УДК 58 ББК 28.57 Т22

Ответственный редактор член-корреспондент РАН *А.И. Гречкин*

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор *Л.Х. Гордон* доктор биологических наук, профессор *Л.П. Хохлова*

ОТ АВТОРА

**Тарчевский И.А.**

Сигнальные системы клеток растений / И.А. Тарчевский; [Отв. ред. А.Н. Гречкин]. - М.: Наука, 2002. - 294 с: ил. ISBN 5-02-006411-4

Рассматриваются звенья информационных цепей взаимодействия патогенов и расте­ний, включающие элиситоры, рецепторы элиситоров, G-белки, протеинкиназы и проте-инфосфатазы, факторы регуляции транскрипции, репрограммирование экспрессии генов и ответ клеток. Главное внимание уделяется анализу особенностей функционирования отдельных сигнальных систем клеток растений - аденилатциклазной, МАР-киназной, фосфатидатной, кальциевой, липоксигеназной, НАДФН-оксидазной, NO-синтазной и про­тонной, их взаимодействию и объединению в единую сигнальную сеть. Предлагается классификация патогениндуцированных белков по их функциональным признакам. При­водятся данные о трансгенных растениях с повышенной устойчивостью к патогенам.

Для специалистов в области физиологии растений, биохимиков, биофизиков, генети­ков, фитопатологов, экологов, агробиологов.

По сети АК

Tarchevsky I.A.

Plant Cell Signaling Systems /1.A. Tarchevsky; [Ed. A.N. Grechkin]. - M.: Nauka, 2002. - 294 p.; il. ISBN 5-02-006411-4

The book discussed the members of signaling chains of interplay of pathogens and plant-host, namely elicitors, receptors, G-proteins, protein kinases and protein phosphatases, transcription factors reprogramming of genes expression, cell response. The main part of the book is devoted to function­ing of separate cell signaling systems: adenylate cyclase, MAP kinase, phosphatidate, calcium, lipoxy-genase, NADPH-oxidase, NO-synthase, protons systems. The concept of interconnections of cell sig­naling systems and their integration to general cell signaling network is developing. The author has preposed the classification of pathogen-related proteins according to their function properties. The data on transgenic plants with the increased resistance to pathogens are presented.

For physiologists, biochemists, biophysicists, genetics, phytopathologists, ecologists, and agrobiologists

ISBN 5-02-006411-4

© Российская академия наук, 2002 © Издательство "Наука"

(художественное оформление), 2002

В последние годы стремительно развиваются исследова­ния молекулярных механизмов регуляции экспрессии генов под влиянием изменения условий существования. В клетках растений было обнаружено существование сигнальных це­пей, которые с помощью специальных белков-рецепторов, в большинстве случаев расположенных в плазмалемме, вос­принимают сигнальные импульсы, преобразуют, усилива­ют и передают их в геном клетки, вызывая репрограммиро­вание экспрессии генов и изменения в обмене веществ (в том числе кардинальные), связанные с включением ранее "молчавших" и выключением некоторых активных генов. Значимость сигнальных систем клеток была продемонстри­рована при изучении механизмов действия фитогормонов. Была также показана определяющая роль сигнальных сис­тем в формировании адаптационного синдрома (стресса), вызванного действием на растения абиотических и биоти­ческих стрессоров.

Отсутствие обзорных работ, в которых анализирова­лись бы все звенья различных сигнальных систем, начиная с характеристики воспринимаемых сигналов и их рецепто­ров, преобразования сигнальных импульсов и передачи их в ядро и кончая драматическими изменениями в обмене ве­ществ клеток и их структуре, заставили автора предпринять попытку восполнить этот пробел с помощью предлагаемой вниманию читателей книги. Необходимо учитывать, что ис­следование информационного поля клеток еще очень дале­ко от завершения и многие детали его структуры и функци­онирования остаются недостаточно освещенными. Все это привлекает новых исследователей, для которых обобще­ние публикаций по сигнальным системам клеток растений будет особенно полезным. К сожалению, не все обзоры

статьи экспериментального характера вошли в список лите­ратуры, что в определенной степени зависело от ограничен­ности объема книги и времени для ее подготовки. Автор приносит извинения коллегам, чьи исследования не были отражены в книге.

Автор выражает благодарость своим сотрудникам, при­нимавшим участие в совместном исследовании сигнальных систем клеток растений. Особую признательность автор выражает профессору Ф.Г. Каримовой, кандидатам биоло­гических наук В.Г. Яковлевой и Е.В. Асафовой, А.Р. Муха-метшину и доценту Т.М. Николаевой за помощь в подготов­ке рукописи к печати.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда Ведущей научной школы РФ (гранты 96-15-97940 и 00-15-97904) и Российского фонда фундаментальных исследова­ний (грант 01-04-48-785).

**ВВЕДЕНИЕ**

Одной из важнейших проблем современной биологии является расшифровка механизмов реагирования прокари-отических и эукариотических организмов на изменения ус­ловий их существования, особенно на действие экстремаль­ных факторов (стресс-факторов, или стрессоров), вызыва­ющих у клеток состояние стресса.

В процессе эволюции у клеток выработались приспособ­ления, позволяющие воспринимать, преобразовывать и уси­ливать приходящие из окружающей среды сигналы химиче­ской и физической природы и с помощью генетического ап­парата реагировать на них, не только адаптируясь к изменив­шимся условиям, перестраивая свои обмен веществ и струк­туру, но и выделяя различные летучие и нелетучие соедине­ния во внеклеточное пространство. Одни из них выполняют роль защитных веществ против патогенов, другие могут рас­сматриваться в качестве сигнальных молекул, вызывающих ответ других клеток, расположенных на большом расстоя­нии от места действия на растения первичного сигнала.

Можно считать, что все эти адаптивные события проис­ходят в результате изменений в информационном поле кле­ток. Первичные сигналы с помощью различных сигналь­ных систем вызывают реакцию со стороны генома клеток, проявляющуюся в репрограммировании экспрессии генов. По сути дела, сигнальные системы регулируют работу основного вместилища информации - молекул ДНК. С дру­гой стороны, они сами находятся под контролем генома.

Впервые в нашей стране целенаправленно исследовать сигнальные системы клеток начали Е.С. Северин [Северин, Кочеткова, 1991] на животных объектах и О.Н. Кулаева [Кулаева и др., 1989; Kulaeva,1990; Kulaeva et al., 1992; Кула­ева, 1995; Бурханова и др., 1999] - на растительных.

В представляемой вниманию читателей монографии содержится обобщение результатов изучения влияния биотических стрессоров на функционирование сигналь­ных систем клеток растений. В настоящее время интенсив­но исследуются МАР-киназная, аденилатциклазная, фос-фатидатная, кальциевая, липоксигеназная, НАДФН-окси-дазная, NO-синтазная и протонная сигнальные системы и их роль в онтогенетическом развитии растений и в форми­ровании ответа на изменяющиеся условия существования, особенно на действие различных абиотических и биотиче­ских стрессоров. Автор решил сосредоточить внимание лишь на последнем аспекте этой проблемы - на молеку­лярных механизмах ответа растений на действие патоге­нов, тем более что в этот ответ вовлечен целый ряд фито-гормонов и выяснение особенностей взаимодействия с ни­ми сигнальных систем клеток растений привлекает боль­шое внимание исследователей.

К патогенам (в широком понимании этого термина) от­носят не только вирусы, бактерии и грибы, но и паразити­рующие на растениях нематоды и насекомые. Биотический стресс вызывают насекомые и травоядные животные из-за появления у растений обширной раневой поверхности, что не только само по себе приводит к стрессу, но и к быстрому инфицированию раны патогенными вирусами, бактериями и грибами.

Воздействие биотических стрессоров приводит к ответу растений, в основных чертах сходному с ответом на абиоти­ческие стрессоры [Neumann et al., 1989; Тарчевский, 1993]. Он характеризуется совокупностью неспецифических реак­ций, что и позволило называть его адаптационным синдро­мом, или стрессом. Естественно, что могут обнаруживаться и специфические черты ответа, зависящие от вида стрессо­ра, однако с усилением меры его воздействия на первый план все в большей степени начинают выступать неспеци­фические изменения [Меерсон, 1986; Тарчевский, 1993]. Наибольшее внимание им было уделено Н.С. Введенским (представления о парабиозе), Д.С. Насоновым и В.Я. Алек­сандровым (представления о паранекрозе), Г. Селье [1972; и др.] - в работах, посвященных стрессу у животных, В.Я. Александровым [1985] - в исследованиях молекуляр­ных основ стресса.

К числу наиболее значительных неспецифических изме­нений при биотическом стрессе можно отнести следующие:

1. Фазность в развертывании во времени ответа на дей­ствие патогена.
2. Усиление катаболизма липидов и биополимеров.
3. Повышение в тканях содержания свободных радика­лов.
4. Подкисление цитозоля с последующей активацией про­тонных помп, что возвращает рН к исходному значению.
5. Повышение в цитозоле содержания ионов кальция с  
   последующей активацией кальциевых АТФаз.
6. Выход из клеток ионов калия и хлора.
7. Падение мембранного потенциала (на плазмалемме).
8. Снижение общей интенсивности синтеза биополиме­ров и липидов.
9. Прекращение синтеза некоторых белков.
10. Усиление синтеза или синтез отсутствовавших так  
    называемых патогениндуцируемых защитных белков (хи-  
    тиназ, (3-1,3-глюканаз, ингибиторов протеиназ и др.).
11. Интенсификация синтеза укрепляющих клеточные  
    стенки компонентов - лигнина, суберина, кутина, каллозы,  
    богатого оксипролином белка.
12. Синтез антипатогенных нелетучих соединений - фитоалексинов.
13. Синтез и выделение летучих бактерицидных и фун-  
    гицидных соединений (гексеналей, ноненалей, терпенов и

Др->-

1. Усиление синтеза и повышение содержания (или по­  
   явление) стрессовых фитогормонов - абсцизовой, жасмо-  
   новой, салициловой кислот, этилена, гормона пептидной  
   природы системина.
2. Торможение фотосинтеза.
3. Перераспределение углерода из |4СО2, усвоенного в  
   процессе фотосинтеза, среди различных соединений -  
   уменьшение включения метки в высокополимерные соеди­нения (белки, крахмал) и сахарозу и усиление (чаще относи­  
   тельное - в процентах от усвоенного углерода) - в аланин,  
   малат, аспартат [Тарчевский, 1964].

17. Усиление дыхания с последующим его торможением.  
Активация альтернативной оксид азы, изменяющей направленность электронного транспорта в митохондриях.

18. Нарушения ультраструктуры - изменение тонкой  
гранулярной структуры ядра, уменьшение числа полисом и  
диктиосом, набухание митохондрий и хлоропластов, умень­  
шение в хлоропластах числа тилакоидов, перестройка цито-  
скелета [Neumann et al., 1989].

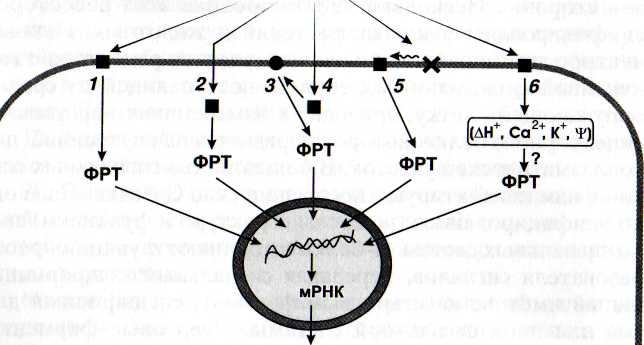
1. Апоптоз (программируемая смерть) клеток, подверг­  
   шихся воздействию патогенов, и соседних с ними.
2. Появление так называемой системной неспецифиче­  
   ской устойчивости к патогенам в удаленных от места  
   воздействия патогенов участках (например, метамерных  
   органах) растения.

Многие из перечисленных выше изменений являются следствием "включения" стрессорами относительно не­большого числа неспецифических сигнальных систем.

По мере все более глубокого изучения механизмов от­ветных реакций растений на действие патогенов обнару­живаются новые неспецифичные ответные реакции кле­ток растений. К ним относятся и неизвестные ранее сиг­нальные пути.

При выяснении особенностей функционирования сиг­нальных систем необходимо иметь в виду, что эти вопросы являются частью более общей проблемы регуляции функ­ционирования генома. Следует заметить, что универсаль­ность структуры основных носителей информации клеток различных организмов - ДНК и генов - предопределяет унификацию и тех механизмов, которые обслуживают реа­лизацию этой информации [Гречкин, Тарчевский, 2000]. Это касается репликации ДНК и транскрипции, структуры и механизма действия рибосом, а также механизмов регуля­ции экспрессии генов изменяющимися условиями существо­вания клеток с помощью набора в значительной степени универсальных сигнальных систем. Звенья сигнальных сис­тем также в основном унифицированы (природа, найдя в свое время оптимальное структурное и функциональное ре­шение биохимической или информационной задачи, сохра­няет и тиражирует его в процессе эволюции). В большин­стве случаев самые разнообразные химические сигналы, поступающие из окружающей среды, улавливаются клет­кой с помощью специальных "антенн" - рецепторных бел­ковых молекул, пронизывающих клеточную мембрану и выступающих над ее поверхностями с наружной и внутрен-

ней стороны. Несколько типов строения этих рецепторов унифицированы у клеток растений и животных. Некова-лентное взаимодействие внешнего участка рецептора с той или иной сигнальной молекулой, поступающей из среды, окружающей клетку, приводит к изменению конформации рецепторного белка, которое передается на внутренний, ци-топлазматический участок. В большинстве сигнальных сис­тем с ним контактируют посреднические G-белки - еще од­но унифицированное (по своим структуре и функциям) зве­но сигнальных систем. G-белки выполняют функции преоб­разователя сигналов, передавая сигнальный конформаци-онный импульс на стартовый фермент, специфичный для той или иной сигнальной системы. Стартовые ферменты одного типа сигнальной системы у различных объектов также универсальны и имеют протяженные участки с одной и той же последовательностью аминокислот. Одним из важ­нейших унифицированных звеньев сигнальных систем явля­ются протеинкиназы (ферменты, переносящие концевой остаток ортофосфорной кислоты с АТФ на те или иные белки), активируемые продуктами стартовых сигнальных реакций или их производными. Фосфорилированные с по­мощью протеинкиназ белки являются следующими звенья­ми сигнальных цепей. Еще одно унифицированное звено сигнальных систем клеток - это белковые факторы регуля­ции транскрипции, которые представляют собой один из субстратов протеинкиназных реакций. Структура этих бел­ков также в значительной степени унифицирована, а моди­фикации структуры определяют принадлежность факторов регуляции транскрипции к той или иной сигнальной систе­ме. Фосфорилирование факторов регуляции транскрипции обусловливает изменение конформации этих белков, их ак­тивацию и последующее взаимодействие с промоторным участком определенного гена, что приводит к изменению интенсивности его экспрессии (индукции или репрессии), а в крайних случаях - к "включению" некоторых молчавших генов или "выключению" активных. Репрограммирование экспрессии совокупности генов генома вызывает изменение соотношения белков в клетке, что и является основой ее функционального ответа. В отдельных случаях химический сигнал из внешней среды может взаимодействовать с рецеп­тором, расположенным внутри клетки - в цитозоле или да-



**СИГНАЛЫ**

**СИБ**

Рис. 1. Схема взаимодействия внешних сигналов с рецепторами клетки

*1,5,6-* рецепторы, расположенные в плазмалемме; *2,4 -* рецепто­ры, находящиеся в цитозоле; *3 -* стартовый фермент сигнальной систе­мы, локализованный в плазмалемме; *5 -* рецептор, активирующийся под влиянием неспецифического изменения структуры липидной состав­ляющей плазмалеммы; СИБ - сигналиндуцированные белки; ФРТ -белковые факторы регуляции транскрипции; i|/ - изменение мембран­ного потенциала

же ядре (рис. 1). В клетках животных такими сигналами яв­ляются, например, стероидные гормоны. Этот информаци­онный путь имеет меньшее число интермедиатов, в связи с чем у него и меньше возможностей для регуляции со сторо­ны клетки.

В нашей стране всегда уделялось большое внимание проблемам фитоиммунитета. Этой проблеме посвящен ряд монографий и обзоров отечественных ученых [Сухоруков, 1952; Вердеревский, 1959; Вавилов, 1964; Горленко, 1968; Рубин и др., 1975; Метлицкий, 1976; Токин, 1980; Метлиц-кий и др., 1984; Метлицкий, Озерецковская, 1985; Курсано-ва, 1988; Ильинская и др., 1991; Озерецковская и др., 1993; Кораблева, Платонова, 1995; Чернов и др., 1996; Тарчев-ский, Чернов, 2000].

В последние годы особое внимание уделяется молеку­лярным механизмам фитоиммунитета. Было показано, что

при инфицировании растений включаются различные сиг­нальные системы, которые воспринимают, умножают и пе­редают сигналы от патогенов в генетический аппарат кле­ток, где происходит экспрессия защитных генов, позволяю­щая растениям организовать как структурную, так и хими­ческую защиту от патогенов. Успехи в этой области связа­ны с клонированием генов, расшифровкой их первичной структуры (в том числе промоторных участков), структуры кодируемых ими белков, использованием активаторов и ин­гибиторов отдельных звеньев сигнальных систем, а также мутантов и трансгенных растений с внедренными генами, отвечающими за синтез участников рецепции, передачи и усиления сигналов. В исследовании сигнальных систем кле­ток растений важную роль играет конструирование транс­генных растений с промоторами генов белков-участников сигнальных систем.

В настоящее время сигнальные системы клеток расте­ний при биотическом стрессе наиболее интенсивно изуча­ются в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, Казанском институте биохимии и биофизики РАН, Институте физио­логии растений РАН, Пущинском филиале Института био­органической химии РАН, центре "Биоинженерия" РАН, Московском и Санкт-Петербургском государственных уни­верситетах, Всероссийском научно-исследовательском ин­ституте сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Всероссийском научно-исследовательском институте фито­патологии РАСХН и др.

Проблема расшифровки молекулярных механизмов био­тического стресса, в том числе роли в его развитии сигналь­ных систем, объединила на протяжении последних десяти с лишним лет физиологов и биохимиков растений, микробио­логов, генетиков, молекулярных биологов, фитопатологов. Публикуется большое количество экспериментальных и об­зорных статей по различным аспектам этой проблемы (в том числе в специальных журналах: "Physiological and Molecular Plant Pathology", "Molecular Plant - Microbe Interactions", "Annual Review of Plant Physiology and Pathology"). В то же время в отечественной литературе отсутствует обобщение работ, посвященных сигнальным системам клеток, что и привело автора к необходимости написания предлагаемой читателям монографии.

**ПАТОГЕНЫ И ЭЛИСИТОРЫ**

Болезни растений вызывают тысячи видов микроорга­низмов, которые можно разделить на три группы [Jackson, Taylor, 1996]: вирусы (более 40 семейств) и вироиды; бакте­рии (Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas, Xanthomonas, Streptomyces) и микоплазмоподобные микро­организмы; грибы (низшие: Plasmodiophoromycetes, Chitridomycetes, Oomycetes: высшие: Ascomycetes, Basidi-omycetes, Deuteromycetes).

К патогенам относят также более 20 родов нематод, ча­ще всего поражающих корни, в меньшей степени — ткани листьев. Фитопатогенные нематоды являются облигатны-ми паразитами, питающимися содержимым цитоплазмы живых клеток растений и в связи с этим вызывающими об­ширные некрозы тканей растений [Williamson, Hussey, 1996]. Структурами, обеспечивающими питание нематод, являются секреторные гланды и стилет, приспособленный для проникновения через клеточную стенку. Секреторная жидкость гланд, содержащая гидролитические ферменты, освобождается через стилет в периплазматическое про­странство клетки. Целостность плазмалеммы на начальных этапах процесса питания нематоды не нарушается. Она из­влекает питательные вещества из цитозоля через неболь­шие поры плазмалеммы, образующиеся в месте ее контак­та с отверстием стилета. Среди продуктов секреции гланд нематод обнаружены белки, углеводы, ферменты целлюла-зы и протеиназы. Образующиеся в результате контакта растения и нематоды элиситоры вызывают в значительной степени неспецифичную ответную защитную реакцию кле­ток хозяина, которая возникает вследствие "включения" сигнальных систем атакуемых клеток [Williamson, Hussey, 1996]. Так, нематоды индуцировали в клетках растений син-

тез защитных ферментов: фенилаланин-аммиак-лиазы [Brueske, 1980] и анионной пероксидазы [Zacheo et al.,

1993].

Одним из важных компонентов экологических систем являются растительноядные насекомые (взрослые и личи­ночные формы), которые относятся в основном к подклассу высших, или крылатых (Pterygota) [Шванвич, 1949]. Бес­крылые формы, относящиеся к этому подклассу, появились в результате утраты этих органов в процессе эволюции крылатых форм. Подкласс насчитывает 20 отрядов насеко­мых, среди которых имеются полифаги, не обладающие специфичностью по отношению к растению, олигофаги и монофаги, у которых ярко выражена специфичность взаи­модействия патогена и растения-хозяина. Одни насекомые питаются листьями (всей листовой пластинкой или скелети-руя лист), другие - стеблями (в том числе выгрызая стебель изнутри), завязями цветов, плодами, корнями. Тли и цикады высасывают сок из проводящих сосудов с помощью хобот­ка или стилета.

Несмотря на принимаемые меры борьбы с насекомы­ми, продолжает оставаться злободневной проблема уменьшения причиняемого ими вреда. В настоящее время свыше 12% урожая сельскохозяйственных растений на планете теряется в результате атаки на них патогенных микроорганизмов, нематод и насекомых [Rommens, Kishore, 2000].

Повреждение клеток приводит к деградации их содер­жимого, например высокополимерных соединений, и появ­лению олигомерных сигнальных молекул. Эти "обломки кораблекрушения" [Тарчевский, 1993] достигают соседних клеток и вызывают в них защитную реакцию, включаю­щую изменение экспрессии генов и образования кодируе­мых ими защитных белков. Часто механическое поврежде­ние растений сопровождается их инфицированием, так как открывается раневая поверхность, через которую в расте­ние проникают патогены. Кроме того, в ротовых органах насекомых могут обитать фитопатогенные микроорганиз­мы. Известно, например, что переносчиками микоплазмен-ной инфекции являются цикады, у которых взрослые фор­мы и личинки питаются соком ситовидных сосудов расте­ний, прокалывая хоботком-стилетом покровы листьев и

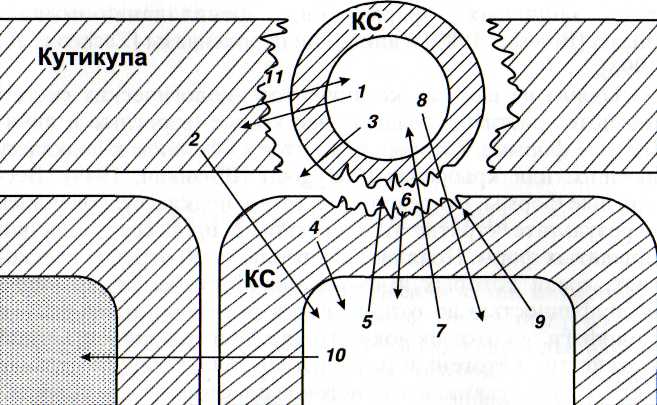


Рис. 2. Схема взаимодействия клетки патогена с растением-хозя­ином

/ - кутиназа; 2 - продукты деградации компонентов кутикулы (воз­можно, обладающие сигнальными свойствами); *3* - (3-глюканаза и другие гликозилазы, экскретируемые патогеном; *4* - элиситоры - фрагменты клеточной стенки (КС) хозяина; *5 -* хитиназы и другие гликозилазы, дей­ствующие разрушающе на КС патогена; *6* - элиситоры - фрагменты КС патогена; 7 - фитоалексины - ингибиторы протеиназ, кутиназ, гликози-лаз и других ферментов патогена; *8* - токсические вещества патогена; 9 - укрепление КС хозяина за счет активации пероксидаз и усиления син­теза лигнина, отложения оксипролиновых белков и лектинов; *10* - индук­торы сверхчувствительности и некроза соседних клеток; // - продукты деградации кутина, действующие на клетку патогена

молодых стеблей. Розанная цикадка, в отличие от других представителей цикадовых, высасывает содержимое кле­ток. Цикады производят меньшее повреждение тканей рас­тений, чем листогрызущие насекомые, тем не менее расте­ния могут на него реагировать так же, как на сопряженное с ним инфицирование растений.

При контакте с растениями клетки патогенов выделяют различные соединения, обеспечивающие их проникновение в растение, питание и развитие (рис. 2). Некоторые из этих соединений являются токсинами, которые патогенные мик­роорганизмы выделяют для ослабления сопротивляемости хозяина. В настоящее время описано более 20 хозяин-специ­фичных токсинов, продуцируемых патогенными грибами.

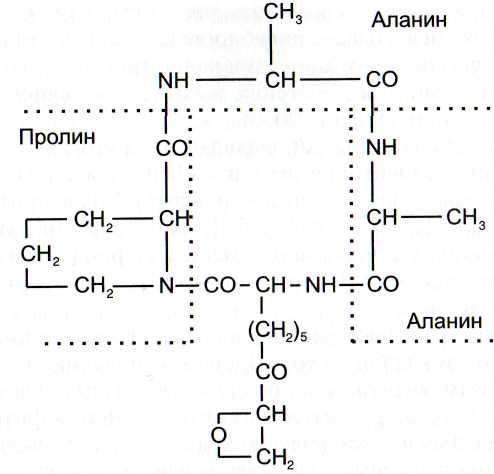


Рис. 3. Фитотоксичное соединение из Cochlio-bolus carbonum [Walton, 1996]

Бактерии и грибы образуют также неселективные токси­ны, в частности фузикокцин, эрихосетен, коронатин, фазе-олотоксин, сирингомицин, табтоксин [Walton, 1996].

Один из хозяин-специфичных токсинов, выделяемых Pyrenophora triticirepentis, - это белок 13,2 кДа, другие явля­ются продуктами вторичного метаболизма, имеющими са­мую разнообразную структуру - это поликетиды, терпено-иды, сахариды, циклические пептиды и т.д.

Как правило, к последним относятся пептиды, синтез которых происходит вне рибосом и которые содержат ос­татки D-аминокислот. Например, хозяин-специфичный то­ксин из Cochliobolus carbonum имеет тетрапептидную цикли­ческую структуру *(D-npo-L-ana-D-ana-L-A3JJ),* где послед­няя аббревиатура означает 2-амино-9,10-эпокси-8-оксо-де-каноевую кислоту [Walton, 1996; 2000] (рис. 3). Токсин обра­зуется в клетках патогена с помощью токсинсинтазы. Ус­тойчивость к этому соединению у кукурузы зависит от гена, кодирующего НАДФН-зависимую карбонил-редуктазу, восстанавливающую карбонильную группу, что приводит к

деактивации токсина. Оказалось, что в организме растения-хозяина токсин вызывает ингибирование гистон-деацетилаз и, как следствие, сверхацетилирование гистонов. Это пода­вляет защитный ответ растения, вызываемый инфицирова­нием патогенами [Walton, 2000].

Другой тип соединений, выделяемых патогенами, полу­чил название элиситоров (от англ. elicit - выявлять, вызы­вать). Собирательный термин "элиситор" был предложен впервые в 1972 г. [Keen et al., 1972] для обозначения химиче­ских сигналов, возникающих в местах инфицирования рас­тений патогенными микроорганизмами, и получил широкое распространение.

Элиситоры играют роль первичных сигналов и приводят в действие сложнейшую сеть процессов индукции и регуля­ции фитоиммунитета. Это проявляется в синтезе защитных белков, нелетучих растительных антибиотиков - фитоалек-синов, в выделении антипатогенных летучих соединений и др. В настоящее время охарактеризована структура множе­ства природных элиситоров. Некоторые из них продуциру­ются микроорганизмами, другие (вторичные элиситоры) образуются при ферментативном расщеплении высокопо­лимерных соединений кутикулы и полисахаридов клеточ­ных стенок растений и микроорганизмов, третьи представ­ляют собой стрессовые фитогормоны, синтез которых в растениях индуцируется патогенами и абиогенными стрес­сорами. К числу важнейших элиситоров относятся белко­вые соединения, экскретируемые патогенными бактериями и грибами, а также белки оболочки вирусов [Toedt et al., 1999]. Наиболее изученными белковыми элиситорами мож­но считать небольшие (10 кДа), консервативные, гидро­фильные, обогащенные цистеином элиситины, секретируе-мые всеми исследовавшимися видами Phytophthora и Pythium [Kamoun et al., 1993; Pernollet et al., 1993; Pallaghy et al., 1994; Huet et al., 1995; Lloyd, 1995; Panabieres et al., 1995; Kamoun et al., 1998; Zhang et al., 1998]. К ним относится, на­пример, криптогеин [Keller et al.,1999; Lebrun-Garcia et al., 1999; Foissner et al., 2000].

Элиситины вызывают сверхчувствительность и отмира­ние инфицированных клеток, особенно у растений рода Nicotiana [Kamoun et al., 1997]. Наиболее интенсивное обра­зование фитофторой элиситинов происходит при росте ми-

целия гриба и на последних стадиях инфекции, когда на­блюдаются обильная споруляция гриба и некрозы в листь­ях. Интересно, что у паразитирующего на томатах гриба Cladosporium fulvum пептидный элиситор не образовывался в оптимальных условиях in vitro, но интенсивно синтезиро­вался внутри листа растения [Van den Ackerveken et al., 1994].

Обнаружено, что элиситины способны переносить сте-ролы через мембраны, так как имеют стеролсвязывающий сайт [Mikes et al., 1998]. Многие патогенные грибы сами не могут синтезировать стеролы, что делает понятной роль эли­ситинов не только в питании микроорганизмов, но и в индуци­ровании защитной реакции растений. Из фитофторы был вы­делен гликопротеидный элиситор 42 кДа [Jabs et al., 1997; Hirt, Scheel, 2000]. Его активность и связывание с белковым рецептором плазмалеммы, мономерная форма которого представляет собой белок 100 кДа [Nennstiel et al., 1998], обеспечивалась олигопептидным фрагментом из 13 амино­кислотных остатков. Расоспецифичный элиситорный пеп­тид, состоящий из 28 остатков аминокислот с тремя дисуль-фидными группами, удалось получить из фитопатогенного гриба Cladosporium fulvum [De Wit, 1997; Van den Hooven et al., 1999], причем образовывался пептид из предшественни­ка, содержавшего 63 аминокислоты. Этот фактор авиру-лентности обнаруживал структурную гомологию с рядом небольших пептидов, таких как ингибиторы карбоксипеп-тидазы и блокаторы ионных каналов [Pallaghy et al., 1994], и связывался рецепторным белком плазмалеммы, по-види­мому, вызывая его модуляцию, димеризацию и передачу сигнального импульса в сигнальные системы [De Wit, 1997]. Из более крупного пре-протеина Cladosporium fulvum, со­стоящего из 135 аминокислот, в ходе посттрансляционного процессинга образуется элиситорный белок, насчитываю­щий 106 аминокислот. Элиситорные белки, продуцируемые ржавчинным грибом Uromyces vignae, представляют собой два небольших полипептида 5,6 и 5,8 кДа, по свойствам не­похожие на другие элиситины [De Silva, Heath, 1997]. Среди бактериальных белковых элиситоров наиболее изучены харпины [Hahn, 1996; Desikan et al., 1998; Pontier et al., 1998; Xie, Chen, 2000]. Многие фитопатогенные бактерии проду­цируют элиситорные олигопептиды (созданы их синтетиче-

ские аналоги), соответствующие наиболее консервативным участкам белка - флагеллина [Felix et al., 1999; Gomez-Gomez et al., 1999], являющегося важным фактором виру­лентности этих бактерий. Из Erwinia amylovora выделен но­вый элиситорный белок, С-область которого гомологична ферменту пектатлиазе, способной вызывать появление эли-ситорных олигомерных фрагментов - продуктов деграда­ции пектина [Gaudriault et al., 1998]. Патогенная бактерия Erwinia carotovora экскретирует элиситорный белок харпин и ферменты пектатлиазу, целлюлазу, полигалактуроназу и протеазы, гидролизующие полимерные компоненты кле­точных стенок растения-хозяина (см. рис. 2), в результате чего образуются олигомерные элиситорные молекулы [Y. Liu et al., 1998]. Интересно, что пектатлиаза, выделяемая Erwinia chrysanthemi [Shevchik et al., 1998], приобретала ак­тивность в результате внеклеточного процессинга.

Некоторые липиды и их производные также относятся к элиситорам, в частности 20-углеродные полиненасыщен­ные жирные кислоты некоторых патогенов - арахидоно-вая и эйкозапентаеновая [Ильинская и др., 1991; Озерец-ковская и др., 1993; Озерецковская, 1994; Гилязетдинов и др., 1995; Ильинская и др., 1996а, б; Ильинская, Озерец-ковская, 1998], и их оксигенированные производные. В об­зорной работе [Ильинская и др., 1991] обобщаются данные об элиситорном действии на растения липидов (липопро-теинов), продуцируемых патогенными грибами. Оказа­лось, что элиситорным эффектом обладает не белковая часть липопротеинов, а их липидная часть, представляющая собой не свойственные для высших растений арахидоно-вую (эйкозатетраеновую) и эйкозопентаеновую кислоты. Они вызывали образование фитоалексинов, некротиза-цию тканей и системную устойчивость растений к различ­ным патогенам. Продукты липоксигеназного превраще­ния в тканях растений С20 жирных кислот (гидроперокси-, гидрокси-, оксо-, циклические производные, лейкотрие-ны), образующиеся в клетках растения-хозяина с помо­щью ферментного липоксигеназного комплекса (субстра­тами которого могут быть как С,8, так и С20 полиеновые жирные кислоты), оказывали сильнейшее влияние на защитную реакцию растений. Это объясняется, по-види­мому, тем, что в неинфицированных растениях нет оксиге-

нированных производных 20-углеродных жирных кислот, и их появление в результате инфицирования приводит к драматическим результатам, например к образованию некрозов вокруг инфицированных клеток, что создает барьер для распространения патогенов по растению.

Имеются данные, что индуцирование патогеном липо-ксигеназной активности приводило к формированию ответ­ной реакции растения и в том случае, когда элиситор не со­держал С20 жирных кислот и субстратом липоксигеназной активности могли быть только собственные С18 полиено­вые жирные кислоты, а продуктами - октадеканоиды, а не эйкозаноиды. Элиситорными свойствами обладают также сиринголиды [Л et al., 1998] и цереброзиды - сфинголипид-ные соединения [Koga et al., 1998]. Цереброзиды А и С, изо­лированные из Magnaporthe grisea, были наиболее активны­ми элиситорами для растений риса. Продукты деградации цереброзидов (метиловые эфиры жирных кислот, сфинго-идные основания, гликозил-сфингоидные основания) не об­наруживали элиситорной активности.

Некоторые элиситоры образуются в результате дейст­вия на ткани растений гидролаз, выделяемых патогенами. Назначение гидролаз двоякое. С одной стороны, они обес­печивают питание патогенов, необходимое для их развития и размножения, с другой - разрыхляют механические барь­еры, стоящие на пути проникновения патогенов в места их обитания в растениях.

Одним из таких барьеров является кутикула, состоящая главным образом из гетерополимера кутина, погруженного в воск. Обнаружено более 20 мономеров, из которых состоит кутин [Kolattukudy, Soliday, 1985; Airansinen, Paaso, 1990]. Это различной длины насыщенные и ненасыщенные жирные ки­слоты и спирты, в том числе гидроксилированные и эпокси-дированные, дикарбоксиловые длинноцепочечные кислоты и т.д. В кутине большинство первичных спиртовых групп участвует в образовании эфирных связей, так же как часть вторичных спиртовых групп, обеспечивающих сшивки меж­ду цепями и точки ветвления в полимере. Часть другого "барьерного" полимера - суберина, по составу близка к кутину. Главное его отличие в том, что свободные жирные кисло­ты являются основным компонентом субериновых восков, в то время как в кутине их очень мало. Кроме того, в суберине

присутствуют главным образом С22 и С24 жирные спирты, в то время как в кутине - С26 и С28 [Kolattukudy, 1987]. Для пре­одоления поверхностного механического барьера растений многие патогенные грибы выделяют ферменты, гидролизу-ющие кутин и часть составляющих суберина. Продуктами кутиназной реакции были различные оксигенированные жирные кислоты и спирты [Kolattukudy, 1985], в основном 10,16-дигидрокси-Ск,- и 9,10,18-тригидрокси-С|8-кислоты, представляющие собой сигнальные молекулы, индуцирую­щие в прорастающей споре гриба образование и выделение дополнительных количеств кутиназы, "разъедающих" кутин и облегчающих проникновение гриба внутрь растения. Было обнаружено, что лаг-период появления у гриба кутиназной мРНК после начала образования упомянутых выше ди- и триоксикислот составляет всего 15 мин, а выделения допол­нительной кутиназы - в два раза больший. Повреждение ге­на кутиназы у Fusarium solani сильно снижало степень виру­лентности этого гриба [Kolattukudy et al., 1995]. Ингибирование кутиназы с помощью химических препаратов или анти­тел предотвращало инфицирование растений. Предположе­ние о том, что оксигенированные продукты деградации кути-на могут выступать в роли не только индукторов образова­ния кутиназы у патогенов, но и элиситоров защитных реак­ций у растения-хозяина [Тарчевский, 1993], впоследствии подтвердилось [Fauth et al., 1998].

После проникновения патогенных микроорганизмов че­рез кутикулу одни из них перемещаются в проводящие пуч­ки растений и используют для своего развития имеющиеся там питательные вещества, а другие транспортируются внутрь живых клеток хозяина. В любом случае патогены встречаются с еще одним механическим барьером - клеточ­ными стенками, состоящими из различных полисахаридов и белков и в большинстве случаев укрепленными жестким полимером - лигнином [Тарчевский, Марченко, 1987; Tarchevsky, Marchenko, 1991]. Как уже упоминалось выше, для преодоления этого барьера и обеспечения своего разви­тия углеводным и азотным питанием патогены выделяют ферменты, гидролизующие полисахариды и белки клеточ­ных стенок.

Специальные исследования показали, что при взаимо­действии бактерий и тканей растения-хозяина ферменты

деградации появляются не одновременно. Например, пек-тилметилэстераза присутствовала и в неинокулированных бактерией Erwinia carotovora subsp. atroseptia тканях клубней картофеля [Pagel, Heitefuss, 1990], тогда как полигалактуро-назная, пектатлиазная, целлюлазная, протеазная и ксила-назная активности появлялись соответственно через 10, 14, 16, 19 и 22 ч после инокуляции.

Оказалось, что олигосахаридные продукты деградации полисахаридов клеточных стенок растений обладают эли-ситорными свойствами. Но активные олигосахариды мо­гут образовываться и полисахаридами, входящими в со­став клеточных стенок патогенов. Известно, что одним из способов защиты растений от патогенных микроорганиз­мов является образование после инфицирования и выделе­ние за пределы плазмалеммы ферментов - хитиназы и β-1,3-глюканазы, гидролизующих полисахариды хитин и β-1,3-полиглюканы клеточных стенок патогенов, что приво­дит к подавлению их роста и развития. Обнаружено, что олигосахаридные продукты такого гидролиза являются и активными элиситорами защитных реакций растений. В результате действия олигосахаридов повышается устой­чивость растений к бактериальной, грибной или вирусной инфекции [Ryan, 1987; Albersheim et al.,1992; Doares et al., 1995b; Bohland et al., 1997].

Олигосахаридным элиситорам, их строению, активно­сти, рецепторам, "включению" ими сигнальных систем кле­ток, индукции экспрессии защитных генов, синтезу фитоалексинов, реакции сверхчувствительности и другим отве­там растений посвящен целый ряд обзорных статей [Ryan, 1987; Albersheim et al., 1992; Ebel, 1998; и др.].

В лаборатории Элберсгейма [Albersheim, 1969; Элберс-гейм, Дарвилл, 1985; и др.], а затем в ряде других лаборато­рий показано, что олигогликозиды, образующиеся в ре­зультате патогениндуцированной эндогликозидазной дегра­дации гемицеллюлоз и пектиновых веществ растений, хити­на и хитозана грибов, могут играть роль биологически ак­тивных веществ. Было даже предложено считать их новым классом гормонов ("олигосахаринов", в отличие от олигоса­харидов, не обладающих активностью). Образование оли­госахаридов в результате гидролиза полисахаридов, а не в ходе синтеза из моносахаридов было показано на примере

ксилоглюканового олигосахарида, обладающего антиауксиновым действием [McDougall, Fry, 1991].

Была расшифрована структура ряда физиологически активных олигосахаридов: разветвленного гептаглюкозида, полученного из клеточных стенок патогенного гриба [Эл-берсгейм, Дарвилл, 1985]; пента- и гексамеров N-ацетил-глюкозамина, полученных при гидролизе хитина, а также глюкозамина, образованного при гидролизе хитозана; 9-13-мерных линейных олигогалактуронидов, образующихся при гидролизе пектиновых веществ; декагалактуронида с 4—5 ненасыщенным концевым галактуронозильным остат­ком; олигогалактуронозидов со степенью полимеризации 2-6, проявляющих определенную активность [Ryan, 1987]. Опубликованы данные о полученных из гемицеллюлоз фи­зиологически активных ксилоглюканах со степенью поли­меризации 8-9 [McDougall, Fry, 1990; 1991], хитобиозе, хито-триозе и хитотетрозе [Roberts, Selitrennikoff, 1988], разветв­ленных ксилоглюкановых фрагментах с формулой Глю(4)-Кси(3)-Гал(1 или 2)-Фук [McDougall, Fry, 1989; Kiefer et al., 1989] и их природных О-ацетилированных производных [Kiefer et al., 1989]. Было установлено, что наивысшей фи-тоалексининдуцирующей активностью обладает разветв­ленный р-глюкозид. Химическая модификация этого оли-госахарина или изменение характера ветвления приводили к уменьшению элиситорных свойств.

Изучение механизма действия олигосахаридов на расте­ния позволило установить, что спектр ответных реакций за­висит от концентрации и структуры исследуемых веществ. Различные олигосахаридные элиситоры проявляют наивы­сшую активность при разных концентрациях. Например, индукция синтеза защитных соединений (хитиназ) в культу­ре клеток риса была максимальной при концентрации N-ацетилхитогексаозы 1 мкг/мл, в то время как для дости­жения того же эффекта в случае ламинарингексаозы (фрагмента (3-1,3-глюкана) потребовалась в 10 раз большая концентрация [Inui et al., 1997].

Обнаружено, что степень устойчивости растений к пато­гену определяется (наряду с другими факторами) соотноше­нием различных полисахаридов клеточных стенок расте­ний. Об этом можно судить на основании сравнения устой­чивой и восприимчивой к патогену Colletotrichum linde-

muthianum линий бобов, которые подверглись действию эн-дополигалактуроназы патогена [Boudart et al., 1998]. Были выделены олигомерные фрагменты пектина; оказалось, что в них у устойчивого сорта преобладают остатки нейт­ральных Сахаров, а у неустойчивого - галактуронатные.

Недавно получены результаты, свидетельствующие, что олигогалактуронатные фрагменты образуются в расте­ниях не только под влиянием пектиндеградирующих ферментов патогенов, но и в результате экспрессии генов полигалактуроназ в клетках хозяина в ответ на системин и олигосахаридные элиситоры [Bergey et al., 1999].

Привлекает внимание разнонаправленность регуляции защитного ответа клеток продуктами деградации полисаха­ридов клеточных стенок [Boudart et al., 1995]. Оказалось, что небольшие олигогалактурониды со степенью полиме­ризации 2-3 являются активными элиситорами, а фрагмен­ты рамногалактуроновых пектинов с большой степенью полимеризации - супрессорами образования гидроксипро-линовых белков клеточных стенок. Иначе говоря, деграда-ционные процессы в клеточных стенках, вызванные пато­генами, могут регулировать (в результате осуществления сложной последовательности реакций сигнальных систем клеток) биосинтетические процессы, повышающие устой­чивость клеточных стенок за счет накопления гидроксипро-линовых белков и образования между ними ковалентных связей.

Фукозосодержащие фрагменты ксилоглюкана (три- и пентасахариды) обладали иммуносупрессорными свойства­ми, но при замене ксилозы на другой моносахарид изменяли супрессорную активность на элиситорную [Ильинская и др., 1997]. Лишение олигосахарида фукозы лишало его как супрессорных, так и элиситорных свойств. Низкие активные дозы и высокая селективность специфических супрессоров свидетельствуют о рецепторном характере их действия [Озерецковская, 2001].

Имеются и другие примеры продукции патогенами не только элиситоров, но и супрессоров защитных реакций растений. Так, пикносгюры Mycosphaerella pinodes выделяли оба типа таких соединений [Yamada et al., 1994].

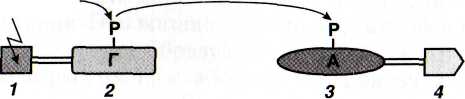
Необходимо отметить, что олигосахаридные фрагмен­ты полисахаридов клеточных стенок растений и грибов от-

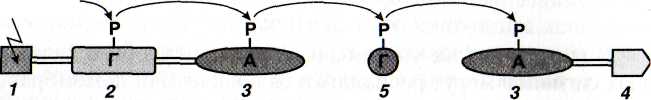
носят к расонеспецифичным элиситорам, вызывающим не­специфичные защитные ответы со стороны инфицируемых растений. Это вполне объяснимо, так как в ходе деградации полисахаридов образуется широкий спектр олигосахаридов, у которых очень слабо выражена видовая специфика пато­гена или хозяина. В то же время расо-специфичными явля­ются белковые (или пептидные) факторы вирулентности бактерий, которые узнаются "своими" рецепторами клеток растений [Blumwald et al., 1998]. Последний тип взаимодей­ствия получил название генетического пинг-понга, или вза­имодействия "ген-на-ген", поскольку специфика элиситора или рецептора определяется кодирующими их генами, а ус­тойчивость или восприимчивость растений к патогену - способностью рецептора узнавать элиситор.

Для исследования механизмов ответа клеток растений на действие элиситоров часто используют не индивидуаль­ные олигосахариды, а смесь олигосахаридов, образующую­ся при гидролизе полисахаридов клеточных стенок патоген­ных грибов [Ayres et al., 1976; Shirasugi, Misaki, 1992; и др.]. Такой подход оправдан, если учесть, что даже в первые мо­менты инфицирования патогенами на клетки растений мо­жет действовать не один, а несколько элиситоров. Кстати, имеется сравнительно мало работ, посвященных исследова­нию особенностей действия нескольких элиситоров одно­временно. Например, показано, что элиситины параситице-ин и криптогеин, так же как олигосахаридные элиситоры из клеточных стенок, вызывают быструю активацию проте-инкиназы 48 кДа SIP-типа и фенилаланинаммоний-лиазы у табака. В то же время именно элиситины, а не олигосахари­ды активировали протеинкиназу 40 кДа [Zhang et al., 1998]. Глюкан и Са2+ усиливали влияние арахидоната и эйкозапен-таеноата. Тот факт, что ЭГТА (специфический лиганд Са2+) ингибировал синтез фитоалексинов, дает возможность ут­верждать, что ионы кальция играют важную роль в регуля­ции осуществления защитной функции растений. Не исклю­чено, что сигнальными веществами являются и продукты деградации белков клеточных стенок, богатых оксипроли-новыми остатками и содержащих олигогликозильные от­ветвления.

РЕЦЕПТОРЫ ЭЛИСИТОРОВ

Во введении уже упоминалось, что рецепторы элиситорных сигналов могут располагаться и в клеточной мембране, и в цитозоле, и в ядре, но нас особенно интересует первый, наиболее распространенный случай, когда элиситор сам не проникает в клетку, а взаимодействует с внеклеточной ча­стью белкового рецептора плазмалеммы, что и является первым звеном сложной цепи сигнальных событий, завер­шающихся ответом клетки на изменившиеся условия суще­ствования. Количество молекулярных антенн одного вида рецепторов плазмалеммы клетки, по-видимому, может дос­тигать нескольких тысяч. Число видов молекулярных ан­тенн остается неизвестным, но можно утверждать, что у них унифицированы основные свойства структуры. Они имеют три основных домена: внешний вариабельный N-концевой домен (акцепторный по отношению к элисито­рам), трансмембранный с повышенным содержанием гид­рофобной аминокислоты лейцина и цитоплазматический вариабельный С-концевой домен, от структуры которого чависит передача сигнального импульса в ту или иную сиг­нальную систему. Рецептор может быть специфичным только для одного вида элиситора или для группы родствен­ных (например, олигомерных) элиситоров. Описано не­сколько типов рецепторных белков клеточных мембран у животных [Schenk, Snaar-Jagalska, 1999]: у одних рецепторов трансмембранная цепь белка лишь один раз пересекает мембрану, у других (серпентиновых) - семь раз, у третьих изаимодействие с лигандом-элиситором приводит к образо­ванию гомо- или гетеродимера (олигомера), который и яв­ляется первичным преобразователем внешнего сигнала. Структура рецепторных белков плазмалеммы растений изучена в меньшей степени, но принципы их построения те





АТФ

АТФ

Рис. 4. Схема структуры двухкомпонентного рецептора сигналь­ных систем [Lohrmann, Harter, 2002]

*а -* простой рецептор; *б —* многозвенный рецептор. 1 - "входной" до­мен; 2 - автокиназный гистидиновый домен; *3 -* воспринимающий домен регулятора ответа; *4 -* "выходной" домен регулятора ответа; 5 - гисти-динсодержащий фосфатпереносящий домен; А - остаток аспарагиновой кислоты; Г - остаток гистидина; Р - остаток ортофосфата, переноси­мый в ходе киназных реакций. Внешний сигнал обозначен в виде симво­ла молнии

же, что и у животных клеток. Привлекает особое внимание двухкомпонентная рецепторная структура, обладающая свойствами протеинкиназы (рис. 4). Сначала она была об­наружена у прокариотических организмов, а затем в изме­ненном виде - и у эукариотических организмов, в том числе у растений, например у арабидопсиса [Loomis et al., 1997]. Если в первом случае два компонента - собственно рецепторный и исполнительный - представляют собой самостоя­тельные, хотя и взаимодействующие, белковые молекулы, то во втором - это два домена одного и того же белка.

Подтверждением роли взаимодействия элиситор-рецептор в передаче и преобразовании сигналов от патогенов в геном было установление положительной корреляции меж­ду способностью элиситоров нековалентно соединяться с рецепторами и вызывать защитную реакцию клеток, на­пример накопление фитоалексинов [De Wit et al., 1997]. Свя­зывание с внешним участком белковых рецепторов плазмалеммы [Hang et al., 1994; Проценко, 1995; Mithofer et al.,

1996; Nennstiel et al., 1998] было характерным для олигоса-харидных элиситоров клеточных стенок растений [Cosio et al., 1990; Klusener, Weiler, 1999], олигохитиновых фрагмен­тов клеточных стенок грибов [Baureithel et al., 1994; Y. Ito et al., 1997], элиситорных белков [Nurnberger et al., 1994; Wendehenne et al., 1995; De Wit et al., 1997; Kamoun et al., 1998; Lauge, De Wit, 1998; Warren et al., 1998; Lebrun-Garcia et al., 1999] и пептидов [Kooman-Gersmann et al., 1998; Nennstiel et al., 1998], сиринголидов [Ji et al., 1998], стрессовых фито-гормонов системина [Schaller, Oecking, 1999], этилена [Savaldi-Goldstein, Fluhr, 2000; и др.], абсцизовой кислоты [Anderson et al., 1994; MacRobbie et al., 1997; Адамовская и др., 2000; Munnik, 2001], метилжасмоната [Lobler, Lee, 1998], брассиностероидов [Braun, Walker, 1996; Li, Chory, 1997]. В последнем случае имеется принципиальное отличие от клеток животных, у которых рецепторы стероидных гор­монов находятся в ядре.

Выделен целый ряд мембранных белковых рецепторов элиситоров. Для этого после связывания рецепторами ме­ченых элиситоров мембраны выделяются из клеток, разру­шаются и белок с удерживаемым элиситором идентифици­руется по его радиоактивности. Обнаружено, например, что рецептором системина является белок 160 к Да [Meindl et al., 1998], бактериального элиситора флагеллина - мембран­ный белок 115 кДа [Meindl et al., 2000], гликопротеина из клеточной стенки фитофторы, имеющего сигнальный оли-гопептидный фрагмент из 13 остатков аминокислот -91 кДа [Nurnberger et al., 1997] или 100 кДа [Nennstiel et al., 1998].

Концепция молекулярного взаимодействия "ген-на-ген" [Flor, 1971] патогенов и растений часто предполагает непрямое (опосредованное сигнальными системами) узна­вание гена авирулентности патогена (avr gene) соответст­вующим ему геном устойчивости (R gene) растительной клетки.

Молекулярной основой "ген-на-ген" взаимодействия па­тогена и растения явилась модель элиситор-рецептор [Gabriel, Rolfe, 1990]. Рецепторные белки были выделены и очищены [Mithofer et al., 1996], а гены, кодирующие эти бел­ки, клонированы [Umemoto et al., 1997]. Имеется ряд обзор­ных работ, посвященных структуре рецепторных белков

[Bent, 1996; Backer et al., 1997; Hammond-Kosack, Jones, 1997]. Оказалось, что многие из них имеют сходные кон­сервативные обогащенные лейцином повторы (от 12 до 21), необходимые для белок-белкового взаимодействия. Эти повторы обеспечивают связывание рецепторного R-белка с элиситорами [Bent, 1996]. Исследования мутан­тов с нарушенной устойчивостью к патогенным бактери­ям, вызванной замещением глутамата на лизин в одном из лейциновых повторов, подтверждают, что межбелковое взаимодействие является важным звеном преобразования и передачи элиситорных сигналов в геном клетки [Warren etal., 1998].

В настоящее время принято несколько моделей структу­ры рецепторов и способов передачи элиситорного сигнала снаружи внутрь клетки растения. У арабидопсиса обнару­жено семейство из 35 серпентиновых рецепторов [Devoto et al., 1999]. Рецептор воспринимает сигнальную молекулу N-терминальным участком на внешней стороне мембраны, а передает сигнальный импульс в цитоплазму внутренним С-участком. Связывание сигнальной молекулы приводит к изменению конформации всей молекулы рецептора, что обусловливает активацию ассоциированных с ним в цито­плазме белковых молекул, осуществляющих преобразова­ние сигнала.

Одним из принципиально важных механизмов, исполь­зуемых в сигнальных системах клеток, является димериза-ция (олигомеризация) некоторых белковых интермедиатов этих систем [Heldin, 1995]. В качестве примеров мож­но привести димеризацию рецепторов после связывания с ними лигандов, димеризацию некоторых интермедиатов сигнальных систем, димеризацию факторов регуляции транскрипции. Наблюдается как гомо-, так и гетеродимеризация (олигомеризация). У животных механизм димеризации тирозин-киназных рецепторов клеточной мембраны характерен, например, для трансдукции полипептидных гормонов (ростовой фактор плаценты и др). Серин/трео-нин-киназные рецепторы функционируют подобным же образом. Мало известно о том, какие формы рецепторов -мономерные, гомодимерные или гетеродимерные - прини­мают участие в преобразовании элиситорных сигналов в клетках растений. Предложена схема гетеродимерного ре-

цептора [Trotochaud et al., 1999], который активируется ли-гандом, что приводит к фосфорилированию цитозольного киназного домена и активации ассоциированных с ним белков, часть из которых передает сигнальный импульс следующим интермедиатам сигнальных систем. Одним из ассоциированных белков является протеинфосфатаза, инактивирующая киназный домен.

У животных клеток тирозин-киназный рецептор состо­ит из трех доменов - экстраклеточного, трансмембранно­го и обращенного в цитозоль. Специфика структуры пер­вого и третьего доменов (заключающаяся, например, в том, что они не способны фосфорилироваться) определя­ет, с одной стороны, с каким гормоном взаимодействует рецептор и, с другой, какие сигнальные системы "включа­ет" этот гормон. Взаимодействие внешнего домена с сиг­нальным лигандом приводит к автофосфорилированию тирозинового остатка этого домена, что повышает его ки-назную активность. Обычно протеинкиназы содержат не­сколько мест фосфорилирования. Это относится и к ре-цепторным протеинкиназам. Цитоплазматический домен мономерной формы рецептора фактора роста у животных клеток содержит, по крайней мере, девять автофосфори-лируемых тирозиновых остатков [Heldin, 1995]. Один из них - Тир 857 - важен для проявления киназной активности, а восемь других определяют специфику связи с молекула­ми, преобразующими сигнал. Есть основания полагать, что те же принципы функционирования рецепторов ис­пользуются и в клетках растений, однако в них найдены главным образом серин-треониновые рецепторные проте­инкиназы, участвующие в патогениндуцированных защит­ных реакциях растений.

В настоящее время 18 рецепторподобных серин-треони-новых протеинкиназ арабидопсиса подразделяют [Hardie, 1999] в зависимости от структуры их экстраклеточного до­мена на четыре группы:

1. Протеинкиназы с доменами, обогащенными лейцино-выми повторами, обычно характерными для фрагментов, участвующих в белок-белковых взаимодействиях. У живот­ных такие рецепторы связывают полипептидные (или пеп­тидные) сигнальные молекулы. Предполагают, что к этой группе относятся рецепторы брассинолидов с обогащенны-

ми лейцином повторами в N-концевой надмембранной об­ласти [Li, Chory, 1997; Cosgrove et al., 2000]. У томата был выделен ген аналогичного белка, но без цитозольного ки-назного домена [Jones et al., 1994].

2. Протеинкиназы с S-доменами, в которых имеется  
много остатков цистеина.

1. Протеинкиназы с доменами, обогащенными лейцино-  
   выми повторами, но, в отличие от первой группы, связан­  
   ные с лектинами. Это создает возможность рецепции этими  
   протеинкиназами олигосахаридных элиситоров.
2. Протеинкиназы, связанные с клеточной стенкой.

В эти группы не вошли некоторые протеинкиназы, в частности протеинкиназа, имеющая экстраклеточный домен, связывающийся с белком, который накапливается в межклеточном пространстве при инфицировании расте­ний различными патогенами. Как уже отмечалось, многие рецепторные киназы могут взаимодействовать с другими белками, и это обеспечивает как большее разнообразие связываемых химических сигналов, так и регуляцию этих процессов. Возможно, упомянутая протеинкиназа являет­ся одним из рецепторных белков, отвечающих за защит­ные реакции растений.

Одним из древних, консервативных и широко распро­страненных типов мембранных рецепторов являются трансмембранные автофосфорилирующие гистидинкина-зы [Loomis et al., 1997], способные активироваться широ­ким кругом элиситорных сигнальных молекул. Связыва­ние элиситора внешним, выступающим над липидным сло­ем плазмалеммы N-концевым участком рецептора вызы­вает изменение его конформации и автофосфорилирова-ние гистидинового остатка (см. рис. 4). Затем остаток фо­сфорной кислоты передается на аспартатный остаток вну­треннего (цитоплазматического) участка белка [Chang, Meyerowitz, 1995; Hahn, 1996; Chang, Stewart, 1998], что так­же вызывает изменение его конформации и, вследствие этого, активацию ассоциированного с рецептором фер­мента (непосредственно или через посредников - чаще всего G-белки). Активация фермента - важнейшее звено сигнальной системы, целью которой является передача и умножение элиситорного сигнала, завершающиеся экс­прессией защитных генов и появлением белков, которые

определяют ответ клеток и растения в целом на инфици­рование и воздействие элиситоров. Специфичность рецеп­торов к элиситорам определяется вариабельным внешним N-концом белка, а специфичность к ферменту - его внут­ренним С-концом. Показано, что этот тип рецепторов взаимо­действует со стрессовым фитогормоном этиленом IBleecker et al., 1998; Hua, Meyerowitz, 1998; Theologis, 1998; Woeste, Kieber, 1998; Alonso et al., 1999; Chang, Shockey, 1999; A.E. Hall et al., 1999; Hirayama et al., 1999; Cosgrove et al., 2000; Savaldi-Goldstein, Fluhr, 2000; и др.], который элиситирует защитные реакции клеток растений. Клонирова­ние и определение первичной структуры гена гистидино­вого рецептора у арабидопсиса показали, что его N-конце­вой мембранный домен похож на транспортеры ионов ме­таллов [Alonso et al., 1999].

В настоящее время описан трансмембранный рецепторный белок, N-конец которого взаимодействует с клеточной стенкой, а С-конец находится в цитоплазме и обладает свой­ствами серин-треониновых протеинкиназ [Kohorn et al., 1996]. По мнению авторов, этот рецепторный белок осуще­ствляет сигнальные функции, обеспечивая сигнальный кон­такт между клеточной стенкой и внутренним содержимым клетки.

Так как взаимодействие сигнальной молекулы и ре­цептора осуществляется без возникновения между ними ковалентных связей, то нельзя исключить возможности их расстыковки. С другой стороны, ассоциация этих двух типов молекул может быть достаточно прочной, а изме­нение конформации рецепторного белка создает предпо­сылки облегчения атаки на него протеаз, распознающих белки с нарушенной структурой и разрушающих эти мо­лекулы. В связи с этим большое значение приобретает способность клеток достаточно быстро восстанавливать численность рецепторов различных типов. Обращают на себя внимание опыты, посвященные изучению влияния ингибиторов синтеза белков на интенсивность связывания элиситоров рецепторными белками плазмалеммы. Оказа­лось, что обработка клеток циклогексимидом - ингибито­ром синтеза белков с участием цитоплазматических рибо­сом, вызывала достаточно быстрое снижение уровня свя­зывания клетками системина, что свидетельствует о вы-

сокой скорости оборота рецепторного белка 160 кда Имеются данные об элиситориндуцированном синтезе рецепторов, располагающихся в плазмалемме [Warren et al 1998], но, насколько известно, в настоящее время все еще отсутствует информация о степени специфичности синтеза того или иного рецепторного белка в зависимости от вида элиситора.

**G-БЕЛКИ**

К G-белкам относятся разнообразные белки, способные взаимодействовать с ГТФ [Gilman, 1987]. Одной из важней­ших функций G-белков является участие в функционирова­нии целого ряда сигнальных систем клеток растений (аде-нилатциклазной, МАР-киназной, фосфатидатной, кальцие­вой, липоксигеназной, НАДФН-оксидазной). Если считать первым звеном этих сигнальных систем трансмембранный рецепторный белок, то в роли второго выступает гетеро-тримерный комплекс G-белков, состоящий из а-, (3- и у-субъ-единиц. Непосредственно с цитозольным С-участком ре­цептора взаимодействует у-субъединица, а (3-субъединица объединяет ее с неактивной а-субъединицей, содержащей связанную молекулу ГДФ. При связывании лиганда, напри­мер элиситора, с внешним (N) участком трансмембранного рецептора происходит изменение его конформации, кото­рое передается на ассоциированный с ним гетеротример-ный комплекс G-белков. В результате изменения конфор­мации последнего происходит реакция переноса концевого фосфата цитоплазматического ГТФ на ГДФ, связанный с а-субъединицей, что приводит к ее активации, выходу из комплекса и взаимодействию с аденилатциклазой или другим стартовым сигнальным ферментом, что обусловливает ак­тивацию этого фермента. Через сравнительно непродолжи­тельное время происходит дефосфорилирование ГТФ, вхо­дящего в состав а-субъединицы (ее переход в неактивную форму), и восстановление исходной структуры неактивного комплекса, связанного с рецептором. Такие циклические преобразования, сопровождающиеся превращением цито-зольного ГТФ в ГДФ, обеспечивают как передачу сигнала от рецептора к первому ферменту той или иной сигнальной системы, так и прерывание через некоторое время сигналь-

ной цепи, что также является необходимым условием эф­фективной работы любой сигнальной системы. Необходи­мо заметить, что прерывание сигнальных цепей достигает­ся и с помощью других механизмов, о которых будет упоми­наться в следующих главах.

Описанная картина участия гетеротримерных комплексов G-белков в передаче сигнального импульса была основатель­но изучена у животных объектов и давно вошла в учебники [Lehninger et al., 1993]. В растениях эти комплексы G-белков также функционируют [Hooley, 1998; Bischoff et al., 1999], причем обнаружены все компоненты гетеротримерного ком­плекса G-белков. Клонированы и охарактеризованы гены а-субъединиц [Iwasaki et al., 1997; Aharon et al., 1998; Kaydamov et al., 2000; Perroud et al., 2000], принимающих участие не толь­ко в активации первых ферментов сигнальных систем [Chapman et al., 1998; Machady et al., 1998; Roos et al., 1999], но и кальциевых каналов [Aharon et al., 1998]. Обнаружено, что ос-субъединица прикреплена к плазмалемме и эндоплазмати-ческой сети, но не к мембранам ядра или хлоропластов [Weiss et al., 1997]. Клонирован и охарактеризован также ген |3-субъ-единицы [Kaydamov et al., 2000]. Подавление функционирова­ния гетеротримерного комплекса приводило к нарушениям морфологических признаков у растений риса, в том числе к появлению карликовых форм [Fujisawa et al., 1999].

Помимо "классических" гетеротримерных форм G-бел­ков у растений обнаружены также "сверхкрупные" G-белки [Lee, Assmann, 1999] и малые G-белки (small G-proteins) [Mulligan et al., 1997; Palme et al., 1997; Ichinose et al., 1999; Valster et al., 2000], гомологичные открытым ранее у живот­ных. Недавно проведена систематизация генов всех форм G-белков [Bischoff et al., 1999]. Структура малых G-белков напоминает а-субъединицу гетеротримерного комплекса. В их состав входят рецепторсвязывающая область и ГТФ / ГДФ-связывающее место.

Функции малых G-белков в растениях в настоящее вре­мя интенсивно изучаются. Обнаружено, что они принимают участие в организации актинового цитоскелета, образова­нии активных форм кислорода (функционировании НАДФН-оксидазы) и апоптозе клеток [Kawasaki et al., 1999], входе ионов кальция в клетки [Н. Li et al., 1999], акти­вации фосфолипазы Д [Holbrook et al., 1999; С. Wang, 2000;

X. Wang, 2000]. Для изучения участия G-белков в различных сигнальных цепях клеток часто используют активатор G-белков - мастопаран [Blumwald et al., 1998; Chapman et al., 1998; Machady et al., 1998; Roos et al., 1999].

Участие в сигнальных системах, включаемых элисито-рами, предполагает достаточно важную роль G-белков в выработке защитных реакций клеток растений по отноше­нию к патогенам. В связи с этим обращают на себя внима­ние факты патоген- и элиситориндуцированного образова­ния G-белков [Ichinose et al., 1999] и обнаруженных ранее [Ueda et al., 1998] ингибиторов диссоциации комплексов G-белков [Kim et al., 1999].

Представляется необходимым отметить роль фермента­тивного липидирования и делипидирования в функциониро­вании мембранных рецепторов и G-белков. Прикрепление белков к мембранам осуществляется с помощью пост-трансляционно приобретенных гидрофобных остатков, ко­торые погружаются в липидный материал мембран, выпол­няя роль корешков, удерживающих большую молекулу белка на мембране. Ферментативное отщепление гидро­фобного (липидного) остатка переводит белок из связанно­го с мембраной состояния в свободное, что может сущест­венно изменить функции этого белка [Casey, 1995]. Деталь­ный механизм регуляции активности этих ферментов оста­ется недостаточно выясненным.

Обнаружено, что 16-углеродные остатки пальмитино­вой кислоты могут быть перенесены на белок с образовани­ем тиоэфирной связи с цистеином белка.

Пальмитоил-S-KoA + HS-белок —> —> Пальмитоил-Б-белок + HS-KoA

Пальмитоильный остаток может впоследствии заме­щаться ацильными остатками других жирных кислот. При переносе на белок остатка 14-углеродной миристиловой ки­слоты она взаимодействует с аминогруппой N-концевого глицина с помощью N-миристоилтрансферазы. Еще один способ усиления связывания с мембранами различных бел­ков - их пренилирование, осуществляющееся путем перено­са 15-углеродного фарнезильного или 20-углеродного гера-нилгеранильного остатков на HS-группу цистеина, располо­женного близ С-конца белка.

О роли прикрепления к белкам гидрофобных остатков можно судить по следующим фактам. Депальмитоилирова-ние мембранных рецепторов может способствовать их осво­бождению из плазмалеммы, что приведет к невозможности восприятия элиситорных сигналов. Известна важная роль в функционировании сигнальных систем "липидированных" G-белков, осуществляющих передачу сигнального импульса от мембранных рецепторов к стартовым ферментам сигналь­ных цепей. Обратимое пальмитоилирование ос-субъединицы этого белка может изменять его сигнальную активность. у-Субъединица G-белка пренилирована, и это определяет связь с мембраной комплекса у- и р-субъединиц. Могут быть пренилированы и малые G-белки, также участвующие в пе­редаче и преобразовании элиситорных сигналов от рецепто­ров к интермедиатам сигнальных цепей. Опубликовано не­сколько работ с описанием элиситориндуцированного пере­хода некоторых белковых интермедиатов сигнальных систем из растворимого (в цитозоле) состояния в связанное с плаз-малеммой, что, по-видимому, определялось их липидироваи-ем. Примером может служить переход фосфолипазы D из растворенного в мембраносвязанное состояние, вызванный действием экзогенной абсцизовой кислоты [Ryu, Wang, 1995]. В связывании с мембранами кальцийзависимых проте-инкиназ играет большую роль меристоилирование N-конца молекулы [Hrbak et al., 1996; Romeis et al., 2000].

Сравнительно недавно стало ясно, что большую роль во внутриклеточном преобразовании сигналов играют вспо­могательные белки, не преобразующие сигналы, но имею­щие "стыковочные" домены, способные связывать сигналь­ные белки. В связи с тем, что один вспомогательный белок может иметь несколько одинаковых или отличающихся стыковочных (достаточно консервативных) доменов, то он может обеспечивать формирование достаточно сложного белкового комплекса, облегчающего взаимодействие меж­ду звеньями сигнальных цепей, такими как, например, ре­цепторы, G-белки, протеинкиназы, факторы регуляции транскрипции, протеинфосфатазы, цитоскелетные белки, такие ферменты, как NO-синтаза. Взаимодействие между вспомогательными белками, а также между ними и сигналь­ными белками регулируется с помощью различных меха­низмов, одними из которых являются реакции фосфорили-

рования-дефосфорилирования определенных остатков аминокислот в белках.

Вспомогательные белки подразделяются на объединяю­щие (scaffold), заякоривающие (anchoring) и адапторные IPawson, Scott, 1997]. Если в двух последних типах белков обычно взаимодействуют два партнера, то в первом объе­диняющий белок "навешивает" на себя несколько сигналь­ных белков. У дрозофилы был найден ген, кодирующий объединительный белок с пятью "стыковочными" PDZ-до-менами, обеспечивающий организацию сигнального комп­лекса. Мутации этого гена (даже в области одного PDZ-до-мена) приводят к серьезным нарушениям распределения сигнальных молекул внутри клеток. Вышеупомянутый белок обеспечивает преобразование светового сигнала в светочувствительной клетке глаза дрозофилы. С помощью пяти модулей (PDZ) он связывает в единый комплекс гете-ротримерный G-белок (взаимодействующий с фоторецеп­тором родопсином), фосфолипазу С, протеинкиназу С, кальциевый канал, кальмодулин [Tsunoda et al., 1997]. Можно ожидать, что у растений имеются подобные объединяющие белки, если исходить из принципа унификации структуры и функций как генома, так и обслуживающих его механизмов [Гречкин, Тарчевский, 2000]. Кроме того, уже обнаружены однотипные обслуживающие белки у растений и животных, например адапторный димерный белок 14-3-3, каждая субъ­единица которого узнает и связывает фосфосериновый остаток одного из двух различных сигнальных белков, в ре­зультате чего происходит их объединение в единый функ­ционирующий сигнальный комплекс. Ключевыми для свя­зывания могут быть и фосфотирозиновые остатки. Один из типов стыковочных доменов имеет полипролиновую после­довательность аминокислот. Усиливает способность обра­зовывать сигнальные олигомеры обратимое преобразова­ние сульфгидрильных групп остатков цистеина в межмоле­кулярные дисульфидные в N-концевой области взаимодей­ствующих сигнальных и вспомогательных белков [Pawson, Scott, 1997]. Функционированием вспомогательных белков объясняют явления локализации и кластеризации рецепто­ров и ионных каналов, а также специфику реализации одно­го и того же сигнала в клетках различных тканей.

ПРОТЕИНКИНАЗЫ И ПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ

Эффективным и широко распространенным способом изменения активности ферментов и других белков является один из видов их посттрансляционной модификации - фос-форилирование входящих в них аминокислот. Так как оста­ток ортофосфорной кислоты обычно (в условиях внутри­клеточного диапазона рН) несет отрицательный заряд, то его появление в белке приводит к изменению суммарного локального электрического заряда и в связи с этим конфор-мации и активности белка. Реакции фосфорилирования белков катализируют различные виды протеинкиназ, кото­рые привлекают большое внимание исследователей в связи с их ключевой ролью в регуляции функционирования кле­ток, в том числе в работе сигнальных систем [Hardie, 1999; Schenk, Snaar-Jagalska, 1999]. Описанию принципов строения и классификации протеинкиназ посвящен целый ряд обзор­ных статей [Hunter, 1995; Stone, Walker, 1995; Hardie, 1999; Walker-Simmons, 1998; Hardie, 1999; Jouannic et al., 1999b; Cohen, 2000; и др.].

В настоящее время у эукариотических организмов опи­сано около 1000 представителей этих ферментов [Hardie, 1999], причем почти половина из них - у растений [Cohen, 2000]. Эти ферменты катализируют реакцию переноса кон­цевого ортофосфата от АТФ на некоторые аминокислот­ные остатки белков:

Белок + АТФ —> Белок-Ф + АДФ

Все протеинкиназы подразделяются на пять подсе­мейств, в зависимости от тех остатков аминокислот, кото­рые они фосфорилируют в белках-субстратах протеинки-назных реакций [Hardie, 1999]: рецепторные двухкомпо-нентные гистидиновые протеинкиназы с автокаталитиче-

ским переносом фосфатного остатка с гистидина на собст-венный аспартат; гистидиновые; серин-треонинспецифич-ныe; тирозиновые; протеинкиназы двойной специфично­сти, способные функционировать и как серин-треониновые, и как тирозиновые. Многие представители этих подсе­мейств принимают участие в функционировании сигналь­ных систем клеток растений.

За последние годы большинство генов протеинкиназ клонировано (только у арабидопсиса - около 200), и пер-вичная структура как этих генов, так и кодируемых ими протеинкиназ была расшифрована, что позволило рассмат­ривать вопросы молекулярной эволюции этих ферментов | Hardie, 1999] и их структурной принадлежности к различ­ным семействам и подсемействам. Сопоставление функцио­нальных особенностей различных протеинкиназ позволило провести дополнительную классификацию этих фермен­тов, подразделить их на следующие подсемейства (здесь приводятся главным образом те из них, которые имеют не­посредственное отношение к функционированию сигналь­ных систем): кальцийзависимые; АМФ-зависимые (при го­лодании клеток снижается содержание АТФ и повышает­ся - АМФ, что активирует протеинкиназы этой группы), обозначаемые также как SNF PK (sucrose non-fermenting pro­tein kinases); рецепторные киназы, образующие активные гомо- или гетеродимеры после связывания с сигнальными молекулами (лигандами); митоген-активируемые протеин­киназы, причем у арабидопсиса клонировано семь МАР-ки-наз и по пять МАР-киназ киназ и МАР-киназ киназ киназ; циклинзависимые протеинкиназы (активируемые белками-циклинами), принимающие участие в прохождении клеточ­ных циклов; казеиновые киназы, принимающие участие, например, в фосфорилировании факторов регуляции транс­крипции и стимулировании их связывания с промоторными участками генов; протеинкиназы группы CTR 1/Raf, прини­мающие участие в "сопряжении" ГТФ-связывающего белка (G-белка) Ras с МАР-киназами, в частности, в индуцируе­мом этиленом МАР-киназном сигнальном каскаде.

Протеинкиназы различных семейств имеют довольно консервативную структуру каталитического домена, менее консервативную структуру регуляторного и наиболее вари­абельную - распознающего субстраты домена, что позволя-

ет ему "узнавать" очертания субстратных участков белков-мишеней. Структура регуляторного домена различных про-теинкиназ определяет их способность взаимодействовать с определенными молекулами эффекторов, в роли которых могут выступать различные вторичные посредники сиг­нальных систем клеток. Это приводит к активированию или инактивированию протеинкиназ и изменению интенсивно­сти преобразования и передачи по сигнальной цепи элиси-торного сигнального импульса. Активация различных изо-форм протеинкиназ может осуществляться ионами каль­ция, Са2+-кальмодулиновым комплексом, циклическими АМФ и ГМФ, диацилглицеринами и другими, ингибирова-ние - таннинами, флавоноидными соединениями, искусст­венными синтетическими ингибиторами.

Белки-представители некоторых групп протеинкиназ состоят из гетеротримерных комплексов, причем каждая из субъединиц комплекса (сс-каталитическая, (3-регуляторная и у-узнающая субстрат) соответствует упоминавшимся вы­ше доменам одномолекулярных протеинкиназ.

Повышение концентрации активатора или ингибитора протеинкиназных реакций может сильно отразиться на на­правленности обмена веществ клеток, так как в качестве субстратов протеинкиназных реакций выступают различ­ные ферменты, белки-участники сигнальных систем клеток (в том числе сами протеинкиназы), белки не только цитозо-ля, но и мембран, например, белки ионных каналов и ион­ных помп.

Протеинфосфатаза

Белок-Ф

Ключевую роль в функционировании сигнальных сис­тем клеток играют не только реакции фосфорилирования белков, но и обратные реакции их дефосфорилирования, катализируемые протеинфосфатазами и возвращающие ак­тивность белков-субстратов в исходное состояние:



Белок + Фн

Протеинфосфатазы растений подразделяют на несколь­ко групп, при этом в основу классификации положено сход­ство (или различие) последовательности аминокислот в до­менах ферментов [Rodriguez, 1998]. Гены многих протеин­фосфатаз были клонированы, и их первичная структура оп­ределена. Обнаружена чрезвычайно высокая консерватив­ность протеинфосфатаз, что подтверждает представление о

впжности исследуемых ферментов в осуществлении функ­ций клеток.

Протеинфосфатазы подразделяются на низкомолеку­лярные цитоплазматические и высокомолекулярные ре-цепторные [Буланова, Будагян, 1994] классы. Первые включают в себя два подкласса: серин-треониновые и тиро-зиновые фосфатазы.

Серин-треониновые протеинфосфатазы (ПФ) растений (гомологичные обнаруженным у животных) подразделяют­ся на три типа: ПФ1, ПФ2А и ПФ2С (РР1, РР2А и РР2С). Протеинкиназы типа 2В (РР2В), характерные для живот­ных, в растениях еще не клонированы, но опыты со специ­фическим ингибитором этих ферментов позволяют счи­тать, что этот тип протеинфосфатаз присутствует и у расте­ний [Schreiber, 1992]. Еще одно различие в том, что у РР2С не обнаружено регуляторной субъединицы. По-видимому, се роль могут играть различные белки, являющиеся мише­нями для фермента. Активность каталитической субъеди­ницы у РР2В регулируется и кальцием, и кальцийсвязываю-щим белком - гомологом кальмодулина [Klee et al., 1988].

Рецепторные протеинфосфатазы имеют достаточно консервативный трансмембранный домен и подразделяют­ся на несколько классов в зависимости от структуры и свойств внеклеточного и цитоплазматического фосфатаз-ного доменов. Первый может содержать гликозильные ос­татки или богатые серином участки.

Дополнительное свидетельство различий протеинфос­фатаз в том, что они по-разному относятся к ингибиторам и ионам. Так, протеинфосфатазы РР2С требовали для своей активации ионы Mg2+ и Мп2+ и не реагировали на окадаевую кислоту - сильный ингибитор активности протеинфосфатаз типа РР1 и PP2A[Cohen, 1989; Rodriguez, 1998].

Расшифровка первичной структуры протеинфосфатазы типа РР2С у растений (главным образом, у арабидопсиса) [Rodriguez, 1998] позволила сделать вывод, что у них глав­ные различия определяются вариациями аминокислотного состава на N-конце молекул. Например, у КАРР (kinase associated protein phosphatase) домен KI связывается только с фосфорилированной формой рецепторных протеинкиназ и дефосфорилирует их, прерывая передачу сигнального им­пульса.

АВ11 и АВ12 играют ключевую роль в АБК-индуциро-ванном сигнальном пути [Merlot, Giraudat, 1997; Gosti et al., 1999]. Наблюдались рН-зависимая и М§2+-зависимая акти­вация ABU [Leube et al., 1998].

У протеинфосфатаз МР2С основной мишенью является МАРККК, активируемая при воздействии различных стрес­соров. Такая специфика становится объяснимой, если учесть, что у некоторых протеинфосфатаз обнаружены ме­ста связывания с соответствующими им протеинкиназами [Williams et al., 1997; Li J. et al., 1999] - участниками сигналь­ных систем клеток. Это позволяет обеспечивать существо­вание комплекса протеинкиназа-протеинфосфатаза и свое­временно и эффективно блокировать преобразование и пе­редачу в геном сигнального импульса. Принцип работы это­го механизма достаточно прост: накопление определенной протеинкиназы - интермедиата сигнальной цепи - активи­рует фосфопротеин-фосфатазу и приводит к дефосфорили-рованию (инактивации) протеинкиназы. Например, актива­ция некоторых протеинкиназ может привести к фосфори-лированию и активации соответствующих протеинфосфа­таз. При исследовании функционирования протеинфосфа­таз часто используют специфические ингибиторы, напри­мер окадаевую кислоту и каликулин [Li et al., 1994b].

**ФАКТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ**

Синтез матричных РНК катализируется ДНК-зависи­мыми РНК-полимеразами'- одними из наиболее крупных белковых комплексов, состоящих из двух больших и 5-13 малых субъединиц, что определяется сложностью и важ­ностью их функций. Эти субъединицы имеют консерва­тивные последовательности аминокислот, в большей или меньшей степени общие для животных и растений, iАктив­ность РНК-полимеразы и узнавание транскрибируемых генов регулируются с помощью нескольких типов белков. Наибольшее внимание привлекают факторы регуляции транскрипции.' Эти белки способны взаимодействовать с другими белками, в том числе с идентичными, изменять конформацию при фосфорилировании нескольких входя­щих в их состав аминокислот,[узнавать регуляторные пос­ледовательности нуклеотидов в промоторных участках ге­нов, что приводит к изменению интенсивности их экспрес­сии.: Именно факторы регуляции транскрипции направля­ют РНК-полимеразу на точку инициации транскрипции соответствующего гена (или совокупности генов), не участвуя непосредственно в каталитическом акте син­теза мРНК.

У животных организмов определены особенности структуры более 1 тысячи факторов регуляции транс­крипции. Клонирование их генов способствовало получе­нию информации, позволившей осуществить классифика­цию этих белков.

Все факторы регуляции транскрипции содержат три ос­новных домена. Наиболее консервативным является ДНК-связывающий домен. Последовательность аминокислот в нем определяет узнавание определенных последовательно­стей нуклеотидов в промоторах генов.

В зависимости от гомологии первичной и вторичной структур ДНК-связывающего домена факторы регуляции транскрипции подразделяются на четыре суперкласса: 1) с доменами, обогащенными основными аминокислотами; 2) с ДНК-связывающими доменами, координирующими ионы цинка, - "цинковыми пальцами"; 3) с доменами типа спи­раль-поворот-спираль; 4) с доменами типа |3-скэффолд, об­разующими контакты с малой бороздкой ДНК [Патрушев, 2000]. Каждый суперкласс подразделяется на классы, се­мейства и подсемейства. В суперклассе 1 обращают на себя внимание факторы регуляции транскрипции с доменами ти­па "лейциновая застежка-молния", представляющими со­бой ос-спирали, у которых каждая седьмая аминокислота яв­ляется лейцином, выступающим с одной стороны спирали. Гидрофобное взаимодействие остатков лейцина одной мо­лекулы с аналогичной спиралью другой молекулы обеспе­чивает димеризацию (по аналогии с застежкой-молнией) факторов регуляции транскрипции, необходимую для взаи­модействия с ДНК.

В суперклассе 2 "цинковые пальцы" представляют со­бой последовательности аминокислот, содержащие четыре остатка цистеина, которые оказывают координирующее действие на ион цинка. "Цинковые пальцы" взаимодейству­ют с большой бороздкой ДНК. В другом классе этого су­перкласса структура "цинковых пальцев" обеспечивается двумя остатками цистеина и двумя остатками гистидина (рис. 5), еще в одном классе координация двух ионов цинка в одном "пальце" осуществляется шестью остатками цисте­ина. Вершины "цинковых пальцев" контактируют с боль­шой бороздкой ДНК.

Исследование структуры факторов регуляции транс­крипции у растений позволило установить гомологию с бел­ками этого типа, характерными для животных объектов. Типичные факторы регуляции транскрипции содержат сле­дующие три основных структурных элемента: ДНК-связы-вающий, олигомеризационный и регуляторный домены [Liu et al., 1999]. Мономерные формы транскрипционных факто­ров неактивны, в отличие от димерных (олигомерных). Об­разованию олигомерных форм предшествует фосфорили-рование мономерных форм в цитозоле, затем происходит их ассоциация и после этого доставка в ядро или с помощью

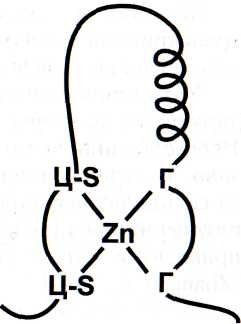


Рис. 5. Структура "цинкового пальца" фактора регуляции транскрипции [Hardie, 1999]

Г - остаток гистидина; Ц-S - остаток цистеина

специальных транспортных белков или благодаря взаимодействию с рецепторными белками в порах ядерной мембраны, после чего они переносятся в ядро и взаимодейст­вуют с промоторными участками соответствующих генов. 'Факторы регуляции транскрипции кодируются мультигенными се­мействами, и их синтез может индуцироваться патогенами и элиситорами, а активность изменяться в результате посттрансляционной модификации (главным образом, фосфо-рилирования или дефосфорилирования).

В настоящее время создана все более расширяющаяся база данных о структуре различных факторов регуляции транскрипции и их генов у растений [Wingender et al., 2000]. Показано, что специфичность связывания с ДНК опреде­ляется аминокислотными последовательностями стержне­вой и петлевой зон в уже упоминавшихся лейциновых "за­стежках-молниях", представляющих собой одну из наибо­лее многочисленных и консервативных групп эукариотиче-ских факторов регуляции транскрипции [Niu et al., 1999]. Часто факторы регуляции транскрипции классифицируют­ся именно по структуре ДНК-связывающих доменов, кото­рые могут включать спиральные последовательности ами­нокислот, "цинковые пальцы" - участки с двумя цистеино-выми и двумя гистидиновыми остатками или со многими ци-стеиновыми остатками и т.д. У растений от одного до четы­рех "цинковых пальцев" найдены в ДНК-связывающих до­менах факторов регуляции транскрипции [Takatsuji, 1999].

Механизм взаимодействия факторов регуляции транс­крипции с ДНК-зависимыми РНК-полимеразами и промо­торными участками генов остается одной из ключевых и все еще недостаточно изученных проблем функционирова­ния генома клеток. Особенно скудна информация, касаю­щаяся растительных объектов.

Мутации в генах, кодирующих факторы регуляции транскрипции у животных, могут привести к определенным заболеваниям [Latchman, 1997].

У растений описаны представители семейства генов, ко­дирующих факторы регуляции транскрипции [Aso et al., 1999] с лейциновыми "застежками-молниями". Было пока­зано, что транскрипционные факторы этого типа отвечают за салицилатиндуцированное образование защитных анти­патогенных белков и что мутации в указанных генах приводят к потере способности синтезировать эти белки [Zhang et al., 1999].

**ПРОМОТОРЫ ГЕНОВ БЕЛКОВ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ И ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ**

В настоящее время интенсивно исследуется структура промоторных участков генов, отвечающих за приобретение иммунитета к различным патогенам. Уже давно привлекает внимание факт практически одновременного синтеза цело­го ряда патогениндуцируемых белков: Это может быть вы­звано как дивергенцией сигнальных путей в одной сигналь­ной системе, что обусловливает активацию нескольких ти­пов факторов регуляции транскрипции, так и "включени­ем" тем или иным элиситором нескольких сигнальных сис­тем, которые, функционируя параллельно, активируют не­сколько типов факторов регуляции транскрипции и, вслед­ствие этого, вызывают экспрессию нескольких видов за­щитных белков. Не исключена также возможность того, что промоторы генов нескольких индивидуальных белков имеют одну и ту же структуру регуляторных элементов, что приводит к их одновременной экспрессии даже в случае сиг­нальной активации одного представителя факторов регуля­ции транскрипции.1

Последний вариант имеет место при действии на расте­ния стрессового фитогормона этилена, когда фактор регу­ляции транскрипции взаимодействует с GCC-боксом промо­торных участков нескольких этилениндуцируемых генов, что обеспечивает более или менее одновременное образо­вание целой группы этилениндуцируемых белков [Thara et al., 1999]. Такой принцип пакетного синтеза защитных бел­ков реализуется при ответе клеток на различные стрессоры или элиситоры (к вторичным элиситорам можно отнести и стрессовые фитогормоны). Например, при действии повы­шенных температур индуцируется транскрипция группы ге­нов, содержащих в промоторных участках общий регуля-

торный элемент HSE (heat shock element), отсутствующий у других генов [Latchman, 1997]. Эта закономерность была подтверждена с помощью приема создания гибридных ге­нов с промотором гена теплового шока, состыкованного с другим геном, обычно не изменяющим интенсивности экс­прессии при действии повышенных температур. В случае же трансгенных растений начиналась его экспрессия. В эукариотических клетках обнаружены также промоторные участки со сходными последовательностями нуклеотидов у различных генов, индуцируемых одним и тем же интерме-диатом (вторичным посредником) сигнальных систем, на­пример циклическим АМФ. В последнем случае сигнальная последовательность нуклеотидов промоторного участка имеет обозначение CRE (cyclic AMP response element).

У арабидопсиса обнаружена глюкокортикоидная систе­ма активации факторов регуляции транскрипции, включе­ние которой приводило к экспрессии патогениндуцируе-мых защитных генов [Н. Kang et al., 1999]. Распространен­ными последовательностями нуклеотидов в G-боксе про­моторов были CCACGTGG, а в С-боксе - TGACGTCA [Niu et al., 1999].

Вирус табачной мозаики и салициловая кислота вызы­вали у растений табака индукцию двух генов факторов ре­гуляции транскрипции класса WRKY, узнающих в промо-торных участках защитных генов определенную последова­тельность нуклеотидов - TTGAC (W-box). Активация этих факторов регуляции транскрипции осуществлялась с помо­щью их фосфорилирования протеинкиназами [Chen, Chen, 2000]. Все белки класса WRKY, в отличие от других классов транскрипционных факторов (таких, как bZIP и myb), име­ют консервативный домен, содержащий гептамерный пеп­тид WRKYGQK [Rushton, Somssich, 1998].

( Один из доменов фактора регуляции транскрипции, от­вечающего за преобразование жасмонатного сигнала, акти­вирует регуляторный участок промотора нескольких генов, кодирующих жасмонат- и элиситор-индуцируемые белки, в частности стриктозидин-синтазу [Van der Fits, Memelink, 2001]. Оказалось, что активирующим действием обладает N-концевой кислый домен фактора регуляции транскрип­ции, а обогащенный остатками серина С-концевой домен -I ингибирующим.

Показано, что промотор гена фенилаланин-аммиак-лиа-зы (важнейшего стартового фермента разветвленного ме­таболического процесса синтеза соединений, играющих за­щитную роль, - салицилата, фенольных кислот, фенилпро-паноидных фитоалексинов и лигнина) содержит по две ко­пии обогащенных АС-повторами участков [Gray-Mitsumune ctal., 1999].

При изучении промотора гена другого фермента синте-ia фитоалексинов - халконсинтазы, у культуры клеток бо­бов, табака и риса было обнаружено, что в активации про­мотора принимают участие G-бокс (CACGTG) в области от -74 до -69 пар нуклеотидов и Н-боксы (ССТАСС) в области от -61 до -56 и от -126 до -121 пар нуклеотидов [Arias et al., 1993].

В других опытах было выяснено, что при действии эли-ситоров экспрессия гена халконсинтазы у растений гороха зависит от области промотора от -242 до -182 пар нуклео­тидов, в которой два участка содержат идентичные AT по­следовательности -ТААААТАСТ-, причем одна из них, располагающаяся в области от -242 до -226, была необхо­дима для проявления максимальной активности гена [Seki et al., 1996].

Промотор гена стриктозидин-синтазы, одного из клю­чевых элиситориндуцируемых ферментов синтеза терпе-ноидных фитоалексинов, имеет активируемую факторами регуляции транскрипции область от -339 до -145 пар нук­леотидов [Memelink et al., 1999]. G-бокс, расположенный вблизи -105 пары нуклеотидов, не влиял на активность промотора.

При исследовании активности гена |3-1,3-глюканазы у растений табака было обнаружено, что она зависит от об­ласти промотора от -250 до -217 пар нуклеотидов, содержа­щей последовательность -GGCGGC-, характерную для про­моторов генов, кодирующих патогениндуцируемые щелоч­ные белки [Alonso et al., 1995].

Так называемый PR-бокс промоторных участков мно­гих патогениндуцируемых белков содержит последователь­ность (5'-AGCCGCC-3'), с которой связываются соответст­вующие факторы регуляции транскрипции, что приводит к экспрессии генов этих белков, в частности эндохитиназ и Р-1,3-глюканаз у растений томатов [Jia, Martin, 1999].

Многие гены патогениндуцируемых белков содержат в промоторах так называемые ocs-элементы, с которыми взаимодействуют факторы регуляции транскрипции, имею­щие в своей структуре лейциновые застежки-молнии. У растений арабидопсиса факторы регуляции транскрип­ции, ответственные за преобразование этиленового сигна­ла, связываются и с GCC-боксом и с ocs-элементами промо­торов, что приводит к экспрессии целого ряда защитных белков [Buttner, Singh, 1997].

Исследование трансгенных растений табака с промото­ром щелочной хитиназы и репортерным геном GUS позво­лило установить, что активируемая этиленовым сигналом область промотора находится между -503 и -358 парами ну-клеотидов, где имеются две копии GCC-бокса (5'-TAAGAGCCGCC-3') [Shinshi et al., 1995], который характе­рен для промоторов многих этилениндуцируемых белков. Дальнейший анализ показал, что ответственный за реак­цию на этилен участок промотора с двумя копиями GCC-бо­кса расположен между -480 и —410 парами нуклеотидов.

При исследовании реакции растений табака на обработ­ку этиленом и инфицирование вирусом мозаики было обна­ружено, что активность промотора гена (3-1,3-глюканазы зависит от области, расположенной между -1452 и -1193 па­рами нуклеотидов, где имеются две копии гептануклеотида 5-AGCCGCC-3' [Vogeli-Lange et al., 1994]. Найдены и допол­нительные области, существенные для регуляции актив­ности промотора.

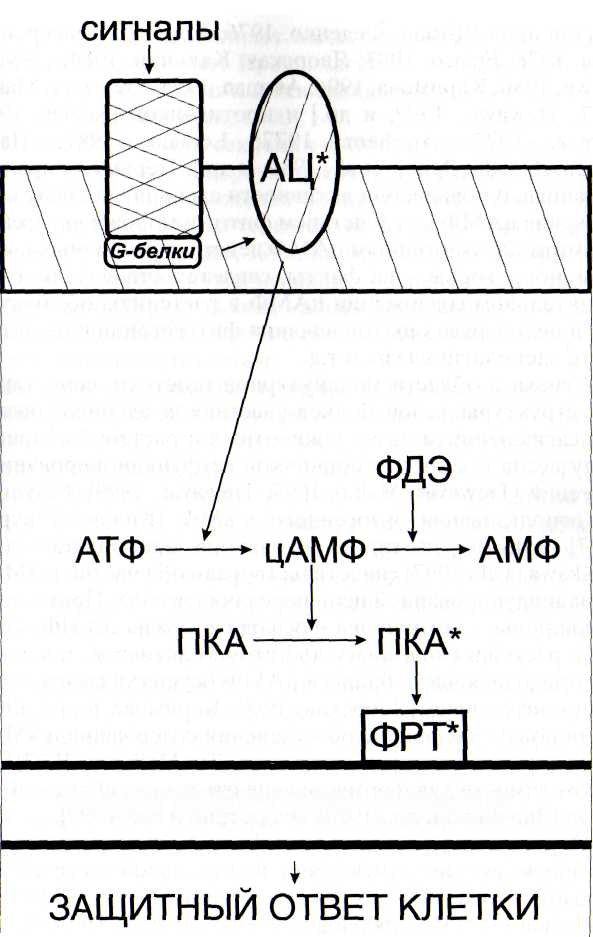
Рассмотренные выше элиситоры, рецепторы элисито-ров, G-белки, протеинкиназы, протеинфосфатазы, факторы регуляции транскрипции, соответствующие им промотор-ные участки генов принимают участие в функционировании целого ряда сигнальных систем клеток, от которых зависит их реакция на сигналы различной природы и интенсивно­сти: аденилатциклазной, МАР-киназной, фосфатидатной, кальциевой, липоксигеназной, НАДФН-оксидазной, NO-синтазной и протонной.

АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНАЯ СИГНАЛЬНАЯ СИСТЕМА

Эта сигнальная система получила свое название по впер­вые охарактеризованному Сазерлендом [Sutherland, 1962] ферменту аденилатциклазе, катализирующей образование основного сигнального интермедиата этой системы - цик­лического аденозинмонофосфата (цАМФ). Схема адени­латциклазной системы такова: внешний химический сигнал, например гормон или элиситор, взаимодействует с белком-рецептором плазмалеммы, что приводит к активации G-белка (связывания им ГТФ) и передаче сигнального импульса на фермент аденилатциклазу (АЦ), который ка­тализирует синтез цАМФ из АТФ (рис. 6).

В аденилатциклазной системе различают Gs-белки, сти­мулирующие аденилатциклазу, и (5,-белки, тормозящие ак­тивность фермента. Различия между этими двумя видами белков определяются в основном особенностями ос-субъ-единиц, а не (3- и у-субъединиц. Молекулярные массы ocs-субъединиц G-белка равны 41-46 кДа, агсубъединиц -40-41 кДа, (3,- и Р2-субъединиц - 36-35 кДа, у-субъединиц -8-10 кДа. Связывание G-белками ГТФ и его гидролиз до ГДФ и неорганического ортофосфата обеспечивают обратимость процессов активации аденилатциклазы [Gilman, 1987].

Аденилатциклаза является мономерным интегральным белком плазматической мембраны и поэтому с трудом под­дается экстракции и переходу в растворимую форму. Моле­кулярная масса аденилатциклазы клеток животных равна 120-155 кДа; имеются также растворимые формы адени­латциклазы 50-70 кДа, не чувствительные к кальмодулину и G-белкам [Ichikawa et al., 1997]. У растений молекулярная масса аденилатциклазы составляет 84 кДа. Кривая зависи­мости активности аденилатциклазы от рН имела одновер­шинный характер, причем пик активности для этого фер-



**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ**

мента находился в области рН 4,8-5,2 [Carricarte et al., 1988]. Получены данные об изоформе аденилатциклазы с оптиму­мом рН, равным 8,8 [Simonin et al., 1988].

Аденилатциклаза может модифицироваться с внешней стороны мембраны гликозилированием, а с внутренней -фосфорилированием А-киназой [Северин, 1991]. Актив­ность мембранной аденилатциклазы зависит от фосфоли-пидного окружения - соотношения фосфатидилхолина, фо-сфатидил-этаноламина, сфингомиелина, фосфатидилс'ери-на и фосфатидилинозитола.

Содержание цАМФ в клетках определяется соотноше­нием активности двух ферментов - аденилатциклазы и фосфодиэстеразы 3',5'-цАМФ (ФДЭ). При действии послед­ней фосфодиэфирная связь цАМФ подвергается гидролизу, что приводит к появлению неактивного нециклического 5'-АМФ.



Элиситориндуцируемое повышение содержания цАМФ в клетках имеет преходящий характер, что объясняется ак­тивацией ФДЭ и, возможно, связыванием цАМФ-зависимы-ми протеинкиназами. Действительно, повышение концент­рации цАМФ в клетках активирует различные цАМФ-зави-симые протеинкиназы, которые могут фосфорилировать различные белки, в том числе факторы регуляции транс­крипции, что приводит к экспрессии различных генов и от­вету клетки на внешнее воздействие.

Коэффициент умножения сигнала, достигаемый при его передаче в геном и экспрессии генов, составляет многие ты­сячи. Схема умножения сигнала при функционировании аденилатциклазной сигнальной системы часто используется в учебниках биохимии [Lehninger et al., 1993]. Эта сигналь­ная система продолжает интенсивно исследоваться на раз­личных объектах, пополняя представления об информаци­онном поле клеток и его связи с внешними информацион­ными потоками.

Необходимо заметить, что вопрос о функционировании аденилатциклазной сигнальной системы в растительных объектах на протяжении почти четверти века продолжал оставаться дискуссионным, разделяя исследователей на ее

Рис. 6. Схема функционирования аденилатциклазной сигнальной системы

АЦ\* - активная форма аденилатциклазы; ПКА и ПКА\* - неактив­ная и активная формы протеинкиназы А; ПЛ - плазмалемма; ФДЭ -фосфодиэстераза; ФРТ\* - активная форма фактора регуляции транс­крипции

сторонников [Доман, Феденко, 1976; Королев, Выскребен-цева, 1978; Franco, 1983; Яворская, Калинин, 1984; Newton, Brown, 1986; Каримова, 1994, Assman, 1995; Trewavas, Malho, 1997; Trewavas, 1999; и др.] и противников [Keates, 1973; Varner, 1975; Amrhein, 1977; Letham, 1987; Hahn, Grisebach,1983; Spiteri et al., 1989; и др.]. Первые опирались на данные о повышении активности аденилатциклазы и со­держания цАМФ под действием фитогормонов и патогенов, об имитации экзогенным цАМФ действия различных фито­гормонов, вторые - на факты, свидетельствовавшие о не­значительном содержании цАМФ в растениях, об отсутст­вии в целом ряде опытов влияния фитогормонов на актив­ность аденилатциклазы и т.д.

Успехи в области молекулярной генетики, сопоставле­ние структуры генов белков-участников аденилатциклаз-ной сигнальной системы у животных и растений склонили чашу весов в пользу сторонников ее функционирования у растений [Trewavas, Malho, 1997; Trewavas, 1999]. Результа­ты использования экзогенного цАМФ [Килев, Чекуров, 1977] или форсколина (активатора аденилатциклазы) [Ichikawa et al., 1997] свидетельствовали об участии цАМФ в сигналиндуцированнои цепи передачи сигнала. Применение теофиллина - ингибитора фосфодиэстеразы цАМФ, кото­рая в растениях оказалась достаточно активной, показало, что приходная часть баланса цАМФ осуществляется доста­точно интенсивно [Яворская, 1990; Каримова и др., 1990]. Были получены данные об изменении содержания цАМФ в растениях под влиянием патогенов [Tu, Malhotra, 1977], его необходимости для формирования ответа на действие пато­генов [Зарубина и др., 1979; Очеретина и др., 1990].

Обращает на себя внимание факт АТФ-зависимого вы­деления во внеклеточную среду значительной части цАМФ, образованного в клетках животных [Makman, Sutherland,1965; Федоров и др., 1990; Fehr et al., 1990; Орлов, Максимова, 1999], прокариот [Goldenbaum, Hall, 1979; Ши-ян, Лазарева, 1988], водорослей [Franco, 1983] и высших рас­тений [Ashton, Polya, 1977; 1978; Каримова и др., 1993]. По­казательно, что у растений, так же как у животных, можно было снизить накопление цАМФ в клетках и выход его во внеклеточную среду с помощью простагландина [Ehsan et al., 1998; 1999], не обнаруживаемого в растениях. Возмож-

но, что эту роль выполняет аналогичный простагландину оксилипин - жасмонат. Предполагается возможность уча­стия в выносе цАМФ из клетки специальных АТФ-связыва-ющих белков [Fehr et al., 1990].

Целесообразность секреции цАМФ из клеток растений в среду объясняют, в первую очередь, необходимостью до­статочно быстрого снижения концентрации этого вторич­ного посредника для того, чтобы не происходило перевоз­буждения клеток [Franco, 1983; Каримова и др., 1993]. Отно­сительно быстрое снижение концентраций вторичных по­средников после достижения максимального уровня являет­ся непременнной неспецифической чертой функционирова­ния всех сигнальных систем.

Вероятно, выводимый за пределы плазмалеммы цАМФ принимает участие в регуляции внеклеточных процессов [Шиян, Лазарева, 1988]. Это мнение может основываться на обнаружении экто-цАМФ-зависимых протеинкиназ [Kang et al., 1979], использующих секрецию цАМФ из клеток для активирования фосфорилирования белков за пределами плазмалеммы. Полагают также, что цАМФ вне клетки мо­жет выполнять роль первого посредника [Федоров и др., 1990], индуцируя запуск каскада реакций сигнальных сис­тем в соседних клетках, что было показано на примере мно­гоклеточных слизевых грибов [Sucgang et al., 1997].

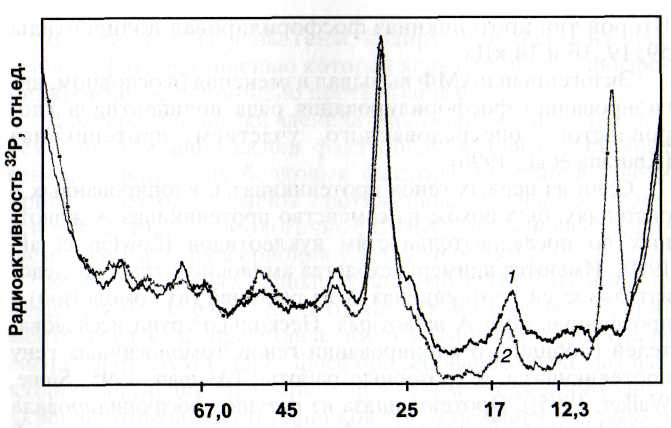
Привлекают внимание данные, полученные на животных объектах, об ингибировании экзогенным аденозином (кото­рый может рассматриваться в качестве продукта деградации цАМФ) кальциевых каналов клеток [Меерсон, 1986] и акти­вировании - калиевых каналов [Орлов, Максимова, 1999].

Большой интерес вызывает информация о возможности регуляции секретируемым цАМФ развития патогенных гри­бов [Knogge, 1998], в частности ржавчины ячменя [Kinane et al., 2000], Magnaporthe grisea, поражающего растения риса [Xu, Hamer, 1996; Choi, Dean, 1997; Adachi, Hamer, 1998], пыльной головни Ustilago maydis [Gold et al., 1997; Kahmann et al., 1999], Erysiphe graminis [A.A. Hall et al., 1999], Colletotrichum trifolii [Yang, Dickman, 1999], пигментирования Ustilago hordei [Lichter, Mills, 1998]. В зависимости от концентрации цАМФ происходила стимуляция или подавление развития грибов. Полагают, что у них в трансдукции цАМФ-сигнала принима­ют участие гетеротримерные G-белки [Bolker, 1998].

Накапливается все больше данных о влиянии различных сигнальных молекул на секрецию цАМФ растительными клетками. Было показано, что роль АБК в адаптации растений к стрессу может заключаться в ее способности ре­гулировать содержание и выход цАМФ из клеток. Предпо­лагается, что уменьшение содержания цАМФ при действии АБК вызвана АБК-индуцированным повышением содер­жания Са2+ в цитозоле [Iagoucheva et al., 2000] и ингибирова-нием аденилатциклазы. Известно, что Са2+ в высокой кон­центрации ингибирует активность аденилатциклазы у эука-риот [Taussig, Gilman, 1995]. В то же время Са2+ может уменьшить содержание цАМФ, индуцируя повышение ак­тивности фосфодиэстеразы, гидролизующей цАМФ. Дейст­вительно, активация фосфодиэстеразы цАМФ комплексом Са2+-кальмодулин была обнаружена у растительных объек­тов [Феденко, 1983].

Показана зависимость профиля фосфорилированности полипептидов от экзогенного цАМФ. Число полипептидов, фосфорилирование которых стимулировалось цАМФ, бы­ло наибольшим при микромолярной концентрации цАМФ. Привлекает внимание факт сильного цАМФ-индуцирован-ного повышения фосфорилированности полипептида 10 кДа при низкой температуре (рис. 7) [Каримова, Жуков, 1991; Ягушева, 2000]. Интересно, что полипептид с такой молекулярной массой является белковым регулятором фо­сфодиэстеразы цАМФ, который активируется абсцизовой кислотой и Са2+ [Junker, 1977] и снижает содержание цАМФ за счет его гидролиза фосфодиэстеразой.

Изучение особенностей активации цАМФ-зависимых протеинкиназ и фосфорилирования ими различных бел­ков - одно из важнейших направлений исследований аде-нилатциклазной сигнальной системы. цАМФ-зависимые протеинкиназы (ПКА) - это ферменты, активирующиеся при взаимодействии с цАМФ и катализирующие перенос концевого остатка фосфорной кислоты с АТФ на гидро-ксильные группы сериновых или треониновых остатков белков-акцепторов. Ковалентная модификация белков, осуществляемая при фосфорилировании, приводит к из­менению их конформации и каталитической активности, вызывая ассоциацию или диссоциацию их субъединиц и т.д.



**Молекулярная масса белков, кДа**

Рис. 7. Влияние цАМФ на фосфорилирование белков трехднев­ных проростков гороха [Каримова, Жуков, 1991]

*1 -* контроль: срезанные побеги переносили на 2 ч черешками в во­ду, затем еще на 2 ч - в раствор меченного по 32Р ортофосфата; 2 - сре­занные растения переносили на 2 ч в раствор 1 мкМ цАМФ, затем еще на 2 ч - в раствор меченного по 32Р ортофосфата

Субстратами в протеинкиназной реакции являются Mg-АТФ и фосфорилируемый белок. Белковые субстраты мо­гут быть одновременно субстратами для цГМФ- и цАМФ-зависимых протеинкиназ по одним и тем же остаткам сери-на (треонина), но скорость цАМФ-зависимого фосфорили­рования в 10-15 раз больше, чем у цГМФ-зависимых протеин­киназ [Cohen, 1980]. Субстраты цАМФ-зависимых протеин­киназ располагаются во всех частях клетки: цитозоле, эндо-плазматическом ретикулуме (ЭПР), аппарате Гольджи, сек­реторных гранулах, цитоскелете и ядре.

Из клеток растений были выделены протеинкиназы, активируемые экзогенным цАМФ, например, из колеоп-тилей кукурузы - протеинкиназа 36 кДа [Janistyn, 1986; 1988]. Като и соавт. [Kato et al., 1983] выделили из ряски Lemna paucicostata три типа протеинкиназ: 165, 85 и 145 кДа, одна из которых ингибировалась цАМФ, другая ак­тивировалась цАМФ и третья была цАМФ-независимой.

Второй тип протеинкиназ фосфорилировал полипептиды 59, 19, 16 и 14 кДа.

Экзогенный цАМФ вызывал изменения (в основном, ин-гибирование) фосфорилирования ряда полипептидов хло-ропластов, опосредованного участием протеинкиназ [Khurana et al, 1996].

Один из первых генов протеинкиназы, клонированных в растениях, был похож на семейство протеинкиназ А живот­ных по последовательностям нуклеотидов [Lowton et al., 1989]. Имеются примеры сходства аминокислотных последо­вательностей протеинкиназ А из растений (их гомологию) с протеинкиназами А животных. Несколько групп исследова­телей сообщили о клонировании генов, гомологичных гену протеинкиназы А (обзорные работы: [Assman, 1995; Stone, Walker, 1995]). Протеинкиназа из петунии фосфорилировала специфичный синтетический субстрат протеинкиназы А [Polya, Bovman, 1991]. Сообщалось о том, что добавление цАМФ к экстрактам растений стимулирует фосфорилирова-ние специфичных белков [Assman, 1995]. Исследование мест фосфорилирования в фенилаланин-аммиак-лиазе (ФАЛ) -ключевом ферменте биосинтеза фитоалексинов, обнаружило сайты, специфичные для протеинкиназы A [Bolwell, 1995].

Использование высокоспецифичного белкового инги­битора (БИ) цАМФ-зависимых протеинкиназ [Walsh et al., 1971] позволило подтвердить предположение [Newton, Brown, 1986], что цАМФ-зависимые протеинкиназы могут быть активированы эндогенным цАМФ еще в процессе приготовления образца: БИ подавлял базальную протеин-киназную активность экстрактов из листьев в разных опы­тах на 30-50% [Каримова, 1994]. Интермедиаты липоксиге-назной сигнальной системы ГДК и МеЖК активировали в присутствии цАМФ протеинкиназную активность на 33-^8% [Каримова и др., 19996]. Салициловая кислота инду­цировала повышение уровня цАМФ-зависимой фосфори-лированности полипептидов 74, 61 и 22 кДа в листьях горо­ха [Мухаметчина, 2000]. цАМФ-стимулируемая протеинки-назная активность растворимых белков листьев гороха за­висела от концентрации Са2+ [Каримова и др., 1989; Тар-чевская, 1990; Каримова, Жуков, 1991], причем фермента­тивная активность обнаруживалась также в изолированных клеточных стенках, ядрах, плазматических мембранах.

В растениях найдены гены, кодирующие фермент про-теинфосфатазу, мишенью которой являются белки, фосфо-рилированные с помощью протеинкиназы А.

Для характеристики аденилатциклазной сигнальной сис­темы чрезвычайно важен факт обнаружения в растениях генов, кодирующих белковые факторы регуляции транс­крипции, которые имеют протяженные последовательно­сти нуклеотидов, гомологичные CREBS - цАМФ-связываю-щему фактору транскрипции у животных [Bolwell, 1995].

Многочисленные данные о влиянии цАМФ на ионные каналы клеток растений и относительно слабая экспери­ментальная база представлений о возможности передачи сигналов от цАМФ через фосфорилирование белковых фа­кторов регуляции транскрипции в геном, с одной стороны, укрепляют позиции сторонников существования непрямого (через активацию ионных каналов) сигнального аденилат-циклазного пути и, с другой, заставляют усилить попытки получения доказательств функционирования прямого цАМФ-сигнального пути.

**МАР-КИНАЗНАЯ СИГНАЛЬНАЯ СИСТЕМА**

Митогенактивируемые серин-треонинового типа про-теинкиназы (МАРК) и МАР-киназный сигнальный каскад (сигнал —> рецептор —> G-белки —> МАРККК —» —> МАРКК —> МАРК —> ФРТ —> геном), достаточно полно изученные в животных объектах, функционируют и в клетках растений (рис. 8). Им посвящены обзорные статьи [Kultz, 1998; Jonak et al., 1999; Jouannic et al., 1999b; Meskiene, Hirt, 2000] и работы экспериментального харак­тера, в которых сообщаются сведения об индивидуальных представителях этой сигнальной системы [Ichimura et al., 1998; Nishihama et al., 1997; Jouannic et al., 1999b] и особен­ностях их регуляции.

МАР-киназный каскад "включается" при митозе (чем и объясняется название этих протеинкиназ), при обезвожива­нии [Mizoguchi et al., 1996; Тепа, Renaudin, 1998], гипоосмо-тическом стрессе [Cazale et al., 1998], низкой температуре [Jouannic et al., 1999b], механическом раздражении растений [Mizoguchi et al., 1996], повреждении тканей [Seo et al., 1995; Bogre et al., 1997; Morris et al., 1997], окислительном стрессе [Kovtun et al., 2000], действии патогенов [Zhang, Klessig, 1998a; Meskiene, Hirt, 2000], элиситоров [Suzuki, Shinshi, 1995; Ligterink et al., 1997; Kultz, 1998; Zhang et al.,1998] (в том числе харпинов [Adam et al., 1997], криптогеина [Lebrun-Garcia, 1998], олигосахаридов [Zhang et al., 1998]), стрессо­вых фитогормонов жасмоната [Seo et al., 1995; 1999], сали-цилата [Zang, Klessig, 1997; 1998], системина [Meindl et al., 1998], этилена [Meskiene, Hirt, 2000]).

Зависимость функционирования МАР-киназного каска­да от различных воздействий нашла отражение в названиях некоторых МАР-киназ, например WIPK и SIPK (соответст­венно wound-induced protein kinases и salicylate-induced protein

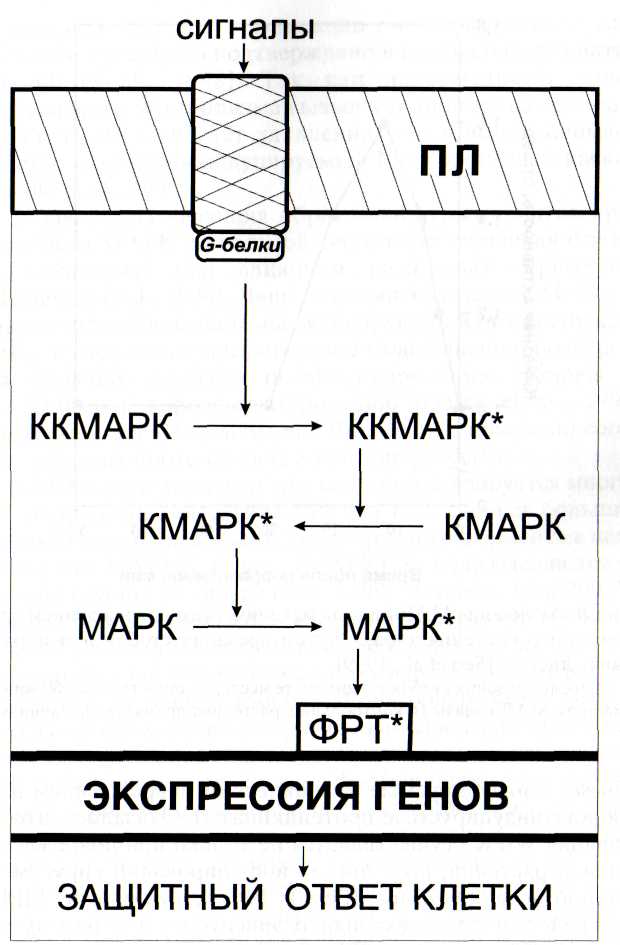
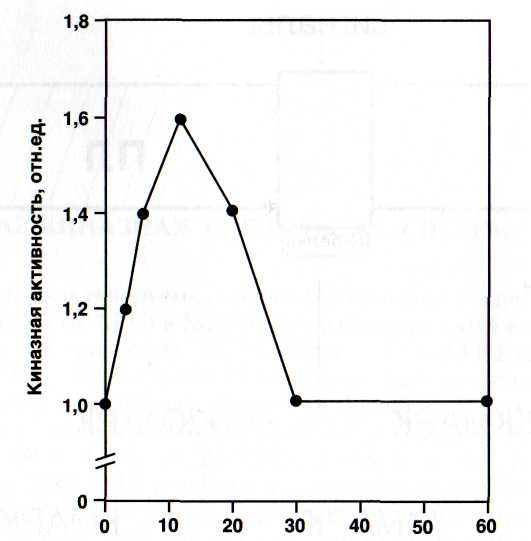


Рис. 8. Схема функционирования МАР-киназной сигнальной си­стемы

ККМАРК - киназа киназы МАР-киназы; КМАРК - киназа МАР-киназы; МАРК - митогенактивируемая протеинкиназа. Остальные обозначения - см. рис. 6



**Время после повреждения, мин**

Рис. 9. Активация МАР-киназы механическим повреждением трех­месячного растения табака путем срезания стебля под первым снизу листом [Seo et al., 1999]

После срезания стебля в этом листе исследовали в течение 60 мин ак­тивность МАР-киназы (в контрольных растениях принятую за единицу)

kinases - индуцируемые механическим повреждением и са-лицилатиндуцируемые протеинкиназы). Оказалось, что ак­тивация WIPK осуществляется не только при повреждении тканей растений, но и при их инфицировании вирусом та­бачной мозаики [Zhang, Klessig, 1998a], а активация SIPK -при действии олигосахаридных элиситоров и белковых эли-ситинов [Zhang et al., 1998].

Активация МАР-киназ носит преходящий характер (рис. 9), наподобие того, что происходит с ферментами и ин-термедиатами других сигнальных систем [Seo et al., 1999].

Интересно, что ранаактивируемая МАР-киназа вызы­вает накопление жасмоната и метилжасмоната, по-види­мому, вследствие активации ФЛА2. Участие МАР-киназной

сигнальной системы в активации липоксигеназного сиг­нального пути было подтверждено в специальных опытах [Meindl et al., 1998]. Так как интермедиаты липо­ксигеназного метаболизма вызывают апоптоз клеток рас­тений, то не вызывает удивления, что в нем принимает участие и элиситориндуцируемый МАР-киназный каскад [Suzuki et al., 1999].

Обнаружена индукция образования транскриптов про-теинкиназ МАРК-сигнальной системы (и связанная с этим их активация) под влиянием различных стрессоров [Mizoguchi et al., 1996]. Чаще всего интермедиаты МАР-ки­назной сигнальной системы активируются или инактивиру-ются за счет посттрансляционной модификации, подверга­ясь главным образом фосфорилированию [Romeis et al.,1999] или дефосфорилированию [Gupta et al., 1998; Meskiene et al., 1998; Meskiene, Hirt, 2000] с помощью соот­ветствующих протеинкиназ и протеинфосфатаз.

МАР-киназная сигнальная система активируется многи­ми внеклеточными сигналами, что объясняется большим разнообразием представителей стартового фермента в цепи киназ. Все МАРКК-киназы (МАРККК) подразделяются на четыре группы [Widmann et al., 1999; Meskiene, Hirt, 2000] в зависимости от особенностей первичной структуры, о кото­рой стало возможным судить после клонирования соответ­ствующих генов. Различия касаются в первую очередь стру­ктуры регуляторного домена, но они обнаружены также в других доменах, таких, например, как zinc zipper (цинковая застежка-молния), лейциновые "застежки", места связыва­ния G-белков, несколько мест фосфорилирования тирози-новых, сериновых и треониновых остатков. Как уже отме­чалось, в соответствии с разнообразием структуры МАРКК-киназ представители этого семейства могут акти­вироваться различными источниками сигналов. Это могут быть другие протеинкиназы - ПКС и МАРКККК, различ­ные G-белки семейств Ras и Rho. MAPKK имеет более огра­ниченные возможности регуляции в связи с меньшей вариа-бильностью структурных элементов этих ферментов. В еще большей степени это касается МАРК. МАРККК ка­тализирует фосфорилирование остатков серина и треонина в МАРКК, а последняя - остатков треонина и тирозина в МАРК. По всей вероятности, МАРКК активирует (путем

фосфорилирования) лишь МАРК. Можно сделать вывод, что в случае с каскадом МАРККК -» МАРКК -» МАРК мы имеем дело с сигнальной "воронкой", с конвергенцией сиг­нальных путей, инициируемых в пределах МАРК-системы различными элиситорами. В этом случае последнее звено этой системы - МАР-киназа, может активировать лишь один тип факторов регуляции транскрипции, вызывая экс­прессию более узкого круга генов, чем можно было бы ожидать, если иметь в виду большое разнообразие МАРККК. МАР-киназа может также катализировать фос-форилирование цитоскелетных белков и фосфолипаз, ак­тивируя их.

К 2000 г. были клонированы гены 17 представителей МАРККК, МАРКК и 28 представителей МАР-киназ из раз­личных видов растений [Ligterink, 2000]. Вполне вероятно, что во взаимодействии этих протеинкиназ определенную роль играют комплексообразующие белки типа scaffold pro­teins.

Как уже отмечалось выше, активация сигнальных сис­тем носит преходящий характер, а это означает, что долж­ны быть эффективные механизмы их самоингибирования. Инактивация МАР-киназной сигнальной системы осущест­вляется, в первую очередь, за счет дефосфорилирования МАРК с помощью протеинфосфатаз. Все имеющие отно­шение к МАР-сигнальному каскаду протеинфосфатазы подразделяются на три группы [Meskiene, Hirt, 2000]: фер­менты двойной специфичности, осуществляющие дефосфо-рилирование остатков тирозина и треонина в МАР-киназах, тирозиновые протеинфосфатазы и серин-треониновые протеинфосфатазы.

**ФОСФАТИДАТНАЯ СИГНАЛЬНАЯ СИСТЕМА**

Следующие три раздела посвящены сигнальным систе­мам, функционирование которых начинается с превраще­ния мембранных фосфолипидов, катализируемого различ­ными фосфолипазами: ФЛД, ФЛС и ФЛА2. Изначально счи­талось, что их активация является главной причиной обно­вления мембранных фосфолипидов при изменении условий существования растений, замены ранее существовавших ли-пидов на более соответствующие новым условиям. В каче­стве примера можно привести замену фосфолипидов с низ­ким содержанием ненасыщенных жирных кислот на фос-фолипиды с высоким их содержанием при понижении тем­пературы. Со временем удалось установить еще одну чрез­вычайно важную функцию фосфолипаз: запуск по крайней мере трех сигнальных систем - фосфатидатной, кальциевой и липоксигеназной.

В последние годы все большее внимание уделяется сиг­нальной системе, "включаемой" активацией фосфолипаз Д под влиянием патогенов, элиситоров и при абиотическом стрессе [Munnik et al., 1998; Wang, 1999] (рис. 10). Так как при этом происходит освобождение из фосфолипидов фос-фатидной кислоты, то эта сигнальная система получила на­звание фосфатидатной [Тарчевский, 2000].

Фосфолипазы Д представляют собой достаточно гете­рогенное семейство белков [Qin et al., 1997; X. Wang, 2000] с большой протяженностью консервативных последователь­ностей аминокислот и с отличающимися участками струк­туры, отвечающими за особенности регуляции каждой из изоформ этого фермента, например за степень активации ионами кальция, инозитолполифосфатами или механиче­ским повреждением тканей [С. Wang, 2000]. Интересно, что последнее воздействие вызывало наивысшую активацию

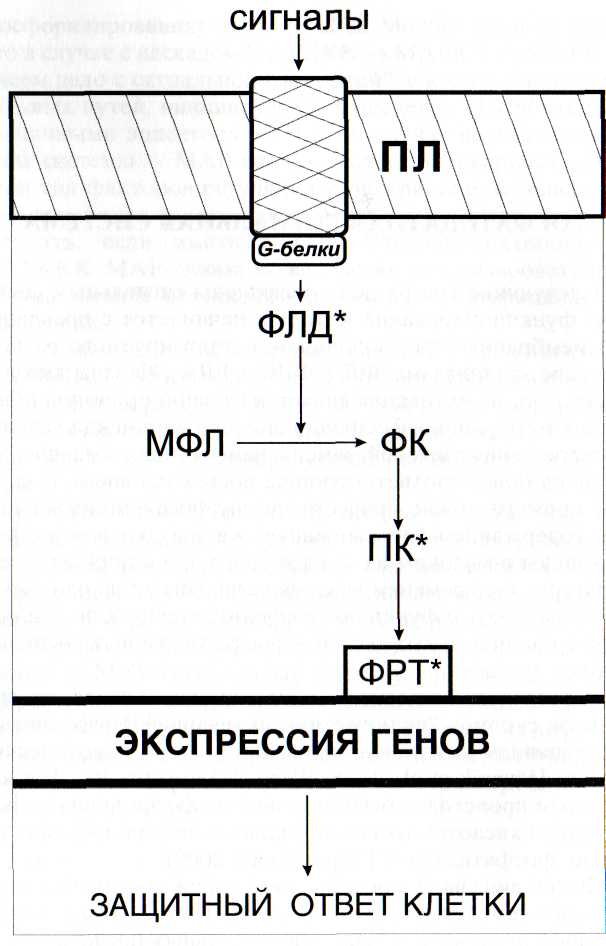


Рис. 10. Схема функционирования фосфатидатной сигнальной си­стемы

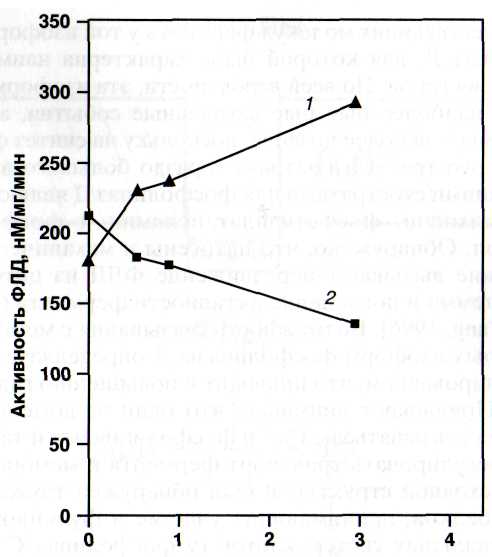
МФЛ - мембранные фосфолипиды; ПК - протеинкиназа; ФК - фос-фатидная кислота; ФЛД - фосфолипаза Д. Остальные обозначения -см. рис. 6

предсуществующих молекул фермента у той изоформы фо­сфолипазы Д, для которой была характерна наименьшая экспрессия генов. По всей вероятности, эта изоформа отве­чает за наиболее быстрые сигнальные события, а другие изоформы - за более поздние, поскольку на синтез фермен­тов de novo требуется затрата гораздо большего времени.

Лучшими субстратами для фосфолипаз Д являются фо-сфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидил-глицерол. Обнаружено, что патогены и механическое по­вреждение вызывают передвижение ФЛД из цитозоля к плазмалемме и повышение активности фермента (рис. 11) [Ryu, Wang, 1996]. Возможность связывания с мембранами некоторых изоформ фосфолипазы Д определяется их ми-ристоилированием, что приводит к повышению гидрофоб-ности. Привлекает внимание, что один из доменов ФЛД способен связываться с Са2+ и фосфолипидами и таким об­разом регулировать транспорт фермента к мембране. До­мен со сходной структурой был обнаружен также у ряда других белков, принимающих участие в функционирова­нии сигнальных систем клеток (у фосфолипаз С и А2, у протеинкиназы С).

Повышают активность части фосфолипаз Д протеинки­наза С, Са2+, тримерные G-белки и малые G-белки, полифо-сфоинозитид; снижают активность лизофосфатиды. Было обнаружено, что преходящее накопление фосфатидатной кислоты происходило и без влияния элиситоров, если на клетки воздействовали активатором G-белков мастопара-ном [Munnik et al., 1995], из чего следует, что в роли сигналь­ного интермедиата между рецептором элиситора и фосфо-липазой Д выступает G-белок.

Различные изоформы фосфолипазы Д имеют отличаю­щиеся оптимальные для проявления активности значения рН. Особый интерес представляет одна из основных изо­форм, которая активируется повышающимися концентра­циями ионов кальция (оптимальные значения для этой изо­формы - от 20 до 100 мМ) и подкислением среды (опти­мальные значения рН от 4,5 до 5,0), т.е. наиболее ранними изменениями в клетках, которые создаются на внутренней поверхности плазмалеммы и на внешней поверхности тоно-пласта при действии на клетки растений различных элиси­торов. Для других изоформ оптимальными являются мик-



**Время после механического повреждения растения, ч**

Рис. 11. Влияние механического повреждения листьев арабидоп-сиса на связывание фосфолипазы Д мембранами [X. Wang, 2000] 1 - фракция мембран (осадок после центрифугирования при 100 000 g надосадочной жидкости, полученной после центрифугирова­ния гомогената листьев при 6000 g); 2 - фракция растворимых соедине­ний, содержащихся в надосадочной жидкости после центрифугирования при 100 000 g. Проводился иммуноблоттинг фосфолипазы Д

ромолярные концентрации ионов кальция и приближающи­еся к нейтральным значения рН.

Сначала у животных, а затем и у растительных объек­тов было обнаружено, что свободная фосфатидная кислота является липидным вторичным мессенджером, который способен активировать ряд белков, включая малый (small) G-белок, Са2+-зависимую и Са2+-независимую протеинкина-зы, МАР-киназы, НАДФН-оксидазу, фосфолипазы С и А2 [Wang, 1999; Sang et al., 2001].

В фосфатидатной системе стимуляция элиситором фос­фолипазы Д, опосредованная активацией G-белка мастопа-

раном, приводит к освобождению из фосфолипидов плазма-леммы фосфатидной кислоты, которая выступает в роли вторичного посредника, от которого сигнальный импульс передается на протеинкиназы и затем на факторы регуля­ции транскрипции, вызывая в конечном итоге экспрессию защитных генов.

Установлено, что фосфатидат способен превращаться в интермедиаты, характерные для других сигнальных путей: в диацилглицерол кальциевого пути, а также в полиеновые жирные кислоты и лизофосфатидную кислоту липоксиге-назного пути.

Оказалось также, что накопление свободной фосфатид­ной кислоты может изменять свойства мембран и, вследст­вие этого, активность связанных с ними участников других сигнальных систем. Обращает на себя внимание, что фос­фатидная кислота является кальциевым ионофором, из че­го следует, что она может оказывать некоторое влияние на функционирование кальциевой сигнальной системы.

КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛЬНАЯ СИСТЕМА

Повышение концентрации ионов кальция в цитозоле яв­ляется одной из наиболее ранних ответных реакций на ин­фицирование патогенами (на действие элиситоров), на ме­ханическое повреждение (или раздражение) и другие стрес­соры. Эта кальциевая "вспышка" носит преходящий харак­тер. Ее восходящая ветвь вызвана открыванием кальцие­вых каналов, расположенных в плазмалемме, вакуолярном тонопласте и в мембранах эндоплазматической сети [Blume et al., 2000]. Во всех трех случаях имеет место чрезвычайно высокий трансмембранный электрохимический градиент Са2+ - в цитозоле концентрация этих ионов при невозбуж­денном состоянии клетки приблизительно в 1000 раз мень­ше, чем в клеточной стенке, вакуоле или в матриксе эндо­плазматической сети, и цитозольная сторона мембран заря­жена отрицательно по сравнению с другой стороной. При открывании кальциевых каналов ионы кальция устремля­ются в цитозоль, и их концентрация повышается в 10-20 раз. Эта кальциевая "вспышка" используется клеткой в ка­честве сигнального интермедиата. В основе сигнальной функции лежит способность ионов кальция взаимодейство­вать с белками. При связывании ионов кальция некоторы­ми остатками аминокислот, например аспартата или глута-мата, происходит изменение заряда соответствующего участка белка и, вследствие этого, конформации белковой молекулы. Это сказывается на ее активности, что и исполь­зуется для передачи элиситорного сигнала на последующие звенья сигнальных цепей.

Так же как и в большинстве других сигнальных систем, в случае кальциевой системы элиситоры связываются с ре­цепторами плазмалеммы (рис. 12), после чего элиситорный импульс трансмембранно передается на комплекс G-бел-

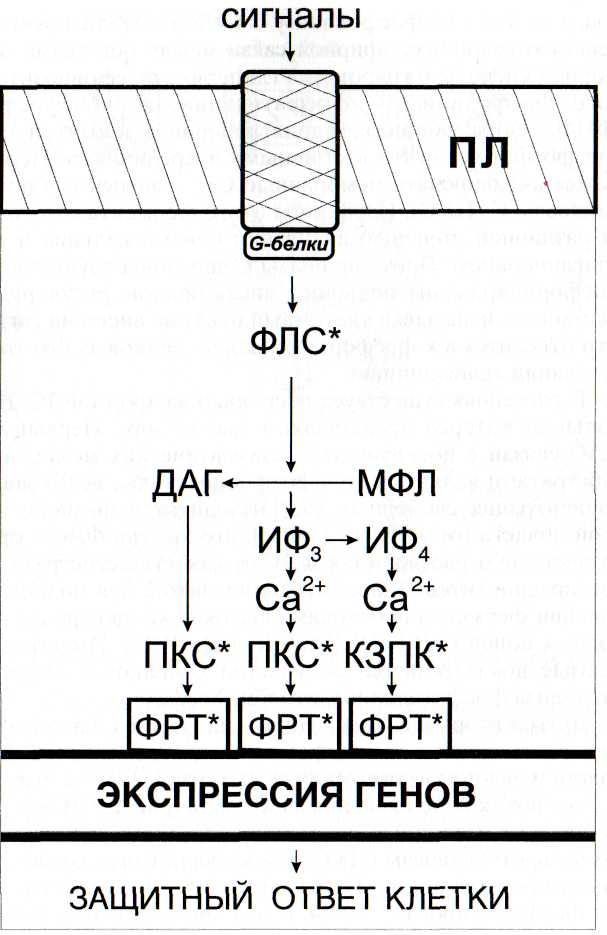


Рис. 12. Схема функционирования кальциевой сигнальной си­стемы

ДАГ - диацилглицерол; ИФ3 - инозитолтрисфосфат; ИФ4 - инози-толтетракисфосфат; КЗПК - кальцийзависимая протеинкиназа, отлич­ная от ПКС; МФЛ - мембранные фосфолипиды; ПКС - протеинкина-зы С; ФЛС - фосфолипаза С. Остальные обозначения - см. рис. 6

ков, а от них - на фосфолипазу С (ФЛС), катализирующую реакцию гидролиза эфирной связи между остатками фос­форной кислоты и гидроксила глицерина фосфоинозитоль-ного фосфолипида - фосфатидилинозитолбисфосфата (ФИФ). Образующиеся диацилглицерин и инозитол-1,4,5-трисфосфат являются вторичными посредниками. Первый может активировать мембранные Са2+ - зависимые проте­инкиназы С (ПКС). Изоформы этого фермента отличают­ся различной степенью активации ионами кальция и диа-цилглицерином. Протеинкиназы С способны осуществлять фосфорилирование большого числа белков, регулируя их активность и вызывая клеточный ответ на внешний сигнал. Это относится и к фосфорилированию белковых факторов регуляции транскрипции.

В растениях существует несколько изоформ ФЛС. Наи­больший интерес представляют две из них. Первый тип ФЛС связан с поверхностью плазматических мембран, ее субстратами являются полифосфоинозитиды, необходимая концентрация свободных Са2+ находится в физиологиче­ской области (от 1 нМ до 1 мкМ); второй тип ФЛС - преи­мущественно растворимая ФЛС, в качестве субстрата для нее предпочтителен фосфатид ил инозитол, для полной ак­тивации фермента необходима высокая концентрация сво­бодных ионов Са2+ (мМ) [Drobak et al., 1996]. Имеются не­прямые доказательства об участии G-белков в индукции гидролиза фосфатидилинозитолбисфосфата.

Другой вторичный посредник - инозитол- 1,4,5-трисфос-фат, взаимодействует с белками кальциевых каналов тоно-пласта и эндоплазматической сети и открывает их, что вы­зывает поток ионов кальция в цитозоль (рис. 13). В нем Са2+ активирует различные ферменты, например кальцийзави-симые протеинкиназы (ПКС) или кальций-кальмодулинзави-симые протеинкиназы (ПКВ), которые, в свою очередь, мо­гут фосфорилировать белки, в том числе факторы регуля­ции транскрипции, и вызвать экспрессию защитных генов. Инозитол-1,4,5-трисфосфат (или продукт его фосфорили-рования - инозитолтетракисфосфат) может повышать кон­центрацию Са2+ в цитозоле, открывая также кальциевые каналы плазмалеммы.

Предполагается, что у животных клеток мономерные трансмембранные белки - рецепторы упомянутых выше

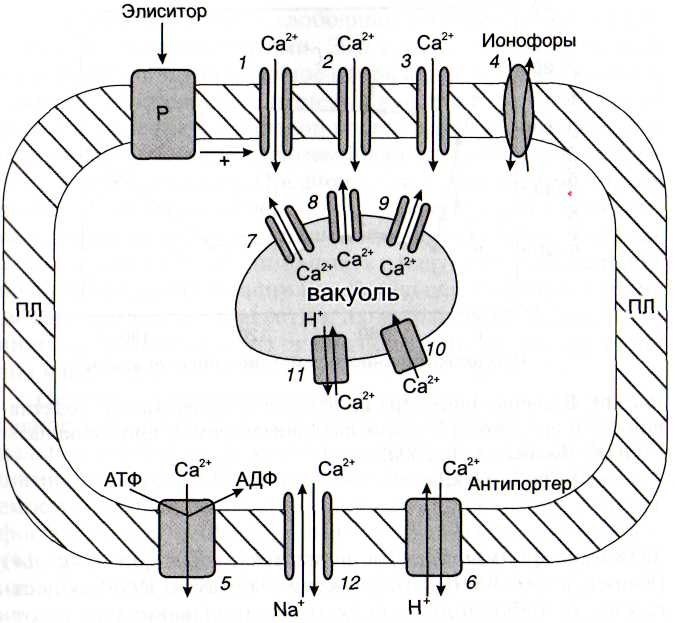
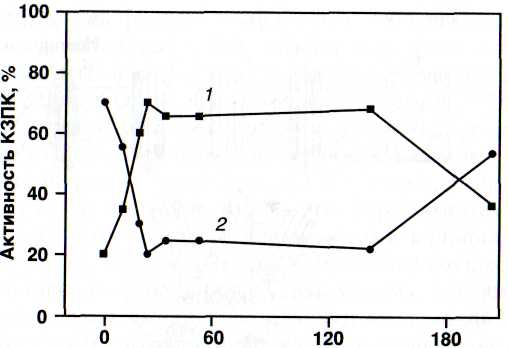


Рис. 13. Влияние элиситоров на кальциевый обмен клеток расте­ний

*1 -* рецепторактивируемый Са2+-канал; 2 - кальциевые каналы, ак­тивируемые ИФ3 и ИФ4; *3 -* потенциалзависимые кальциевые каналы; *4 -* транспортировка ионов Са2+ ионофорами; 5 - Са +-АТФазы плазма-леммы; *6 -* Са /Н+-антипортер плазмалеммы; 7 - кальциевые каналы, активируемые ИФ3; *8* - кальциевые каналы, активируемые цАДФР; 9 -кальциевые каналы, активируемые протеинкиназами; *10* - Са2+-АТФазы тонопласта; *11 -* Са2+/Н+-антипортер тонопласта; *12 -* Ca2+/Na+-o6-менник; ПЛ - плазмалемма; Р - рецептор

инозитолфосфатов, после взаимодействия с ними образуют тетрамерные каналы, осуществляющие вброс ионов каль­ция в цитозоль [Крутецкая, Лебедев, 2001].

Недавно обнаружено новое семейство кальцийзависи-мых протеинкиназ (КЗПК), отличных от ПКС. Показано, что под влиянием элисторов может происходить вызван­ная фосфорилированием фермента трансформация его не-



**Продолжительность действия элиситора, мин**

Рис. 14. Влияние элиситора на изменение содержания неактив­ной (7) и активной (2) форм кальцийзависимой протеинкиназы (КЗПК) [Romeis et al., 2000] 7-70 кДа; 2-68 кДа

активной формы 68 кДа в активную 70 кДа (рис. 14) [Romeis et al., 2000]. Предложена [Trewavas, 1999] сущест­венная модификация этой схемы, основывающаяся на от­носительно медленном передвижении ионов кальция в ци-тозоле, как было показано в опытах с использованием инъекции меченого кальция в гигантский аксон кальмара. Причинами могло быть интенсивное связывание ионов кальция белками и обратный перенос избытка ионов каль­ция Са2+-активируемыми АТФазами. Новая схема распро­странения кальциевой волны в клетках предполагает, что после открывания кальциевого канала у его отверстия происходит накопление относительно медленно диффун­дирующих ионов кальция, что вызывает активацию в этой области мембраносвязанной фосфолипазы С. Освобожда­ющийся в результате фосфолипазной реакции инозитол-трисфосфат подвижен и, диффундируя от места образова­ния, может достигать соседних кальциевых каналов, свя­зываться с ними и открывать их. Необходимо иметь в ви­ду, что белки каналов имеют места связывания не только ИФ3, но и ионов кальция. Предполагается, что при локаль­ном передвижении от соседнего открытого кальциевого

канала они достигают свободных кальцийсвязывающих мест и захватываются ими. Это вносит дополнительный вклад в ИФ3-индуцированное открывание и поддержание в открытом состоянии кальциевых каналов. Так происходит распространение кальциевой волны вдоль мембраны и од­новременно, местное (примембранное) повышение содер­жания ионов кальция. Предполагается, что этот механизм проявляется в том случае, когда концентрация элиситора невелика и лимитирует количество активируемых кальци­евых каналов. Необходимо иметь в виду, что значительное повышение концентрации ионов кальция в цитозоле вбли­зи каналов может привести к их закрыванию и ограниче­нию поступления Са2+ из окружающей среды или органои­дов в цитозоль.

Передача элиситорного сигнала в геном клеток, интен­сивность и направленность функционирования этой сиг­нальной системы осложнена различными деталями, касаю­щимися природы элиситоров, большей или меньшей атаку-е мости фосфолипазой С различных молекулярных видов фосфолипидов, особенностями строения изоформ белков -участников сигнальной системы, различиями вклада каль­циевых каналов плазмалеммы и различных органелл клет­ки в кальциевую "вспышку", наконец, вероятной "класте­ризацией" кальциевых каналов и кальцийзависимых Са2+-АТФаз и удаленностью друг от друга этих кластеров |Trewavas, 1999]. Недавно была высказана гипотеза [Олов-ников, 2001] о существовании во внутренней ядерной мемб­ране животных клеток кластеров специальных, например кальциевых каналов, с помощью которых осуществляется локальное (фонтанное) изменение концентрации ионов вблизи определенных генов и таким образом происходит специфическая регуляция их экспрессии. Топографическая специфичность регуляции генов могла бы осуществляться с помощью специальной фонтанной РНК (фРНК) и так на­зываемых фионов - участков ДНК, способных связывать фРНК. Вброс порции ионов в ядро происходит с помощью комплекса фион-фРНК-белок ионного канала внутренней мембраны ядерной оболочки.

Имеется ряд обзорных работ [Gilroy et al., 1993; Poovaiah, Reddy, 1993; Bush, 1995; Trewavas, Malho, 1997; Ткачук, 1998; Sanders et al., 1999; Trewavas, 1999; Bowler, Fluhr, 2000; White,

2000; Reddy, 2001], посвященных сигнальной функции ионов кальция, в которых анализируются особенности функционирования структур, обеспечивающих как повы­шение концентрации ионов кальция в цитозоле (кальцие­вые каналы), так и снижение - до исходного уровня с помо­щью связывания избытка ионов кальция белками, разруше­ния (дефосфорилирования) ИФ3 и вследствие этого закры­вания кальциевых каналов, а также с помощью ионных помп, перебрасывающих ионы кальция обратно против гра­диента концентрации за счет использования энергии гидро­лиза макроэргических фосфатных связей АТФ (см. рис. 13).

У высших растений охарактеризованы различные Са2+-каналы, по которым Са2+ транспортируется через плазматические мембраны, тонопласт, мембраны эндоплаз-матической сети, хлоропластов и ядер [White, 2000]. Эти ка­налы подразделяются на несколько групп, в зависимости от их электрических характеристик. Они в разной степени чув­ствительны к верапамилу и La3+. В функционирование сиг­нальных путей вовлечены главным образом, кальциевые каналы, активируемые деполяризацией мембран от -140 мВ до менее отрицательных значений, что, по-видимому, при­водит к изменению конформации белков кальциевых кана­лов и их открыванию. Элиситор-активируемые каналы вы­делены в отдельную группу [White, 2000].

ИТФ3- и цАДФрибоза-управляемые каналы найдены в мембранах ЭПР и вакуолей растений, тогда как в клетках животных ИТФ3 и цАДФрибоза индуцируют выход Са2+ только из ЭПР. Обнаружено, что разные типы стрессоров индуцируют выход Са2+ в цитозоль из разных внутрикле­точных компартментов [Reddy, 2001].

Последующее за "кальциевой вспышкой" снижение кон­центрации Са2+ в цитозоле является обязательным условием функционирования кальциевой сигнальной системы. Более того, длительное сигналиндуцированное повышение концен­трации ионов кальция может привести к гибели клеток.

Существует несколько механизмов понижения уровня Са2+ в цитозоле. Оно может осуществляться за счет связы­вания Са2+ кальмодулином и другими белками. Са2+-связывающие белки, обнаруженные в растениях, под­разделяются на четыре группы: 1) кальмодулин (КМ); 2) КМ-подобные белки с кальцийсвязывающими доменами;

3) Са2+-регулируемые протеинкиназы; 4) белки без специ­фического Са2+- связывающего домена.

У животных клеток одна молекула кальсеквестрина, не имеющая такого домена, связывает до 43 ионов кальция за счет их взаимодействия с остатками аспарагиновой и глута-миновой кислот. Каждая молекула другого активного бел­ка - кальретикулина, связывает ионы кальция с помощью специального домена [Крутецкая, Лебедев, 2001].

Привлекают все большее внимание аннексины -Са2+-связывающие белки, взаимодействующие с кислыми фосфолипидами в присутствии Са2+. Некоторые аннексины способны образовывать ионные каналы в искусственных мембранах [Минкин и др., 1998]. Показано, что аннексины Arabidopsis thaliana участвуют в защите от окислительного стресса [Gidrol et al., 1996].

Пожалуй, основной вклад в снижение концентрации ионов кальция в цитоплазме играют закрывание кальциевых каналов в результате гидролиза ИФ3 специфическими фос-фатазами и активация кальциевых насосов (Са2+-АТФаз), которые за счет энергии гидролиза АТФ переносят ионы кальция в обратном направлении против градиента концен­трации, восстанавливая исходные значения градиента Са2+ и is связи с этим способность клеток воспринимать новый эли-ситорный сигнал. Са2+-АТФазы характеризуются высоким сродством к Са2+.

В растениях найдены различные Са2+-АТФазы, принад­лежащие в том числе к автоингибирующемуся (АСА) типу (которые регулируются комплексом Са2+-кальмодулин). АСА-тип Са2+-АТФаз растений локализуются в ЭПР и плазматических мебранах, тогда как в животных клетках этот тип АТФаз локализован исключительно на плазмати­ческих мембранах. Активность АСА-типа Са2+-АТФаз ЭПР в Arabidopsis ингибируется Са2+-зависимой протеинкиназой | Hwang et al., 2000]. Обнаружены зависимые и независимые от кальмодулина Са2+-АТФазы. Установлен элиситоринду-цированный синтез кальмодулин-стимулируемой кальцие­вой АТФазы плазмалеммы [Chung et al., 2000].

Еще один механизм снижения содержания ионов каль­ция в цитозоле - их удаление в процессе работы Са2+/Н+ ан-типортеров, использующих для этого энергию гидролиза АТФ. Роль кальциевых каналов и кальциевых помп в мем-

бранах клеток растений была экспериментально обоснова­на опытами с использованием специфических ингибиторов [Scheel, 1998].

Возникает вопрос, существует ли в растениях еще один механизм удаления Са2+ из цитозоля, характерный для кле­ток животных после их возбуждения, с помощью Na+/ Са2+-обменника, обладающего низким сродством к Са2+, но высокой скоростью переноса - около 20 нМ на 1 мг мембранного белка в секунду при 300 °С? Функционирова­ние этого белка-переносчика осуществляется за счет энер­гии трансмембранного градиента Na+ и мембранного потен­циала. На клетках водорослей получены данные о противо­положно направленных трансмембранных потоках Са2+ и Na+, характеристики которых свидетельствуют о сходстве их с функциональными характеристиками Na+/Ca2+-o6MCH-ника животных клеток [Karimova et al., 2000].

В клетках растений существуют еще два органоида, в которых концентрация ионов кальция может достаточно сильно изменяться, - хлоропласты и митохондрии; однако это в значительной степени автономные образования со своими системами поддержания ионного гомеостаза. До сих пор неясно, в какой степени они участвуют в элиситоринду-цированном изменении концентрации ионов кальция в ци­тозоле. Есть надежда, что этот вопрос будет разрешен с ис­пользованием специально сконструированных для этой це­ли трансгенных растений. Необходимо отметить, что воп­рос о вкладе митохондрий в функционирование кальциевой сигнальной системы у животных клеток решается положи­тельно. Более того, считается, что они принимают актив­ное участие в сигнальных внутриклеточных процессах [Крутецкая, Лебедев, 2001], что они могут освобождать Са в цитозоль с помощью Na+/ Са2+-обменника внутрен­ней мембраны и поглощать, используя Са2+-унинортер.

Для измерения концентрации ионов кальция в цитозоле и других компартментах используют селективные электро­ды, красители, а также трансгенные растения с привнесен­ным геном экворина - Са2+-зависимого флуоресцентного белка. Использование таких трансгенных растений позво­лило установить, что сигналиндуцированное преходящее повышение содержания ионов кальция в цитозоле приводит к быстрому и преходящему возрастанию их концентрации в

митохондриях, что может быть предотвращено предобра­боткой разобщителями электронного транспорта и фосфо-рилирования [Rizzuto et al., 1992]. Установление этого фак­та позволяет подойти к объяснению до сих пор еще не очень ясного механизма передачи элиситорного сигнала, рецептируемого плазмалеммой, в хлоропласты и митохонд­рии. Получение трансгенных растений с химерным геном экворина и ядерного белка нуклеоплазмина позволило ус­тановить, что сигналиндуцированное повышение содержа­ния Са2+ происходит не только в цитозоле, но и в ядре [Van der Luit et al., 1999].

Как уже отмечалось, в целом ряде опытов было показа­но, что сигналиндуцированное возрастание концентрации ионов кальция в цитозоле объясняется активацией кальци­евых каналов не только плазмалеммы, но и внутренних вместилищ ионов кальция [Knight et al., 1996; Mori et al., 1998].

В опытах с активатором G-белков мастопараном было обнаружено, что устранение внешнего пула Са2+ могло не ингибировать кальциевого "всплеска" в цитозоле, из чего был сделан вывод об активации кальциевых каналов мемб­ран органелл [Takahashi et al., 1998]. Подавление эффекта с помощью ингибитора неомицина позволило сделать вывод об участии в этом процессе фосфоинозитидов.

В настоящее время интенсивно обсуждаются возможно­сти автокаталитических и автосупрессорных процессов в кальциевой сигнальной системе. Большой интерес вызвали сообщения о том, что если незначительное повышение кон­центрации ионов кальция в цитозоле стимулирует, то силь­ное - ингибирует индуцируемое инозитол-1,4,5-трисфосфа-том открывание кальциевых каналов. Обнаружен Са2+-ин-дуцируемый синтез белка кальмодулина, который образует с ионами кальция комплекс, принимающий участие в акти­вации различных белков, в том числе протеинкиназ [Romeis et al., 1999], и через них - факторов регуляции транскрип­ции. В растениях существуют и кальмодулин-независимые, но Са2+-зависимые протеинкиназы, имеющие у С-конца до­мен, по своей структуре близкий к структуре кальмодулина и способный связывать ионы кальция, что приводит к акти­вации протеинкиназы без участия молекулы кальмодулина | Harper etal., 1991].

В последнее время у животных объектов обнаружена не только инозитол-1,4,5-трисфосфатная, но еще одна ветвь кальциевой сигнальной системы - инозитол-3,4,5-трисфос-фатная, причем предполагается возможность ее функцио­нирования и в клетках растений [Munnik et al., 1995; 1998]. Оказалось, что изменение местоположения одной из фос­фатных групп существенно изменяет набор белков, кото­рые являются мишенями для инозитолтрисфосфата и кото­рые активируются им.

Возможность регуляции функционирования цитоскеле-та с помощью кальциевой сигнальной системы - одна из ак­туальных задач физиологии растений. Имеются данные, по­зволяющие считать, что действие на микротрубочки и мик-рофиламенты изменения концентрации ионов кальция опо­средовано кальмодулином и кальцийзависимыми протеин-киназами. Динамическое состояние микротрубочек в значи­тельной степени зависит от фосфорилирования-дефосфо-рилирования связанных с ними белков. Ингибирование про-теинкиназ индуцировало стабилизацию микротрубочек в суспензионной культуре клеток табака при гипотермии. Из­менения в цитоскелете могут иметь существенные послед­ствия для клетки, так как от него зависит движение цито­плазмы, ориентация отложения микрофибрилл целлюлозы в клеточную стенку [Тарчевский, Марченко, 1987; Tarchevsky, Marchenko, 1991], транспортные процессы и т.д

Изменения ионных потоков наблюдаются в клетках не только при действии на них патогенов (и патогенпродуци-руемых элиситоров), но и при симбиотическом взаимодей­ствии азотфиксирующих бактерий и бобовых растений, в результате которого появляются узелки на корнях. Один из наиболее быстрых ответов растений на действие вызы­вающих образование корневых узелков (nodules) липохи-тоолигосахаридов (Nod-факторов) - это повышение в ци­топлазме концентрации ионов кальция, а также протонов [Cardenas et al., 1999; 2000]. Показательно, что кальциевый ионофор А-23187 по своему действию на образование кор­невых узелков приближался к эффекту Nod-факторов [Felle et al., 1998].

Рецепторы Nod-факторов могут быть непосредственно связаны с Са2+ и С1-каналами [Cardenas et al., 2000]. Альтер­нативное мнение заключается в том, что вход кальция - это

следующее звено за гетеротримерным G-белком (о чем сви­детельствуют опыты с активаторами этих белков мастопа-раном и пертуссиновым токсином) и фосфолипазой С (опы­ты с ингибитором фермента - неомицином). В первом слу­чае наблюдалась индукция, а во втором - ингибирование эффекта Nod-факторов [Pingret et al., 1998].

**ЛИПОКСИГЕНАЗНАЯ СИГНАЛЬНАЯ СИСТЕМА**

Известно, что многие мембранные липиды (в особенно­сти фосфолипиды) могут освобождать входящие в их состав жирные кислоты в ходе реакций, катализируемых липаза­ми, например фосфолипазами А2. Фосфолипазы А2 активи­руются патогенами, стрессовыми фитогормонами, элисито-рами, абиогенными стрессорами [Mueller et al., 1993; Creelman, Mullet, 1995; Conconi et al., 1996; Гречкин, Тарчев-ский, 1999]. Освободившиеся из сложных липидов линоле-вая и особенно линоленовая кислоты являются субстратами липоксигеназной сигнальной системы (рис. 15). Ее название обязано ферментам, катализирующим присоединение мо­лекулярного кислорода к одному из атомов углерода *цис,* цис-пентадиенового радикала жирных кислот в клетках ми­кроорганизмов, растений и животных. В результате проис­ходит образование гидропероксидного производного, у ко­торого наблюдается изменение г<мс-конфигурации двойной связи в транс-конфигурацию. Большинство растительных липоксигеназ отличается высокой специфичностью, окис­ляя линолеат и линоленат по положению С-9 или С-13 (9- и 13-липоксигеназы). Наиболее отзывчиво изменение экс­прессии и активности 13-липоксигеназ [Eiben, Slusarenko, 1994; Royo et al., 1996]. Субстратами липоксигеназ могут быть не только свободные ненасыщенные жирные кисло­ты, но и находящиеся в составе запасных триацилглицери-нов [Feussner et al., 1997а] и фосфолипидов [Brash et al., 1987] (рис. 16).

Гидроперекиси жирных кислот в ходе пероксигеназной реакции с ненасыщенными кислотами превращаются в эпо­ксидные формы и гидроксипроизводные (рис. 17) [Vick, Zimmerman, 1987; В1ее,1996]. Это путь синтеза мономерных субстратов гетерополимера кутина [В lee, 1995] - основного

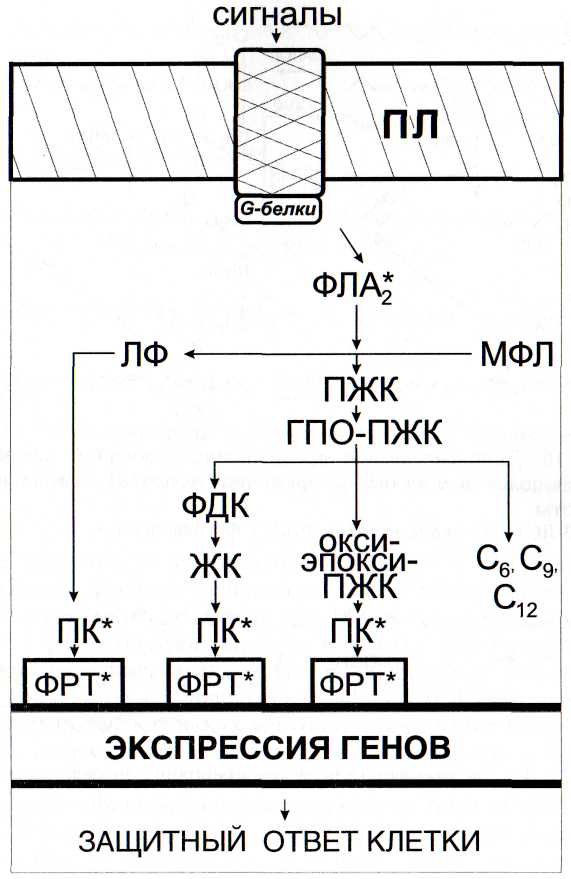
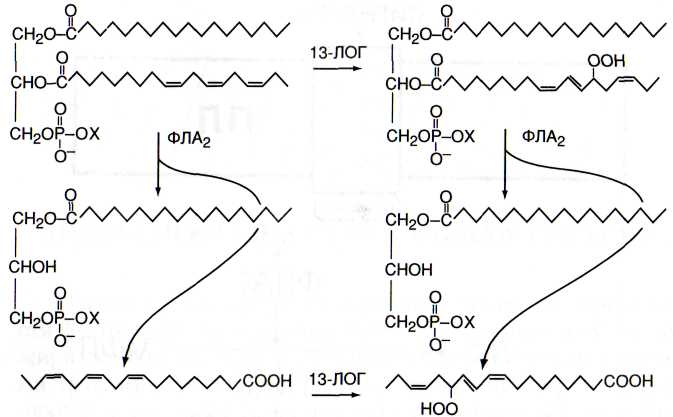


Рис. 15. Схема функционирования липоксигеназной сигнальной системы

ГПО-ПЖК - гидропероксиформы полиеновых жирных кислот; ЖК — жасмоновая кислота; ЛФ — лизофосфатиды; МФЛ — мембранные фосфолипиды; ПЖК - полиеновые жирные кислоты; окси-эпокси-ПЖК - гидроксилированные и эпоксидированные формы ПЖК; ПК *-*протеинкиназы; ФДК - фитодиеновая кислота; ФЛА2 - фосфолипаза А7; С6, С9, С12 - шести-, девяти- и двенадцатиуглеродные продукты лиазных реакций превращения ГПО-ПЖК. Остальные обозначения - см. рис. 6



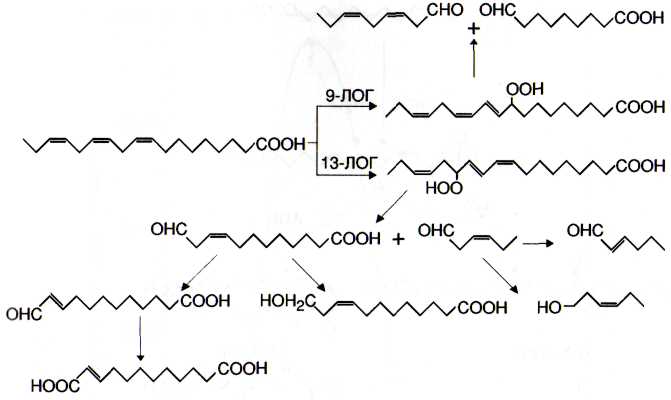


Рис. 16. Липоксигеназное превращение свободной (слева) и находящейся в составе фосфолипида (справа) линоленовой кислоты

13-ЛОГ - 13-липоксигеназа; ФЛА2 - фосфолипаза А2

Рис. 18. Гидропероксидлиазные реакции липоксигеназного мета­болизма

9-ЛОГ и 13-ЛОГ - соответственно 9- и 13-липоксигеназы

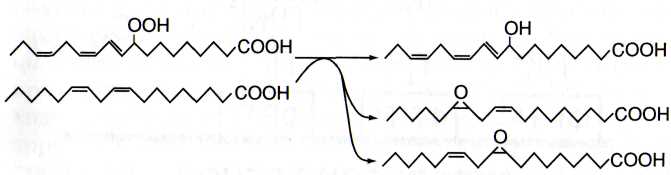


Рис. 17. Пероксигеназные реакции превращения гидроперокси-линолената

компонента кутикулы, являющейся защитным покровом надземных органов растений.

Важную роль в липоксигеназном метаболизме играют гидропероксидлиазы высших растений, катализирующие превращение 9-гидропероксилинолеата или 9-гидроперок-силинолената в С9-альдегиды и С9-альдокислоты (рис. 18), а также 13-гидропероксилинолеата или 13-гидропероксили-нолената в С6-альдегиды и С12-альдокислоты [Gardner, 1991]. С6- и С12-соединения могут играть важную роль в за-

щите растений от патогенов и адаптации к абиогенным стрессорам. К числу физиологически активных раститель­ных оксилипинов относятся 2(2)-додецен-1,12-дикарбокси-ловая (травматиновая) кислота и 12-оксо-10(Е)-додецено-вая кислота (травматин), идентифицированные ранее как раневые гормоны [Zimmerman, Coudron, 1979]. Они способ­ны индуцировать деление клеток и образование каллуса в местах повреждения растения. Еще одно близкое по струк­туре соединение - 12-гидрокси-9(2)-додеценовая кислота, было идентифицировано в экспериментах in vitro с пророст­ками гороха [Гречкин и др., 1987]. Она является активным стимулятором роста, вызывая прирост биомассы каллуса сои до 400% по сравнению с контролем. Продуктами актив­ности 13-гидропероксидлиазы также являются С6-альдеги-ды. Эти соединения, придающие специфический запах свежескошенной траве - 3(2)-гексеналь, 2(Е)- и 3(Е)-гексе-нали, образуются уже через 15 с после механического повреждения листьев [Hildebrand et al., 1990], а так же как продукты их восстановления - гексенолы (см. рис. 18). Под влиянием 9-гидропероксидлиазы из линолевой кислоты появ­ляется еще одна группа летучих 9-углеродных соединений

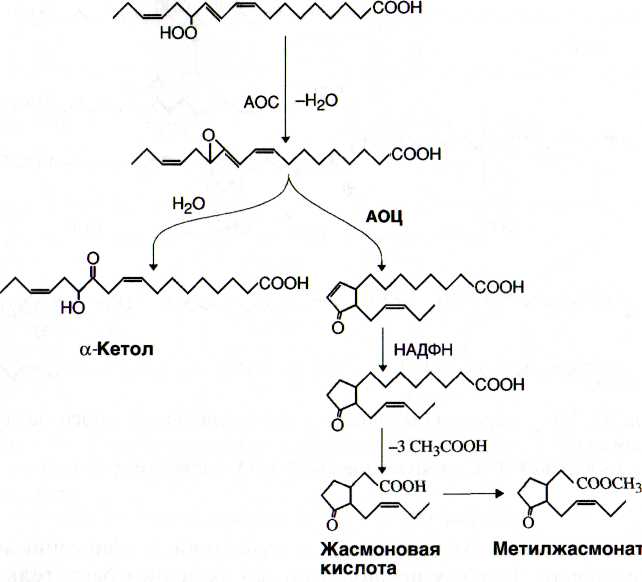


Рис. 19. Реакция образования кетола и жасмоната из гидропер-оксилинолената

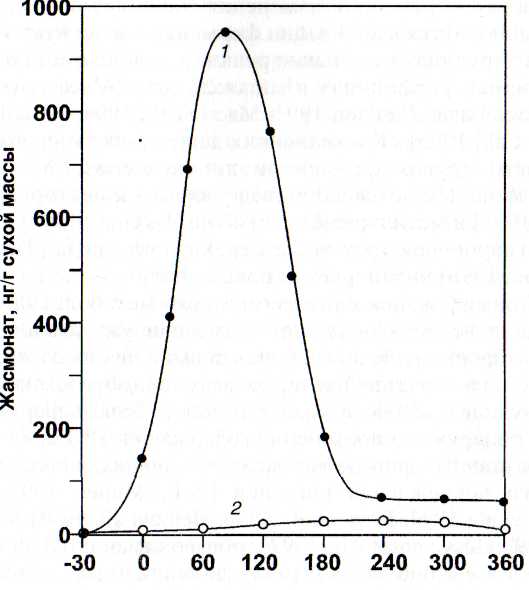
АОС - алленоксидсинтаза; АОЦ - алленоксидциклаза

(обусловливающих запах разрезанного огурца) - 2(Е)-ноне-наль и 3(2)-ноненаль. Линоленовая кислота образует 3(Z), 6(2)-нонадиеналь и 2(Е), 6(2)-нонадиеналь.

Обнаружено превращение летучих альдегидов в нелету­чие: 4-гидрокси-2-гексеналь и 4-гидрокси-2-ноненаль, обла­дающие свойствами физиологически активных соединений [Gardner, Hamberg, 1993; Takamura, Gardner, 1996].

Алленоксидсинтаза катализирует образование кетолов [Grechkin et al., 1991a], способных затормаживать развитие патогенов (рис. 19).

13-Гидропероксилиноленат в ходе нескольких реакций может претерпевать циклизацию с образованием 12-оксо-10,15(7)-фитодиеновой кислоты. В результате восстановле­ния двойной связи в цикле и ^-окисления она превращается



**Время воздействия элиситора, мин**

Рис. 20. Элиситориндуцированное образование жасмоната [Mueller et al., 1993]

*1 -* элиситор (гидролизат клеточных стенок дрожжей); *2* - контроль

в жасмоновую кислоту, причисляемую к стрессовым фито-гормонам (см. рис. 19).

Изменение содержания жасмоната под влиянием элиси-торов имеет одновершинный характер (рис. 20).

Сравнительно недавно были выявлены необычные ок-силипины, содержащие простую эфирную связь в своих уг­леводородных цепях, - дивиниловые эфиры: колнелевая и колнеленовая [Galliard, Chan, 1980], а также этеролевая и этероленовая кислоты [Grechkin et al., 1995; Grechkin, Hamberg, 1996; Grechkin et al., 1997].

Абиотические и биотические стрессоры вызывают сильную активацию липоксигеназного пути. Причина по-

вышения содержания и изменения соотношения оксилипи-нов заключается в активации ферментов, в первую очередь катализирующих начальные реакции липоксигеназного ме­таболизма: фосфолипаз и липоксигеназ [Maccarone et al., 1992; Sembdner, Parthier, 1993; Macri et al., 1994; Rosahl, 1996; Royo et al., 1996]. К сожалению, данных об изменениях ак­тивности других ферментов липоксигеназной системы очень мало. Имеются лишь сведения, что элиситоры [Kondo et al., 1995] и метилжасмонат [Adviushko et al., 1995] активи­руют гидропероксидлиазу, а перекись водорода [Takamura, Gardner, 1996] ингибирует пероксигеназу.

Интенсификация липоксигеназного метаболизма осуще­ствляется не только за счет активации уже имеющихся в клетках ферментов, но и за счет повышения их содержания, вызванного индукцией экспрессии генов (образования соот­ветствующих мРНК и с их помощью белков-ферментов). Было обнаружено повышение содержания мРНК, кодирую­щих различные формы липоксигеназ, под влиянием механи­ческого повреждения растений [Bell, Mullet, 1991; 1993; Geerts et al., 1994; Royo et al., 1996; Heitz et al., 1997; Mauch et al., 1997; McConn et al., 1997], обезвоживания [Bell, Mullet, 1991; Maccarrone et al., 1995], повышенных температур [Maccarrone et al., 1992], патогенов [Melan et al., 1993; Peng et al., 1994; Veronesi et al., 1996; Schweizer et al., 1997], абсцизо-вой кислоты [Maccarrone et al., 1995], жасмоновой кислоты [Veronesi et al., 1996; Schweizer et al., 1997], метилжасмоната [Bell, Mullet, 1991; 1993; Melan et al., 1993], гибберелловой ки­слоты [Veronesi et al., 1996], ограничения потребления асси-милятов репродуктивными органами [Jensen et al., 1997] и т.д. При этом тот или иной стрессор или сигнал может вызывать неодинаковую интенсивнось и временной ход накопления транскриптов различных форм липоксигеназ [Eiben, Slusarenko, 1994; Royo et al., 1996; Saravitz, Siedow, 1996].

Активация процессов транскрипции генов, кодирующих липоксигеназы, приводит к повышению интенсивности ок-сигенирования свободных и эстерифицированных (находя­щихся в составе галактолипидов и фосфолипидов) ненасы­щенных жирных кислот, а также дальнейших превращений их оксигенированных форм.

Многие исследователи нашли, что гидроперокси- и гид-роксипроизводные линолевой и линоленовой кислот, обра-

зующиеся в инфицированных растениях, обладают антими­кробным действием [Kato et al., 1992; Namai et al., 1993]. Сре­ди них самая высокая фунгицидная активность у гидропер­окси- и гидроксикислот [Kato et al., 1983; 1986]. Антимикроб­ные свойства обнаружены также у эпокси- и эпоксигидрок-сипроизводных линолевой и линоленовой кислот [Kato et al., 1986; и др.]. Гексенали и гексенолы являются одними из наиболее важных антимикробных [Croft et al., 1993; Deng et al., 1993] и антигрибных [Hamilton-Kemp et al., 1992; Vaughn, Gardner, 1993] агентов, обеспечивающих первичную хими­ческую защиту раневой поверхности растения от атаки па­тогенов [Croft et al., 1993]. Примечательно, что *транс-2-гек-*сеналь обладает большей бактерицидной активностью, чем цмс-3-гексеналь. Нонадиенали также обладают бактери­цидными и фунгицидными свойствами [Hamilton-Kemp et al., 1992; Vaughn, Gardner, 1993]. Фунгицидную активность про­являет 13-оксо-тридека-9,11 -диеновая кислота, образующа­яся в растениях под влиянием элиситоров [Kondo et al., 1995].

Оксилипины участвуют в механизмах защиты не только против инфекции, но и листогрызущих насекомых [Doss et al., 1989; Farmer, Ryan, 1990; Howe et al., 1996]. Имеются све­дения о том, что у некоторых видов растений сигналом, вы­зывающим защитную реакцию в ответ на атаку насекомых, является жасмонат [Farmer, Ryan, 1990; Howe et al., 1996]. В растениях люцерны был обнаружен макролактон [Doss et al., 1989] упоминавшейся ранее 12-гидрокси-9^)-додецено-вой кислоты, определяющий устойчивость люцерны по от­ношению к насекомому-вредителю Medicago rugosa Desr.

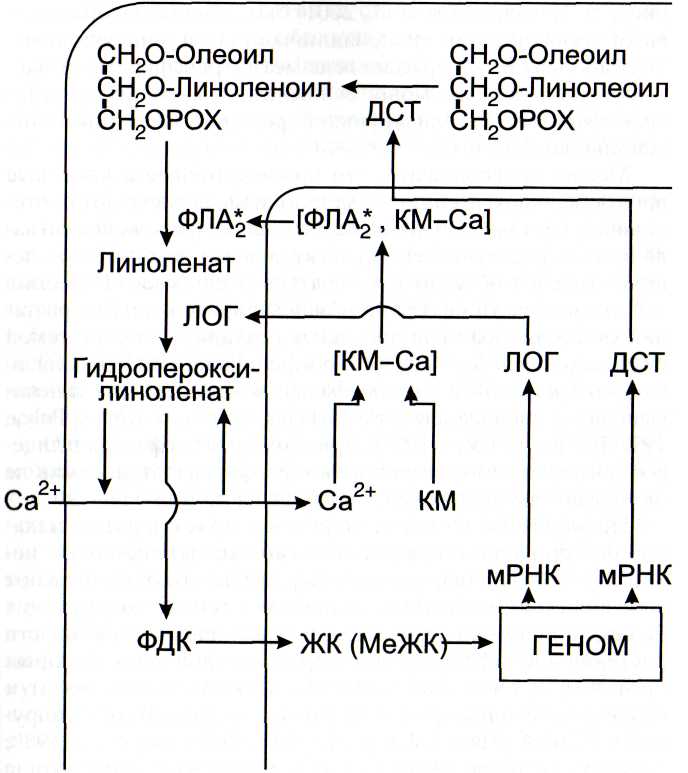
Важен вопрос о внутриклеточной локализации различ­ных реакций липоксигеназного метаболизма. В большинст­ве клеток растений эта сигнальная цепь начинается в плаз-малемме и продолжается в цитоплазме. Однако в клетках, содержащих хлоропласты, ситуация сильно осложняется. Дело в том, что хлоропласты являются основным вместили­щем полиеновых жирных кислот (входящих главным обра­зом в состав галактолипидов), которые освобождаются при повышении активности липазных реакций, вызванном, на­пример, атакой патогенов [Marechal et al.,1997]. В хлоропла-стах имеется набор ферментов, участвующих в образовании интермедиатов липоксигеназной сигнальной системы: деса-

туразы жирных кислот [Nishiuchi et al.,1997], липоксигена-зы, алленоксидсинтазы [Song et al., 1993; Laudert et al., 1996; Maucher et al., 2000; Froehlich et al., 2001], алленоксидцикла-зы [Ziegler et al., 2000], лиазы гидропероксипроизводных по-лиеновых жирных кислот fBlee, Joyard, 1996; Zhuang et al., 1996; Froehlich et al., 2001]. Все перечисленные ферменты имеют ядерное происхождение, и при транспорте в хлоро-пласты от первых трех отщепляется сравнительно неболь­шой "транзитный" полипептид [Ziegler et al., 2000; Froehlich et al., 2001]. Четвертые не имеют транзитного фрагмента и поэтому не могут проходить внутрь хлоропласта через внешнюю мембрану оболочки [Froehlich et al., 2001]. Место локализации первых двух - мембраны тилакоидов, треть­их - внутренняя мембрана оболочки хлоропластов, четвер­тых - цитоплазматическая поверхность внешней мембраны оболочки. Давно установлено, что индукция синтеза неко­торых ферментов липоксигеназного метаболизма биотиче­скими и абиотическими стрессорами в большей степени ха­рактерна для хлоропластных изоформ (например, липокси-геназ [Bell, Mullet, 1993; Maccarrone et al., 1994; Bell et al., 1995; Heitz et al., 1997; Voros et al., 1998]). Все это позволяет считать, что хлоропласты могут вносить существенный вклад в функционирование липоксигеназной сигнальной си­стемы и в формирование адаптационного синдрома в фото-синтезирующих клетках. Имеются основания полагать, что алленоксидциклазное и гидропероксидлиазное направления липоксигеназного метаболизма обеспечиваются в хлоро-филлсодержащих клетках главным образом хлоропласта­ми. До сих пор не решено, каким образом "включается" ли-поксигеназный метаболизм хлоропластов, особенно в тех случаях, когда рецептор внешнего химического сигнала ло­кализован в плазмалемме. Неясно, какова природа сигна­лов, участвующих в быстрой передаче информационного импульса от плазмалеммы к хлоропластам. Относительно недавно обнаружено, что при действии патогенов, элисито-ров и механического повреждения тканей листьев происхо­дит быстрое освобождение фосфатидной кислоты вследст­вие активации фосфолипазы Д (см. раздел Фосфотидатная сигнальная система) и только после этого - появление лизо-фосфатидов благодаря активации фосфолипазы А2. Инте­ресно, что ингибирование фосфолипазы Д приводило к тор-

можению индукции синтеза хлоропластной липоксигеназы (ЛОГ2), алленоксидсинтазы и интенсивности образования жасмоната [Wang, 2000]. Эти данные позволяют выстроить следующую вероятную сигнальную цепь: элиситор —> ре­цептор плазмалеммы —> активация ассоциированной с плаз-малеммой фосфолипазы Д —> фосфатидная кислота —> транспорт фосфатидата в хлоропласты —> активация хлоро­пластных фосфолипазы А2 и ацилгидролаз —> освобожде­ние линоленовой и линолевой кислот —> липоксигеназный метаболизм. Передача информации по этому сигнальному пути должна осуществляться достаточно быстро, так как появление значительных количеств гексеналей регистриру­ется через десятки секунд после механического воздействия на листья (запах свежескошенной травы).

Не исключено, что в сигнальную цепь между плазма-леммой и хлоропластами входит повышение концентрации ионов кальция в цитозоле (кальциевая волна от плазмалем­мы к хлоропластам), но этот механизм вызывает опреде­ленные сомнения, если принять во внимание относитель­ную автономность ионного режима хлоропластов. С другой стороны, наличие в оболочке хлоропластов кальциевых каналов и помп заставляет с вниманием отнестись к этой ги­потезе. Поддерживают необходимость поисков в этом на­правлении результаты специальных опытов по изучению возможности передачи воспринимаемого плазмалеммой сигнала в другие клеточные органеллы - митохондрии. Оказалось, что сигналиндуцированное преходящее повы­шение содержания ионов кальция в цитозоле приводит к быстрому и также временному возрастанию их концентра­ции в митохондриях [Rizzuto et al., 1992].

Нельзя исключить не опосредованного плазмалеммой включения липоксигеназного метаболизма в хлоропластах. Известно, что различные стрессоры вызывают нарушения В функционировании системы фотосинтетического элек­тронного транспорта и это приводит к существенным нару­шениям структуры тилакоидных мембран, проявляющимся В распаде белка Д1 фотосистемы II. Возможно, что конфор-мационные изменения мемран тилакоидов при фотострессе и являются первичным сигналом, способным активировать гидролазы и, вследствие этого, освобождать полиеновые жирные кислоты из галактолипидов и фосфолипидов и



"включать" липоксигеназный каскад в хлоропластах. Эти вопросы составляют лишь часть проблемы участия хлоро-пластов в функционировании липоксигеназнои сигнальной системы и общей сигнальной сети клеток растений.

В настоящее время имеется достаточно убедительная информация, чтобы считать липоксигеназный путь превра­щения мембранных липидов самостоятельной сигнальной системой. Одним из признаков сигнальных систем является не только передача сигнала в генетический аппарат клеток, но и его значительное усиление (принцип фотоумножи­теля). Взаимодействие одной исходной сигнальной молеку­лы с рецептором может привести к появлению миллионов молекул, определяющих ответную реакцию клетки. Так же как в других сигнальных системах, в липоксигеназнои взаи­модействие первичного сигнала с рецептором плазмалеммы активирует фермент (фосфолипазу А2), обеспечивающий передачу информации по сигнальной цепи. Накопление сво­бодных линолеата или линолената (субстратов липоксигеназ), вызванное активацией фосфолипазы А, приводит к экс­прессии генов липоксигеназ [Veronesi et al., 1996], активируя тем самым липоксигеназную сигнальную систему.

Одной из особенностей усиления сигналов в липоксиге­назнои системе является использование нескольких видов автокаталитических процессов (циклов). В частности, это -автокаталитическое усиление сигнала с участием ионов кальция и кальмодулина (рис. 21) [Leshem, 1987]. Образую­щиеся в плазмалемме из линолената или линолеата гидро-пероксиформы этих кислот могут выступать в роли ионо-форов, переносящих ионы кальция снаружи внутрь клетки по градиенту концентрации (известно, что концентрация ионов кальция за пределами плазмалеммы на 2-3 порядка выше, чем в цитозоле). Повышение концентрации ионов кальция в цитозоле приводит к активации фосфолипаз А при участии кальмодулина и вследствие этого - к еще боль­шему освобождению полиеновых жирных кислот из фос-фолипидов. Второй механизм усиления липоксигеназного метаболизма - это опосредованная жасмонатом [Jensen et al., 1997] или метилжасмонатом [Bell, Mullet, 1991; 1993; Melan et al., 1993; Geerts et al., 1994; Eiben, Slusarenko, 1994; Avdiushko et al., 1995; Veronesi et al., 1996] индукция экспрессии генов липоксигеназ (см. рис. 21), приводящая к

Рис. 21. Автокаталитические реакции в липоксигеназнои сиг­нальной системе [Гречкин, Тарчевский, 1999]

ДСТ - десатураза; ЖК - жасмоновая кислота; КМ - кальмодулин; | КМ-Са] - комплекс кальмодулин-Са; ЛОГ - липоксигеназа; МеЖК -метилжасмонат; ФДК - фитодиеновая кислота; ФЛА2 - фосфолипаза А2

повышению скорости оксигенирования линолеата и лино­лената. Третий автокаталитический цикл - индукция ме­тилжасмонатом экспрессии генов десатуразы, катализиру­ющей превращение линолевой кислоты в линоленовую [ Nishiuchi et al., 1997]. По всей вероятности, это самый про­тяженный автокаталитический оксилипиновый цикл (см.

рис. 21). Недавно [Seo et al., 2001] был обнаружен еще один авто каталитический цикл, заключающийся в индукции ме-тилжасмонатом экспрессии гена метилтрансферазы (S-аде-нозил-метионин: жасмоновая кислота - карбоксил-метил-трансферазы), катализирующей реакцию метилирования жасмоновой кислоты.

Можно предположить, что промежуточные и конечные продукты липоксигеназного метаболизма активируют проте-инкиназы и, таким образом, осуществляют умножение сигна­ла и его передачу на геном растительных клеток. К сожале­нию, сведений об этом в литературе очень мало. Известно, что активировать мембраносвязанные протеинкиназы расте­ний способны оба типа продуктов реакции, катализируемой фосфолипазами А2, - как лизофосфолипиды (особенно, лизо-фосфатидилхолин и лизофосфатидная кислота), так и нена­сыщенные жирные кислоты [Scherer, 1996 a, b; Klucis, Polya, 1987; Lucantoni, Polya, 1987]. При этом лизофосфатидилглице-рол, лизофосфатидилсерин и лизофосфатидилэтаноламин не оказывают активирующего действия на протеинкиназы.

Несмотря на то что конкретные молекулярные меха­низмы активации генов различными оксилипинами еще не­достаточно изучены, можно утверждать, что они обладают способностью вызывать экспрессию генов, кодирующих белки, принимающие участие в повышении устойчивости растений к абиогенным стрессорам и в защитных реакциях против патогенов. Так, экзогенный жасмонат приводит к синтезу целого набора так называемых жасмонатиндуциру-емых белков [Mueller-Uri et al., 1988; Herrmann et al., 1989; Sembdner, Parthier 1993]. Среди них имеются ингибиторы протеиназ 1 и 2, ингибитор трипсина, тионин, напин, круци-ферин, вегетативные запасные белки, фенилаланин-аммо-ний-лиаза, халконсинтаза, липоксигеназа, полифенолокси-даза и др. Имеются данные [Farmer, Ryan, 1992], что не толь­ко жасмонат, но и его метаболические предшественники -13(8)-гидроперокси-9(г),(Е),15(Х)-октадекатриеновая кис­лота и 12-оксо-10,15(г)-фитодиеновая кислота - иницииру­ют образование стрессовых белков, в частности ингибито­ров протеиназ. Высказывается мнение [Parchmann et al., 1997], что 12-оксофитодиеновая кислота, проявляющая да­же большую активность в индукции защитных белков, чем жасмонат, является главным индуктором экспрессии генов

при местной реакции клеток на стрессоры, а за счет жасмо-ната и метилжасмоната обеспечивается передача сигнала в удаленные от места воздействия стрессора ткани и органы и формирование в них системного иммунитета. Это мнение подтверждается тем, что в отличие от жасмоната 12-оксо­фитодиеновая кислота не секретируется из культуры расти­тельных клеток в среду.

Обнаружено также, что летучие продукты липоксигеназ­ного метаболизма могут индуцировать (в том числе в сосед­них растениях) защитную реакцию. Так, т/?анс-2-гексеналь вызывал образование фенилаланин-аммоний-лиазы, катали-шрующей образование предшественников растительных ан­тибиотиков - фенилпропаноидных фитоалексинов. Показа­но [Fukuda et al., 1997], что 4-гидрокси-2-ноненаль **индуциро­вал** синтез глутатион-Б-трансферазы, участвующей в обез­вреживании токсичных для растений веществ.

Одно из свойств сигнальных систем - возможность тор­можения (прерывания) прохождения сигнала после того, как он был воспринят клеткой. Такая возможность была продемонстрирована и в отношении липоксигеназной сиг­нальной системы. Установлено [Avdiushko et al., 1995], что метилжасмонат активирует 13-гидропероксидлиазу; это приводит не только к усилению продукции бактерицидных и фунгицидных гексеналей, но соответственно к уменьше­нию доли метаболического потока, направляемого в сторо­ну жасмоната и метилжасмоната (эффект автоингибирова-н ия своего синтеза, проявляющийся, по-видимому, при дос­тижении пороговых концентраций метилжасмоната). Ока­залось, что дивиниловые эфиры - колнелевая и этеролевая кислоты - могут ингибировать активность липоксигеназ и таким образом затруднять функционирование липоксиге-пазной сигнальной системы [Corey et al., 1987]. Колнелевая кислота является активным ингибитором 9-липоксигеназы, j-геролевая кислота - 13-липоксигеназы [Гречкин, неопуб­ликованные данные]. Предполагается, что ингибирующее действие на липоксигеназную активность может также ока­зывать эпоксидный продукт превращения 9-гидроперокси-линолената [Sok, Kim, 1989].

Итак, результаты изучения сигнальных функций липок­сигеназного метаболизма позволяют считать, что ему при­сущи основные свойства, характерные и для других сиг-

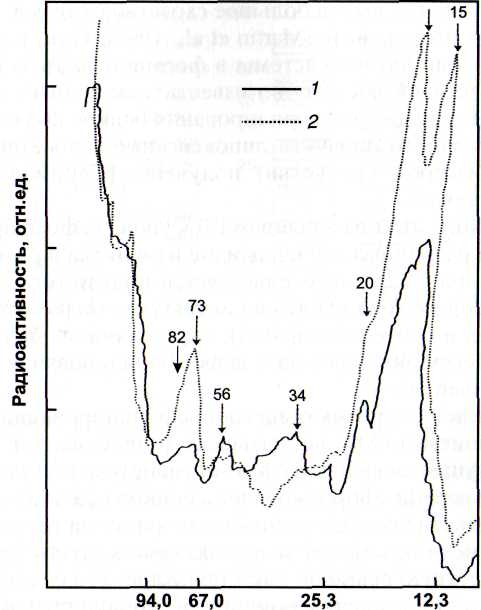
нальных систем, - рецепция, преобразование и умножение сигнала, приводящие (при участии протеинкиназ) к экспрес­сии определенных генов и соответствующему ответу расти­тельной клетки.

В связи с тем что участие протеинкиназ является важ­нейшим звеном сигнальных систем клеток растений, осо­бую значимость приобретают данные о влиянии интермеди-атов липоксигеназного метаболизма на фосфорилирование белков растений [Каримова и др., 19996]. Показано, что эк­зогенная 12-гидроксидодеценовая кислота (ГДК) в неболь­ших концентрациях является очень активным стимулято­ром роста, более активным, чем травматин и жасмоновая кислота [Гречкин, 1992]. Поскольку нельзя было исклю­чить возможность участия ГДК в функционировании сиг­нальных систем, мы поставили перед собой задачу исследо­вать ее влияние на фосфорилирование белков, имея в виду, что протеинкиназные реакции являются важнейшим зве­ном всех известных сигнальных систем клеток.

ГДК в широком диапазоне концентраций (с максимумом при 10"7 М) вызывала значительное повышение содержа­ния радиоактивного фосфата во фракции растворимых бел­ков. Поскольку при гомогенизации листьев и в реакцион­ной смеси использовались неспецифические ингибиторы фосфатаз, эффект отщепления фосфата от белков в про­цессе обработки материала был минимальным. ГДК оказы­вала больший стимулирующий эффект на фосфорилирова­ние белков, чем такой известный эффектор протеинкиназ-ной активности, как цАМФ. Метилжасмонат также вызы­вал большее фосфорилирование белков, чем цАМФ, но меньшее, чем ГДК.

Результаты экспериментов по разделению фосфорили-рованных белков и определению их радиоактивности пока­зали, что обработка ГДК приводила к значительному повы­шению уровня фосфорилированности трех полипептидов низкой молекулярной массы (10-24 кДа) и высокомолеку­лярного полипептида 70 кДа (рис. 22). Из данных рисунка следует, что уровень радиоактивности отдельных полипеп­тидов (в области 40 кДа) был ниже в варианте с обработкой растений ГДК.

Фосфорилирование белков участвует в регуляции мно­жества процессов [Protein Phosphorylation in Plants, 1996].



Молекулярная масса белков, кДа

Рис. 22. Влияние 12-гидроксидодеценовой кислоты (ГДК) на фос-форилирование белков [Каримова и др., 19996] гомогената трехдневных растений гороха

*1* - контроль; 2 - ГДК (0,1 мкМ). Рентгенограммы сканировали на денситографе ИФО-450. Стрелками указаны молекулярные массы бел­ков, радиоактивность которых подвергалась наибольшим изменениям

Получены данные о существовании в растениях различных типов протеинкиназ и об участии фосфорилирования бел­ков в экспрессии защитных генов после взаимодействия различных патогенов, элиситоров и стрессовых гормонов с клетками растений [Grab et al., 1985; Dietrich et al., 1990; Farmer et al., 1991; Bolwell et al., 1996]. О важной роли фос­форилирования белков в формировании устойчивости рас­тений к патогенам свидетельствуют данные о том, что не­которые клонированные гены, кодирующие защитные бел­ки растений, повышающие их устойчивость к инфицирова-

нию патогенами, имели большое сходство с генами, кодиру­ющими протеинкиназу [Martin et al., 1993]. Если роль в це­лом липоксигеназной системы в формировании защитного ответа растений достаточно известна, то данные о значи­тельном усилении фосфорилирования белков под влиянием промежуточного продукта липоксигеназного метаболизма (самой быстрой его ветви) получены [Каримова и др., 19996] впервые.

Тот факт, что под влиянием ГДК уровень фосфорилиро­ванности различных полипептидов изменился в разной сте­пени (см. рис. 22), свидетельствует в пользу того, что она может неодинаково влиять на активность ферментов (про-теинкиназ и протеинфосфатаз), определяющих баланс ско­ростей фосфорилирования и дефосфорилирования отдель­ных полипептидов.

Повышение уровня общего фосфорилирования белков под влиянием цАМФ не вызывает удивления, так как из­вестно существование цАМФ-активируемых протеинки-наз. Большее фосфорилирование белков под влиянием ме-тилжасмоната тоже объяснимо, так как известно, что жас-монат и метилжасмонат могут включать (пусть не полно­стью) ответную реакцию растений, характерную для меха­нического повреждения тканей или инфицирования пато­генами. Известно, что в этих случаях активируются сиг­нальные системы клеток, в том числе не только циклоаде-нилатная. Наибольшее фосфорилирование белков под вли­янием ГДК свидетельствует или о существовании активи­руемых непосредственно ГДК протеинкиназ, или о вклю­чении с помощью экзогенной ГДК совокупности сигналь­ных систем клеток, причем не только циклоаденилатной (поскольку цАМФ вызывал меньший эффект), но и каль­циевой, и НАДФ-оксидазной [Chandra, Low, 1995], и, воз­можно, "собственной" липоксигеназной системы. Факты такого влияния продуктов фосфолипазных и липоксиге-назных реакций обнаружены у животных [Гамалей, Клю-бин, 1996] и растительных [Гречкин, Тарчевский, 1999] клеток.

Выявлено [Гречкин и др., 1987], что ГДК является пре­обладающим продуктом метаболизации гидроперекисей линолевой и линоленовой кислот у бобовых. Высокая рост-стимулирующая активность 12-ГДК обнаружена в опытах

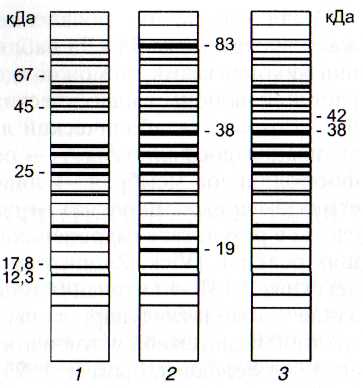


Рис. 23. Схема радиоавто­графов электрофореграмм белков, характеризующая влияние инфицирования микоплазмами и обработки жасмоновой кислотой на синтез полипептидов [Тар­чевский и др., 19966]

*1* - контроль; 2 - инфици­рование микоплазмами; *3* - об­работка жасмоновой кисло­той. Слева от столбика 1 - мо­лекулярные массы маркерных белков

с каллусной культурой сои [Гречкин, 1992; Гречкин и др., 1987].

Как известно, уровень фосфорилированности белков определяется активностью не только приходной протеин-киназной, но и расходной протеинфосфатазной реакции. В растениях обнаружены высокоактивные протеинфосфата-зы нескольких типов [MacKintosh, Cohen, 1989; Vera-Estrella et al., 1994; Xing et al., 1996], которые могут контролиро­ваться с помощью различных эффекторов. Насколько большой вклад вносит активность фосфатаз в изменение уровня фосфорилированности полипептидов под влиянием ГДК, остается невыясненным.

Изменение спектров фосфорилированности белков яв­ляется достаточно важным показателем активности интер-медиатов сигнального пути. Чаще изучается их влияние на синтез белков. Мы исследовали образование жасмонатин-дуцированных белков в сопоставлении с влиянием на этот процесс инфицирования растений микоплазмами Achole-plasma laidlawii 118 [Тарчевский и др., 19966].

Результатом действия на растения экзогенной жасмоно­вой кислоты (5 • К)-5 М) было увеличение поглощения 14С-лей-цина и включения радиоактивной метки в белки. Относи­тельная доля включения 14С в белки от поглощения также возрастала. При разделении полипептидов с помощью элек­трофореза было обнаружено индуцированное жасмонатом образование двух новых полипептидов - 38 и 42 кДа (рис. 23).

Если учесть, что появление нового, индуцированного жасмонатом белка 38 кДа наблюдается и при инфицирова­нии микоплазмами, то можно сделать вывод, что заражение растений включает классический, характерный для биоген­ного стресса, катаболический липидный сигнальный путь: активация фосфолипазы А2 —> освобождение линолената из фосфолипидов мембран —» липоксигеназное превращение его в 13-пероксилиноленат -> образование жасмоновой ки­слоты в результате гидропероксидциклазной и сопутствую­щих реакций [Vick, Zimmerman, 1987; Гречкин, 1992; Тар-чевский, 1993] —*>* активация генов устойчивости —> образо­вание жасмонатиндуцированных белков —» формирование местной и системной устойчивости к патогенам [Neumann et al., 1989; Sembdner, Parthier, 1993].

Так как жасмонат вызывал индукцию образования лишь одного из трех микоплазмаиндуцированных белков, то можно предположить, что он является только частью сиг­нальной системы, приводящей к формированию иммуните­та растений [Тарчевский и др., 19966].

**НАДФН-ОКСИДАЗНАЯ СИГНАЛЬНАЯ СИСТЕМА**

Вызванная действием элиситоров на клетки растений активация НАДФН-оксидазы - стартового фермента НАДФН-оксидазной системы (рис. 24), является причиной интенсивного образования активных форм кислорода - сво­бодных радикалов О2 и OFT, а также перекиси водорода. Впервые такой окислительный "взрыв" наблюдали в 1983 г. [Doke et al., 1996] в ответ на инфицирование клубней карто­феля фитофторой. Позднее обнаружили появление окисли­тельного "взрыва" под влиянием различных патогенных грибов, бактерий, вирусов, элиситоров, механического по­вреждения растений.

Обращает на себя внимание преходящий характер окис­лительного "взрыва", проявляющийся в относительно бы­стром возврате концентрации перекиси водорода к исход­ному уровню (рис. 25). Это может быть вызвано как сниже­нием активности НАДФН-оксидазы, в результате чего уменьшается приходная часть баланса перекиси водорода, так и усилением расходной части этого баланса, а именно выходом части Н2О2 за пределы клеток (где она использу­ется в пероксидазных реакциях), разрушением перекиси во­дорода каталазой [Willekens et al., 1997], потреблением части Н2О2 в аскорбат-пероксидазной реакции аскорбат-глутатионового цикла (рис. 26).

В образование активных форм кислорода при действии элиситоров, кроме НАДФН-оксидазы, могут вносить вклад и другие ферменты, например локализованные в клеточной стенке оксалатоксидаза [Zhou et al., 1998] и пероксидазы, активирующиеся при щелочном сдвиге рН за пределами плазмалеммы, который наблюдается при инфицировании патогенами и действии элиситоров [Wojtaszek, 1997]. При этом была обнаружена патогениндуцированная секреция

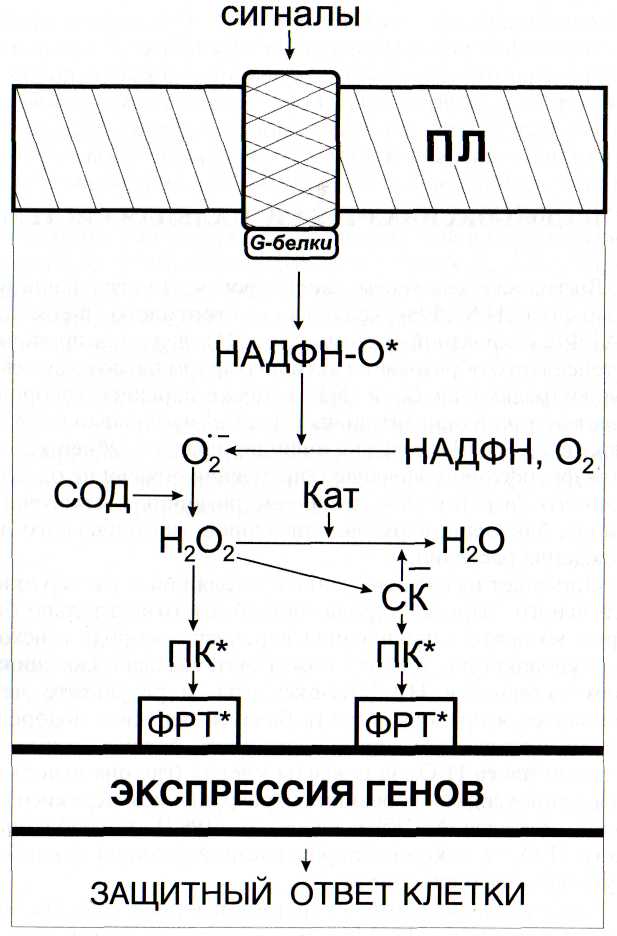
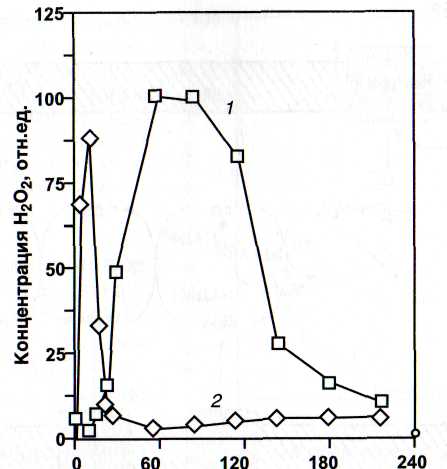


Рис. 24. Функционирование НАДФН-оксидазной сигнальной си­стемы

Кат - каталаза; НАДФН-О\* - активная форма НАДФН-оксидазы;

*Of -* супероксиданион-радикал; ПК\* - активные формы протеинки-

наз; СК - салициловая кислота; СОД - супероксиддисмутаза. Осталь­ные обозначения - см. рис. 6

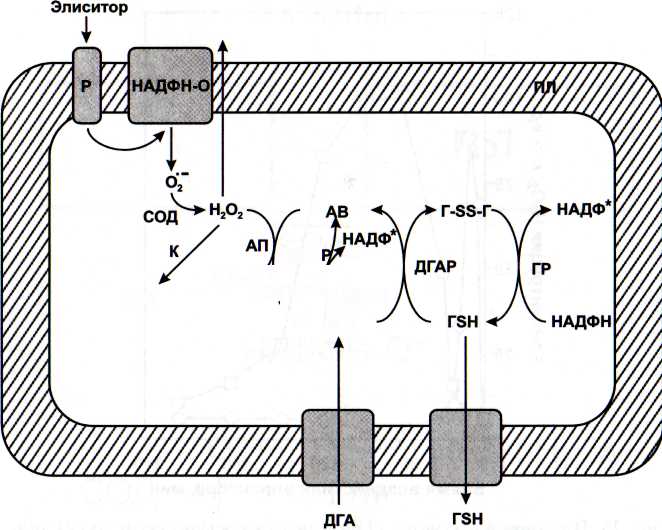


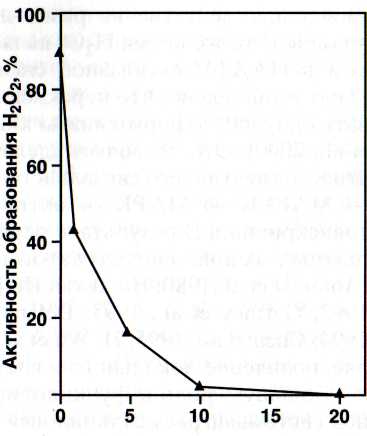
**Время воздействия элиситора, мин**

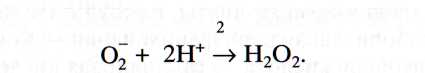
Рис. 25. Влияние белкового (/) и олигогалактуронатного (2) эли-ситоров на образование перекиси водорода [Levine et al., 1994]

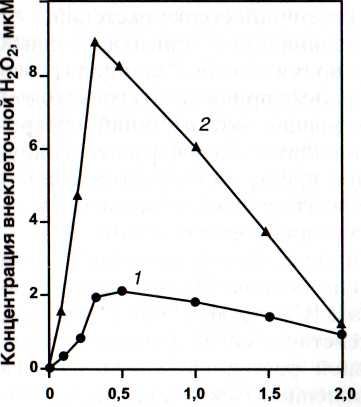
иероксидазы в клеточные стенки [McLusky et al., 1999]. Оба нида ферментов катализируют реакции, в ходе которых об­разуется перекись водорода. Но главное внимание исследо­вателей механизмов окислительного "взрыва" продолжает привлекать НАДФН-оксидаза плазмалеммы. Она представ­ляет собой гетеродимерный цитохром 6-типа, состоящий из субъединиц 22 и 91 кДа. Как и в случаях других сигнальных систем, фермент (большая субъединица) оказался гомоло­гичным ферменту животных объектов. Для активации фер­мента требуется участие еще двух цитоплазматических бел­ков \_ 47 и 67 кДа. При действии патогенов или элиситоров первый из этих двух белков фосфорилируется, затем они мигрируют к плазмалемме и образуют активный комплекс фермента.

Элиситориндуцируемое образование перекиси водоро­да подавляется ингибиторами протеинкиназ, например ставроспорином (рис. 27), но активируется ингибиторами протеинфосфатазы 2А [Tenhaken et al., 1995], причем по-









**МДГА**

**Н2О«^ *J***

**Н2О МД[А *У* НАДФН**

**V ДГА**

что у субъединицы 91 кДа НАДФН-оксида-{ы имеются два Са2+-связывающих участка | Keller et al., 1998].

Окисление НАДФН молекулярным кисло­родом приводит к обра­зованию супероксид-анионов, которые в результате реакции, катализируемой супероксиддисмутазой, превращаются в перекись водорода.

О2 + НАДФН -^ О~ + НАДФ+ + Н+; ■>

**Ставроспорин, мкМ**

Окислительный "взрыв" - это одна из самых быстрых

ответных реакций кле- ток на действие элисито-ров [Chandra, Low, 1995].

Значительное повы­шение содержания ак-тивных форм кислорода О2 и Н2О2 оказывает по-

Рис. 26. Потребление перекиси водорода с помощью аскорбат-глутатионового цикла [Vanacker et al., 1998]

АВ - аскорбат восстановленный; АП - аскорбатпероксидаза; ГР -глутатион-редуктаза; TSH - глутатион восстановленный; Г-SS-T - ди­сульфид глутатиона; ДГА - дегидроаскорбат; ДГАР - дегидроаскорбат-редуктаза; К - каталаза; МДГА - монодегидроаскорбат; МДГАР - мо-нодегидроаскорбат-редуктаза; ПЛ - плазмалемма; Р - рецептор; СОД -супероксиддисмутаза

явление окислительного "взрыва" в этом случае происхо­дит и в отсутствие элиситора. Все это свидетельствует о важной роли фосфорилирования и дефосфорилирования белков в осуществлении НАДФН-сигнального пути [Levine et al., 1994; Chandra, Low, 1995; Chen et al., 1995; Rajasekhar et al., 1999].

Для активации НАДФН-оксидазы требуется также уча­стие G-белков, что подтверждается в опытах с активатором G-белков мастопараном (рис. 28). Стимулирующее влияние фосфолипазы С на активность НАДФН-оксидазы позволя­ет говорить о взаимодействии НАДФН-оксидазного пути с кальциевой сигнальной системой. Это тем более вероятно,

Рис. 27. Влияние ставро-спорина на образование Н2О2 [Chandra, Low, 1995] Окислительный взрыв (накопление перекиси водо­рода) в культуре клеток сои индуцировался олигогалак-туронатным элиситором

**Концентрация мастопарана, мкМ**

Рис. 28. Влияние мастопа­рана на образование Н2О2 в культуре клеток петрушки, индуцированное салицило­вой кислотой [Kauss, Jeblick, 1995]

*1 -* контроль; 2 - клетки, обработанные салициловой кислотой

давляющее действие на развитие патогенных микроорга­низмов. В то же время Н2О2 является вторичным посредни­ком в НАДФН-оксидазной сигнальной системе. Недавно было установлено, что перекись водорода может активиро­вать одну из изоформ киназы киназы МАР-киназы [Kovtun et al., 2000]. Это позволяет сделать предположение о веро­ятности следующего сигнального пути: Н2О2 —> МАРККК —> —*>* МАРКК —> МАРК —> активация факторов регуляции транскрипции. В результате осуществляется экспрессия за­щитных генов, синтез патогениндуцированных белков [Antoniw et al.,1980; Hooft van Huijsduijnen et al., 1986; Raskin, 1992; Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994; Levine et al., 1994; Chen et al., 1995; H. Wu et al., 1997; и др.] и, как следст­вие, появление локального и системного иммунитета.

Большую роль в функционировании НАДФН-оксидаз­ной системы играет салициловая кислота, концентрация ко­торой при действии патогенов, элиситоров или экзогенной перекиси водорода повышается в десятки раз [Leon et al., 1995; Н. Wu et al., 1997; и др.]. Одной из причин "салицило­вой вспышки" является элиситор-индуцируемое образова­ние фенилаланин-аммиак-лиазы, в результате чего активи­руется метаболическая цепь фенилаланин *—>* коричная кис­лота —> бензойная кислота —> салициловая кислота. Второй причиной может быть быстрая активация гидролазы, осво­бождающей салициловую кислоту из О-|3-О-глюкозидсали-цилата, локализованного в клеточной стенке растений.

Снижение содержания салицилата в элиситированных клетках через некоторое время после "салицилатного взрыва" объясняется несколькими причинами: его выходом из клеток в апопласт и проводящие пути растений, превра­щением в летучий метилсалицилат и его диффузией в окру­жающее растение воздушное пространство, образованием глюкозильного эфира салицилата и его отложением в кле­точные стенки, деградацией салициловой кислоты.

Для выяснения функций салициловой кислоты начали поиск салицилатсвязывающих белков. Оказалось, что та­ким белком является каталаза [Chen et al., 1993]. Считается, что салициловая кислота действует ингибирующе на ката-лазу и, перекрывая основной расходный канал баланса Н2О2, способствует ее накоплению. Некоторые исследова­тели не разделяют этого мнения о роли салициловой кисло-

ты в НАДФН-оксидазной системе, однако полученные дан­ные о существовании нескольких органоспецифичных изо­форм катал азы, отличающихся способностью ингибиро-ваться салицилатом, рассеяли эти сомнения. Кстати, было обнаружено, что салициловая кислота - это ингибитор не только каталазы, но и целого ряда других железосодержа­щих ферментов [Chen et al., 1997] - аскорбат-пероксидаз, аконитаз, АСС-оксидазы. Последнее объясняет, почему са­лициловая кислота затормаживает синтез этилена [Leslie, Romani, 1986; 1988]. Имеются результаты, свидетельствую­щие о существовании активируемых салицилатом МАР-ки-назах (SIPK) [Zhang, Klessig, 1997; Zhang et al., 1998; Romeis et al., 1999; Mikolajczyk et al., 2000] и о салицилатиндуцируе-мых рецепторных киназах [Не et al., 1999], которые активи­ровались также патогенами и окислительным стрессом ICzernic et al., 1999]. Если иметь в виду, что расположение двух гидроксильных групп у салициловой кислоты и пере­киси водорода может быть сходным [Тарчевский и др., i 999], то не исключено, что салицилатактивируемые проте-инкиназы являются и Н2О2-активируемыми протеинкиназа-ми [Guyton et al., 1996].

Одним из важных последствий активации патогенами и элиситорами НАДФН-оксидазной системы можно считать появление так называемой сверхчувствительности инфици­рованных и рядом расположенных клеток, что приводит к их гибели и появлению некротических пятен. Отмирание клеток - это результат включения специальной генетиче­ской программы. У растений программируемая смерть кле­ток (апоптоз) начала изучаться позднее, чем у животных, причем было обнаружено, что механизмы апоптоза в ос­новном идентичны [Самуилов и др., 2000; Shirasu, Schulze-Lefert, 2000]. Необходимо отметить, что в апоптозе прини­мают участие перекись водорода и салициловая кислота НАДФН-оксидазной системы и некоторые интермедиаты кальциевой, липоксигеназной, МАР-киназной и NO-синтаз-ной сигнальных систем.

Ранее [Тарчевский и др., 19966] мы показали, что инфи­цирование микоплазмой Acholeplasma laidlawii 118 приводит к появлению ряда новых белков, синтез одного из которых (38 кДа) индуцируется также салицилатом и янтарной кис­лотой [Тарчевский и др., 1999]. Полученные данные позво-

ляют утверждать, что экзогенные салицилат и сукцинат включают тот же сигнальный путь, который вызывает об­разование части индуцируемых микоплазмами белков. Так как это мог быть НАДФН-оксидазный путь, в котором важную роль играет перекись водорода, то это побудило нас провести сравнительное изучение действия экзогенных салицилата (ингибитора каталазы) и сукцината на каталаз-ную активность. Оказалось, что оба эти соединения в одних и тех же концентрациях тормозят разложение Н2О2, т.е. яв­ляются ингибиторами каталазы.

В связи с этим с помощью программы "Oxford molecular modelling program" мы построили молекулярные модели Н2О2, салициловой и янтарной кислот. Близость расстояний между водородными атомами гидроксильных групп во всех трех типах молекул (у перекиси водорода - 2,62 А, салици­лата - 2,56 А, у одной из возможных конформаций сукцина­та - 2,64 А) позволяет предполагать, что салициловая и ян­тарная кислоты могут связываться с активным центром ка­талазы, выступая в роли конкурентных ингибиторов в реак­ции разложения перекиси водорода.

Вполне вероятно, что экзогенная янтарная кислота, по­добно салициловой, может приводить и к другим эффектам: активации супероксиддисмутазы [Rao et al., 1997; Minibayeva et al., 2001] (а это приводит к повышению концентрации пе­рекиси водорода), ингибированию аконитаз, пероксидаз и оксидаз [Ruffer et al., 1995].

Не исключено, что освобождаемые из одних клеток са­лициловая и янтарная кислоты могут в качестве первич­ных сигналов взаимодействовать с одним и тем же рецеп-торным белком плазмалеммы других клеток, изменяя его конформацию и "включая" метаболические цепи преобра­зования и умножения сигнального импульса, завершающи­еся экспрессией генов и синтезом защитных белков и фи-тоалексинов.

В нашей лаборатории при исследовании влияния экзо­генной салициловой кислоты на полипептидный спектр и (качественно, по почернению рентгеновской пленки) на включение |4С-аминокислот в отдельные полипептиды ока­залось, что салициловая кислота очень сильно повышала содержание полипептида 29 кДа из группы кислых белков, а также увеличивала набор щелочных белков, среди кото-

рых появлялись новые полипептиды 11, 38, 42 и 72 кДа [Тарчевский и др., 1999].

Полипептиды 72 и 11 кДа можно отнести к белкам с вы­сокой скоростью оборота (turnover), отличающимся интен­сивным образованием (что определяет их высокую радио­активность) и быстрым распадом (это приводит к столь низ­кому содержанию этих полипептидов, что они не проявля­ются на гелях). Обычно такие соединения играют в обмене веществ роль оперативных регуляторов, достаточно чутко реагирующих на изменение внутриклеточной или внешней ситуации.

Обращает на себя внимание, что салицилатиндуциро-ванный кислый белок 29 кДа имел очень высокую радиоак­тивность, наивысшую среди всех рассматриваемых поли­пептидов. В то же время в полипептидах 38 и 42 кДа не об­наруживалось высокой радиоактивности. Не исключено, что в двух последних случаях салициловая кислота не столь­ко усиливала синтез этих полипептидов, сколько подавляла интенсивность их деградации. Быть может, установленный ранее факт стимулирования салицилатом образования ин­гибиторов протеиназ [Jung et al., 1993] белковой природы свидетельствует о возможности действия некоторых из этих ингибиторов не только на протеиназы патогена, но и на некоторые протеиназы растения-хозяина.

Нами не установлено случаев полной репрессии салици­латом образования полипептидов, наблюдалось лишь силь­ное снижение содержания полипептида 27 кДа.

Электрофоретическое разделение белков показало, что салициловая и янтарная кислоты вызвали сходное измене­ние набора полипептидов. Эти данные позволяют заклю­чить, что экзогенные салицилат и сукцинат включают одни и те же механизмы экспрессии генов. Особенности измене­ния синтеза различных белков под влиянием экзогенного салицилата изучались многими авторами [Antoniw, White, 1980; Van Loon, Antoniw, 1982; Pennazio et al., 1983; и др.]. В одной из таких работ [Jung et al., 1993] было обнаружено индуцирование ацетилсалициловой кислотой в растениях подсолнечника синтеза полипептидов 17 кДа (из группы PR 1 белков), 40 кДа (из группы PR 2 белков), 29 и 37 кДа (из группы PR 3 белков) и 20 кДа (из группы PR 5 белков), причем все они экскретировались в межклеточное прост-

ранство. Для белков группы PR 2 характерна (3-глюканазная активность, для группы PR 3 - хитиназная, к белкам груп­пы PR 5 относят ингибиторы протеиназ. По всей вероятности, найденные нами в растениях гороха салицилатиндуцирован-ные белки 29 и 38 кДа аналогичны белкам группы PR 3 под­солнечника с близкими молекулярными массами.

Проведенные исследования позволяют считать, что ян­тарная кислота является природным миметиком салицило­вой кислоты, приводя в действие те же механизмы индук­ции локальной и системной устойчивости растений к пато­генам. Вероятно, этим и объясняется положительное воз­действие обработок препаратами янтарной кислоты на ус­тойчивость и продуктивность сельскохозяйственных расте­ний [Тарчевский, 1997].

Как и ожидалось, сходным с салицилатом действием об­ладает не только янтарная кислота, но и другие ди- и три-карбоксиловые органические кислоты цикла Кребса со сходным с салицилатом расположением гидроксильных групп. Было показано, что салициловая, янтарная, яблоч­ная, фумаровая и лимонная кислоты активируют внекле­точную пероксидазу, что приводит к значительной интенси­фикации образования супероксида [Minibayeva et al., 2001]. Можно предположить, что освобождение янтарной кисло­ты и других ди- и трикарбоксиловых органических кислот во внеклеточное пространство происходит при механиче­ском повреждении клеток или начинающемся апоптозе. По всей вероятности, эти соединения являются одними из тех молекулярных "сигналов бедствия", которые включают за­щитные механизмы в соседних клетках [Тарчевский, 1993].

Роль перекиси водорода и салицилата в растениях не ог­раничивается их участием в функционировании НАДФН-оксидазной системе клетки, подвергшейся действию элиси-торов. Оказалось, что они активируют программируемую смерть клеток (апоптоз), подавляют развитие патогенов. Кроме того, салициловая кислота может быть одним из фак­торов индукции системного иммунитета в частях растений, удаленных от места инфицирования патогенами. Это объ­ясняется ее способностью транспортироваться по флоэме [Shulaev et al., 1995] и служить элиситором, включающим сигнальные системы клеток. Некоторые исследователи ос­паривали роль салицилата в качестве индуктора системного

иммунитета, но опыты с использованием трансгенных рас­тений [Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994] с привнесен­ным геном бактериальной салицилатгидроксилазы (не спо­собных накапливать салициловую кислоту после инфици­рования патогенами и осуществлять с ее помощью систем­ный иммунитет) устранили эти возражения.

Салициловая кислота может метилироваться, а летучий метилсалицилат - принимать участие в аллелопатических взаимоотношениях в фитоценозах, наряду с летучими про­изводными липоксигеназного метаболизма (гексеналями, гексенолами, ноненалями, ноненолами, метилжасмонатом) и летучими терпеноидными фитоалексинами.

Ознакомление с многочисленными публикациями поз­воляет сделать вывод, что окислительный взрыв может иг­рать одну из главных ролей в появлении разнообразных за­щитных ответов [Grant, Loake, 2000] и что многие вопросы функционирования НАДФН-оксидазной сигнальной систе­мы остаются еще неизученными.

**NO-СИНТАЗНАЯ СИГНАЛЬНАЯ СИСТЕМА**

Роль N0 в качестве одной из важнейших сигнальных мо­лекул в растениях была установлена сравнительно недавно, хотя к этому времени NO-сигнальной системе животных и ее роли в воспалительных процессах, апоптозе клеток и выра­ботке иммунитета к патогенам было посвящено очень много работ, и это привело к тому, что в 1992 г. NO была признана редакцией журнала "Science" "молекулой года". N0 образу­ется из аргинина, НАДФН и кислорода в результате реакции, катализируемой ферментом NO-синтазой [Меньшикова и др., 2000; Wendehenne et al., 2001] - стартовым ферментом NO-синтазной сигнальной системы (рис. 29):

2Аргинин + ЗНАДФН + 4О2 + ЗН+ -> -> 2Цитруллин + 2NO + ЗНАДФ+ + 4Н2О.

NO-синтаза принадлежит к числу наиболее сложных ферментов, причем активность проявляет гомодимерная форма фермента, а каждый неактивный мономер состоит из редуктазного (НАДФН-ФАД-ФМН) и оксигеназного (Fe-гем) доменов, между которыми распологается кальмо-дулин. Электроны, участвующие в окислении азота гуани-динового радикала аргинина и образовании NO, транспор­тируются из редуктазного в оксигеназный домен (рис. 30). Имеется несколько изоформ фермента: мембраносвязан-ные кальцийзависимые конститутивные, а также раствори­мые кальцийнезависимые индуктивные (цитозольные), вы­полняющие роль первого фермента NO-сигнальной цепи. Недавно появилась информация о возможности местонахож­дения NO-синтаз в пероксисомах клеток растений [Corpas et al., 2001].

До сих пор неясно, какая из этих изоформ играет глав­ную сигнальную роль. Нет данных об участии G-белков в

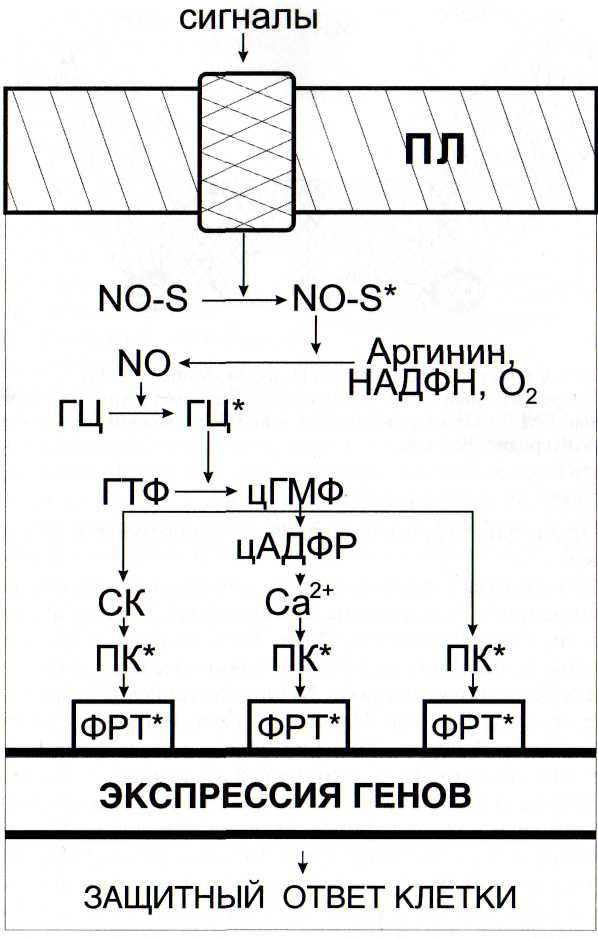


Рис. 29. Схема функционирования NO-синтазной сигнальной сис­темы

ГЦ - гуанилатциклаза; СК - салициловая кислота; цАДФР - цикли­ческая АДФ-рибоза; NO-S - NO-синтаза. Остальные обозначения - см. рис. 6

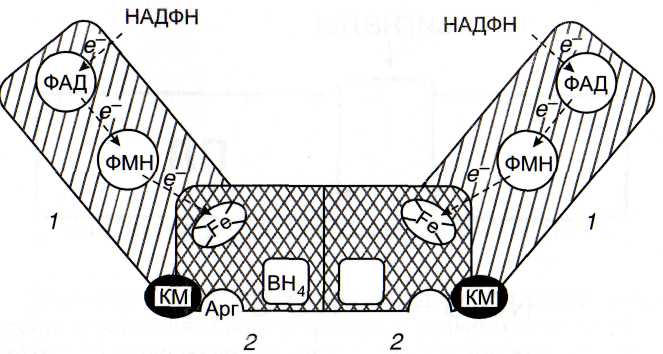


Рис. 30. Структура NO-синтазы [Горрен, Майер, 1998]

/ - редуктазный домен; 2 - оксигеназный домен; Apr - остаток ар­гинина; КМ - кальмодулин; ФАД и ФМН - флавиновые нуклеотиды; ВН4 - птеридин; Fe - гем

передаче элиситорного сигнала от рецепторов к NO-син-тазам.

NO-синтаза у растений была обнаружена практически одновременно в нескольких лабораториях [Cueto et al., 1996; Leshem, 1996; Ninnemann, Maier, 1996; Noritake et al., 1996]. Для нас особый интерес представляют исследования, в ко­торых была показана роль N0 в абиотических и биотиче­ских стрессах [Leshem, Haramathy, 1996; Haramathy, Leshem, 1997; Huang, Knopp, 1998]. Оказалось, что активация NO-синтазы происходит у устойчивых к патогенам растений [Delledone et al., 1998; Klessig et al., 2000], а образующийся NO вызывает синтез фитоалексинов и защитных белков [Noritake et al., 1996; Dangl, 1998; Delledone et al., 1998]. Выз­ванное патогенами и элиситорами многократное повыше­ние содержания NO в тканях растений стали называть "NO-взрывом", по аналогии с "окислительным взрывом" [Foissneretal., 2000].

С 1998 г. начинается интенсивный поиск сходства и различий в функционировании NO-сигнальных систем у животных и растений. Было найдено, что, так же как у животных, в качестве сигнальных посредников между NO и геномом выступают цГМФ- и цАДФ-рибоза (см. рис. 29)

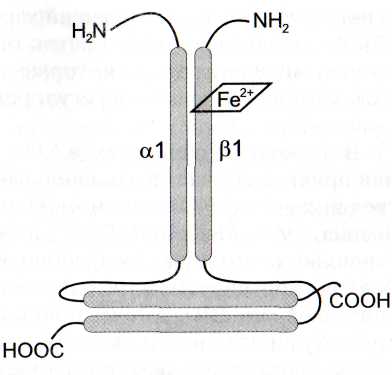
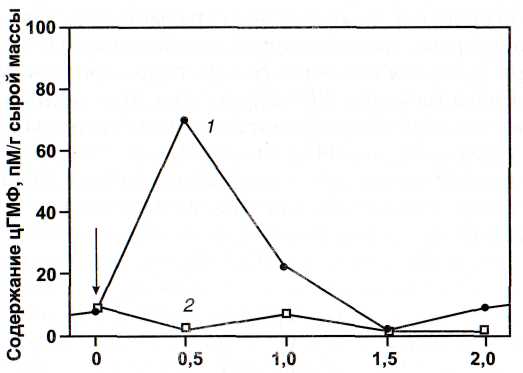


Рис. 31. Структура диме-ра цитоплазматической гуанилатциклазы, со­стоящей из al- и (31-субъединиц [Denninger, Marietta, 1999] Fe2+ - гем

[Delledone et al., 1998; Durner et al., 1998; Hausladen, Stamler, 1998], что раститель­ная NO-синтаза инги-бируется теми же со­единениями, что и животная.

цГМФ образуется из ГТФ с помощью растворимой цито­плазматической гетеродимерной гуанилатциклазы. Одна из субъединиц фермента содержит гем, связанный с остатком гистидина (рис. 31). Активация гуанилатциклазы происхо­дит при взаимодействии NO с гемом [Denninger, Marietta, 1999]. Необходимо отметить, что NO-индуцируемое накоп-



Бремя воздействия NO, ч

Рис. 32. Влияние NO на образование цГМФ в суспензии клеток табака [Durner et al., 1998]

*I* - клетки, обработанные донором NO; *2 -* контроль. Стрелкой по­казано начало воздействия NO

ление цГМФ имеет преходящий характер (рис. 32). Участие цГМФ в сигнальной сети клеток определяется его способ­ностью активировать некоторые протеинкиназы, откры­вать катионные каналы и регулировать активность фосфо-диэстераз.

В отличие от животных, в NO-синтазной системе расте­ний принимает участие салициловая кислота в качестве по­средника между N0 и геномом [Durner et al., 1998; Hausladen, Stamler, 1998; McDowell, Dangl, 2000; Kumar, Klessig, 2000]. Изучение с помощью иммуноблотинга синтеза некоторых белков, индуцируемых различными интермедиатами NO-синтазной системы, в сочетании с использованием ингиби­торов гуанилатциклазы и трансгенных растений с привне­сенным бактериальным геном салицилат-гидроксилазы по­зволил прийти к выводу о разветвленной структуре этого сигнального пути. О первой точке ветвления можно судить по открытию цГМФ-зависимой и независимой NO-индук-ции фенилаланин-аммиак-лиазы, о второй - по NO-индуци-рованному салицилатзависимому образованию матричных РНК белка PR-1 и NO-индуцированному салицилатнезави-симому образованию фенилаланин-аммик-лиазы [Durner et al., 1998]. Многократное накопление салицилата под влия­нием NO было показано во многих работах, и в связи с этим были оправданы исследования взаимосвязей NO и салици­лата при функционировании NO-синтазной сигнальной сис­темы. Существование NO-индуцированного цАДФрибоза-зависимого- и цАДФрибозанезависимого синтеза белков (PR-1) [Klessig et al., 2000] предполагает еще одну точку ветвления NO-сигнального пути. Обслуживает NO-синтаз-ную систему, помимо NO-синтазы, еще целый ряд фермен­тов, активируемых различными интермедиатами этого сиг­нального пути [Klessig et al., 2000]. Монооксид азота активи­рует гуанилатциклазу, катализирующую образование цГМФ, который, в свою очередь, активирует цГМФ-зависи-мую протеинкиназу, а последняя - факторы регуляции транскрипции (NO -> цГМФ -> ПК -> ФРТ -> геном) и каль­циевые каналы (NO —> цГМФ —» активация кальциевых ка­налов —> повышение концентрации ионов кальция в цитозо-ле —> Са-зависимые ПК —> ФРТ -> геном). Салициловая кис­лота, накапливающаяся в результате гидролиза глюкозил-салицилата или активации ФАЛ, способна активировать

специальную изоформу МАР-киназы (СК —> салицилатин-дуцируемая МАР-киназа -» ФРТ -> геном). Циклический гуанозинмонофосфат способен активировать АДФ-рибо-зил-циклазу, катализирующую образование цАДФрибозы, а последняя открывает кальциевые каналы (цГМФ —» цАДФрибоза —> повышение содержания Са2+ в цитозоле -» Са-зависимые ПК —> ФРТ —> геном).

NO является весьма активным свободным радикалом (время его жизни in vivo составляет, по-видимому, немно­гим более 10 с), он способен взаимодействовать с нуклеи­новыми кислотами и белками неферментативно (рис. 33). Так, было обнаружено, что у животных NO изменяет ак­тивность железорегуляторного белка цитоплазмы (ЖРБ), который связывает специфический элемент матричных РНК и поэтому активирует или ингибирует их [Klausner et al., 1997]. Оказалось, что у растений NO оказывал влияние на изоформу ЖРБ - аконитазу, вызывая ее ингибирова-ние, что косвенно свидетельствует (наряду с существова­нием протяженных консервативных последовательностей у этих ферментов) о возможности влияния NO на процес­сы трансляции непосредственно, неферментативно, минуя классические и относительно долгие ферментативные сиг­нальные пути. По-видимому, NO может влиять и на про­цессы транскрипции, если учитывать факт ингибирования им ДНК-связывающей активности факторов регуляции транскрипции при S-нитрозилировании определенного ци-стеинового остатка. Кроме того, обнаружено, что экзоген­ный NO активировал ДНК-метилтрансферазу, что приво­дило к повышению содержания метилированных остатков цитозина в ДНК и, вследствие этого, препятствовало свя­зыванию факторов регуляции транскрипции с промотор-ными участками генов и переводу их из активных в "мол­чащие" [Bogdan, 2001].

Еще один возможный неферментативный путь - нитро-зилирование монооксидом азота S-белков кальциевых ка­налов, что приводит к их открыванию и повышает концен­трацию ионов кальция в цитозоле [Klausner et al., 1997]. Так же как и в случае белков кальциевых каналов, нитрозили-рование цитозольных S-белков может привести к измене­нию их конформации, а это, в свою очередь, - к атакуемо-сти протеазами и изменению времени жизни S-белков.

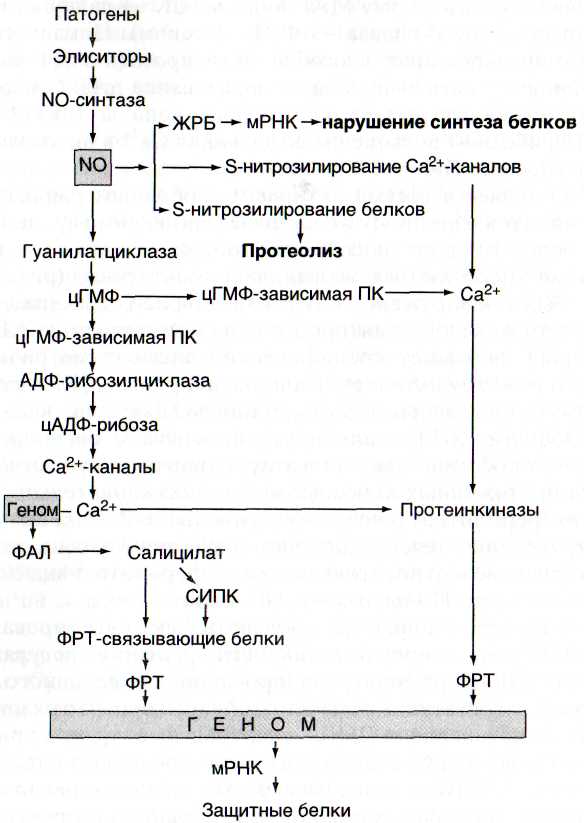


Рис. 33. Схема NO-синтазной сигнальной системы, дополнен­ная неферментативным влиянием NO на метаболические про­цессы

ЖРБ - железорегуляторный белок; ПК - протеинкиназа; СИПК -салицилатиндуцируемая протеинкиназа; ФАЛ - фенилаланин-аммиак-лиаза; ФРТ - факторы регуляции транскрипции

N0 и образующийся из него пероксинитрит могут окис­лять тиоловые остатки в белках с образованием сульфено-вых R-SOH-, сульфиновых R-SO2H- и сульфоновых R-SO3H-остатков [Bogdan, 2001]. В результате окисления тиоловых остатков сульфгидрильные группы могут окисляться до ди-сульфидных. Обнаружено, что под влиянием NO происхо­дит разрушение кластеров ZnS в "цинковых пальцах" фак­торов регуляции транскрипции, и это приводит к повыше­нию концентрации ионов цинка в цитозоле и ядре.

Неферментативными путями вмешательства N0 в бел­ковый метаболизм тканей растений могут быть объяснены данные о влиянии донора NO - нитропруссида, на набор белков, полученные в нашей лаборатории В.Г. Яковлевой. Введение в проростки гороха нитропруссида привело уже через сутки после начала опыта к изменению набора поли­пептидов в растениях. Исчезли характерные для контроль­ных растений полипептиды 19 и 30 кДа и появились новые с молекулярными массами 32 и 36 кДа.

Проростки гороха уже давно стали для нашей лабора­тории модельным объектом, с помощью которого мы ис­следовали влияние на набор и содержание белков салици­ловой [Тарчевский и др., 1996а, б; 1999; 2001], янтарной |Тарчевский и др., 1999], абсцизовой [Тарчевский и др., 2001], жасмоновой [Тарчевский и др., 1996а, б] кислот, а также инфицирования микоплазмами [Тарчевский и др., 1996а, б]. Во всех случаях наблюдаемое изменение набора полипептидов в растениях отмечалось лишь через несколь­ко дней после начала воздействия того или иного исследуе­мого соединения. Через сутки после начала воздействия на проростки гороха салициловой кислоты не произошло из­менения набора полипептидов, наблюдалось лишь некото­рое относительное (по сравнению с контрольными расте­ниями) повышение содержания полипептида 34 кДа, Бы­строе салицилатнезависимое появление этого полипепти­да, вызванное донором NO нитропруссидом, могло объяс­няться неферментативной активацией матричной РНК с помощью монооксида азота.

Ранее [Durner et al., 1998; Klessig et a!., 2000] было уста­новлено, что NO вызывал достаточно быстрое появление двух белков - PR 1 и фенилаланин-аммиак-лиазы - менее чем через 24 ч после начала воздействия, но эти результаты

были получены в опытах с использованием более чувстви­тельного метода иммуноблотинга.

Быстрое NO-индуцированное салицилатнезависимое ис­чезновение полипептидов 19 и 30 кДа в опытах, проведенных в нашей лаборатории, можно было бы объяснить прекраще­нием их синтеза. Но это происходило бы лишь в том случае, если скорость их оборота была бы очень велика. Возможно, что непосредственное взаимодействие NO с этими белками приводило к изменению их конформации и, вследствие это­го, к быстрой деградации с помощью протеаз.

Примечателен тот факт, что многократное повышение (всплеск) содержания цГМФ, вызванное N0, было преходя­щим [Dinner et al., 1998], но синтез NO-индуцированных белков продолжался, что свидетельствует о гораздо большем време­ни жизни более поздних звеньев этого сигнального пути.

Остается неясным, что в NO-синтазой системе является рецептором элиситоров, расположены они в плазмалемме или цитозоле и принимают ли участие G-белки в качестве промежуточного звена между рецептором и NO-синтазой? Ответа на этот вопрос не содержится ни в статьях журнала "Биохимия" [1998. Т. 63, вып. 7], специально посвященного N0, ни в пока еще немногочисленных статьях о сигнальной функции NO у растений. Возникает вопрос: не является ли рецептором сама молекула фермента NO-синтазы? К этому предположению склоняют ее сложность и присутствие в до­менах регуляторных цистеиновых сайтов, изменение актив­ности в ответ на различные эффекторы, такие как цитоки-ны у животных, на фосфорилирование, существование не­большого эндогенного белкового ингибитора, препятству­ющего образованию активной димерной формы фермента. Интересно, что мутантные мыши, лишенные каждая одной из изоформ NO-синтазы, оказались жизнеспособными, но обнаруживали ряд особенностей в поведении. Кроме того, мыши, дефектные по индуцибельной NO-синтазе, были бо­лее чувствительны к инфекциям [Snyder, 1995].

Интенсивные исследования функционирования NO-син-тазной сигнальной системы у растений должны в ближай­шем будущем привести к новым интересным фактам, каса­ющимся локализации ферментов этой системы, регуляции их активности, взаимоотношений с другими сигнальными системами и т.д.

ПРОТОННАЯ СИГНАЛЬНАЯ СИСТЕМА

При анализе участия различных сигнальных систем в за­щитных реакциях против патогенов (образование фитоале-ксинов и т.д.) необходимо учитывать, что одна из наиболее ранних и неопровержимо доказанных реакций клеток на действие элиситоров, учитываемых с помощью селектив­ных электродов или флуоресцирующих рН-индикаторных красок, - быстрое преходящее изменение в цитозоле кон­центрации протонов за счет входа Н+ из вакуоли и внекле­точной среды [Conrath et al., 1991; Mathieu et al., 1991; 1994; 1996; Horn et al., 1992; Nurnberger et al., 1994; Hahlbrock et al., 1995; Amano et al., 1997; Jabs et al., 1997; Roos et al., 1998]. Трансмембранное передвижение протонов происходит по градиенту концентрации за счет того, что с внешней сторо­ны плазмалеммы среда более кислая, чем с внутренней, и разница может достигать двух единиц рН.

Так, в культуре клеток табака происходили подкисление цитозоля и подщелачивание инкубационной среды, вызван­ное олигогалактуронидами [Mathieu et al., 1991]. Подкисле­ние цитозоля и подщелачивание среды наблюдались в сус­пензионных клетках табака не только при действии олиго-галактуронидов, но и криптогеина и других элиситоров [Mathieu et al., 1996], причем интенсивность и кинетика сдви­га рН зависела от вида элиситоров, связывающихся с рецеп­торами плазмалеммы. Механизм преобразования элиситор-ных сигналов, приводящий к открыванию протонных кана­лов, продолжает оставаться невыясненным. Совершенно очевидно, что необходимым звеном этого механизма явля­ется фосфорилирование белков Н+-каналов [Mathieu et al., 1996]. Показано, что ингибиторы протеинкиназ, например стауроспорин, подавляли элиситориндуцируемое подкисле­ние цитозоля, а ингибитор протеинфосфатаз каликулин А

вызывал снижение рН в цитозоле и повышение рН в сус­пензионной среде даже в отсутствие элиситора. Это свиде­тельствует об участии процессов фосфорилирования-де-фосфорилирования в элиситации изменений рН и заставля­ет с большим вниманием отнестись к представлениям о сиг­нальной роли трансмембранного изменения концентрации протонов [Скулачев, 1989; Polevoi et al., 1996], тем более что оно приводило к синтезу классических патогениндуцируе-мых белков. Примером может служить искусственное под­кисление цитозоля, которое вызывало образование фенил-ал анин-аммиак-лиазы [Mathieu et al., 1994]. Продолжают оставаться невыясненными интермедиаты протонной сиг­нальной системы. Обнаружение протонозависимой актива­ции некоторых изоформ МАР-киназ [Тепа, Renaudin, 1998] позволяет выстроить ранее скрытую последовательность звеньев протонной сигнальной системы: сигнал —> рецептор —> *—>* активация протонных каналов —> подкисление цитозоля —> —> активация МАР-киназ —> активация факторов регуляции транскрипции —> изменение программы экспрессии генов.

Обнаружены также активные при пониженных значени­ях рН изоформы фосфолипазы Д [Munnik et al., 1995] и аде-нилатциклазы [Carricarte et al., 1988], что может рассматри­ваться в качестве аргумента в пользу существования протон­ной системы. С другой стороны, эти эффекты можно расце­нивать лишь как рычаг дополнительной активации подкис-лением цитозоля элиситориндуцируемых фосфатидатной, МАР-киназной и аденилатциклазной сигнальных систем. Имеются также данные о том, что ингибиторы МАР-киназ приводят к подавлению подщелачивания внеклеточной сре­ды, вызванного действием элиситоров [Zhang et al., 1998]. В этом случае не протонный импульс находится "выше по те­чению" сигнальной системы, а МАР-киназное звено.

Важным представляется решение вопроса о том, из ка­кого источника протоны поступают в цитозоль. С одной стороны, имеются данные, что взаимодействие элиситоров с липидной фазой плазмалеммы может приводить к неспе­цифическому входу протонов снаружи внутрь клетки и к подкислению цитозоля [Klusener, Weiler, 1999]. С другой стороны, показано, что после контакта клеток с элисито-ром подкисление цитозоля и ядерной области происходит в первую очередь за счет подщелачивания вакуоли [Roos et

al., 1998]. "Протонная вспышка" начиналась практически без лаг-фазы и продолжалась в течение десятков минут. Ис­тощение вакуолярного протонного пула предотвращало как элиситорное подкисление цитозоля, так и синтез фито-алексинов. Подщелачивание внеклеточной среды обнару­живалось только при более высоких концентрациях элиси­тора. По мнению авторов, подкисление цитозоля за счет выхода протонов из вакуоли - необходимый и достаточный шаг в сигнальной системе синтеза фитоалексинов. Насыща­ло образование фитоалексинов в суспензионных клетках мака изменение концентрации протонов, соответствующее 0,6 единицы рН.

Протонные каналы и Н+-АТФазы не были обнаружены в мембранах ядерной оболочки [Matzke et al., 2001], в отличие от кальциевых каналов и помп, что свидетельствует о прин­ципиальных различиях в механизмах регуляции концентра­ции этих ионов в ядрах клеток, по сравнению с вакуолями.

Преходящий характер протонной вспышки объясняется усиливающимся при подкислении цитозоля (рис. 34) функ­ционированием протонных помп (Н+-АТФаз) плазмалеммы |Palmgren, 1991] и тонопласта. Можно отметить, что АТФа-за была первым клонированным мембранным белком рас­тений. В настоящее время уже многие растительные АТФа-зы клонированы (например, у арабидопсиса - более 40) и подразделяются на пять типов [Palmgren, Harper; 1999; Palmgren, 2001]. Структура Н+-АТФаз проще, чем у других ионных помп, и в большинстве случаев содержит только одну каталитическую субъединицу. Трансмембранный домен представлен десятью спиралями, причем и N- и С-концы по­липептида обращены в цитозоль. АТФазы имеют регуля-торные домены (в том числе автоингибиторные) на С-кон-це молекулы и, по-видимому, места связывания с регуля-торными белками, в первую очередь с белком 14-3-3 (акти­вирующим разнообразные ферменты). Предполагается, что важную роль в активации Н+-АТФаз играет их фосфо-рилирование протеинкиназами, но, с другой стороны, обна­ружена и их активация при дефосфорилировании.

Интересно, что работа Н+-АТФаз плазмалеммы стимули­ровалась Са2+-активируемыми протеинкиназами [Schaller, Oecking, 1999]. Если иметь в виду, что обычно под влиянием элиситоров происходит одновременное повышение содержа-



Рис. 34. Схема участия протонных каналов и помп в преходящем подкислении цитозоля

*1* и 2 - Н+-каналы; *3* и 5 - протонные помпы; *4* - Н+/Са2+-антипор-тер; ПЛ - плазмалемма; Р - рецептор

ния протонов и ионов кальция в цитоплазме, то опосредован­ная стимуляция последними Н+-АТФаз может играть роль дополнительного рычага снижения содержания протонов.

Основное назначение Н+-АТФаз - перенос протонов против градиента концентрации, создание трансмембранно­го протонного градиента и, в связи с этим, электрогенного мембранного потенциала (положительного снаружи и отри­цательного с внутренней стороны плазмалеммы).

Итак, можно сделать вывод, что за элиситориндуцирован-ной активацией протонных каналов следует интенсификация функционирования протонных помп. Необходимо, однако, за­метить, что имеются также данные об элиситориндуцируемом подавлении Н+-АТФаз как причине подкисления цитозоля.

**МЕХАНИЗМЫ ПАТОГЕНИНДУЦИРУЕМОЙ СМЕРТИ КЛЕТОК**

Одним из распространенных результатов взаимодейст­вия патогенов и растений являются локальные разрушения клеток в инфицированных участках тканей хозяина. Види­мая картина этого - появление темных, бурых, иногда свет­лых пятен в местах проникновения в ткань патогенов.

Существуют два типа смерти клеток, вызываемые раз­личными непосредственными причинами и осуществляю­щиеся по различным сценариям. Первый и наиболее прос­той - это некроз клеток, который происходит благодаря на­рушению целостности плазмалеммы и других мембран кле­ток, что приводит к невосстанавливаемым нарушениям трансмембранных ионных градиентов плазмалеммы, осво­бождению лизосомальных ферментов, вызывающих дегра­дацию белков, нуклеиновых кислот и липидов. Наблюдает­ся также снижение интенсивности синтеза АТФ в хлороплас-тах и митохондриях.

Одними из главных ультраструктурных проявлений нек­роза являются набухание клеток, лизис их составляющих, разрушение плазмалеммы и вытекание содержимого кле­ток [Cohen, 1993]. Этот процесс не регулируется генетиче­ским аппаратом.

Второй тип гибели клеток - это генетически программи­руемая смерть (апоптоз), вызванная действием элиситоров и опосредованная сигнальными системами [Dangl et al., 1996; Greenberg, 1997; Hammond-Kosack, Jones, 1997; Mittler et al., 1997; Pennell, Lamb, 1997; Green, 1998; Lam et al., 1999; Самуи­лов и др., 2000; Shirasu, Schulze-Lefert, 2000]. Кстати, апоптоз может быть вызван тем же агентом, что и некроз, например перекисью водорода, но в последнем случае требуется гораз­до большая концентрация агента. О начале процесса можно

судить по изменению ультраструктуры: вакуолизации [Shirasu, Schulze-Lefert, 2000] и съеживанию цитоплазмы, вздутиям ядерной оболочки, фрагментации ядер, конденса­ции хроматина [Aoyagi et al.,1998; Gao, Showalter, 1999], уп­лотнению матрикса митохондрий и т.д. Необходимо отме­тить, что плазмалемма сохраняет свою целостность. Апопто-зу подвергаются клетки, окружающие инфицированный учас­ток, причем наибольшей восприимчивостью отличаются клетки, примыкающие к проводящим пучкам листьев. Апоп-тоз и, вследствие этого, высыхание клеток создают механи­ческий барьер для распространения инфекции по растению, в том числе системно по проводящим путям.

Принципиально важен вопрос о том, участвуют в про­цессе апоптоза белки, уже имевшиеся в клетках до воспри­ятия ими элиситора - сигнала смерти, или этот сигнал вы­зывает экспрессию генов апоптоза с помощью сигнальных систем, и уже затем образовавшиеся протеазы, нуклеазы и другие ферменты апоптоза приводят к смерти клетки. Вторая возможность подтверждается тем, что процесс апоптоза подавляется при действии на клетки ингибиторов синтеза белков, например циклогексимидом. Известны ге­ны, экспрессия которых приводит к апоптозу клеток у жи­вотных и растений; он не происходит, если синтез белков подавлен с помощью ингибиторов [Greenberg, 1996; Mittler et al., 1997].

В исследовании процесса апоптоза все большую роль иг­рают параноидные мутанты растений, образующие некро­тические пятна самопроизвольно, без действия патогенов, и трансгенные растения с привнесенными генами апоптоза или генами ферментов, влияющих на содержание небелко­вых соединений, принимающих участие в процессе апопто­за, например интермедиатов сигнальных систем, таких как салициловая кислота.

Культура клеток - хорошая модель для изучения апоптоза [McCabe, Leaver, 2000], так же как трансгенные растения со спонтанным образованием апоптозных пятен без действия патогенов [Mittler, Rizhsky, 2000].

Исследования апоптоза вышли на новый, более высокий уровень после установления основополагающих фактов ге­нетического контроля за протеканием апоптоза у нематоды Caenorhabditis elegans. Оказалось, что этот контроль осуще-

ствляется тремя основными генами: ced-3, ced-4 и ced-9 (аб­бревиатура от С. elegans death). Первый кодирует каспазы, третий - белок-ингибитор каспаз, гомологичный белкам се­мейства Вс1-2 (например, Bcl-xL) у млекопитающих. Для осуществления своих функций ингибитор каспаз нуждается в белке, кодируемом геном ced-4, действующим в качестве моста между каспазой и ее ингибитором. Существует и не­сколько вспомогательных генов ced. Эндогенные белковые активаторы апоптоза - Bad, Bax и Bcl-Xs, ингибиторы -Вс1-2 и Bcl-XL.

Основной механизм апоптоза у животных и растений консервативен, но в геноме арабидопсиса отсутствуют мно­гие гены, кодирующие регуляторы апоптоза, характерные для человека, червей, насекомых, что показывает, что рас­тения используют и другие регуляторы для контроля над этим процессом [Lam et al., 2001]. В то же время обработка кеточной суспензии томатов химическими индукторами апоптоза животных клеток приводила к апоптозу и клеток растений [De Jong et al., 2000].

Очень важным этапом апоптоза является активация цис-теиновых протеиназ - каспаз (сокращение от кальцийзави-симых протеиназ). С помощью ингибиторного анализа по­казано, что сериновые протеиназы не отвечают за развитие этих событий [Green,1998]. Гибель клеток затормаживалась под влиянием экзогенного ингибитора цистеиновых проте­иназ [Vardi et al., 1999] и при активации экспрессии гена эн­догенного белкового ингибитора цистеиновых протеиназ ISolomon et al., 1999]. Еще один существенный этап апопто­за - активация эндонуклеаз.

Растения имеют два основных класса ДНКаз: Zn2+- и Са2+-зависимые, и оба принимают участие в процессе апоп­тоза [Sugiyama et al., 2000]. Их активация приводит к фраг­ментации ядерной ДНК [Mittler et al., 1997; Gao, Showalter, 1999; Vardi et al., 1999; De Jong et al., 2000; Pedroso et al., 2000; Xu, Roossinck, 2000]. Исследование апаптоза животных кле­ток позволило установить, что существуют программы апоптоза и их начальными звеньями можно считать лиган-ды (первичные сигналы) апоптоза - своеобразную "черную метку" и семейство рецепторов этих лигандов.

Эти события проявляются достаточно быстро, напри­мер, фрагментация ДНК обнаруживалась через 12 ч после

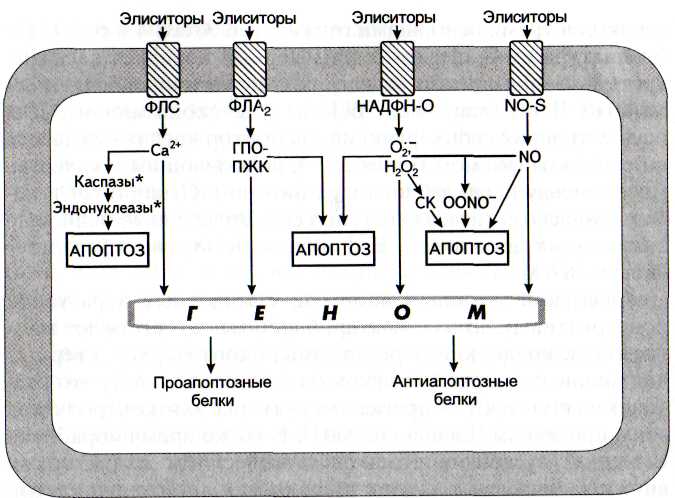


Рис. 35. Схема участия кальциевой, липоксигеназной, НАДФН-оксидазной и NO-синтазной сигнальных систем в процессе апоп­тоза клеток

ГПО-ПЖК - гидропероксипроизводные полиеновых жирных кис­лот; НАДФН-О - НАДФН-оксидаза; ФЛА2 - фосфолипаза А2;

ФЛС - фосфолипаза С; NO-S - NO-синтаза; *Of* - супероксиданион-радикал; OONO" - пероксинитрит

воздействия перекиси водорода на протопласты из корней чечевицы, достигая максимальной величины еще через 12 ч [Maccarrone et al., 2000].

Имеются доказательства, что начальные этапы процес­са апоптоза осуществляются с помощью сигнальных систем клеток растений, "включаемых" элиситорами или(и) токси­нами патогенов. Об этом свидетельстуют, например, дан­ные, что малые G-белки могут регулировать интенсивность процесса апоптоза [Kawasaki et al., 1999], так же как проте-инкиназы и протеинфосфатазы.

Доказано, что основное участие в инициировании апоп­тоза принимают такие сигнальные системы клеток, как кальциевая [Mittler et al., 1995; и др.], НАДФН-оксидазная [Mittler et al., 1998; 1999], NO-синтазная [Pedroso et al., 2000; и др.] и липоксигеназная [Rusterucci et al., 1999; Maccarrone et

al., 2000] (рис. 35). О последнем свидетельствует предотвра­щение фрагментации ДНК при действии ингибиторов липо-ксигеназ на клетки, осуществляющие Н2О2-индуцируемый апоптоз [Maccarrone et al., 2000].

Имеются немногочисленные свидетельства участия в апоптозе МАР-киназной сигнальной системы [Suzuki et al., 1999]. МАРК-каскад регулирует апоптоз. МАРКК располо­жена выше SIPK и WIPK. У мутанта табака конститутивно экспрессируемая МАРКК индуцировала апоптоз [Yang et al., 2001].

NO независимо от АФК вызывал апоптоз у суспензии клеток арабидопсиса со всеми его атрибутами: конденсаци­ей хроматина, каспазной активностью, а ингибитор каспаз блокировал апоптоз [Clarke et al., 2000].

Предполагается, что в апоптозе животных клеток мо­жет принимать участие и аденилатциклазная сигнальная си­стема [Северин и др., 2001].

Сигнальные интермедиаты перечисленных выше систем могут активировать предсуществующие в клетках фермен­ты, а также инициировать экспрессию главных генов апоп­тоза, кодирующих эндонуклеазы [Mittler, Lam, 1995; 1997; Aoyagi et al.,1998; Tada et al., 2001] и протеиназы [De Silva et al., 1998; Solomon et al., 1999; De Jong et al., 2000; Tada et al., 2001], в том числе представителей семейства каспаз, не только специфичных для животных объектов [De Jong et al., 2000], но обнаруживаемых и у растений. Получены данные об элиситориндуцируемой экспресии генов белков, осуще­ствляющих тонкую регуляцию процесса апоптоза [Polyak et al., 1997; Pontier et al., 1998].

Патогены или элиситоры могут не только активиро­вать, но и затормаживать экспрессию некоторых генов, на­пример, катал азы и аскорбатпероксидазы [Mittler et al., 1998; 1999] - ферментов, принимающих участие в снижении уровня перекиси водорода в цитоплазме, что повышает со­держание этого сигнального соединения и, возможно, явля­ется определяющим в индукции экспрессии генов апопто­за - эндонуклеаз и протеиназ. Кстати, накапливается все больше фактов экспрессии генов, вызывающих торможе­ние развития апоптоза [Gallois et al., 1997; Gray et al., 1997; Tanaka et al., 1997; Mayda et al., 1999; Mitsuhara et al., 1999].

В активации предсуществующих ферментов на первом

этапе апоптоза (после рецепции клеткой элиситора - сигна­ла смерти) важную роль играет кальциевая сигнальная сис­тема в связи с тем, что основные ферменты, отвечающие за программируемую смерть клеток протеазы семейств каспаз и эндонуклеаз, - это кальцийактивируемые ферменты.

У животных одной из мишеней сигнального Са2+, инду­цирующего апоптогенный сигнал, являются митохондрии. Обнаружено, что сигналы, приводящие к апоптозу, вызыва­ют раннее, еще до появления первых ультраструктурных симптомов гибели клетки, повышение проницаемости внут­ренней митохондриальной мембраны, одним из последст­вий которого может считаться потеря митохондриями ци-тохрома *с* [Северин и др., 2001]. В цитозоле он вызывает "включение" каскада каспаз, разрушающих топоизомеразу и гистон HI, который защищает ДНК от действия эндону­клеаз на межнуклеосомальном уровне. Повышение кон­центрации ионов кальция в цитозоле может привести так­же к непосредственной активации Са2+, Mg^-зависимых эндонуклеаз.

У растений освобождение цитохрома *с* тоже предшест­вует морфологическим изменениям, связанным с апопто-зом [Balk, Leaver, 2001]. Оказалось, что цитохром *с* индуци­рует апоптоз только в окисленном состоянии. Высокий уровень цитоплазматического восстановленного глутатио-на (GSH) поддерживает его в неактивном состоянии, а Н2О2, снижая содержание GSH, вызывает апоптоз [Hancock et al., 2001].

В целом ряде работ были получены свидетельства уча­стия стрессовых фитогормонов салициловой кислоты, жас-моновой кислоты и этилена в развитии процесса апоптоза. В опытах с использованием трансгенных растений арабидоп-сиса с чужеродным геном NahG (что приводило к деградации салициловой кислоты), а также с мутантами, нечувствитель­ными к жасмоновой кислоте или этилену, было обнаружено, что апоптоз медиируется сигнальными путями, включающи­ми салицилат, жасмонат и этилен [Asai et al., 2000].

Этилен вызывал апоптоз [Mergemann, Sauter, 2000] -фрагментацию ДНК, съеживание ядра [Herbert et al., 2001], у клеток табака в культуре. Тот же эффект вызывала обра­ботка перекисью водорода [Houot et al., 2001]. Салицилат и этилен вовлечены в регуляцию апоптоза у арабидопсиса

[Greenberg et al., 2000]. В отношении салицилата это было подтверждено в опытах и других исследователей [Heath, 2000; Ludwig, Tenhaken, 2000].

Салицилат-опосредованная активация апоптоза у топо­ля ингибировалась жасмоновой кислотой [Koch et al., 2000]. Существует большая литература о взаимодействии этих двух сигнальных метаболитов. Экзогенный салицилат, в за­висимости от концентрации, может приводить как к апоп­тозу, так и к антиоксидантным защитным путям. Озон вызывал апоптозный ответ через салицилатзависимый и независимый (жасмонатный и этиленовый) пути. Если ли­стья тополя перед действием озона подвергались раневому воздействию или действию жасмоната, то уровень повреж­дений был меньше. Озониндуцированное образование по­вреждений (lesion) происходит двумя отдельными путями у двух клонов тополя. У устойчивого клона - это апоптоз, связанный со сверхчувствительностью, а у чувствительно­го - некроз, вызванный потерей антиоксидантной защиты от активных форм кислорода.

На листьях трансгенного арабидопсиса с привнесенным геном NahG (салицилатгидроксилазы) было показано [Rao, Davis, 1999], что смерть клеток наступает из-за неспособно­сти поддерживать достаточный уровень антиоксидантной защиты.

Участие топоизомеразы в качестве одного из критиче­ских звеньев осуществления апоптоза подтверждено с по­мощью ингибиторного анализа. В суспензии клеток томата ингибитор топоизомеразы I камптотецин вызывал апоптоз. Каспазный ингибитор уменьшал эффект, а этилен - усили­вал его [Orzaez et al., 2001]. Камптотецин вызывал также межнуклеосомальную деградацию ДНК у клеток культуры томата [Hoeberichts et al., 2001].

Использование трансгенных растений табака с привне­сенными антиапоптозными генами человека Вс1-2 и Bcl-xl, а также нематодным геном ced-9 [Dickman et al., 2001] пока­зало, что у них грибная инфекция не приводила к фрагмен­тации ДНК, в отличие от контрольных растений.

В последнее время предпринимаются усилия для рас­шифровки механизмов регуляции апоптоза, что может иметь и большое практическое значение для изменения ус­тойчивости растений к патогенам.

**СИГНАЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА**

От цитоскелета (тубулиновых микротрубочек и актино-вых микрофиламентов) зависит морфогенез на клеточном уровне (ультраструктура клеток), осуществление простран­ственно-временного контроля роста, деления и дифферен­циации клеток [Васильев, 1996; Клячко, 1998; Медведев, Маркова, 1998]. Известно, что переориентация расположе­ния микротрубочек под влиянием фитогормонов приводит к соответствующему изменению направленности отложе­ния вновь синтезируемых микрофибрилл целлюлозы [Тар-чевский, Марченко, 1987; Tarchevsky, Marchenko, 1991] и па­раметров роста клеток, например, к замедлению или пре­кращению удлинения клеток и их утолщению. Это может происходить достаточно быстро. Например, переориента­ция микротрубочек в замыкающих клетках устьиц осущест­вляется уже через несколько минут после начала действия экзогенной абсцизовой кислоты [Eun, Lee, 1997]. Ауксин и гиббереллины способствуют поперечному расположению микротрубочек по отношению к продольной оси клеток, цитокинины, абсцизовая кислота и этилен ориентируют мик­ротрубочки в продольном направлении. Особенно быстро клетки реагируют на этилен.

В последнее время обращают все большее внимание на важную роль сигнальных систем не только в изменении ме­таболизма, но и в структурных изменениях клеток и участии в них цитоскелета при патогенезе [Chrispeels et al., 1999; Volkmann, Baluska, 1999; Papakonstanti et al., 2000].

И у животных, и у растений цитоскелет - сложная сеть нитей, пронизывающих цитозоль, - состоит из трех основ­ных типов структур: толстых тубулиновых микротрубочек, тонких актиновых нитей (филаментов) и промежуточных (по диаметру) нитей. От этих надмолекулярных образова-

ний, постоянно распадающихся и создаваемых заново из мо­номерных белков, зависит движение цитозоля, органоидов и очертания клеток растений, а также внутриклеточный транспорт ряда белков. Все типы микротрубочек и актино­вых филаментов способны связываться латерально с помо­щью вспомогательных белков или с себе подобными или с другими типами структур. Белки цитоскелета и обслужива­ющие их белки имеют консервативные последовательно­сти, характерные и для животных, и для растений (еще один пример универсальности молекулярной и надмолекулярной структуры). Микротрубочки образуются в два этапа: снача­ла путем димеризации а- и Р-тубулина, а затем димеры по-лимеризуются с образованием трубчатой структуры диа­метром 22 нм. Вспомогательные МАР-белки (microtubules associated proteins) нескольких классов значительно снижа­ют пороговую концентрацию тубулина, необходимую для сборки из него микротрубочек. Спиралевидные актиновые нити диаметром 6-7 нм образуются из однотипных актино­вых субъединиц с затратой АТФ. Баланс между мономер­ными актиновыми белками и микрофибриллами обеспечи­вается вспомогательными белками - актин-деполимеризу-ющим фактором, кофилином и профилином. С помощью вспомогательного белка фодрина обеспечиваются лате­ральное взаимодействие нитей и появление пучков микро­фибрилл, а вспомогательный белок фил амин участвует в образовании сетчатой (решетчатой) структуры, скрепляя филаменты в местах их пересечения друг с другом. Микро­трубочки и микрофиламенты способны участвовать в пере­мещении вдоль своей поверхности различных структур (включая везикулы и органеллы) с помощью специальных вспомогательных белков-моторов кинезина и цитоплазма-тического динеина.

Все эти факты приобретают для нас особое значение в связи с тем, что многие участники процессов функциониро­вания, образования и деградации микротрубочек и микро­фибрилл, а также их реориентации являются мишенями ин-термедиатов некоторых сигнальных систем клеток. Это от­носится к повышению в цитозоле концентраций протонов, ионов кальция, Са2+-кальмодулина, активности МАР-киназ. Могут регулировать процессы полимеризации актина и ло­кализации в клетках актиновых нитей ГТФ-связывающие

белки, протеинкиназы, протеинфосфатазы, фосфоинози-тидфосфатазы.

Показано, что актин-деполимеризующий фактор изме­няет активность под влиянием фосфорилирования с помо­щью Са2+- зависимых протеинкиназ. У арабидопсиса был выделен кальмодулинсвязывающий моторный вспомога­тельный белок кинезин, причем Са2+-кальмодулиновый комплекс этого белка с кинезином ингибировал способ­ность микротрубочек участвовать в процессах внутрикле­точного движения. Фосфорилирование а- и |3-тубулинов ак­тивировалось Са2+-кальмодулинзависимыми и цАМФ-зави-симыми протеинкиназами, а также протеинкиназой С [Blume et al., 1997].

Абсцизовая кислота вызывала быструю деполимериза­цию кортикальных актиновых нитей в замыкающих клет­ках устьиц, причем этот процесс был опосредован входом в клетки ионов кальция [Hwang, Lee, 2001]. Деполимеризация медиировалась также протеинкиназами (о чем свидетельст­вовало ее подавление стауроспорином).

Особое внимание привлекает установление факта уди­вительного сходства трехмерной структуры цитоскелетных вспомогательных моторных белков с G-белками. Так как G-белки могут непосредственно взаимодействовать с цито-плазматическим доменом многих рецепторов в сигнальных системах (и изменять при этом свою конформацию и актив­ность), то этот факт позволяет допускать возможность очень тесной связи даже между начальными звеньями сиг­нальных систем и цитоскелетом.

Димеры тубулина имеют особенно высокое сродство с ос-субъединицами G-белков [Крутецкая, Лонской, 1994]. Обнаружено, что активатор G-белков мастопаран вызыва­ет (предположительно, при участии фосфоинозитольной сигнальной системы) переход вспомогательного белка про-филина (взаимодействующего с мономерной формой акти­на [McCurdy et al., 2001]) из ядра в цитоплазму у клеток кор­ней кукурузы и связанное с этим изменение структуры ак­тиновых микрофиламентов [Baluska et al., 2001].

Выделен класс белков - пипмодулинов (связывающихся с фосфоинозитидными фосфолипидами клеточной мембра­ны), контролирующих освобождение фосфоинозитолбис-фосфата (Р1Р2) с помощью фосфолипазы С [Lanier, Gertler,

2000] и зависящую от Р1Р2 динамику изменения структуры и локализации актиновых нитей, которые, в свою очередь, определяют морфогенез клеток.

Использование ингибитора полимеризации тубулино-вых белков оризалина, вызвавшего скопление ретикуло-плазминовых Са2+-связывающих белков вблизи плазмати­ческой и ядерной мембран [Олиневич и др., 2001], позволи­ло авторам сделать вывод об участии цитоскелета и ретику-лоплазминов в преобразовании внешних сигналов.

Перестройки актиновых нитей очень чувствительны к изменениям рН. При высоком содержании протонов акти-новые нити более стабильны, а микротрубочки менее ста­бильны, что не может не отразиться на состоянии цитоскеле­та в целом [Медведев, Маркова, 1998]. Если иметь в виду, что одним из наиболее ранних ответов клеток растений на действие патогенов и элиситоров является подкисление ци-тозоля, то становится очевидным, что это не может не по­влиять на структуру и функции цитоскелета.

Описаны контролируемые цитоскелетом изменения морфогенеза клеток, вызванные не только фитогормона-ми, но и светом, изменением направления силы тяжести и другими причинами. Для нас особый интерес представляют факты действия на функционирование цитоскелета инфи­цирования растений патогенами, приведенные в обзорной работе [Nick, 1999]. Показано, что ядро клетки растения-хо­зяина начинает двигаться к месту контакта с клеткой гриба [Gross et al., 1993]. Движение ядра осуществляется с помо­щью актиновых микрофиламентов и обусловлено также локальной деполимеризацией кортикальных микротрубо­чек вокруг места контакта с грибом. Можно вызвать тор­можение движения ядра с помощью специальных препара­тов, причем в этом случае грибы, которые не были способ­ны инфицировать растение, становились патогенными [Kobayashi et al., 1997]. Авторы связывают это с ослаблени­ем отложения каллозы на внешней поверхности плазма-леммы, в месте контакта с патогеном.

Исследование особенностей действия элиситоров крип-тогеина и олигогалактуронидов на цитоскелет клеток таба­ка показало [Binet et al., 2001], что первый вызывал быстрое и сильное разрушение сети микротрубочек, в то время как вторые не оказывали влияния на нее. Действие криптогеи-

на положительно коррелировало с поглощением клетками ионов кальция. В то же время имеется информация о регу­ляции функционирования кальциевых каналов цитоскеле-том [Thuleau et al., 1998].

Непатогенный мутант патогенного для риса гриба Magnaporthe grisea вызывал целый ряд защитных метаболи­ческих реакций и перестройку актинового цитоскелета [Хи et al., 1998].

Большой интерес вызывает информация о том, что глю-кановые фрагменты из клеточных стенок фитофторы вы­зывали снижение содержания мРНК одной из двух обнару­женных изоформ тубулина, причем это было вызвано не подавлением экспрессии гена тубулина, а деградацией тубу-линовой мРНК, опосредованной глюканиндуцированным повышением содержания ионов кальция в цитозоле [Ebel et al., 2001].

Вызванная липохитоолигосахаридами (Nod-факторами) быстрая деполимеризация актина считается главной причи­ной успешного проникновения бактерий Rhizobium в кор­невые волоски с последующим образованием клубеньков у бобовых растений [Cardenas et al., 1998; Ruijter et al., 1998]. Обнаружено, что при бактериальной атаке растений одним из наиболее быстро индуцируемых белков является цент-рин цитоскелета [Cordeiro et al., 1998].

Итак, есть все основания считать, что цитоскелет связан с сигнальной сетью и его изменения являются частью за­щитного механизма против патогенных грибов и бактерий. С другой стороны, вирусы могут использовать микротру­бочки цитоскелета для передвижения от клетки к клетке через плазмодесмы [Heinlein et al., 1995], и в этом случае ци­тоскелет скорее способствует инфицированию растений, а не их защите.

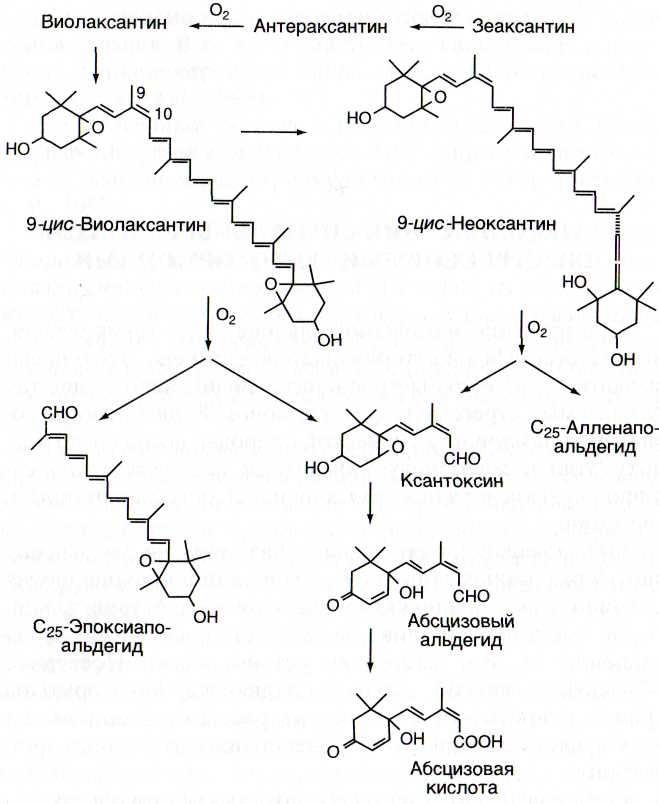
**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ СО СТРЕССОВЫМИ ФИТОГОРМОНАМИ**

При изучении механизмов влияния на растения различ­ных патогенов и элиситоров было обнаружено, что они вы­зывают достаточно быстрое и интенсивное накопление так называемых стрессовых фитогормонов. К ним относят со­единения различной химической природы: абсцизовую кис­лоту, этилен, жасмоновую кислоту (и метилжасмонат), са­лициловую кислоту (и метилсалицилат), брассиностероиды, системин.

Образовавшиеся стрессовые фитогормоны вызывают синтез различных защитных соединений и повышение ус­тойчивости как в клетках, подвергшихся действию элиси­торов (местная или локальная устойчивость), так и на удалении от них (системная устойчивость). Последнее объясняется способностью большинства фитогормонов транспортироваться на большие расстояния или вызы­вать в клетках появление транспортных вторичных эли­ситоров.

Стрессовый фитогормон абсцизовая кислота образуется в результате окисления и связаного с этим разрыва углево­дородной цепи в каротиноидах, вызванного патогенами или элиситорами [Chernys, Zeevaart, 2000] (рис. 36). Ключевым индуктивным ферментом, от активности которого зависит интенсивность появления абсцизовой кислоты, является 9-1(мс-эпоксикаротиноид-диоксигеназа.

Другой стрессовый фитогормон - летучее соединение этилен - синтезируется в ходе последовательных реакций (рис. 37), в которых принимают участие индуктивные фер­менты: 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-синтаза (АЦКС) и 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-оксидаза (АЦКО).



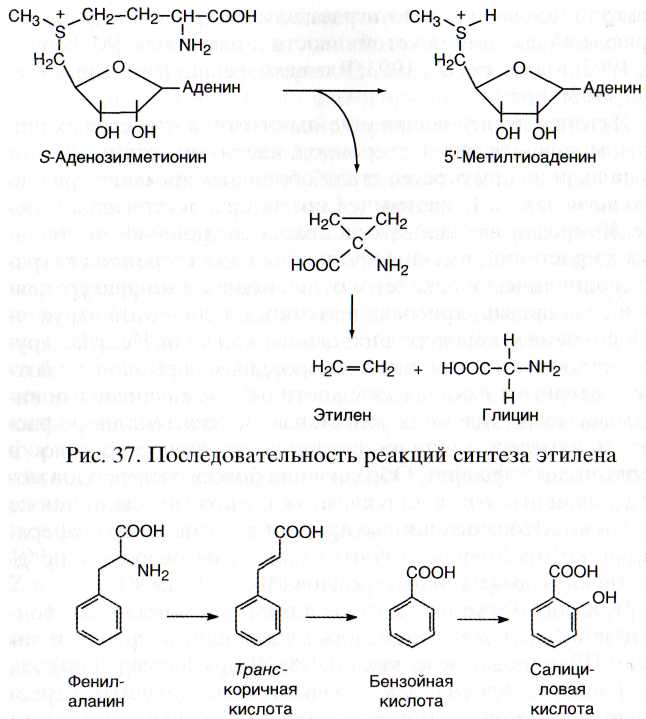


Рис. 38. Последовательность реакций синтеза салици­ловой кислоты

Рис. 36. Последовательность реакций синтеза абсцизовой кисло­ты [Chernys, Zeevaart, 2000]

Содержание еще одного фитогормона - салициловой кислоты - при действии патогенов и элиситоров повышает­ся в десятки, а в некоторых случаях более чем в сто раз [Malamy et al., 1990; Raskin, 1992; Delaney et al., 1994; Leon et al., 1995]. Образуется салициловая кислота в серии реакций из аминокислоты фенилаланина (рис. 38), причем лимити­рует этот процесс фермент фенилаланин-аммоний-лиаза,

активируемая при действии на растения различных элиси­торов. Фермент катализирует превращение фенилаланина в транс-коричную кислоту, которая, по-видимому, в ре­зультате (3-окисления образует бензойную кислоту, а пос­ледняя с помощью бензоат-2-гидроксилазы (принадлежа­щей к семейству цитохрома Р-450) — салициловую. Повы­шение содержания салициловой кислоты вызывает образо­вание из нее эфира глюкозы, откладывающегося в клеточ­ных стенках и гидролизуемого при инфицировании расте­ний патогенами, что вносит вклад в салицилатный "всплеск" при патогенезе. Считается, что флоэмоподвиж-

ная салициловая кислота играет важную роль в выработке у растений системной устойчивости к патогенам [Malamy et al., 1993; Metraux et al., 1993; Rasmussen et al., 1991; Запроме-тов, 1993; и др.].

История исследования еще одного типа стрессовых фи-тогормонов - брассиностероидов, насчитывает уже 20 лет, но на их роль при стрессе стали обращать внимание сравни­тельно недавно. В настоящее время охарактеризовано бо­лее 40 представителей этого класса соединений, выделен­ных из растений, имеющих типичный для стероидов тетра-гетероциклический скелет и отличающихся конфигурация­ми и радикалами, присоединеными к циклической структу­ре и боковой углеводородной цепи. Так же как в случае дру­гих стеролов (в том числе стероидных гормонов живот­ных), их синтез начинается с ацетил-КоА, а основными ин-термедиатами являются мевалонат, изопентенилпирофос-фат и диметилаллилпирофосфат, геранилпирофосфат и фарнезилпирофосфат. Образование брассиностероидов мо­жет усиливаться под влиянием патогенов, но было также отмечено и торможение экспрессии гена метилтрансфера-зы, от которой зависел синтез одного из основных пред­шественников брассиностероидов [Shi et al., 1996].

При обработке растений экзогенными брассиностерои-дами повышается устойчивость к патогенным грибам и ви­русам [Шакирова, Безрукова, 1998; Khripach et al., 2000].

Выше уже отмечалось, что патогениндуцируемые стрес­совые фитогормоны могут вызывать ответную реакцию на достаточно большом удалении от места инфицирования ткани - системный иммунитет растений, проявляющийся в устойчивости к самым различным патогенам.

Внимание исследователей механизма формирования си­стемного иммунитета привлек сравнительно небольшой по­липептид, состоящий из 18 аминокислотных остатков, на­званный системином. Ряд авторов признали его первым идентифицированным фитогормоном полипептидной при­роды [McGurl et al., 1992; Slosarek et al., 1995; Bergey et al., 1996; Bowles, 1998; Constabel et al., 1998; Ryan, Pearce, 1998; Chao et al., 1999; Dombrowski et al., 1999; Sheer, Ryan, 1999]. Интен­сивное образование системина, который сначала считали раневым сигналом, происходит при механическом повреж­дении тканей растений (например, травоядными животны-

ми или листогрызущими насекомыми), действии на расте­ния различных патогенов, элиситоров, обезвоживания, за­соления и других стрессоров. В связи с этим системин мо­жет считаться стрессовым фитогормоном. Этот пептид яв­ляется продуктом частичной деградации (посттрансляцион­ной модификации) более крупного предшественника - про-системина, состоящего из 200 аминокислот. Замещение в системине остатка пролина-13 и тирозина-17 аланином при­водит практически к полной потере элиситорной активно­сти системина [Pearce et al., 1993]. Накопление системина носит двухфазный характер, что объясняется его разруше­нием за счет протеолиза связи по местоположению лизи­на-14. При N-метилировании этой связи системин становит­ся более устойчивым к действию протеаз, и активность сис­темина становится более продолжительной, по сравнению с контрольным вариантом [Schaller, 1998]. Исследования кон-формации системина привели к неоднозначным результа­там. С одной стороны, на основании данных ЯМР-спектро-скопии сделан вывод об отсутствии в этом полипептиде жесткой структуры типа спирали или ленты [McGurl, Ryan, 1992], с другой [Slosarek et al., 1995] - предложена модель Z-подобной ленточной (3-структуры системина.

В интактных растениях ген просистемина может быть отнесен к числу спящих. Он состоит [McGurl et al., 1992] из десяти интронов и одиннадцати экзонов, десять из которых организованы в пять гомологичных пар. Данные о роли системина в качестве фактора индукции системной устой­чивости растений подкрепляются тем, что это — флоэмомо-бильный полипептид [Schaller, Ryan, 1996].

Фитогормон может опосредовать лишь часть ответа клеток на тот или иной элиситор. Обнаружено, например, что метилжасмонат индуцирует накопление сесквитерпен-циклазы (одного из ключевых ферментов синтеза терпено-идных фитоалексинов) лишь в следовых количествах, в от­личие от быстрого и интенсивного образования этого фер­мента в культуре клеток табака под влиянием грибных эли­ситоров [Mandujano-Chavez et al., 2000].

Один из стрессовых фитогормонов - жасмоновая кисло­та, а также метилжасмонат образуются (см. рис. 19) в ходе реакций элиситориндуцируемого липоксигеназного метабо­лизма [Vick, Zimmerman, 1987; Гречкин, Тарчевский, 1999].

Оказалось, что элиситоры могут также активировать фер­менты синтеза этилена [Spanu et al., 1991; Bowler, Chua, 1994; Oetiker et al., 1997], причем повышенные концентра­ции ионов кальция усиливали этот процесс [Gallardo et al., 1999].

Элиситоры индуцировали экспрессию некоторых генов, кодирующих ферменты синтеза абсцизовой кислоты [Chernys, Zeevaart, 2000]. Наблюдалось также повышение содержания салициловой кислоты [Malamy et al., 1990; Klessig, Malamy, 1994] и системина [Bergey et al., 1996], уча­ствующих в индукции системного ответа растений на дейст­вие того или иного патогена. Некоторые исследователи считают таким индуктором защитных реакций растений пе­рекись водорода, которая может выступать в этой роли не­зависимо от салицилата. Было, например, обнаружено, что у растений табака сублетальные концентрации перекиси водорода вызывали системную индукцию образования ос­новных и кислых защитных белков (PR) и повышение ус­тойчивости растений табака к патогенам, но этот эффект был быстрее и сильнее, когда сопровождался некротиче­скими изменениями в листьях [Chamnongpol et al., 1998]. Ос­тается неясным, был ли системный ответ следствием непо­средственного действия перекиси водорода или был опосре­дован другими сигнальными молекулами. Ими могут быть интермедиаты или продукты функционирования различных сигнальных систем клеток. Обнаружено, что жасмонат и метилжасмонат активируют липоксигеназную [Bell, Mullet, 1991; Melan et al., 1993; Avdiushko et al., 1995; Jensen et al., 1997; Voros et al., 1998] и НАДФН-оксидазную [Tamagami et al., 1997] сигнальные системы. Этилен активировал липок­сигеназную и МАР-киназную [Voeste, Kieber, 1998; Iten et al., 1999] системы. Абсцизовая кислота ингибировала адени-латциклазную [Корчуганова и др., 1998], но активировала липоксигеназную [Melan et al., 1993] (ингибируя в то же вре­мя превращение фитодиеновой кислоты в жасмоновую [Laudert, Weiler, 1998]) и кальциевую [Mikami et al., 1998; Owen, 1988; Staxen, 1999], МАР-киназную [Knetsch et al., 1996; Iten et al., 1999], НАДФН-оксидазную [Guan, Scandalios, 1998] и фосфатидатную [Munnik et al., 1995; Ritchie, Gilroy, 1998; Munnik, 2001] сигнальные системы. Абсцизовая кислота вызывала накопление одного из ин-

термедиатов NO-сигнальной системы - цАДФрибозы [Yu et al., 1997; Leckie et al., 1998; Walden, 1998].

Салицилат активировал липоксигеназную [Feussner et al., 1997b], МАР-киназную [Zhang, Klessig, 1997; Iten et al., 1999; Romeis et al., 1999], НАДФН-оксидазную [Chen et al., 1993] и NO-синтазную [Klepper, 1991; Van Camp et al., 1998]; системин-кальциевую [Bergey, Ryan, 1999], липоксигеназ­ную [Constabel et al., 1995; Narvaez-Vasquez et al., 1999; Orozco-Cardenas, Ryan, 1999], НАДФН-оксидазную [Stennis et al., 1998], МАР-киназную [Stratmann, Ryan, 1997; Meindl et al., 1998] и протонную [Schaller, Oecking, 1999], а перекись водорода - липоксигеназную [Macri et al., 1994] и НАДФН-оксидазную [Leon et al., 1995; Dorey et al., 1999] сигнальные системы.

Обнаружено, что экзогенный системин вызывает акти­вацию липоксигеназной [Narvaez-Vasquez et al., 1999; Sheer, Ryan, 1999], кальциевой [Bergey, Ryan, 1999] и MAPK-[ Stratmann, Ryan, 1997] сигнальных систем.

Стрессовые фитогормоны могут усиливать или затор­маживать образование друг друга. Так, оказалось, что жас­монат вызывает значительное снижение содержания в клетках абсцизовой кислоты [Hays et al., 1999], а салицилат ингибирует синтез жасмоната [Репа-Cortes et al., 1993; Doares et al., 1995a] и этилена [Leslie, Romani, 1986]. Последнее объ­ясняется тем, что салициловая кислота - это ингибитор не только каталазы, но и ряда других железосодержащих фер­ментов, в том числе ключевого фермента синтеза этилена -1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-оксидазы [Chen et al., 1997]. Этилен и метилжасмонат синергично индуцировали синтез защитных белков [Xu et al., 1994]. Салицилат подав­лял жасмонатиндуцированное [Репа-Cortes et al., 1993; Doares et al., 1995a], АБК- [Taipalensuu et al., 1997] и систе-мининдуцированное [Doares et al., 1995a] образование бел­ков, а абсцизовая кислота затормаживала этилениндуциро-ванный синтез клетками растений глюканаз, но усиливала такой синтез хитиназ [Rezzonico et al., 1998]. Метилжасмо­нат индуцировал синтез рецептора системина, локализован­ного в плазмалемме и, вследствие этого, стимулировал появ­ление вызванных системином ответных реакций [Sheer, Ryan, 1999], а системин индуцировал синтез абсцизовой кислоты [Chao et al., 1999].

Салицилат приводил к экспрессии стероидной сульфо-трансферазы, вызывающей подавление брассиностероидной активности [Rouleau et al., 1999]. В то же время синтез стеро­идной гидроксилазы семейства цитохромов Р-450, играющей центральную роль в синтезе брассинолида, не изменялся под влиянием экзогенных салицилата, этилена и жасмоната, но авторегулировался брассинолидом [Mathur et al., 1998].

Использование мутантов растений позволило установить, что жасмонат и этилен "включают" одни сигнальные пути, а салицилат - другие [Dong, 1998], однако были также установ­лены различия в особенностях протекания ответных реак­ций, вызванных жасмонатом и этиленом [Penninckx et al., 1998]. На растениях арабидопсиса было показано, что сали­цилат и жасмонат вызывают аддитивный защитный ответ на инфицирование патогенами, но не в тех случаях, когда иссле­довались мутанты с заблокированным салицилатным или жасмонатным сигнальными путями [Van Wees et al., 2000]. Авторы считают, что эти пути являются комплементарными и нет оснований говорить об их пересечении (cross-talk) и пе­ретоке сигналов из одного в другой.

О степени автономности или взаимовлияния сигнальных путей, "включаемых" различными стрессовыми фитогор-монами, можно судить по индуцированию ими образования различных транскриптов и синтеза различных белков. Так, у листьев редиса под влиянием метилжасмоната и этилена активировалась экспрессия генов дефенсинов [Terras et al., 1998; Shah et al., 1999], но не защитных белков PR1, а сали­циловая кислота вызывала активацию локального синтеза PR1, но не системного синтеза дефенсинов. В то же время метилжасмонат не действовал на синтез некоторых изо-форм дефенсинов [Epple et al., 1997]. Как правило, салици­ловая кислота не индуцировала образование дефенсинов [Epple et al., 1997; Terras et al., 1998; Shah et al., 1999].

У томатов салицилат ингибировал, а абсцизовая кисло­та и системин активировали синтез мРНК леициновых ами-нопептидаз, вызванный повреждением тканей, причем два последних фитогормона действовали синергично. В то же время синтез ингибиторов протеиназ не зависел от экзоген­ной абсцизовой кислоты [Chao et al., 1999].

К сожалению, упомянутые исследования, в которых проводилось сравнительное изучение влияния различных

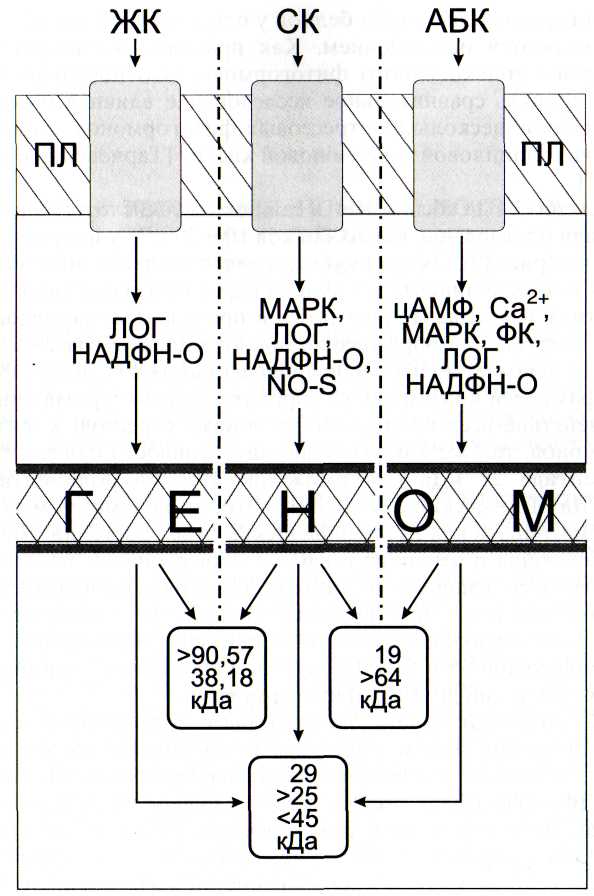


Рис. 39. Схема влияния абсцизовой (АБК), салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот на синтез полипептидов [Тарчевский и др., 2001]

ЛОГ - липоксигеназная сигнальная система; МАРК - МАР-киназ-ная сигнальная система; НАДФН-О - НАДФН-оксидазная сигнальная система; ПЛ - плазмалемма; ФК - фосфатидатная сигнальная система; цАМФ - аденилатциклазная сигнальная система; Са2+ - кальциевая сиг­нальная система; NO-S - NO-синтазная сигнальная система

фитогормонов на синтез белков у одного и того же объек­та, являются исключением. Как правило, анализируется действие только одного фитогормона. Это побудило нас предпринять сравнительное исследование влияния на син­тез белков нескольких стрессовых фитогормонов - абсци-зовой, салициловой и жасмоновой кислот [Тарчевский и др., 2001].

Экзогенные абсцизовая и салициловая кислоты индуци­ровали образование новых белков 19 и 29 кДа у проростков гороха (рис. 39). Экзогенный жасмонат вызывал появление двух новых полипептидов 29 и 96 кДа и исчезновение поли­пептида 104 кДа. Из результатов проведенных исследова­ний следует, что образование нового полипептида 29 кДа, интенсивно метящегося и не проявляющегося на радиоавто­графах гелей контрольного варианта, - характерный ответ на действие всех исследовавшихся нами стрессовых фито­гормонов, так же как усиление интенсивности синтеза по­липептида 25 кДа и торможение синтеза полипептида 45 кДа [Тарчевский и др., 2001]. Это, по-видимому, можно рассматривать как неспецифический ответ растений. Были обнаружены и различия в наборе образующихся полипеп­тидов и интенсивности их синтеза. Так, при действии жасмо­новой кислоты наблюдалось появление полипептида 96 кДа, исчезновение белка 104 кДа и усиление образования полипептидов 35 и 71 кДа, чего не наблюдалось при обра­ботке растений другими фитогормонами.

Сопоставляя данные литературы с полученными нами результатами, необходимо обратить внимание на то, что две важнейшие сигнальные системы (липоксигеназная и НАДФ-оксидазная) "включаются" каждым из исследовав­шихся нами стрессовых фитогормонов. По всей вероятно­сти, это и определяет неспецифичность ответа со стороны части генома клеток (образование нового полипептида 29 кДа, усиление синтеза полипептида 25 кДа и торможение синтеза полипептида 45 к Да). Специфичность экспрессии генов и вследствие этого включения [14С]-лейцина в поли­пептиды может объясняться своеобразием индукции от­дельными фитогормонами различных сигнальных систем клеток.

**РЕГУЛЯЦИЯ ИОННЫХ ПОТОКОВ**

**ИНТЕРМЕДИАТАМИ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ**

Тот факт, что блокаторы ионных каналов ингибировали синтез фитоалексинов [Ward et al., 1995; Roos et al., 1998], свидетельствует об участии ионов в работе сигнальных сис­тем клеток и формировании ответа на инфицирование рас­тений патогенами. Это положение подтверждается также фактами "включения" синтеза фитоалексинов (даже при отсутствии элиситоров) целым рядом ионофоров, способ­ных переносить в клетку из окружающей среды протоны или ионы кальция, а также отсутствием действия элисито­ров при "декальцинировании" или "депротонизации" среды. Для исследования роли ионных потоков в сигнальном мета­болизме клеток применяют такие ионофоры, как 2,4-динит-рофенол (протонофор), валиномицин (специфический К+-переносчик), нигерицин (К+/Н+-обменник), моненсин (Ка+/Н+-обменник), А23187 (специфический Са2+-перенос-чик), иономицин (специфический Са2+-переносчик); канало-формеры грамицидины А и Д (образуют каналы, через ко­торые проходят Н+, К+), полиеновые антибиотики амфоте-рицин и нистатин (образуют поры, через которые проходят катионы и анионы); блокаторы ионных каналов тетраэтил-аммоний (блокирует К+-каналы), верапамил и нифедипин (блокируют Са2+-каналы), лантаниды (блокируют прак­тически все каналы; но чаще всего используются для блока­ды Са2+-каналов), этакриновая кислота (блокатор анион­ных каналов). Используются также ингибиторы (эритро-зин В, диэтилстилбестрол, ванадат) и активаторы (фузикок-цин) Н+-АТФаз.

Очень важно, что изменения концентраций ионов и свя­занной с ними трансмембранной разности потенциалов -

преходящи, так же как многие более поздние метаболиче­ские ответы клеток на действие элиситоров. Подавление со временем возбуждения клетки, индуцированного внешним сигналом, является одним из основных принципов регуля­ции биологических систем. Выяснение механизмов или "ры­чагов" такой супрессии - одна из очень важных задач фи­зиологии растений. Можно предположить, что если ранняя активация сигнальных систем клеток зависит от трансмем­бранного изменения концентраций определенных ионов, то они, в свою очередь, могут испытывать на себе регулирую­щее действие со стороны сигнальных систем.

Действительно, происходит активация ионных каналов относительно небольшими концентрациями интермедиа-тов сигнальных систем. Показана активация кальциевых каналов интермедиатами сигнальных систем: аденилатцик-лазной (цАМФ), кальциевой (ИФ3 и ИФ4, Са2+), NO-син-тазной (цАДФРиб и цГМФ) [Авдонин, Ткачук, 1994]. От­мечено также ингибирование кальциевых каналов интер­медиатами липоксигеназной системы (полиеновыми жир­ными кислотами и их гидропероксипроизводными) [Авдо­нин, Ткачук, 1994], а также повышенными концентрация­ми ионов кальция (случай автокаталитического подавле­ния нарастания ионов кальция в цитоплазме).

Все большее автокаталитическое повышение концент­раций указанных вторичных посредников приводит к акти­вации кальциевых насосов клетки, выводящих эти ионы из цитозоля (см. рис. 13) и, таким образом, снижающих их ак­тивирующее влияние на сигнальные системы. Стимуляция кальциевых и протонных помп вызывает реполяризацию мембран (плазмалеммы и тонопласта). К такому же эф­фекту должны приводить активация калиевых каналов (на­пример, повышающимися концентрациями цАМФ) и усили­вающийся выход СГ. Повышают активность Н+-АТФаз плазмалеммы ионы кальция, лизофосфолипиды [Li et al., 1994а; Scherer, 1996a,b], полиеновые жирные кислоты [Scherer, 1996], цАМФ и цГМФ, причем два последних сиг­нальных интермедиата могут прямо, минуя стадию актива­ции протеинкиназ, связываться с белками ионных каналов (цАМФ- и цГМФ-зависимых каналов) [Li et al., 1994a; Дячок и др., 1997]. Имеются также противоположные данные о влиянии на активность мембранных Н+-АТФаз [Владими-

ров, 1998] низких и высоких, но физиологических концент­раций ионов кальция.

Промежуточные продукты различных сигнальных сис­тем могут оказывать влияние на функционирование ион­ных каналов и помп непосредственно или с помощью соот­ветствующих протеинкиназ [Conrath et al., 1991; Li et al., 1994b]. Кальциевые каналы активируются такими сигналь­ными интермедиатами, как ИФ3, ИФ4 [Gilroy et al., 1990, 1993; Trewavas, 1999; и др.], цАМФ [Авдонин, Ткачук, 1994; Дячок и др.,1997; Volotovsky et al., 1998], цАДФ-рибоза, цГМФ [Авдонин, Ткачук, 1994; Volotovsky et al., 1998]. Са2+-АТФазы активируются Са2+-кальмодулином, но ингибиру-ются гидропероксипроизводными полиеновых жирных кис­лот [Владимиров, 1998]. Активируют [Scherer, 1996a,b; Ши-шова, 1999] (или ингибируют [Шишова, 1999]) Н+-АТФазу плазмалеммы повышенные концентрации ионов кальция (Kinoshita et al., 1995; Scherer, 1996a,b], Са2+-зависимые про-теинкиназы [Schaller, Oeckingb, 1999], лизофосфатиды, по­лиеновые жирные кислоты [Scherer, 1996a,b], цАМФ и цГМФ [Palmgren, 1991; Vera-Estrella et al., 1994]. Выход ионов калия из клеток усиливается под влиянием цАМФ, активирующего протеинкиназы и с их помощью - калие­вые каналы плазмалеммы [Li et al., 1994a; Tang, Hoshi, 1999].

Следующая за изменением ионных потоков местная де­поляризация плазмалеммы, вызванная разрушением клеток листогрызущими насекомыми и другими способами меха­нического повреждения, приводит к распространению элек­трического импульса, которое захватывает соседние клет­ки и проводящую систему растений и может участвовать в индукции системного иммунитета в удаленных от места пов­реждения участках растений [Stankovic , Davies, 1996].

Деполяризация ПЛ представляет собой сдвиг мембран­ного потенциала покоя от (-140...-200 мВ) до более поло­жительных значений под влиянием различных воздействий, в том числе элиситорных сигналов. Существует несколько механизмов, от функционирования которых зависит депо­ляризация плазмалеммы и тонопласта: активация кальцие­вых каналов, анионных каналов, ингибирование протонной АТФазы и др. Имеются потенциалзависимые Са2+-каналы, потенциалзависимые К+-каналы, анионные каналы с отно­сительно малым (секунды) или более продолжительным

(минуты) временем деполяризации. Местное повышение концентрации ионов кальция, а также вызванное этим сни­жение величины трансмембранного электрического потен­циала могут привести к открыванию калиевых и анионных (хлорных) каналов [Trewavas, 1999] и транспорту этих ионов из цитоплазмы за пределы клетки или в тонопласт.

Очень важными мишенями действия цАМФ у живот­ных, помимо протеинкиназ А, являются циклонуклеотидре-гулируемые ионные каналы. Существуют доказательства того, что и у растений цАМФ может регулировать К+-кана-лы [Li et al., 1994a; Bolwell, 1995; Kurosaki, 1997], Са2+-кана-лы [Kurosaki et al., 1994; Volotovsky, 1998; Leng et ah, 1999], Cl-каналы [Gabriel et al., 1999], Н+-каналы [Bolwell, 1999] мембран клеток, возможно, минуя их фосфорилирование с помощью протеинкиназ [Bolwell, 1995; Walden,1998]. Более того, клонированные белки ионных каналов растений име­ли циклонуклеотидсвязывающие места [Bolwell, 1995; Leng et al., 1999]. Наличие в белках ионных каналов как кальмо-дулинсвязывающего, так и цАМФ-связывающего доменов позволяет сделать вывод о совместном влиянии аденилат-циклазной и кальциевой сигнальных систем на ионные по­токи в клетках [Arazi et al., 2000].

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ**

Различные сигнальные системы могут включаться не только разными элиситорами, но даже одним элиситором. Так, криптогеин, секретируемый Phytophthora crypto-gea, связывается с рецептором (рецепторами) в плазмати­ческой мембране и индуцирует активацию нескольких сигнальных систем (МАР-киназной, кальциевой и супер-оксидсинтазной) [Allan, Fluhr, 1997; Lebrun-Garcia et al., 1999]. Обнаружена также активация криптогеином липок-сигеназной сигнальной системы [Rusterucci et al., 1999]. У гликопротеидного элиситора патогенного гриба Verticillium белковая часть обеспечивала сигнальные пу­ти, ведущие к синтезу фитоалексинов, а углеводная инду­цировала окислительный взрыв, зависящий главным об­разом от функционирования НАДФН-оксидазной сиг­нальной системы. Элиситор, продуцируемый Pseudomonas syringae, взаимодействует с рецепторной киназой, которая активирует несколько (по крайней мере три) факторов регуляции транскрипции [Zhou et al., 1997], что обеспечи­вает дивергенцию сигнального потока. Возможность по­добной дивергенции поддерживается и другими исследо­вателями (рис. 40), учитывающими факты множествен­ности мест фосфорилирования у киназ и олигомеризации рецепторных киназ, увеличивающей число мест фосфо­рилирования, по сравнению с мономерной неактивной формой [Cohen, 2000].

Высказываются мнения о возможности как раздельного (параллельного) функционирования сигнальных систем [Doares et al., 1995a; Desikan et al., 1996; Bolwell et al., 1998; Heo et al., 1999]: липоксигеназной и НАДФН-оксидазной [Doares et al., 1995b], кальциевой и НАДФН-оксидазной [Heo et al., 1999], NO-синтазной и НАДФН-оксидазной

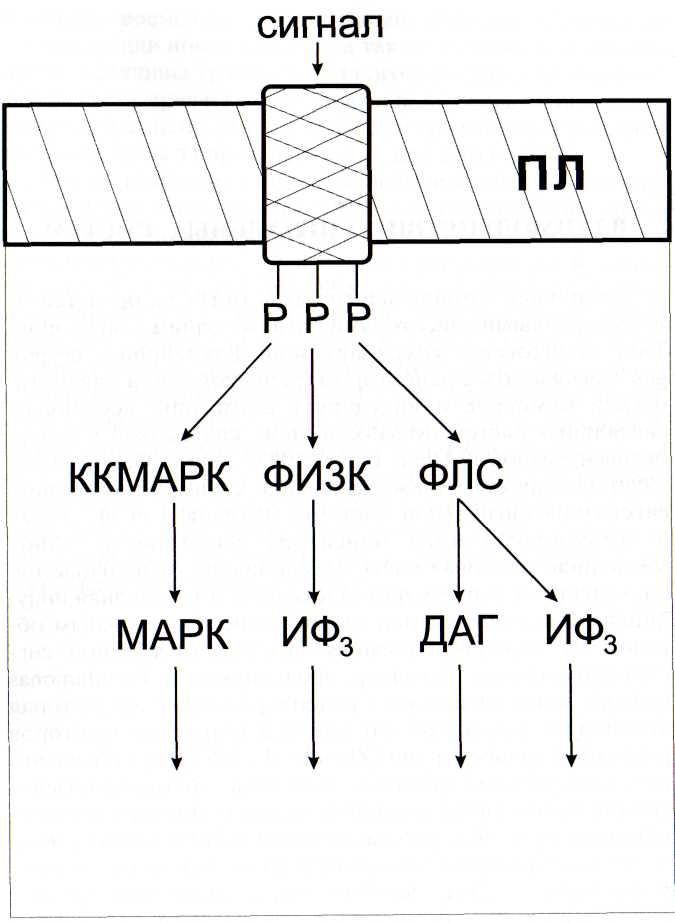


Рис. 40. Дивергенция сигнальных путей, обусловленная несколь­кими сайтами фосфорилирования у одной молекулы рецептор-ной протеинкиназы [Cohen, 2000]

ДАГ - диацилглицерол; ИФ3 - инозитолтрисфосфат; ККМАРК -киназа киназы МАР-киназы; МАРК - митогенактивируемая протеин-киназа; ПЛ - плазмалемма; Р - остатки фосфорной кислоты; ФИЗК -фосфатидилинозитол-3-киназа; ФЛС - фосфолипаза С

[Delledone et al., 1998], так и интеграции некоторых из них [Cheng et al., 1998; и др.].

Одним из наиболее простых случаев взаимодействия сигнальных систем может считаться взаимопревращение "стартовых" фосфолипидов, принадлежащих двум различ­ным сигнальным системам - кальциевой и фосфатидатной [Munnik et al., 1998; Munnik, 2001]:





Диацилглицерол

Фосфатидат



Фосфатидат-киназа

ФЛС ДАГ-киназа ФЛД

Диацилглицерол-пирофосфат

Найдено образование из фосфатидной кислоты диацил-глицеролпирофосфата [Van der Luit et al., 2000], роль кото­рого в сигнальных процессах может быть двоякой: снижение содержания основного сигнального соединения фосфатида-та и активация специфической протеинкиназы. Возмож­ность активации протеинкиназ диацил-глицеролом, лизо-фосфатидами и фосфатидной кислотой уже отмечалась в разделах, посвященных кальциевой, липоксигеназной и фосфатидатной сигнальным системам.

Отмечено взаимодействие сигнальных систем на уровне факторов регуляции транскрипции, имеющих много мест фосфорилирования, которые могут обслуживаться проте-инкиназами, активируемыми разными сигнальными систе­мами [Hill, Treisman, 1995], что еще более выражено у оли-гомерных активных форм факторов регуляции транскрип­ции, по сравнению с неактивными мономерными [Cohen, 2000] (рис. 41).

К настоящему времени накопилось немало фактов, сви­детельствующих о возможности модулирования (активации или ингибировании) одних сигнальных систем с помощью промежуточных продуктов (вторичных посредников) дру­гих. В циклоаденилатной системе таким сигнальным интер-медиатом является цАМФ, в фосфатидатной - фосфатид-ная кислота, в МАР-киназной - различные протеинкиназы, в кальциевой - инозиттрисфосфат и инозиттетракисфос-фат, диацилглицерин и ионы кальция, в липоксигеназной -

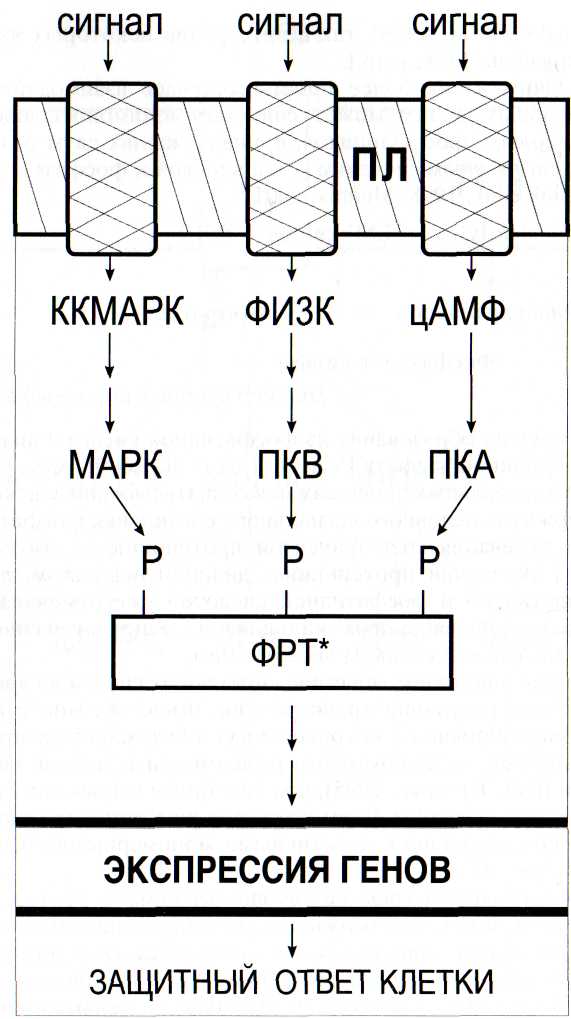


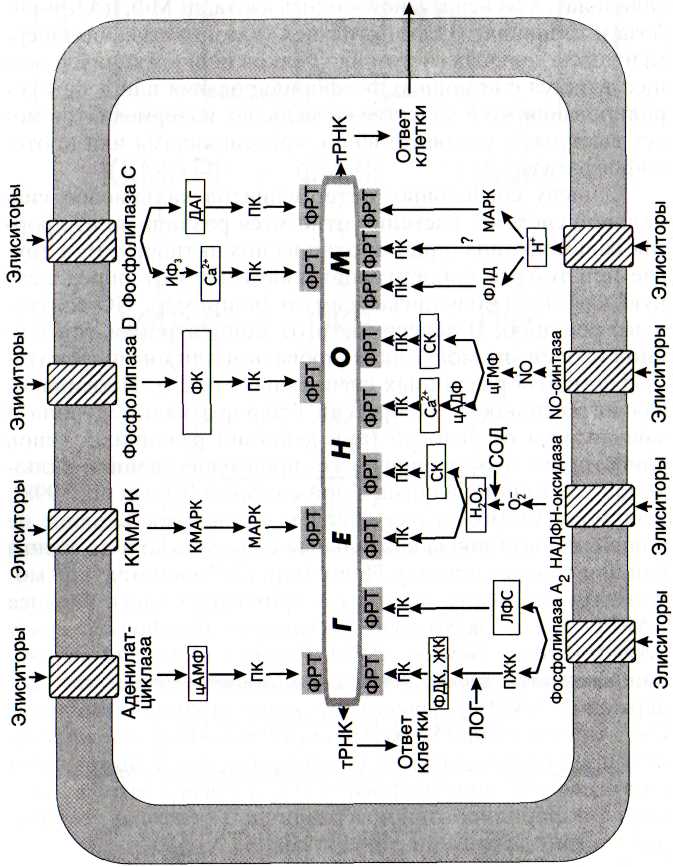
Рис. 41. Конвергенция сигнальных систем [Cohen, 2000]

ПКА и ПКВ - протеинкиназы А и В; ФРТ - фактор регуляции транскрипции. Остальные обозначения - см. рис. 40

полиеновые жирные кислоты, их гидроперокси-, гидрокси-, эпокси-, кето-, циклические и другие производные, в НАДФН-оксидазной - активные формы кислорода (напри­мер, супероксидный анионрадикал и перекись водорода) и салицилат, в NO-синтазной - окись азота, цГМФ, цАДФ-ри-боза и салицилат. Если активация (или инактивация) фер­ментов сигнальных систем или белков ионных каналов осу­ществляется с помощью фосфорилирования или дефосфо-рилирования, то в качестве сигнальных интермедиатов мо­гут выступать, соответственно, протеинкиназы или проте-инфосфатазы.

К числу сигнальных интермедиатов кальциевой сиг­нальной системы растений относятся различные изофор-мы кальмодулина, причем одни из них активируют, а дру­гие при той же концентрации инактивируют определен­ную Са2+-кальмодулинзависимую (например, NO-синтаз-ную) реакцию. В зависимости от концентрации той или иной изоформы могут активироваться или ингибировать-ся ферменты различных сигнальных систем. Неодинако­вая интенсивность экспрессии изоформ кальмодулина в зависимости от условий (при действии различных типов элиситоров) может определять преимущественное вклю­чение той или иной сигнальной системы [Cho et al., 1998]. Кальмодулин может оказывать неодинаковое влияние не только на различные сигнальные системы, но и на звенья одной и той же системы. Например, Са2+-кальмодулин мо­жет стимулировать не только приходную часть баланса цАМФ, но и расходную, активируя фосфодиэстеразу цАМФ [Brown, Newton, 1981]. Разница в степени актива­ции аденилатциклазы и фосфодиэстеразы (а значит, и со­держание цАМФ) зависит от концентрации комплекса Са2+—кальмодулин. Та же закономерность прослеживает­ся и при анализе влияния ионов кальция и кальмодулина на активность протеинфосфатаз и в связи с этим на сте­пень фосфорилированности различных белков, в том чис­ле участников сигнальных систем.

На рис. 42 показаны не только основные участники сиг­нальных цепей, но и места активации или ингибирования их основных ферментов. Как и в случае обычных метаболиче­ских цепей, главным объектом регуляции в сигнальных си­стемах является фермент первой реакции.



В аденилатциклазной сигнальной системе таким фер­ментом является аденилатциклаза (рис. 43). Она активиру­ется относительно низкими концентрациями ионов каль­ция [Brown, Newton, 1981] и Са2+-кальмодулином, оксиге-нированными производными полиеновых жирных кислот [Маеда, Акаике, 1988], но ингибируется относительно вы­сокими концентрациями Са2+ [De Bernardi, Brooker, 1996]. Комплекс Са2+-кальмодулин может стимулировать не только приходную часть баланса цАМФ, но и расходную, активируя фосфодиэстеразу цАМФ [Brown, Newton, 1981]. Разница в степени активации аденилатциклазы и фосфо-диэстеразы (а значит, и содержание цАМФ) зависит от концентрации комплекса Са2+-кальмодулин. Приводятся также данные об активации фосфодиэстеразы цАМФ с помощью фосфатидной кислоты [Munnik et al., 1998; Munnik, 2001].

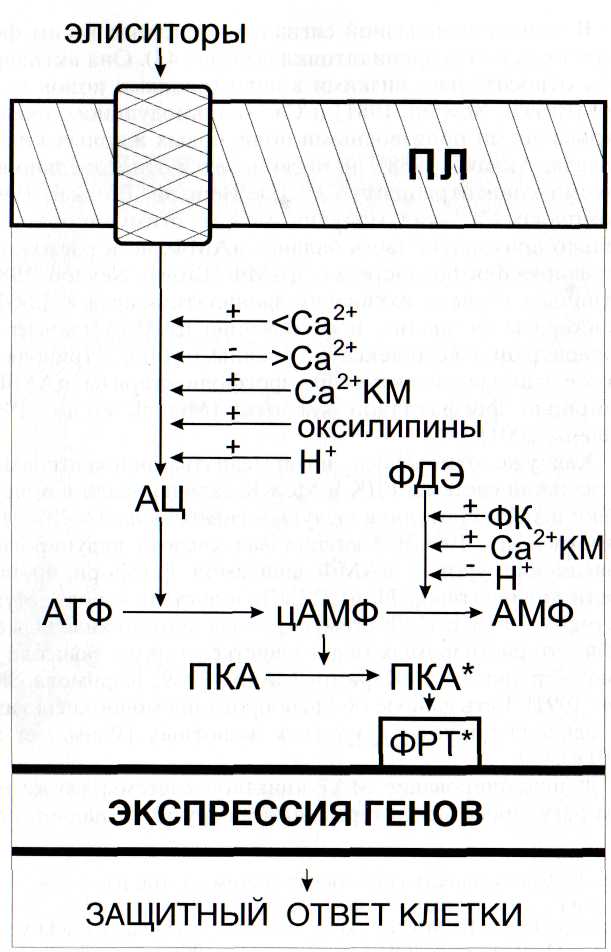
Как уже отмечалось, интермедиаты липоксигеназной сигнальной системы ГДК и МеЖК активировали в присут­ствии цАМФ протеинкиназную активность на 33-48% [Ка­римова и др., 19996]. Салициловая кислота индуцировала повышение уровня цАМФ-зависимой фосфорилирован-ности полипептидов 74, 61, 22 кДа в листьях гороха [Муха-метчина, 2000]. цАМФ-стимулируемая протеинкиназная ак­тивность растворимых белков листьев гороха зависела от концентрации Са2+ [Каримова и др., 1989; Каримова, Жу­ков, 1991]. Есть данные об ингибировании моноокисью азо­та аденилатциклазы в клетках животных [Watson et al., 2001].

Функционирование МАР-киназной системы также мо­жет регулироваться интермедиатами других сигнальных пу-



Рис. 42. Совокупность сигнальных систем клеток растений

ДАГ - диацилглицерол; ЖК - жасмоновая кислота; ИФ3 - инози-толтрисфосфат; ККМАРК - киназа киназы МАР-киназы; КМАРК — киназа МАР-киназы; ЛОГ - липоксигеназа; ЛФС — лизофосфатиды; МАРК — митагенактивируемая протеинкиназа; ПЖК — полиеновые жирные килоты; ПК - протеинкиназы; СК - салициловая кислота; СОД - супероксиддисмутаза; ФДК - фитодиеновая кислота; ФК - фос-фатидная кислота; ФЛД - фосфолипаза Д; ФРТ - факторы регуляции транскрипции; цАДФР - циклическая АДФ-рибоза; цАМФ - цикличе­ский аденозинмонофосфат; цГМФ — циклический гуанозинмоно-фосфат



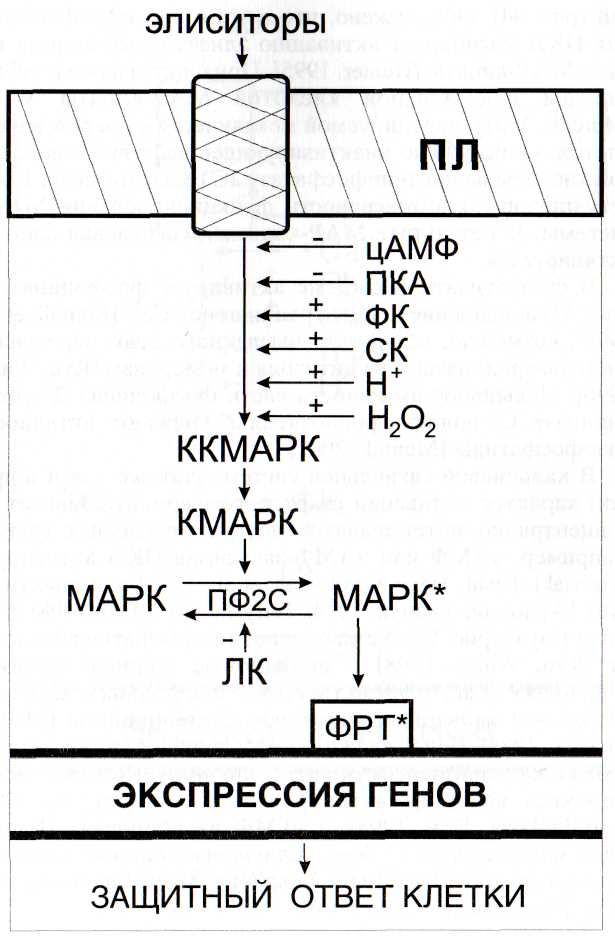


Рис. 43. Регуляция функционирования аденилатциклазной сиг­нальной системы интермедиатами других сигнальных систем

АЦ - аденилатциклаза; КМ - кальмодулин; ПКА - протеинкиназа А; ПЛ - плазмалемма; ФДЭ - фосфодиэстераза. > - высокие концен­трации; < - низкие концентрации. Здесь и на последующих рисунках: (+) - активация; (-) - ингибирование. Остальные обозначения - см. рис. 42

Рис. 44. Регуляция функционирования МАР-киназной сигнальной системы интермедиатами других сигнальных систем

ЛК - линоленовая кислота; ПКА - протеинкиназа А; ПЛ - плазма-лемма; ПФ2С - протеинфосфатаза 2С. Остальные обозначения - см. рис. 42

тей (рис. 44). Обнаружено, что цАМФ или цАМФ-зависи-мая ПКА ингибирует активацию элиситорами киназы ки-назы МАР-киназы [Hunter, 1995]. Приводятся данные об ак­тивации фосфатидной кислотой МАР-киназы WIPK [Munnik, 2001], индуцируемой механическим повреждением клеток. Обнаружено инактивирующее действие линолено-вой кислоты на протеинфосфатазу 2С [Baudouin et al., 1999], регулирующую интенсивность функционирования МАРК системы. В результате МАР-киназная сигнальная система активируется.

В фосфатидатной системе активирует фосфолипазу Д (рис. 45) повышение концентрации ионов Са + [Munnik et al., 1995], возможно, вследствие вызванного этим передвиже­нием фосфолипазы Д из цитозоля к мембранам [Ryu, Wang, 1996]. Повышают активность части фосфолипаз Д проте-инкиназа С, полифосфоинозитолы, снижают активность лизофосфатиды [Munnik, 2001].

В кальциевой сигнальной системе (так же как и в дру­гих) характер активации стартового фермента зависит от концентраций интермедиатов других сигнальных систем. Например, цАМФ или цАМФ-зависимая ПКА активирует [Kurosaki, Nishi, 1993; Volotovsky et al., 1998] или инактиви-рует [Авдонин, Ткачук, 1994; Tertyshnikova, Fein,1998] фос­фолипазу С (рис. 46). Установлено, что фосфатидная кисло­та [Ryu, Wang, 1998] и полиеновые жирные кислоты [Volotovsky et al., 1998] активируют фосфолипазу С, а пос­ледние - и кальцийрегулируемые протеинкиназы [Маеда, Акаике, 1988]. Более сложная смесь липидов также активи­ровала кальцийзависимую протеинкиназу [Roberts, 1992]. Перекись водорода активировала [Stennis et al., 1998; Tertyshnikova, Fein, 1998], а цГМФ ингибировала [Ванин, 1998] фосфолипазу С. Как полиеновые жирные кислоты, так и их гидропероксиформы ингибировали кальциевые ка­налы [Ninnemann, Maier, 1996].

Для липоксигеназной системы характерен один из наи­более сложных механизмов регуляции (рис. 47). На фосфо­липазу А2 могут действовать МАР-киназы, так как они спо­собны вызывать фосфорилирование и вследствие этого ак­тивацию этого ключевого фермента [Hunter, 1995]. Повы­шение концентраций фосфатидной кислоты [Ryu,Wang, 1998], а также ионов Са2+ [Scherer, 1996a,b] активировало

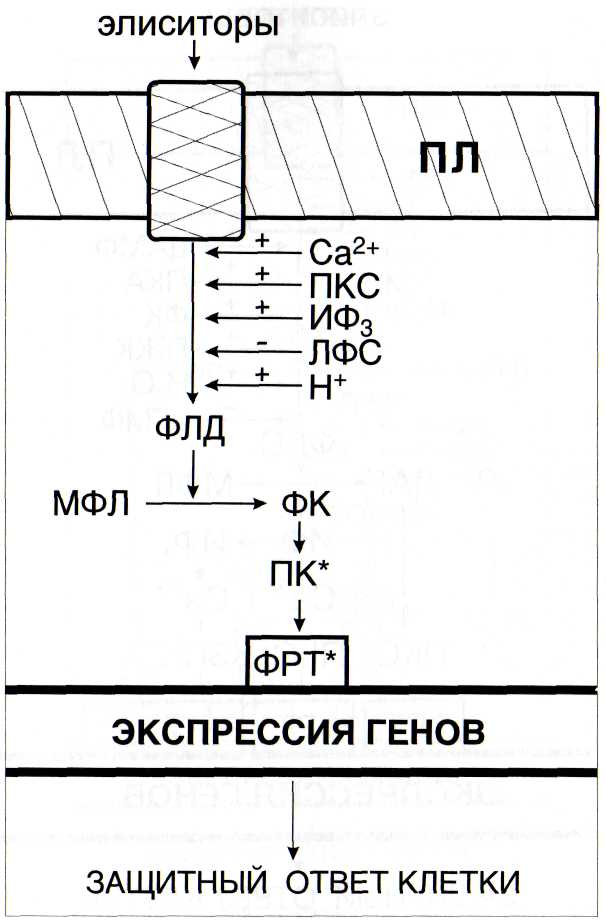


Рис. 45. Регуляция функционирования фосфатидатной сигналь­ной системы интермедиатами других сигнальных систем

ЛФ - лизофосфатиды; МФЛ - мембранные фосфолипиды; ПКС -протеинкиназа С; ПЛ - плазмалемма. Остальные обозначения - см. рис. 42

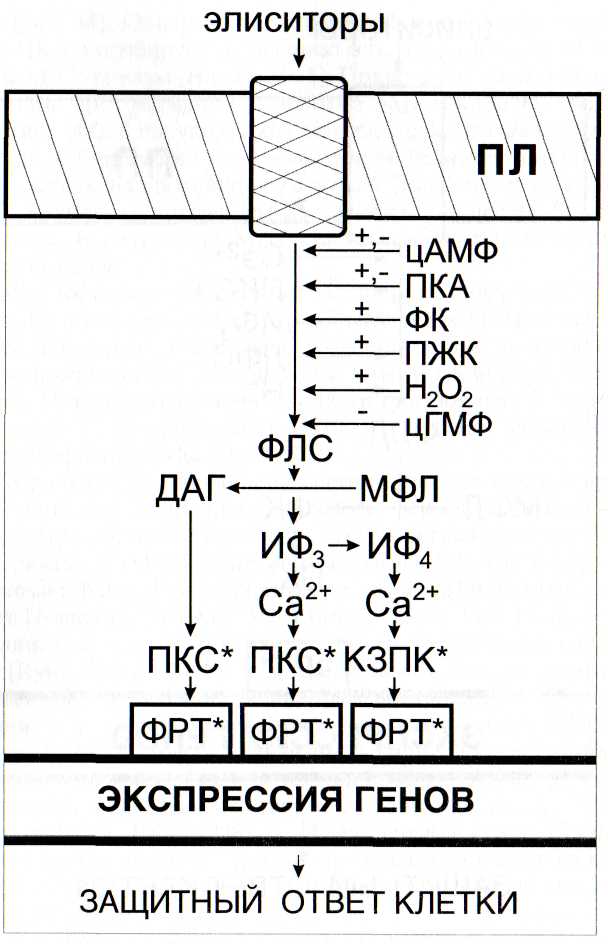


Рис. 46. Регуляция функционирования кальциевой сигнальной системы интермедиатами других сигнальных систем

ИФ4 - инозитолтетракисфосфат; КЗПК - кальцийзависимая проте-инкиназа; МФЛ - мембранные фосфолипиды; ПКА - протеинкиназа А; ПКС *-* протеинкиназы С; ПЛ - плазмалемма; ФЛС - фосфолипаза С. Остальные обозначения - см. рис. 42

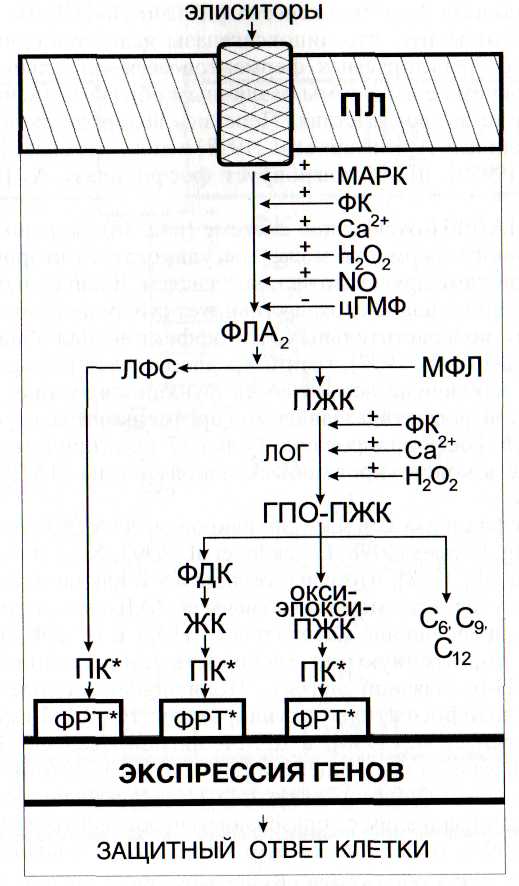


Рис. 47. Регуляция функционирования липоксигеназной сигналь­ной системы интермедиатами других сигнальных систем

ГПО-ПЖК - гидропероксипроизводные полиеновых жирных кис­лот; ЖК - жасмоновая кислота; ЛФС - лизофосфатиды; МФЛ - мемб­ранные фосфолипиды; окси-эпокси-ПЖК - гидропероксиформы поли­еновых жирных кислот; ПЛ - плазмалемма; ФЛА2 - фосфолипаза А2; С6, С9, С12 - шести-, девяти- и двенадцатиуглеродные продукты лиазных реакций. Остальные обозначения - см. рис. 42

фосфолипазу А2 и липоксигеназу [Macri et al., 1994]. Необ­  
ходимо отметить, что липоксигеназы являются одними из  
наиболее регулируемых ферментов всех сигнальных сис­  
тем, причем ее изоформы различным образом отвечают на  
одни и те же воздействия. Перекись водорода активирует  
фосфолипазу А2 [Stennis et al., 1998] и липоксигеназу [Doares  
et al., 1995b], цГМФ ингибирует фосфолипазу А, [Ванин,  
1998]. '

В НАДФН-оксидазной системе (рис. 48) активность од­ноименного фермента может регулироваться вторичными посредниками других сигнальных систем. В животных клет­ках фосфатидная кислота активирует супероксидсинтазную систему, но в растительных этот эффект не был обнаружен [Schroeder et al., 1997], хотя и предполагается [Wang, 1999], что не исключена возможность функционирования специ­фической фосфатидатзависимой протеинкиназы, осуществ­ляющей фосфорилирование белка 47 кДа, принимающего участие в конструировании активной формы НАДФН-ок-сидазы.

Фосфолипаза С и Са2+ активировали НАДФН-оксидазу [Harding, Roberts, 1998; Legendre et al., 1993; Xing et al., 1997; Keller et al., 1998], что свидетельствует о влиянии кальцие­вой системы. Кальмодулинзависимая НАД-киназа стимули­ровала превращение цитозольного НАД в НАДФ, обеспе­чивая достаточную интенсивность функционирования НАДФН-оксидазной системы. Полиеновые жирные кисло­ты и лизофосфатиды активировали НАДФН-оксидазу [Brightman et al., 1990], а цГМФ ингибировал ее [Ванин, 1998]. Возрастание концентрации оксида азота может при­вести к повышению интенсивности его связывания с супер­оксидным радикалом с образованием пероксинитрита [Волин и др., 1998]. В результате этого снижаются концентрация О2 и скорость образования из него перекиси водорода в ходе реакции, катализируемой супероксиддисмутазой. В то же время N0 ингибирует каталазу [Волин и др., 1998], что должно привести к повышению содержания перекиси водо­рода. По всей вероятности, итог этого противоположного влияния на содержание Н2О2 зависит от концентрации оксида азота.

В настоящее время интенсивно исследуется регуляция ферментов NO-синтазной системы (рис. 49). Са2+ активиро-

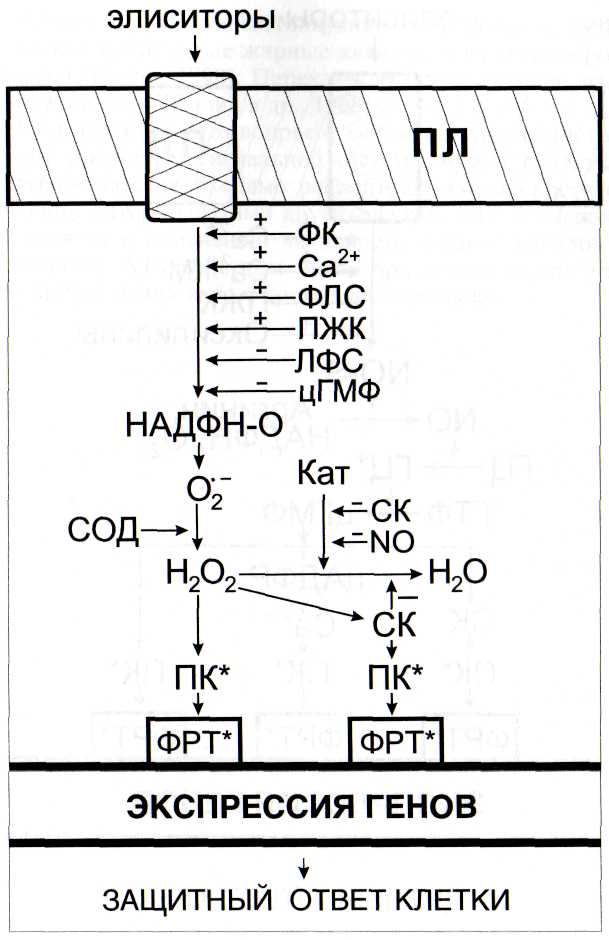


Рис. 48. Регуляция функционирования НАФН-оксидазной сиг­нальной системы интермедиатами других сигнальных систем

Кат - каталаза; ЛФС - лизофосфатиды; НАДФН-О - оксидаза НАДФН; ПЛ - плазмалемма; ФЛС - фосфолипаза С. Остальные обо­значения - см. рис. 42

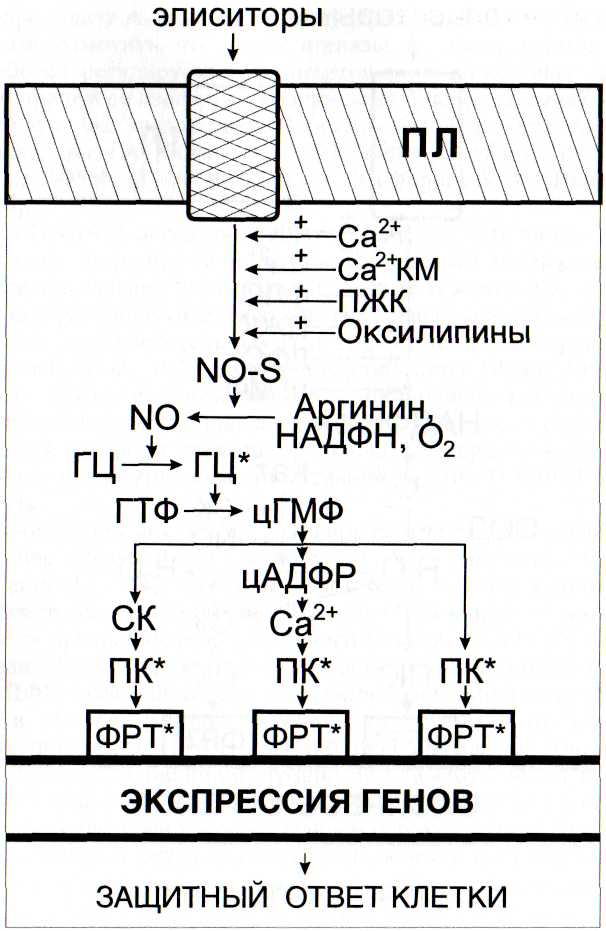


Рис. 49. Регуляция функционирования NO-синтазной сигнальной системы интермедиатами других сигнальных систем

ГЦ - гуанилатциклаза; КМ - кальмодулин; ПЛ - плазмалемма; NO-S - NO-синтаза. Остальные обозначения - см. рис. 42

вал NO-синтазу [Малышев, Манухина, 1998; Cho et al., 1998], так же как полиеновые жирные кислоты и их гидроперок-сиформы [Ванин, 1998]. Перекись водорода активировала гуанилатциклазу [Волин и др., 1998].

Несмотря на то что вопрос о существовании самостоя­тельной протонной сигнальной системы может считаться дискуссионным, необходимо рассмотреть возможности ее регуляции интермедиатами других систем. Эти возможно­сти сводятся к изменению активности ионных каналов и мембранных АТФаз (в том числе протонных помп), что было проанализировано в предыдущем разделе.

**ПАТОГЕНИНДУЦИРУЕМЫЕ БЕЛКИ**

При изучении особенностей влияния патогенов на рас­тения (с использованием методов хроматографии и элек­трофореза) было обнаружено интенсивное накопление в инфицированных тканях нескольких так называемых па-тогениндуцируемых полипептидов (PR) [Neumann et al.,1989]. В дальнейшем в результате применения все боль­шего арсенала методов удалось значительно расширить круг патогениндуцируемых полипептидов, в том числе за счет минорных полипептидов, содержание которых может быть невысоким. Назрел вопрос о классификации патоген­индуцируемых и элиситориндуцируемых белков по их функциональной принадлежности, по роли в формирова­нии иммунитета у растения-хозяина и в подавлении разви­тия патогена.

При инфицировании патогенами в клетках растений происходит репрограммирование экспрессии генов, прояв­ляющееся в замедлении синтеза одних белков и усилении образования или появлении других, отсутствующих в тка­нях неинфицированных растений. Было выявлено, что это происходит с помощью сигнальных соединений - элисито-ров. Некоторые из них продуцируются микроорганизмами (например, белок криптогеин - фитопатогенным грибом Phytophthora cryptogea [Ricci et al., 1989]), другие образуют­ся в клетках растений.

Можно подразделить все патоген(элиситор)индуцируе-мые белки на несколько групп по тем функциям, которые они выполняют. Одни являются участниками сигнальных систем растений, и их интенсивное образование обеспечива­ет усиление восприятия, преобразования и передачи в гене­тический аппарат элиситорного сигнала, другие ограничи­вают питание патогенов. Третьи патогениндуцируемые

белки катализируют образование низкомолекулярных рас­тительных антибиотиков - фенилпропаноидных или терпе-ноидных фитоалексинов. Четвертые катализируют реак­ции укрепления клеточных стенок растений, пятые вызыва­ют самоубийство инфицированных и соседних клеток. Функционирование всех этих патогениндуцированных бел­ков может существенно ограничивать распространение ин­фекции по растению. Наконец, шестая группа белков мо­жет непосредственно действовать на структуры и функции патогенов, прекращая или подавляя их развитие. Некото­рые из этих белков вызывают деградацию клеточной стен­ки грибов и бактерий, другие дезорганизуют функциониро­вание их клеточной мембраны, изменяя ее проницаемость для ионов, третьи подавляют работу белоксинтезирующей машины, блокируя синтез белков на рибосомах грибов и бак­терий или действуя на вирусную РНК.

**Патогениндуцируемые белки - участники сигнальных систем клеток.** Результаты многочисленных исследований убеждают в возможности элиситориндуцируемого образо­вания как начальных белковых участников сигнальных сис­тем - рецепторов [Warren et al., 1998], и функционально свя­занных с ними G-белков [Terryn et al., 1993; Ichinose et al.,1999], а также ингибиторов диссоциации G-белков [Kim et al., 1999], так и конечных - факторов регуляции транс­крипции [Da Costa de Silva et al.,1993; Rushton, Somssich, 1998; Eulgem et al., 1999; Lee et al., 2001] (рис. 50 ).

Имеются данные и об элиситориндуцируемой актива­ции синтеза белковых промежуточных продуктов раз­личных сигнальных систем, в частности об экспрессии ге­нов фосфолипазы Д [Young et al., 1996], МАР-киназы [Takezawa,1999], экспрессии генов кальмодулина, участвую­щего в функционировании кальциевой сигнальной системы [Bergey, Ryan,1999; Heo et al.,1999], генов ретикулоплазми-нов (белков эндоплазматической сети) - BIP и кальретику-лина, играющего определенную роль в связывании ионов кальция и в связи с этим способного участвовать в регуля­ции функционирования кальциевой сигнальной системы [Denecke et al.,1995]. При грибной инфекции индуцируется мессенджерный белок 29,2 кДа, аналогичный многофунк­циональным кальцийзависимым протеинкиназам [Brandt et al.. 1992].

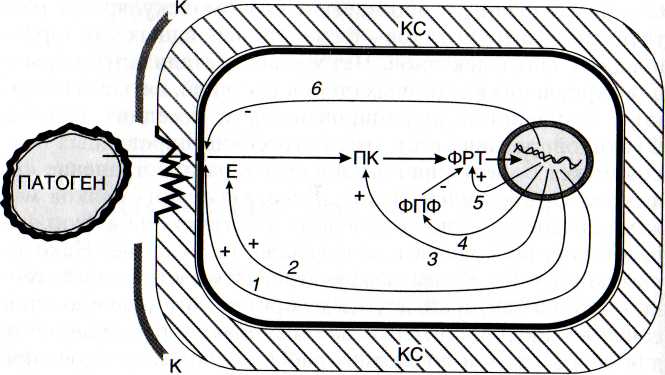


Рис. 50. Схема патогениндуцируемого образования интермедиа-тов сигнальных систем

*1 —* рецепторный белок; 2 - стартовый фермент сигнальной систе­мы; *3* - протеинкиназы (ПК); *4* - фосфопротеинфосфатазы (ФПФ); 5 -факторы регуляции транскрипции (ФРТ); *6* - протеиназы, разрушаю­щие рецептор. (+) - активация, (-) - ингибирование сигнальных систем. Е - стартовый фермент сигнальной системы; К - кутикула; КС - кле­точные стенки

В липоксигеназной сигнальной системе было обнару­жено патоген- и элиситориндуцируемое повышение содер­жания мРНК, кодирующих различные формы липоксиге-наз [Melan et al.,1993; Peng et al.,1994; Veronesi et al.,1996; Schweizer et al.,1997; Гречкин, Тарчевский, 1999]. Анало­гичный эффект обнаруживался при действии экзогенных абсцизовой [Melan et al., 1993] и салициловой [Feussner et al., 1997b] кислот, а также метилжасмоната [Bell, Mullet, 1993; Bergey, Ryan, 1999]. Показано патогениндуцирован-ное накопление в растениях циклооксигеназы, гомологич­ной простагландиновому ферменту у животных [Sanz et al.,1998], а также представителей семейства цитохромов Р-450, к которым относят и некоторые ферменты липок­сигеназной сигнальной системы [Song, Brash, 1991]. Необ­ходимо отметить, что тот или иной стрессор или сигнал может вызывать неодинаковую интенсивнось и временной ход накопления транскриптов различных форм липоксиге-наз [Saravitz, Siedow,1996]. Патогены [Kirsch et al., 1997],

так же как метилжасмонат [Nishiuchi et al., 1997], вызыва­ли экспрессию генов десатураз, обеспечивая образование полиеновых жирных кислот из насыщенных, необходи­мых для осуществления начальных реакций липоксигеназ­ной сигнальной системы. Еще один автокаталитический цикл - это индукция метилжасмонатом экспрессии генов десатуразы, катализирующей превращение линолевой кислоты в линоленовую. По всей вероятности, это самый протяженный автокаталитический оксилипиновый цикл (см. рис. 21). Недавно [Seo et al., 2001] был обнаружен еще один автокаталитический цикл, заключающийся в индук­ции метилжасмонатом экспрессии гена метилтрансферазы (S-аденозил-метионин: жасмоновая кислота - карбоксил метилтрансферазы), катализирующей реакцию метилиро­вания жасмоновой кислоты.

В супероксидсинтазной системе патогены индуцировали экспрессию генов супероксиддисмутазы, глутутион-S-трансферазы, глутатион-пероксидазы [Levine, 1994; Vanacker et al., 1998], но подавляли экспрессию генов аскор-бат-пероксидазы и каталазы (т.е. антиокислительные меха­низмы), вызывая повышение содержания активных форм кислорода, что, в свою очередь, приводило к образованию патогениндуцированных белков [Mittler et al., 1999]. Однако имеются сведения о том, что содержание транскриптов ци-топлазматической аскорбат-пероксидазы, с помощью кото­рой происходит в значительной степени детоксикация пере­киси водорода, повышается при инфицировании патогена­ми, в то время как синтез фермента подавляется посттранс-крипционно [Mittler et al., 1998].

В NO-синтазной сигнальной системе возможна не толь­ко активация предсуществующей NO-синтазы элиситором -протеогликаном из крокуса [Escribano et al., 1999], но и эли-ситориндуцированная экспрессия этого фермента. Имеют­ся также факты противоположного влияния. Сесквитерпе-новые лактоны из некоторых мексиканских и индийских лекарственных растений подавляли экспрессию NO-синта­зы в животных клетках [Wong, Menendez, 1999]. Таким же действием обладало и кумариновое соединение скополетин [Kang et al., 1999]. Триптохинон растений подавлял липопо-лисахарид-индуцированную экспрессию индуцибельной NO-синтазы в животных тканях [Niwa et al,, 1996].

Элиситориндуцируемый **синтез ферментов, катализиру­ющих образование стрессовых** фитогормонов. Установле­но, что патогены и элиситоры вызывают экспрессию генов ферментов 1 -аминоциклопропан-1 -карбоксилат-синтазы [Liu et al.,1998] и 1-аминоциклопропан-1-карбоксил ат-окси-дазы [Jia, Martin, 1999], катализирующих реакции образова­ния этилена. Повышение концентрации этилена активиро­вало 1 -аминоциклопропан-1-карбоксилат-синтазу [J. Arteca, R. Arteca, 1999], что может быть еще одним примером отмечавшихся нами ранее [Гречкин, Тарчевский, 1999; Тар-чевский, 2000] явлений автокатализа сигнального метабо­лизма.

Элиситориндуцируемый синтез жасмоната происходит в результате активации экспрессии генов ферментов липок-сигеназной сигнальной системы клеток растений [Гречкин, Тарчевский, 1999].

Абсцизовая кислота (еще один стрессовый фитогормон) начинает интенсивно синтезироваться в клетках растений после атаки патогенов вследствие элиситориндуцированной экспрессии гена оксидазы зеаксантина [Audran et al., 1998; Grill, Himmelbach, 1998]. Позднее было обнаружено стресс-индуцированное образование одной из изоформ 9-^ыс-эпок-сикаротиноид-диоксигеназы [Chernys, Zeevaart, 2000] - фер­мента, регулирующего образование абсцизовой кислоты из каротиноидов 9-цмс-виолаксантина или 9-цмс-виолаксан-тина.

Патогениндуцированный синтез стрессового фитогор-мона салициловой кислоты объясняется экспрессией гена фермента бензоат-2-гидроксилазы (представителя семейст­ва цитохромов Р-450), катализирующего превращение бен­зойной кислоты в салициловую [Leon et al., 1993; 1995]. При интенсивном синтезе салицилата часть его может перево­диться в глюкозилированную форму с помощью фермента УДФГ: салицилат глюкозилтрансферазы. Интересно, что быстрая экспрессия гена этого фермента вызывается экзо­генным салицилатом и патогенами.

Как уже упоминалось выше, к числу стрессовых фито­гормонов относят сравнительно небольшой полипептид (названный системином), состоящий из 18 аминокислот­ных остатков [Constabel et al., 1998]. Он был признан рядом авторов первым идентифицированным фитогормоном по-

липептидной природы [McGurl et al., 1992; Slosarek et al., 1995; Bergey et al., 1996; Bowles, 1998; Ryan, Pearce, 1998; Dombrowski et al., 1999]. Патогены, элиситоры и механи­ческое повреждение растений вызывают интенсивную экспрессию системина.

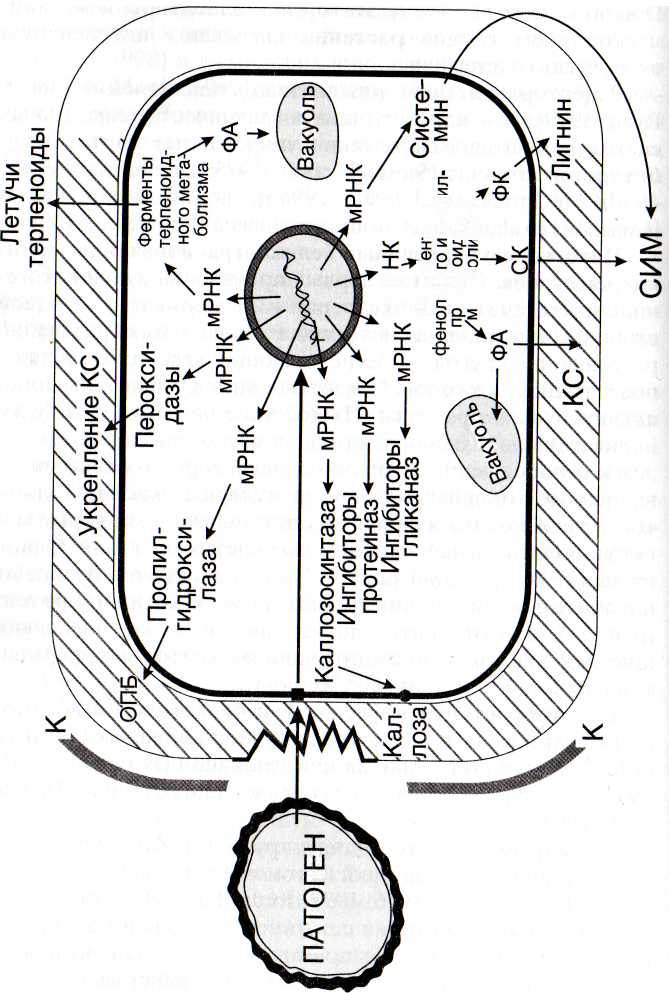
Рецептор системина локализован в плазмалемме [Sheer, Ryan, 1999]. По-видимому, при посредничестве сигнальных систем происходил системининдуцированный синтез инги­биторов протеиназ [Slosarek et al., 1995; Dombrowski et al., 1999; McGurl et al., 1992; 1994a], полифенолоксидазы [Constabel et al., 1995] и аминопептидазы [Chao et al., 1999].

**Патогениндуцированные белки, ограничивающие пита­ние патогенов.** Одним из первых проявлений атаки патоге­нов может считаться экскреция ими ферментов, с одной стороны, нарушающих целостность защитных образований растения, а с другой - обеспечивающих углеводное и азот­ное питание патогенов. Имеются в виду кутиназы, эндопо-лигликаназы и протеазы. Их действие на кутин кутикулы, полисахариды и белки клеточных стенок растений приво­дит к освобождению вторичных элиситоров - оксигениро-ванных мономерных высокомолекулярных кислот и спир­тов, а также олигосахаридов и олигопептидов, которые мо­гут включать сигнальные системы клеток растений. Одной из защитных реакций растений является синтез белковых ингибиторов эндополигликаназ и ингибиторов протеаз (рис. 51). Это относительно небольшие белки, подавляю­щие активность соответствующих экскреторных фермен­тов патогенов - грибов и бактерий.

Обнаружено, что у фасоли ген белкового ингибитора полигалактуроназы активировался под влиянием элисито­ров - олигогалактуронидов или глюканов [Bergmann et al., 1994], или при механическом повреждении растений [Devoto et al., 1998].

Возможно, что патогениндуцируемые субтилизинподоб-ные эндопротеазы растений (в том числе кальцийактивиру-емая) [Tornero et al., 1996; 1997; Jorda et al., 1999] также мо­гут ограничивать питание патогенов, гидролизуя экскрети-руемые ими ферменты (например, кутиназы, эндогликана-зы и протеиназы) во внеклеточном пространстве.

**Патоген(элиситор)индуцированные ферменты синтеза фенилпропаноидных фитоалексинов.** Ряд патогениндуциро-



**CD**

***ли***

*ъ* fip

нанных белков-ферментов катализирует образование низ­комолекулярных растительных антибиотиков - фенилпро-маноидных или терпеноидных фитоалексинов [Метлицкий, ()зерецковская, 1985; Ebel,1986; Дмитриев, 1999] (рис. 52). Фенилпропаноидные фитоалексины насчитывают большое количество соединений, объединенных общностью первых тгапов синтеза и отличающихся последними этапами. Сво­им названием они обязаны первой реакции - образованию фенилпропанового производного аминокислоты фенилала-пина - коричной кислоты с помощью фермента фенил ал а-мин-аммиак-лиазы. Насчитывается более 20 ферментов, принимающих участие в синтезе фенилпропаноидных фи­тоалексинов [Neumann et al., 1989]. Наиболее простыми 7-11-углеродными продуктами превращения фенил ал анина являются бензойная, салициловая, кумаровая, гидроксику-маровая, кофейная, оксиметилкофейная (феруловая) кис­лоты. Из феруловой кислоты путем гидроксилирования и метилирования образуются 5-гидрокси-ферулат и синапо-вая кислота. Большинство из этих соединений обладает свойствами антибиотиков, а салициловая кислота, как уже неоднократно упоминалось ранее, играет роль одного из главных системных сигналов.

Важны в защите растений от грибов и бактерий более сложные продукты фенилпропаноидного метаболизма, со­держащие два, три, четыре и пять гетероциклов. Большин­ство из них происходят из 15-углеродного флавоноидного каркаса, который синтезируется с помощью халконсинтазы из производного кумаровой кислоты - кумароил-КоА и трех молекул малонил-КоА. Отмечена активация у люцер­ны грибными элиситорами фермента ацетил-КоА-карбок-силазы, катализирующей реакцию синтеза малонил-КоА из ацетил-КоА, СО2 и АТФ [Shorrosh et al., 1994]. Найдено, что халконсинтаза имеет много изоформ даже в одном и том же

Рис. 51. Схема образования элиситориндуцируемых белков, вы­зывающих укрепление клеточных стенок растений, синтез фито­алексинов, системных элиситоров, ингибиторов протеиназ и гли-каназ

К - кутикула; КС - клеточные стенки; ОПБ - оксипролиновые бел­ки; СИМ - системный иммунитет; СК - салициловая кислота; ФА - фи­тоалексины; ФК - фенольные кислоты

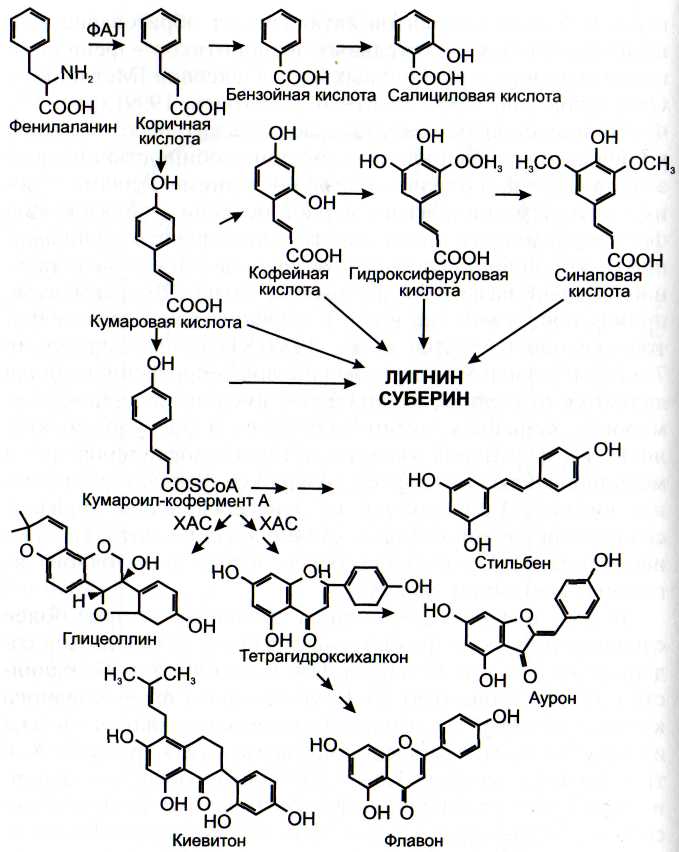


Рис. 52. Схема синтеза некоторых фенилпропаноидных фито-алексинов (по: [Dixon, Paiva, 1995])

ФАЛ - фенилаланин-аммиак-лиаза; ХАС - халконсинтаза

растении (семь у гороха), причем они различным образом реагируют на сигналы из окружающей среды. Так, одна из изоформ активировалась элиситорами, но не ультрафиоле­том, а для другой была отмечена противоположная зависи­мость [Y. Ito et al., 1997].

Продуктом халконсинтазной реакции является тетра­гидроксихалкон, который впоследствии превращается в другие флавоноидные классы соединений, такие как фла-воны, флавононы, флаванолы, антоцианины и 3-дезокси-антоцианидины [Dixon, Paiva, 1995]. При участии халкон-редуктазы, стильбенсинтазы, изофлавонсинтазы происхо­дит образование различных простых изофлавоноидов, ку-местанов, птерокарпанов и изофлаванов, которые облада­ют ярко выраженными фунгицидной [Morrissey, Osbourn, 1999] и бактерицидной активностью, подавляя, например, развитие стрептококков, актиномицетов, лактобацилл [Tsuchiya et al., 1994]. Простые фитоалексины усложняют­ся у различных растений за счет модификационных реак­ций гидроксилирования, гликозилирования, ацилирования, пренилирования, сульфатации и метилирования, отража­ющих видоспецифические особенности метаболизма, но сохраняющих или даже усиливающих фунгицидные и бак­терицидные свойства этих соединений. В ряде случаев по­казано, что они эффективно защищают от нематод [Baldridge et al., 1998].

Из различных растений выделено большое количество индивидуальных фитоалексинов: из Brassica - брассинин, циклобрассинин, брассилексин, из Potato - ришитин, люби-мин, из Wasabia - вазалексины, из Arabidopsis - камалек-син, из Orizae - момилактон и сакуранетин, из Medicago -медикарпин, из Pisum - писатин, из Glycine - глицеоллины, из Orchidaceae - орхинол и хирцинол, из Phaseolus - киеви­тон, из Petroselenium - апиин, из Dianthus - диантрамидные соединения, из Ruta - 1,3-дигидрокси-1Ч-метилакридон, образующийся из N-метилантраноила и малонил-КоА. Фенилпропаноидные фитоалексины - это нелетучие ве­щества.

Образование и накопление различных фитоалексинов происходит благодаря индукции патогенами и элиситорами экспрессии генов, кодирующих ферменты фенилпропано-идного метаболизма (см. рис. 52) - фенилаланин-аммиак-лиазу [Ebel et al., 1984; Bonhoff et al., 1986; Ni et al., 1996; Weiergang et al., 1996; Baldridge et al., 1998], халконсинтазу [Ebel et al., 1984; Grab et al., 1985; Bonhoff et al., 1986; Weiergang et al., 1996; Colliver et al., 1997; Baldridge et al., 1998; Ferrer et al., 1999], халконизомеразу и халконредуктазу

[Ni et al., 1996], циннамат-4-гидроксилазу [Ni et al., 1996; Ferrer et al., 1999], стильбенсинтазу [Bolwell, Dixon, 1986; Tropf et al., 1994; Colliver at al., 1997], изофлавонсинтазу [Ebel et al., 1984], изофлавонредуктазу [Weiergang et al., 1996], изофлавоноидредуктазу [Tsuchiya et al.,1994], кофеат-О-метилтрансферазу [Bonhoff et al., 1986; Tsuchiya et al., 1994], пренилтрансферазы [Hain et al., 1993], халкон-О-ме-тилтрансферазу [Weiergang et al., 1996], метилтрансферазу [Hamerski et al., 1990], акридонсинтазу [Rakwal et al., 1996], ферменты синтеза триптофана [Junghanns et al., 1998], ак­тивность которых коррелировала с накоплением камалек-сина у арабидопсиса, дигидробензофенантридин-оксидазу [Zhao, Last, 1996], ферменты семейства цитохром Р-450 [Schopfer et al., 1998], вызывающие гидроксилирование кольчатых фенилпропаноидных структур, и др. Было пока­зано, что грибной элиситор вызывает неодновременное по­вышение активности различных ферментов фенилпропано-идного метаболизма [Chappel et al., 1984]: сначала фенил-аланин-аммиак-лиазы, а уже затем - метилтрансферазы, катализирующей последние этапы синтеза фенилпропано­идных фитоалексинов.

Обнаружено, что индукция фитопатогенными грибами синтеза фенилаланин-аммиак-лиазы у растений гороха по­давлялась супресцином — соединением, продуцируемым гри­бом вместе с элиситорами [Wada et al., 1995].

**Патогениндуцируемые ферменты синтеза терпеноид-ных фитоалексинов.** Для терпеноидных фитоалексинов, так же как и для фенилпропаноидных, характерны общ­ность начальных реакций и различия в заключительных ре­акциях метаболизма (рис. 53). Исходным субстратом их син­теза является ацетил-КоА, промежуточными соединения­ми - 3-гидрокси-З-метилглутарил-КоА, мевалонат, изопен-тенилпирофосфат и диметилаллилпирофосфат, геранилпи-рофосфат, фарнезилпирофосфат, геранилгеранилпирофос-фат, а также сквален, который может превращаться в раз­личные фитоалексины путем реакций циклизации и присо­единения различных радикалов за счет реакционной спо­собности ненасыщенных связей [Threlfall, Whitehead, 1990; Bach, 1995]. Можно перечислить некоторых представите­лей терпеноидных фитоалексинов: у картофеля сесквитер-пеноидные ришитин, любимин, фитоберин, у полыни -

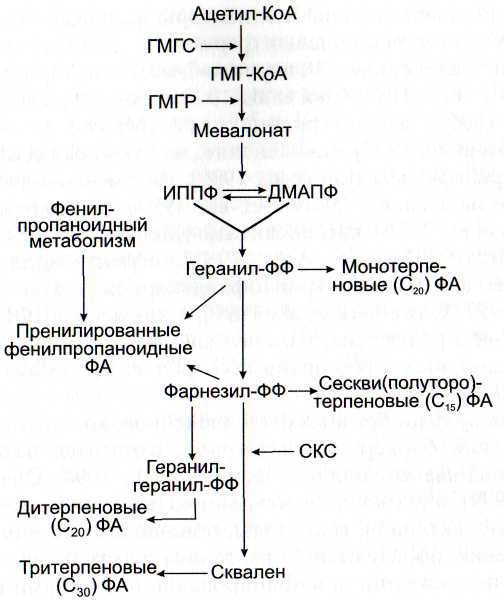


Рис. 53. Схема синтеза терпеноидных фитоалексинов (по: [Threlfall, Whitehead, 1990; Bach, 1995])

ГМГС - З-гидрокси-3-метил-глутарилсинтаза; ГМГ-КоА - 3-гид-рокси-3-метилглутарил-КоА; ГМГР - З-гидрокси-3-метилглутарил-ре-дуктаза; ДМАПФ ~ диметилаллилпирофосфат; ИППФ - изопентенил-пирофосфат; СКС - скваленсинтаза; ФА - фитоалексины; -ФФ - оста­ток пирофосфата

олефиновые монотерпены лимонен, терпинолен, а- и у-терпинены, мирцен, сесквитерпены, *а-* и (3-цедрены, (3-фарнезен, а-акорадиен, а-бисаболен, оксигенированные цедрол и эпицедрол, у риса - 9-(3-пимара-7,15-диен и сте-мар-13-ен, у хлопчатника - госсипол и ласинилен, дезокси-гемигоссипол, гемигоссипол, гемигоссиполон, гелиоциды, у фасоли - два летучих гомотерпена 4,8-диметил-1,ЗЕ,7-ди-метилнонатриен и 4,8,12-триметил-1,ЗЕ,7Е,11-тридекатет-раен, у табака - капсидиол, глютинозон, ветиспирадиен, у хиосциамус - соединения с ветиспирановым углеродным остовом и др.

Различные патогены и элиситоры вызывают индукцию экспрессии генов ключевых ферментов синтеза терпеноид-ных фитоалексинов: З-гидрокси-3-метилглутарилредукта-зы [Yang et al., 1991; Choi et al., 1992; Nelson et al., 1994; Joost et al., 1995], сесквитерпенциклазы [Mercke et al., 1999; Yoshioka et al., 1999], скваленсинтазы [Yoshioka et al., 1999], метилтрансферазы [Liu et al., 1999], изопентенил-дифосфат-изомеразы [Ramos-Valdivia et al., 1997], дитерпенсинтазы [Mohan et al., 1996], касбенсинтазы [Mohan et al., 1996], А-ка-диенсинтазы [Moesta, West, 1985], стриктозидинсинтазы [Chen et al., 1995] и триптофандекарбоксилазы [Cardoso et al., 1997; Ouwerkerk et al., 1999], а также НАДФН: цито-хром Р-450 редуктазы, участвующей в синтезе терпеноид-ных индольных алкалоидов [Schopfer et al., 1998; Pasquali et al., 1999].

К числу газообразных фитоалексинов, которые создают химический барьер для патогенов, относятся некоторые терпеноидные соединения [Норке et al., 1994; Ouewerkerk et al., 1999], а также продукты липоксигеназной сигнальной системы: гексенали, гексенолы, ноненали и ноненолы. Эти соединения образуются в растениях в ответ на механи­ческое повреждение и инфицирование патогенами и могут оказывать бактерицидное и фунгицидное действие на пато­гены на расстоянии, еще до контакта последних с растени­ем. Летучие продукты липоксигеназной сигнальной систе­мы - метилжасмонат, и супероксиддисмутазной сигнальной системы - метилсалицилат, могут выполнять роль вторич­ных элиситоров.

**Патоген(элиситор)индуцируемые белки, укрепляющие клеточные стенки растений.** Обнаружено, что после воз­действия элиситоров на ткани растений из них значительно труднее получить изолированные протопласты [Bradley et al., 1992; Brisson et al., 1994] с помощью общепринятой ме­тодики, предусматривающей использование целлюлаз и пек-тиназ для разрушения клеточных стенок. Это происходит вследствие того, что элиситоры индуцируют экспрессию целого ряда генов, которые кодируют ферменты, катализи­рующие образование ковалентных связей между белками клеточных стенок, белками и полисахаридами. К числу та­ких ферментов относятся пероксидазы [Rebmann et al., 1991;

Flocco et al., 1998], протеиндисульфид изомераза [Esquerre-Tugaye et al., 1979], катализирующая образование дисуль-фидных мостиков. В формировании более жесткой белко-войструктуры принимают участие не все белки клеточных стенок, а два полипептида - 35 и 100 кДа, так как именно они исчезают из спектра полипептидов на полиакриламид-ном геле у вытяжек из клеточных стенок, обработанных элиситорами растений [Bradley et al., 1992].

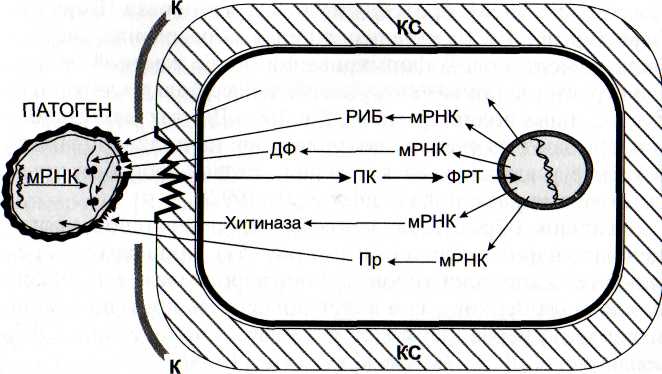
Усиление образования белков клеточных стенок, обога­щенных гидроксипролином (см. рис. 51), происходит в ре­зультате экспрессии генов пролингидроксилаз, а гликози-лированных белков - при индукции синтеза протеин-араби-нозил-трансфераз [Dixon et al., 1986; Corbin et al., 1987; Denecke et al., 1995; Garcia-Muniz et al., 1998].

Укрепление клеточных стенок происходит также с по­мощью повышения интенсивности отложения каллозы в результате элиситориндуцированной экспрессии каллозо-синтазы [Bonhoff et al., 1987], а также лигнина за счет индуцированного синтеза ферментов (фенилаланин-амми-ак-лиазы и др.) фенилпропаноидного метаболизма, обес­печивающих образование мономерных предшественников

лигнина.

**Патогениндуцируемые белки растений, вызывающие деградацию клеточной стенки патогенов.** Одними из пер­вых обнаруженных антипатогенных белков прямого дейст­вия были кислые и щелочные хитиназы и р-1,3-эндоглюка-назы [Ebel, 1986; и др.], способные гидролизовать главные компоненты клеточной стенки грибов (рис. 54), тем самым замедляя или прекращая рост гифов и распространение ин­фекции [Benhamou, 1995]. В последние годы появилось до­вольно много работ, посвященных этим ферментам, их изо-формам, первичной структуре [Ori et al., 1990; Daugrois et al., 1992; Buchter et al., 1997; Busam et al., 1997; Munch-Garthoff et al., 1997; Thimmapuram et al., 2001], промоторным участ­кам их генов и особенностям регуляции их экспрессии [Fukuda, 1997; Н. Wu et al., 1997], в том числе при действии не только патогенов и элиситоров, но и различных стрессо­вых гормонов [Simmons et al., 1992], а также механического повреждения растений [Chang et al., 1995].

Получены данные о возможности хитиназ и (3-1,3-глю-



(3-1,3-Глюканаза-» мРНК

Рис. 54. Схема элиситориндуцируемого образования клетками растений белков прямого антипатогенного действия

ДФ - дефенсины; К - кутикула; КС - клеточные стенки; ПК - про-теинкиназы; Пр - протеиназы; РИБ - рибосомоинактивирующие бел­ки; ФРТ - факторы регуляции транскрипции

каназ не только разрушать клеточные стенки грибов, но и продолжать деградацию освобождающихся фрагментов хи­тина и (3-1,3-глюканов, снижая их элиситорные способности [Salzer et al., 1997].

**Патогениндуцируемые белки растений, нарушающие функционирование клеточной мембраны патогенов.** Под влиянием инфицирования и ряда других неблагоприятных факторов в растениях быстро образуются модификаторы свойств клеточных мембран патогенных грибов и бактерий (см. рис. 54) - относительно небольшие (от 2 до 9 кДа) по­липептиды, подразделяемые на целый ряд семейств: тиони-ны, дефенсины, липидпереносящие белки, хевеины, ноти-ны, снейкины и др. [Garcia-Olmedo et al., 1998]. Список бак­терицидных и фунгицидных полипептидов продолжает по­полняться. Все они имеют идентичный план строения - нес­колько дисульфидных мостиков, гидрофобное ядро, одну протяженную а-спираль и три или четыре антипараллель-но расположенных небольших (3-полос [Song et al., 1997; Garcia-Olmedo et al., 1998; Fant et al., 1999]. Так, у одного из

тионинов - у-1-пуротионина [Bruix et al., 1995], насчитыва­ется четыре дисульфидных мостика, а-спираль, включаю­щая участок полипептида от 16 до 28 аминокислоты, три Р-полосы, включающие 1-6-, 31-34- и 39^7-остатки амино­кислот. У вискотоксина дисульфидные мостики соединяют 3 и 40, 4 и 32, 16 и 26 остатки цистеина [Orru et al., 1997], а у у-тионина из сорго - 3 и 47, 14 и 34, 20 и 41, 24 и 43 [Nitti et al., 1995].

Примечателен факт принципиального сходства строе­ния и относительно высокой гомологии отдельных участ­ков этих полипептидов с нейротоксинами скорпиона и де-фенсинами насекомых, что свидетельствует об эволюцион­ной стабильности этих важных защитных соединений [Zinn-Justin et al., 1996; Thevissen et al., 1997; Kushmerick et al., 1998]. Следует ожидать, что взаимодействующие с ними ре­цепторы клеточной мембраны бактерий и грибов также об­ладают консервативной структурой.

Образование дефенсинов растений индуцируется не только патогенами, но и промежуточными продуктами сигнальных систем клеток и некоторыми стрессовыми фитогормонами, например МеЖК и этиленом [Terras et al., 1998; Shah et al., 1999], однако регуляция этими со­единениями экспрессии генов различных дефенсинов мо­жет сильно отличаться. Так, МеЖК не действовал на син­тез некоторых изоформ дефенсинов [Epple et al., 1997]. Как правило, салициловая кислота также не индуцирова­ла образования дефенсинов [Epple et al., 1997; Terras et al., 1998; Shah et aL, 1999].

При выяснении причин ингибирующего действия на грибы тионинов и дефенсинов было обнаружено, что они вызывают изменение мембранного потенциала клеточной мембраны гриба [Froy, Gurevitz, 1998], усиливают погло­щение Са2+, выход К+, подщелачивание среды [Thevissen et al., 1996; De Samblanx et al., 1997], ингибируют №+-кана-лы [Kushmerick et al., 1998]. Дефенсины, тионины и липид­переносящие белки в разной степени вызывали аггрега-цию и усиление проницаемости для различных веществ ис­кусственных фосфолипидных липосом [Caaveiro et al., 1997]. Считается, что тионины могут подавлять рост гри­бов, непосредственно (неспецифически) действуя на их клеточные мембраны, а дефенсины - связываясь с распо-

ложенными в них специфическими рецепторами [Thevissen et al., 1996].

Интересно, что грибы в ответ на действие дефенсинов включают пока еще неизвестный механизм подавления их образования у растений [Sharma, Lonneborg, 1996]. Этот фе­номен проявляется через сутки и более после начала дейст­вия антигрибных полипептидов на грибы и является еще од­ним подтверждением гипотезы генетического пинг-понга между патогеном и хозяином.

**Патогениндуцируемые белки растений, вызывающие нарушение процессов трансляции у патогенов.** Рибосомо-инактивирующие белки (РИБ) относятся к широко распро­страненным [Gasperi-Campani et al., 1985; Stirpe, Barbieri, 1986; Barbieri et al., 1993; Citores et al., 1993; и др.] защитным антибиотическим стрессовым белкам, синтез большинства которых начинается после воздействия на растения биоген­ных и абиогенных стрессоров [Stirpe et al., 1996; Rippmann et al., 1997; и др.] (см. рис. 54). Следует отметить, что неко­торые из РИБ синтезируются конститутивно, например в семенах и плодах многих растений [Vigers et al., 1991], где вместе с другими белками (хитиназами, [3-1,3-глюканазами, ингибиторами протеиназ) обеспечивают защиту от бакте­рий, грибов и вирусов. В последние годы РИБ привлекли к себе особое внимание, так как обнаружилось, что они обла­дают противоопухолевой активностью [Langer et al., 1999; Sharma et al., 1999].

В настоящее время известны десятки патогениндуциру-емых представителей РИБ у растений различных семейств. Названия этих РИБ обычно отражают родовую или видо­вую принадлежность растений: аспарины из Asparagus offi-cinalis [Bolognesi et al., 1990], волкенсин из Avenia volkensii [Sparapani et al., 1997], бриодины из Bryonia dioica [Bolognesi et al., 1990], колоцины из Citrullus colocynthis [Bolognesi et al., 1990], диантин из Dianthus caryophyllus [Hong et al., 1996], гелонин из Gelonium multiflorum [Brigotti et al., 1999], луф-фины и луффацилин из Luffa cylindrica [Brigotti et al., 1995], лихнин из Lychnis chalcedonica [Bolognesi et al., 1990; Brigotti et al., 1995], мапалмин из Manihot palmata [Bolognesi et al.,1990], MOR и MOR 1 из Marah oreganus [Bolognesi et al., 1996], момордины [Bolognesi et al., 1996], моморхарины

| Mock et al., 1996; Wang, Ng, 1998] и моморкохин [Bolognesi ct al., 1990] из Momordica charantia, фитолакцин из Phytolacca americana [Barbieri et al., 1992], рицин из Ricinus communis [Wang, Ng, 1998; Sharma et al., 1999], эбулитины из Sambucus ebulus [De Benito et al., 1995], нигритины и ниг-рины из Sambucus nigra [Battelli et al., 1997], сапорины из Saponaria officinalis [Bolognesi et al., 1996], кириловины и трихокирин из Trichosanthes kirilowii [Brigotti et al., 1995], тритины из Triticum aestivum [Brigotti et al., 1995], синамо-мин и камфорин из Cinnamomum camphora [Li, Chory, 1997] и т.д.

Определение первичной структуры многих РИБ показа­ло, что они обладают более или менее хорошо выраженной гомологией [Funatsu et al., 1991; Wang, Ng, 1998] и что все они могут быть подразделены на два основных типа: одно-цепочечные (РИБ I) и двухцепочечные (РИБ II). Некото­рые из них гликозилированы [Di Maro et al., 1999]. Молеку­лярные массы большинства РИБ находятся в пределах 28-32 кДа. Защита против патогенных бактерий и грибов обеспечивается ингибирующим действием РИБ на процесс трансляции в рибосомах, а именно блокированием фактора элонгации [Citores et al., 1993]. Специальные исследования молекулярного механизма подавления трансляции позволи­ли установить, что РИБ вызывают расщепление N-связи между рибозой и аденином, причем в специфическом нук-леотиде А-4256, который находится в петле 28S в рибосо-мальной РНК, входящей в состав 60S субъединицы рибосо­мы [Fong et al., 1991; Brigotti et al., 1999]. Считается, что де-иуринизация нуклеотида А-4256 нарушает динамическую гибкость структуры рибосом, которая необходима для осу­ществления синтеза очередной пептидной связи [Holmberg, Nygard, 1996].

Накапливается все больше фактов не только о N-глико-шдазной, но также о суперспиральзависимой эндонуклеаз-ной [Liu, Pu, 1999], РНКазной [Obrig et al., 1985; Mock et al., 1996], ДНКазной [Nicolas et al., 1998] активностях РИБ. Об­наружен также новый фермент - сайт-специфическая рРНК-лиаза, которая способна расщеплять молекулу РНК на 3'-участке апуринового сайта [Ogasawara et al., 1999] и ра­ботающая в комплексе с N-гликозидазой, обеспечивая не

только точечное видоизменение, но и последующее раз­рушение рибосомной РНК патогенов. У одного из РИБ -камфорина, обнаружена супероксиддисмутазная актив­ность [Li, Chory, 1997].

Получены любопытные данные о связи структуры не­которых РИБ с другими стрессиндуцируемыми белками. Так, N-концевой участок одного из РИБ типа I отличался от аналогичного участка хитиназы лишь одной аминокисло­той [Di Maro et al., 1999]. Обнаружена гомология между N-концом жасмонатиндуцируемого белка 60 кДа и каталити­ческим доменом одного из РИБ [Fong et al., 1991]. Оказа­лось, что последний может образовываться из белка 60 кДа в ходе двухступенчатого процессинга.

Многие РИБ вызывают гибель не только грибов и бак­терий, но и клеток растений и животных [Chaudhry et al., 1994; Bolognesi et al., 1996]. В клеточной мембране найден специфический РИБ I-связывающий белок, причем РИБ I не проникает через плазмалемму в неинфицированные про­топласты, в отличие от инфицированных вирусами, что предотвращает их размножение [Watanabe et al., 1997]. РИБ I проявляют гомологию с А-цепью РИБ II [Wang, Ng, 1998], обладающей каталитической активностью, а проник­новение РИБ II в клетки (перенос А-цепи) обеспечивается с помощью В-цепи, отвечающей за узнавание специфических рецепторных белков клеточной мембраны [Sharma et al., 1999]. В-цепь обладает галактозоспецифичным лектино-вым доменом, узнающим галактозные остатки на поверх­ности клеточной мембраны [Chaudhry et al., 1994].

Гены перечисленных в разделе десятков белков облада­ют определенной видовой, тканевой и органоидной специ­фичностью. Вид и интенсивность синтеза белков зависят от природы элиситорных сигналов и времени, прошедшего после начала их действия. Можно быть абсолютно уверен­ным, что в одном опыте на определенном объекте исследо­ватель не сможет обнаружить значительную часть этих белков. В этом отношении представляется показательным исследование пространственных и временных характе­ристик транскриптов различных белков, образующихся в листьях бобов в месте инокуляции патогенных бактерий и на различном расстоянии от него [Meier et al., 1993]. В мес-

те инокуляции обнаруживались мРНК хитиназ, фенилала-нин-аммиак-лиазы, халконсинтазы, в небольшой степени -липоксигеназ. На расстоянии 0,5- 0,7 см от места инокуля­ции было зарегистрировано высокое содержание мРНК ли­поксигеназ, не было найдено мРНК халконсинтазы и лишь в небольших количествах обнаруживались мРНК хитиназы и фенилаланин-аммиак-лиазы. На еще большем удалении можно было найти лишь мРНК липоксигеназ, но их содер­жание было достаточно высоким. Естественно, что по мере увеличения времени действия патогенов системные элиси-горные сигналы распространяются на все большее расстоя­ние и в удаленных от места инфекции клетках индуцирует­ся синтез защитных белков и фитоалексинов.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛИСИТОРОВ И ИНТЕРМЕДИАТОВ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ**

**КЛЕТОК ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРЕПАРАТОВ,**

**ПОВЫШАЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ**

**К ПАТОГЕНАМ**

Материалы, приведенные в предыдущем разделе, свиде­тельствуют, что элиситоры, интермедиаты сигнальных сис­тем и стрессовые фитогормоны индуцируют образование большого набора защитных белков, в том числе фермен­тов, катализирующих образование антипатогенных ве­ществ небелковой природы. Некоторые из защитных со­единений повышают устойчивость самих растений, другие оказывают ингибирующее действие на развитие патогенов.

Все это приводит к снижению отрицательного действия патогенов на продукционные процессы и урожай растений, что не могло не обратить на себя внимания. Было предло­жено достаточно много рекомендаций практического ис­пользования препаратов, содержащих природные элисито­ры, интермедиаты сигнальных систем и стрессовые фито­гормоны или их химические аналоги. Часть этих предложе­ний запатентована, и налажены выпуск и реализация анти-фитопатогенных препаратов.

Из элиситоров чаще всего использовались арахидоновая кислота и производные хитина - олигохитозаны. В качест­ве сырья для получения арахидоновой кислоты используют морских животных и некоторые органы теплокровных жи­вотных. Первый препарат для повышения устойчивости растений к патогенам на основе арахидоновой кислоты был предложен более 20 лет тому назад [Метлицкий и др., 1978, 19826; Озерецковская, 1994]. Установлено, что после пред­посевной обработки клубней картофеля или листьев в пе-

риод бутонизации значительно повышалась комплексная устойчивость к фитофторозу, ранней сухой пятнистости, ризоктониозу и парше. Прибавка урожая составляла в сред­нем 25%. Обработка арахидоновой кислотой защищала клубни картофеля и при хранении [Чаленко и др., 2001]. За­щитное действие арахидоновой кислоты от фитопатогенов было подтверждено при исследовании ее действия на тома­ты и сахарную свеклу [Метлицкий, Озерецковская, 1985].

Установлено, что арахидоновая и эйкозапентаеновая кислоты индуцируют не только локальную, но и системную пролонгированную устойчивость картофеля к возбудителю фитофтороза [Чалова и др., 1989]. Было также обнаруже­но, что арахидоновая кислота повышает устойчивость к не­матодам при выращивании растений в теплицах [Зиновьева и др., 1996], особенно в сочетании с метилжасмонатом [Зи­новьева и др., 1998].

В Российской Федерации налажен производственный выпуск антипатогенных препаратов на основе арахидоно­вой кислоты.

В последние годы широко испытывается действие на ус­тойчивость растений к патогенам еще одного элиситора -хитозана. Обнаружено, что максимальная фитофтороус-тойчивость картофеля проявляется при использовании во­дорастворимого хитозана с молекулярной массой 5 кДа [Переход и др., 1997; Васюкова и др., 2000]. Хитозан повы­шал также устойчивость к нематодам растений томатов в условиях тепличного хозяйства [Зиновьева и др., 1999], при­чем индуцировал не только локальную, но и системную ус­тойчивость растений к фитофторе и нематодам [Васюкова и др., 2001].

На основе хитозана 5 кДа создан препарат "Агрохит", рекомендуемый для защиты картофеля от фитофтороза, но, по-видимому, достаточно эффективный в защите и от других патогенов.

Молекулярные механизмы и практические аспекты ис­пользования хитозана для повышения устойчивости расте­ний к различным патогенам обсуждались на 6-м Междуна­родном симпозиуме по хитину и хитозану, проведенном в Москве в 2001 г.

Практическое применение получили препараты на ос­нове стрессовых фитогормонов и их синтетических анало-

гов. Достаточно широкое распространение получили препараты на основе 2-хлорэтилфосфоновой кислоты (2-ХЭФК), пролонгированно освобождающие фитогормон этилен: амхел, этрел, кампозан, флорел, гидрел, дигидрел [Кораблева, Платонова, 1995]. Установлено, что обработка этими препаратами растений картофеля и клубней перед закладкой на хранение усиливает покой клубней и их устой­чивость к фитопатогенным микроорганизмам и улучшает качество семенного материала [Метлицкий и др., 1982а; Ко­раблева и др., 1989]. Положительные результаты от приме­нения препаратов-доноров этилена были получены и при хранении лука и моркови [Карякина и др., 1990; Кораблева, Платонова, 1995].

Повышение устойчивости к болезнями продемонстри­ровано при использовании препаратов брассиностероидов и их аналогов [Кораблева, Платонова, 1995].

Начинается практическое использование еще одного стрессового гормона - жасмоната (и его производного - ме-тилжасмоната) [Зиновьева и др., 1998].

Давно известно, что экзогенный стрессовый фитогор­мон салициловая кислота (являющаяся также интермедиа-том НАДФН-оксидазной и NO-синтазной сигнальных сис­тем) и ацетилсалицилат вызывают синтез защитных соеди­нений и повышение устойчивости растений к патогенам. Практическое использование нашел природный миметик салициловой кислоты [Тарчевский и др., 1999] — янтарная кислота.

Уже давно было отмечено, что янтарная кислота явля­ется биологически активным соединением [Благовещен­ский, 1968]. Нами в полевых условиях на более чем 10 тыс. га и в тепличных хозяйствах на многих сельскохозяй­ственных культурах было показано, что предпосевная обра­ботка семян или вегетирующих растений препаратами ян­тарной кислоты приводит к повышению интенсивности продукционных процессов и урожаев растений, что в значи­тельной степени связано с их устойчивостью к болезням.

Технология получения янтарной кислоты, не содержа­щей примесей тяжелых металлов, была разработана в Ка­занском химико-технологическом институте в лаборатории профессора А.Г. Лиакумовича, и было начато производство препаратов на основе этого соединения.

Технология использования тех или иных элиситоров, ннтермедиатов сигнальных систем и стрессовых фитогор-монов по отдельности или в сочетаниях должна быть раз­работана применительно к конкретным видам и сортам растений [Озерецковская, Васюкова, 2002], в противном случае может быть получен результат, противоположный ожидаемому.

**ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ**

**С ИЗМЕНЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ**

**К ПАТОГЕНАМ**

Успехи молекулярной генетики, появление эффектив­ных методов переноса в растения "чужих" существующих в природе и искусственно конструируемых генов, клониро­вание генов, изучение структурных и функциональных особенностей генов и их промоторных участков обеспечи­ли большие возможности в создании трансгенных расте­ний специально для изучения особенностей функциониро­вания сигнальных систем клеток растений. Кроме того, трансгенные сельскохозяйственные растения с привнесен­ными генами элиситоров, интермедиатов сигнальных сис­тем и элиситориндуцируемых белков оказались более ус­тойчивыми к патогенам и стали использоваться в практи­ческих целях. В настоящее время ими заняты значитель­ные посевные площади. Работы в этой области продвига­ются настолько интенсивно, что появилась необходимость систематизировать их и ознакомить с ними специалистов, работающих в области физиологии растений и смежных направлениях науки.

Эффективность работ по созданию трансгенных расте­ний в значительной степени определялась результатами ис­следований молекулярных основ адаптации и иммунитета, соответственно, к абиотическим и особенно к биотическим стрессорам.

При изучении особенностей влияния патогенных микро­организмов на растения было обнаружено образование в атакуемых тканях патогениндуцируемых защитных белков (PR) [Neumann et al., 1989; Stintzi et al., 1993]. Оказалось, что эта реакция в определенной степени неспецифична: многие защитные белки образуются при атаке на растения самых

разнообразных патогенных грибов, бактерий, вирусов, а также насекомых и паразитирующих на растениях круглых червях - нематодах. Последнее можно рассматривать и как приспособительную реакцию против последующего инфи­цирования растений через образовавшуюся раневую по­верхность.

Патогены, продуцируемые ими и инфицированными растениями элиситоры, "включают" сигнальные системы клеток [Тарчевский, 2000], которые осуществляют рецеп­цию, преобразование и усиление элиситорного сигнала и передачу его в геном, где происходит экспрессия генов за­щитных белков, что обеспечивает появление локальной и системной устойчивости. В предыдущем разделе все пато-ген(элиситор)индуцируемые белки были подразделены на несколько групп по тем функциям, которые они выполня­ют [Тарчевский, 2001].

Для создания устойчивых к биогенным стрессорам трансгенных растений используются гены белков - участ­ников сигнальных путей клеток. К ним относятся белковые элиситоры; интермедиаты сигнальных систем, например ферменты, катализирующие синтез или деградацию вто­ричных мессенджеров; белки, обеспечивающие устойчи­вость самого растения-хозяина или нарушение функций па-тогеных микроорганизмов, растительноядных насекомых или нематод.

Очевидно, что чем более раннее звено сигнальной цепи клетки растения кодирует переносимый ген (например, ген элиситорного белка), тем менее специфичным и более раз­нообразным будет набор изменений в функционировании трансгенного растения, обеспечивающих появление повы­шенной устойчивости к стрессорам. Можно ожидать, что более направленной и специфичной будет защита растений, вызванная переносом в них генов белков прямого антипато­генного действия, являющихся заключительным звеном функционирования сигнальных цепей.

Обычно практикуется прикрепление переносимого ге­на к промотору другого гена растения (рис. 55) - к консти­тутивно функционирующему или, чаще всего, эффектив­но изменяющему активность под влиянием воздействия на растения того или иного стрессора. Иногда с целью боль­шего повышения устойчивости трансгенного растения в

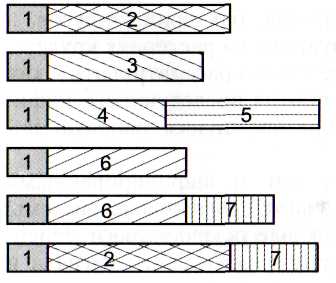


Рис. 55. Схема строения генов, используемых в трансгенных растениях

*1 -* промоторная область; *2 —* соответствующий промотору "свой" ген; *3 -* чужеродный ген; *4* и 5 - два чужеродных гена под контролем одного промотора; *6 -*репортерный ген; *6* и 7 - два ре-портерных гена под контролем одного промотора; 2 и 7 - "свой" и репортерный гены под контролем одного промотора

него могут переносить не один, а различные гены [Zhu et al., 1996].

**Трансгенные растения с репортерными генами.** Для ис­следования сигнальных систем используют трансгенные растения, у которых к промотору гена, установленного ра­нее или предполагаемого участника сигнальной системы, прикрепляется так называемый репортерный ген, кодирую­щий белок, активность которого может быть определена, например белок, обладающий способностью люминесциро-вать в присутствии определенных люминофоров. Чаще все­го репортерный ген присоединяется к промоторному участ­ку исследуемого гена. Интенсивность экспрессии репортер-ных генов и распределение по органам растения или внутри клеток кодируемых ими белков достаточно легко исследо­вать по люминесценции. В большинстве случаев в качестве репортерного используется ген фермента (3-глюкуронида-зы (GUS) из энтеробактерии Е. coli. Фермент гидролизует Р-£)-глюкурониды, превращая их в D-глюкуроновую кисло­ту и агликоновый фрагмент, но может также отщеплять от полисахаридов остаток (3-глюкуроновой кислоты, связан­ный с сахарами [Gilissen et al., 1998]. Фермент проявляет активность в форме гомотетрамера, обычно локализуется в цитоплазме, но с помощью введения в репортерный ген по­следовательности нуклеотидов, кодирующей транспортный пептид, можно позволить ферменту перенос через мембра­ны и накопление, например, в эндоплазматической сети. Качественный, количественный и гистохимический анали­зы активности GUS проводятся с помощью коммерческих препаратов глюкуронидов по люминесценции продуктов

реакции в присутствии люминофоров. Этот подход оказал­ся эффективным при изучении сигнального пути, "включа­емого" элиситорными белками - элиситинами. Оказалось, что молекула элиситина имеет два отличающихся участка структуры, один из которых определяет сигнальный путь, ведущий к синтезу защитных белков, а другой - к индукции некрозов [Perez et al., 1997]. Репортерный ген GUS приме­нялся также для определения структуры промоторов, на­пример, отвечающих за экспрессию генов этилениндуциру-емых защитных белков [Eyal et al., 1993], для изучения осо­бенностей регуляции сигналиндуцируемого синтеза супер-оксиддисмутазы [Herouart et al., 1994], каталазы [Guan, Scandalios, 1993], анионных пероксидаз и их локализации в различных органах растений [Mohan et al., 1993a, b; Klotz et al., 1998; Gray-Mitsumune et al., 1999], обогащенных гид-роксипролином белков клеточных стенок [Wycoff et al., 1995; Puigdomenech et al., 1997], msr (multiple stimulus response) ге­нов, от которых зависит апоптоз [Pontier et al., 1998], осмо-тинов [Zhu et al., 1995; 1996], дефенсинов [Manners et al., 1998; Mitter et al., 1998], PR1 защитных белков [Tornero et al., 1997], протеаз [Jorda, Vera, 2000], хитиназ [Clarke et al., 1994; Leah et al., 1994; Shinshi et al., 1995], р-1,3-глюканаз [Castresana et al., 1990; Vogeli-Lange et al., 1994; Alonso et al., 1995], стриктозидин-синтазы - ключевого фермента элиси-ториндуцируемого образования терпеноидных алкалоидов [Memelink et al., 1999], а также ферментов синтеза фенил-пропаноидных фитоалексинов - фенилаланин-аммиак-лиа-зы и сесквитерпенциклазы [Yin et al., 1997], 4-кумарат-ко-фермент А-лигазы [Hauffe et al., 1991]. Введение гена (3-глюкуронидазы помогло понять, как распределяется по органам и тканям калретикулиновый ген [Coughlan et al., 1997], изменяющий активность в ходе развития растений, и моносахаридный Н+-симпортерный ген [Truernit et al., 1996], экспрессируемый при действии патогенов и элиситоров. С помощью гена GUS удалось установить, что экспрессия белка оболочки вируса, обеспечивающего его транспорти­ровку по растению, локализована в тканях флоэмы вегета­тивных органов [Christou et al., 2000]. Это объясняет, поче­му скорость распространения вируса по растению значи­тельно увеличивается после его попадания во флоэму из клеток мезофилла листа [Курсанов, 1976]. Использование

гена (3-глюкуронидазы, введенного под промоторы двух изоформ супероксиддисмутазы [Tanaka et al., 1995], показа­ло, что только одна из них активируется экзогенной абсци-зовой кислотой. При изучении особенностей экспрессии ге­на тримерной протеинфосфатазы типа 2А, играющей важ­ную роль в регуляции функционирования сигнальных сис­тем, GUS-метод позволил выяснить, что от набора катали­тического и регуляторных субъединиц протеинфосфатазы зависит ее специфичность, активность и распределение внут­ри клетки [Thakore et al., 1999].

Для исследования роли ионов кальция в функциониро­вании сигнальных систем используют трансгенные расте­ния с привнесенным конститутивно экспрессируемым ге­ном экворина (aequorin) [Knight et al., 1991; Chandra et al., 1997; и др.] - Са2+-зависимого флуоресцентного белка (из представителя кишечнополостных - Aequorea victoria), ко­торый образуется в результате посттранскрипционной мо­дификации из предшественника - апоэкворина 22 кДа. Эк-ворин локализован в цитозоле клеток, и интенсивность его люминесценции в присутствии люминофора коэлентерази-на зависит от концентрации ионов кальция в этом компарт-менте. Найдена также принципиальная возможность раз­мещения экворина в таких органоидах, как митохондрии и хлоропласты, с помощью конструирования химерных генов апоэкворина с прикрепленными к ним фрагментами, коди­рующими синтез сигнальных последовательностей, от ко­торых зависит транспорт белков в органоиды. Были найде­ны аналоги коэлентеразина, которые делают экворин более чувствительным и позволяют определять низкие кон­центрации ионов кальция [Knight et al., 1993].

Для исследования сигнальных систем клеток растений и особенностей взаимодействия патогенов и растений ис­пользуют еще один репортерный ген из Aequorea victoria -ген так называемого зеленого флуоресцентного белка [Rossi et al., 1996; Liu, Kolattukudy, 1999; Liu et al., 2001]. Практикуется получение гетерорепортерных генных кон­струкций, кодирующих как этот белок, так и (3-глюкуро-нидазу, под промотором одного и того же гена [Quaedvlieg et al., 1998; Ottenschlager et al., 1999], что предоставляет до­полнительные возможности исследования распределения и транспортировки белков, а также взаимоотношений па-

тогенов и растений. С помощью гена зеленого флуорес­центного белка, введенного в геном растений табака, уда­лось установить, что вирус мозаики табака транспортиру­ется по растению с помощью двух различных механиз­мов - медленного, когда вирус передвигается от клетки к клетке, что сопровождается репликацией, и быстрого, осу­ществляющегося по сосудам растения [Casper, Holt, 1996]. Использование зеленого флуоресцентного белка под про­мотором белка движения вируса X картофеля позволило получить новую информацию о движении вирусов через плазмодесмы [Oparka et al., 1996].

В некоторых опытах определялась активность репор-терных генов хлорамфеникол-ацилтрансферазы, например, при исследовании особенностей действия патогенов и эли-ситоров на активность халконсинтазы [Loake et al., 1991; Yamada et al., 1994] - ключевого фермента синтеза фенил-пропаноидных фитоалексинов.

Использование репортерного гена люциферазы для ис-ледования сигнальных систем клеток растений поставлено под сомнение в связи с тем, что субстрат этого гена (люци-ферин) сам вызывает активацию генов защитных белков IJorda, Vera, 2000].

Трансгенные растения с репортерными генами доста­точно часто конструируют для познания структуры промо-горных участков генов белков - участников сигнальных си­стем клеток растений, ферментов синтеза фитоалексинов и защитных белков.

**Трансгенные растения с генами белков-элиситоров.** На­ибольшее число работ в этом направлении посвящено соз­данию более устойчивых растений с помощью переноса в них генов белков оболочки вирусов [Miller, Hemenway, 1998], элиситирующих включение сигнальных систем кле­ток путем взаимодействия с рецепторами (табл. 1) [Глагоц-кая и др., 1990а, б; Culver, Dawson, 1991; Lomonossoff, 1995; Bendahmane et al., 1997; Hammond, Dienelt, 1997; Lim et al., 1997; Moon et al., 1997; Seppanen et al., 1997; Watanabe et al., 1997; Chowrira et al., 1998; Guo et al., 1998; Lorito et al., 1998; Miller, Hemenway, 1998; Moreno et al., 1998; Ravelonandro et al., 1998; Reimann-Philipp, 1998; Beachy et al., 1999; Boria et al., 1999; Han et al., 1999; Jan et al., 1999; Keller et al., 1999; Kehm et al., 2001; Savenkov, Valkonen, 2001; Sunter et al.,



2001]; вирусных белков, обеспечивающих их транспорти­ровку из клетки в клетку [Herbers et al., 1997; Seppanen et al., 1997; Spillane et al., 1997; Sanz et al., 2000; Kotlizky et al., 2001; Simone et al., 2001] и, наконец, вирусных репликаз и геликаз [Jones et al., 1998; Wittner et al., 1998; Erickson et al., 1999; Guo et al., 1999; Thomas et al., 2000; Vazquez et al., 2001], а также рибозимов [Kwon et al., 1997; Yang et al., 1997].

Сконструировано относительно мало трансгенных рас­тений с генами белков элиситоров, продуцируемых пато­генными грибами и бактериями. Из них особенно большое внимание исследователей привлекает криптогеин фито­фторы [Lorito et al., 1998; Keller et al., 1999].

**Трансгенные растения с генами белков, участвующих в синтезе стрессовых фитогормонов.** Стрессовые фитогор-моны (абсцизовая, жасмоновая и салициловая кислоты, эти­лен, системин) могут рассматриваться в качестве соедине­ний, элиситирующих сигнальные системы, поэтому пред­ставляют интерес работы, в которых приводятся данные о

трансгенных растениях с привнесенными генами белков, участвующих в образовании фитогормонов [Hedden, Phillips, 2000]: просистемина и системина [McGurl et al., 1992, 1994а], 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-синтазы [С. Liu et al., 1998; De Martinis, Mariani, 1999] - одного из ферментов синтеза этилена, алленоксидсинтазы [Harms et al., 1995; С. Wang et al., 1999; Laudert et al., 2000], катализирующей об­разование предшественника жасмоната.

**Трансгенные растения с генами белков - участников сигнальных систем. В** настоящее время осуществлен пере­нос в растения генов белков, участвующих почти во всех этапах передачи сигнала от элиситоров до генома клеток. Получены трансгенные растения с рецепторным автоки-назным белком [Ohtake et al., 2000; Tao et al., 2000] и с рядом белков, принимающих участие в обслуживании сигнальных систем клеток. Одним из важнейших участников этих сис­тем являются G-белки и протеинкиназы. Трансгенные рас­тения с активным геном G-белка подтверждают это поло­жение, обнаруживая повышенную устойчивость к вирусам [Sano et al., 1994; Sano, Ohashi, 1995; Li et al., 2001], так же как растения с привнесенным геном протеинкиназы |Morello et al., 2000]. Были получены трансгенные растения с привнесенным геном кальцийзависимой протеинкиназы [Romeis et al., 2000]. Обязательным участником сигнальных систем клеток являются факторы регуляции транскрипции, и трансгенные растения с активными генами этих белков обнаруживают повышенную устойчивость к патогенам |Mayda et al., 1999; Park et al., 2001]. Недавно было обнару­жено, что при вирусной инфекции повышается активность гена РНК-зависимой РНК-полимеразы растения табака, что предположительно повышало устойчивость к вирусу. Использование трансгенных растений табака с антисмыс-ловым геном этого фермента показало, что у исследуемых растений наблюдалось нарушение защитных реакций и как локальное (в месте инфицирования), так и системное накоп­ление вирусов [Xie et al., 2001].

Выше уже были охарактеризованы основные сигналь­ные системы клеток растений: аденилатциклазная, МАР-киназная, фосфатидатная, кальциевая, липоксигеназ-ная, супероксиддисмутазная (НАДФН-оксидазная), NO-син-тазная и протонная сигнальные системы.

Изменение работы МАР-киназной сигнальной системы и повышение устойчивости к стрессорам достигалась в трансгенных растениях с помощью гена МАРК [Seoa et al., 1999] или изоформы МАРККК, активируемой перекисью водорода [Kovtun et al., 2000], снижение интенсивности син­теза фосфатидной кислоты в фосфатидатной системе у ара-бидопсиса - с помощью антисмыслового подавления синте­за фосфолипазы Д [С. Wang, 2000]. В кальциевой сигналь­ной системе использовались трансгенные растения с анти-смысловым геном фосфолипазы С [Sanchez, Chua, 2001], привнесенными генами кальмодулина [Harding et al., 1997] и инозитол-5'-фосфатазы (снижающей содержание инози-толтрисфосфатов и инозитолтетракисфосфатов, что подав­ляет кальциевый сигнальный путь) [Berdy et al., 2001; Sanchez, Chua, 2001], в липоксигеназной - генами гидро-пероксидлиазы [Vancanneyt et al., 2001], образующей анти­патогенные летучие С6-соединения, и алленоксидсинтазы [Harms et al., 1995], катализирующей образование фитодие-новой кислоты, из которой синтезируется жасмоновая кис­лота. Трансгенные растения арабидопсиса с привнесенным геном метилтрансферазы обнаруживали повышение устой­чивости к патогенным грибам за счет усиления образования из жасмоновой кислоты подвижной стрессовой сигнальной молекулы метилжасмоната [Seo et al., 2001], что вызвало усиление формирования системного иммунитета.

Особенно много работ посвящено трансгенной модифи­кации супероксидсинтазной сигнальной системы с помо­щью переноса генов супероксиддисмутазы [Van Camp et al., 1996; Chung et al., 2000; Pan et al., 2001], катал азы [Takahashi et al., 1997; Willekens et al., 1997; Chamnongpol et al., 1998; Mittler et al., 1999], аскорбатпероксидазы [Mittler et al., 1999] или гидроксилазы салициловой кислоты [Chamnongpol et al., 1998; Reuber et al., 1998; Kumar, Klessig, 2000; Lee et al., 2001; Yoshioka et al., 2001], катализирующей ее превращение в не­активный катехол. Как правило, генетическое вмешатель­ство в функционирование НАДФН-оксидазной системы приводило к изменениям в вызванном патогенами апоптозе клеток. Трансгенные растения табака с перенесенным в них геном подавления апоптоза животных проявляли большую устойчивость к вирусу табачной мозаики [Mitsuhara et al., 1999; Dickman et al., 2001], что еще раз свидетельствует об

общности механизмов апоптоза и его участников. Ингиби­тор апоптоза животных клеток оказывал аналогичное дейст­вие и на клетки арабидопсиса [Kawai-Yamada et al., 2001]. На протекание апоптоза и устойчивость к патогенам может оказывать влияние активность не только супероксидисму-тазы и каталазы, но и ферментов, от которых также зави­сит окислительно-восстановительный режим клеток — цис-теин-пероксиредоксина и глутатион-пероксидазы, о чем свидетельствуют трансгенные растения с генами этих фер­ментов [Lee et al., 2000; Roxas et al., 2000]. Интересны результаты опытов с катионной пероксидазой растений, по­казавшие, что ее свойства можно изменять с помощью на­правленной генетической замены одной из трех гликозили-рующихся аминокислот [Lige et al., 2001].

В связи с тем, что Н+-АТФаза, по-видимому, играет важ­ную роль в функционировании протонной сигнальной сис­темы [Schaller, (Decking, 1999], представляют интерес дан­ные о повышении устойчивости растений к грибам и бакте­риям после введения в них гена бактериородопсина из Halobacterium halobium [Mittler et al., 1995; Abad et al., 1997; Rizhsky, Mittler, 2001], выполняющего функции протонной помпы, как было показано в серии работ В.П. Скулачева, доказавшего с помощью этого объекта справедливость представлений о трансмембранном протонном градиенте как предшественнике АТФ.

**Трансгенные растения с генами фенилпропаноидного и терпеноидного метаболизма.** Как известно, в результате включения сигнальных систем образуются растительные ан­тибиотики - фитоалексины, относящиеся главным образом к соединениям фенилпропаноидного и терпеноидного мета­болизма клеток. Имеется несколько удачных попыток повы­шения устойчивости растений с помощью привнесения генов ферментов синтеза фенилпропаноидных [Hain et al., 1993; Maher et al., 1994; Oommenet et al., 1994; Colliver et al., 1997; Coutos-Thevenot et al., 2001; Jones et al., 2001] и терпеноидных [Kunkel et al., 1999; Ouwerkerk et al., 1999] фитоалексинов. К этому направлению работ примыкает усиление лигнифи-кации клеток с помощью гена пероксидазы [Dowd et al., 1998; Ostergaard et al., 2000], катализирующей превращение моно­мерных производных фенилпропаноидного метаболизма (фенольных кислот и спиртов) в гетерополимер лигнин.

**Трансгенные растения с генами ферментов, нарушаю­щих питание патогенов, насекомых и нематод.** Еще одно на­правление работ по повышению устойчивости использует свойство растений образовывать (в результате включения сигнальных систем клеток) белки-ингибиторы протеиназ, обеспечивающих азотное питание патогенных микроорга­низмов, насекомых и нематод, или эндоглюканаз, участвую­щих в их углеводном питании. С помощью переноса генов белковых ингибиторов протеиназ [Johnson et al., 1989; De Leo et al., 1998; Urwin et al., 1998; Walker et al., 1999] и поли-галактуроназ [Desiderio et al., 1997; Глинка, Проценко, 1998; Devoto et al., 1998; Lorito et al., 1998] достигалось подавление развития этих организмов.

**Трансгенные растения с генами хитиназ, Р-1,3-эндоглю-каназ и лектинов.** Достаточно эффективное отражение ата­ки патогенных грибов, насекомых и нематод осуществляет­ся в результате привнесения в растения генов хитиназ из других растений, насекомых или микроорганизмов [Neuhaus et al., 1991; Hart et al., 1992; Ding et al., 1998; Datta et al., 2001; Mora, Earle 2001], разрушающих хитин клеточных стенок патогенных грибов или хитин насекомых. Опыты с транс­генными растениями, в которые привносились в разной сте­пени укороченные гены хитиназы, привели к выводу, что in vivo могут существовать различные формы хитиназ, об­разующиеся благодаря протеолитическому процессингу С-конца фермента и его гликозилированию [Zhu et al., 2001]. Трансгенные растения с антисмысловым геном хити­назы значительно уменьшали содержание этого защитного белка [Samac, Shah, 1994]. В меньшей степени используются гены Р-1,3-эндоглюканаз [Masoud et al., 1996; Borkowska et al., 1998], разрушающие полисахариды клеточных стенок патогенных бактерий и грибов, или совместно гены этих двух ферментов [Zhu et al., 1996]. Фунгицидной активностью обладали растения табака с геном (3-1,3-1,4-глюканазы из термофильной бактерии Clostridium thermocellum [Дарби-нян и др., 1995]. Оказалось, что трансгенные растения с привнесенным геном лектина обладают повышенной ус­тойчивостью к повреждению личинками моли [Down et al., 2001].

**Трансгенные растения с генами дефенсинов, тионинов и рибосомоинактивирующих белков.** Одним из важных на-

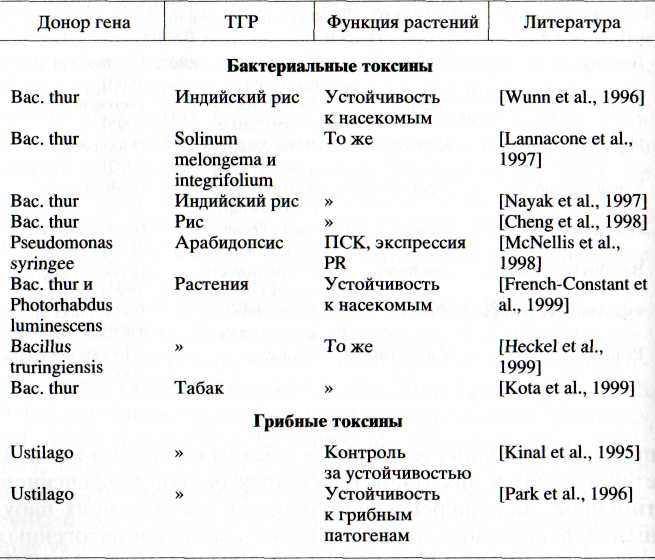


правлений создания устойчивых к патогенам растений явля­ется перенос в них генов природных белков (дефенсинов, тионинов, липидпереносящих белков), вызывающих нару­шение функционирования клеточных мембран патогенных грибов и бактерий [Carmona et al., 1993; Terras et al., 1995; Butt et al., 1998; Dempsey et al., 1998; Gao et al., 2000; Ляпко-ва и др., 2001]. В роли поставщиков этих генов могут высту­пать как сами растения, так и животные, насекомые, грибы и бактерии (табл. 2), у которых, например, дефенсины име­ют сходный план строения и достаточно консервативные участки молекул [Zinn-Justin et al., 1996; Thevissen et al., 1997; Kushmerick et al., 1998]. В качестве примера можно привес­ти трансгенные растения табака, обладающие повышенной устойчивостью к патогенам, что было обеспечено перено­сом гена дефенсина кролика [Zhang et al., 2000].

Еще одно направление создания устойчивых трансген­ных растений - это перенос в них генов белков (N-гликози-даз), нарушающих функционирование белоксинтезирую-щей машины грибов и бактерий (так называемых рибосо­моинактивирующих белков, блокирующих фактор элонга­ции [Girbes et al., 1996; Hong et al., 1996; Lam et al., 1996; Zoubenko et al., 2000; Nielsen, Boston, 2001]). Обнаружено,

90S

Таблица 3 Трансгенные растения с генами бактериальных и грибных токсинов



что рибосомоинактивирующие белки действуют также на вирусную РНК, что, по-видимому, связано с их РНКазной активностью [Obrig et al., 1985; Mock et al., 1996].

Недавно были получены трансгенные растения с кон­ститутивно экспрессируемыми привнесенными генами от­носительно небольших белков пуроиндолинов, токсичных для фитопатогенных грибов in vivo и in vitro [Krishnamurhy etal., 2001].

К последним двум направлениям работ по созданию ус­тойчивых трансгенных растений примыкает еще одно, в ко­тором используются гены бактериальных токсинов, обла­дающих инсектицидными свойствами (табл. 3).

Большой интерес вызывало установление факта индук­ции синтеза РНК-зависимой РНК-полимеразы вирусами или салициловой кислотой. Растения табака с привнесен­ным геном антисмысловой РНК-зависимой РНК-полимера-

зы обнаруживали более высокое содержание вирусной РНК и более ярко выраженные симптомы заболевания, чем исходные растения [Xie et al., 2001]. Это означает, что РНК-зависимая РНК-полимераза играет важную роль в ан­тивирусной защите растений.

Из приведенных данных следует, что для создания трансгенных растений, устойчивых к патогенным бактери­ям, грибам и вирусам, а также к паразитирующим на расте­ниях насекомым и нематодам используется целый арсенал генов, кодирующих белки различных этапов функциониро­вания сигнальных систем клеток растений, начиная с элиси-торных белков и кончая антипатогенными, инсектицидны­ми и антинематодными белками. Работы по созданию трансгенных растений с повышенной устойчивостью к био­тическим стрессорам осуществляются со все более высоки­ми темпами и, безусловно, будут способствовать все боль­шему расширению общей площади посевов, отведенных для сельскохозяйственных трансгенных растений, и увели­чению разнообразия видов и сортов этих растений [Lamb et al., 1992; Ноу, 1998; Salmeron, Vernooij, 1998; Бурьянов, 1999; Kolodziejczyk, Fedec, 1999; Романов, 2000; Borch, Rasmussen, 2000; Melchers, Stuiver, 2000; Rommens, Kishore, 2000; Wolfenbarger, Phifer, 2000]. Опасность загрязнения не­желательным генетическим материалом других хозяйствен­но ценных растений (за счет переопыления, горизонтально­го переноса генетического материала при инфицировании растений вирусами и бактериями [Чернов и др., 1996] и т.д.), связанная с повышением темпов создания трансгенных рас­тений, заставляет исследователей учитывать эти факторы при получении новых трансгенных сортов.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Из приведенного в книге материала можно сделать вы­вод о чрезвычайной сложности механизмов, формирующих функциональный и структурный ответы клеток на внешние сигналы. Под влиянием патогенов и элиситоров включают­ся различные сигнальные системы растений и приходит в движение вся сигнальная сеть клеток (напрашивается ана­логия с паутиной, у которой импульс механического раздра­жения передается к центру паутины не только по радиаль­ным нитям - аналогам отдельных сигнальных систем, но и по связывающим их поперечным нитям - аналогам сигналь­ных интермедиатов). В результате осуществляются пере­программирование работы генетического аппарата клеток и формирование защитных антипатогенных химических и физических барьеров.

Уже в процессе функционирования липоксигеназной, НАДФН-оксидазной и NO-синтазной сигнальных систем образуются очень активные антипатогенные соединения -оксилипины (в том числе гексенали и ноненали), перекись водорода, монооксид азота, пероксинитрит, способные по­давлять развитие патогенов. Обращает на себя внимание, что все эти соединения являются интермедиатами "кисло­родных" сигнальных систем, у которых стартовые или близкие к ним реакции осуществляются с участием кисло­рода воздуха. Исключением является интермедиат адени-латциклазной сигнальной системы - цАМФ, подавляющий развитие патогенных грибов. Выше уже отмечалось, что три перечисленные сигнальные системы могут быть отне­сены к эволюционно наиболее "молодым". Перечисленные выше интермедиаты эволюционно более "молодых" сиг­нальных систем могут оказывать губительное действие не только на клетки патогенов, но и на клетки растения-хозяина,

приводя к их апоптозу, что препятствует распростране­нию патогенов из мест инфицирования в другие части рас­тения.

Антипатогенным действием обладают также различные элиситориндуцируемые "классические" фитоалексины -фенилпропаноидные, летучие терпеноидные и другие со­единения, образование которых начинается или интенсифи­цируется за счет элиситориндуцируемого синтеза соответ­ствующих ферментов. Повышение устойчивости к различ­ным стрессорам, в том числе биотическим, определяется также укреплением клеточных стенок (их лигнификацией, синтезом каллозы и гидроксипролиновых белков, образо­ванием сшивок между белками), изменением содержания и соотношения белковых и липидных компонентов мембран. Изменяется и ультраструктура клеток.

Исследование молекулярных механизмов взаимоотно­шений патогенов и растений привело к появлению ряда пер­спективных практических направлений формирования и повышения фитоиммунитета. К ним относятся использова­ние элиситоров и интермедиатов сигнальных систем в каче­стве индукторов иммунитета и конструирование трансген­ных устойчивых к патогенам растений с переносом в пос­ледние генов белковых элиситоров, интермедиатов сиг­нальных систем или защитных белков непосредственного антипатогенного действия.

Дальнейшая расшифровка механизмов взаимодействия сигнальных систем, по-видимому, должна составлять одну из важнейших задач биохимии и клеточной биологии начала XXI в. Можно прогнозировать следующие направления ис­следований и разработок, связанных с сигнальными система­ми и сетями: поиск новых сигнальных систем и минорных участников уже известных сигнальных систем; расшифровка особенностей функционирования сигнальной сети как едино­го целого; "привязка" отдельных сигнальных систем к тому или иному виду сигналов и рецепторов; продолжение установ­ления структуры промоторных участков и молекулярного механизма их взаимодействия со "своими" факторами регу­ляции транскрипции у различных генов; расшифровка меха­низмов, обусловливающих временной (преходящий) харак­тер включения тех или иных сигнальных систем и в то же время длительную память об их включении, проявляющую-

ся, например, в формировании системного иммунитета про­тив патогенов; характеристика видовой, органной и тканевой специфичности функционирования сигнальных систем; соз­дание трансгенных форм растений с видоизмененными сиг­нальными системами, что позволит получить или сверхчув­ствительные формы нежелательных организмов (и поста­вить их на грань выживания), или сверхустойчивые к биоген­ным и абиогенным стрессорам; конструирование трансген­ных форм растений с генами защитных белков, в том числе прямого антипатогенного действия; использование приемов генетической инженерии растений для получения ценных фармакологических препаратов.

Необходимо отметить, что общие принципы работы сигнальных систем в значительной степени универсальны. Универсальность ДНК - основного вместилища информа­ции, определяет сходство механизмов ее обслуживания в клетках микроорганизмов, растений и животных. Это каса­ется универсальности структуры рецепторов, встроенных в клеточные мембраны, ассоциирующих с ними G-белков, структуры стартовых ферментов сигнальных систем и фер­ментов, ответственных за синтез и деградацию небелковых вторичных посредников, структуры протеинкиназ, проте-инфосфатаз, факторов регуляции транскрипции, РНК-по-лимераз, рибосом и обслуживающих их работу белков.

Исследование особенностей функционирования сиг­нальных систем клеток позволяет сформулировать следую­щие общие положения [Гречкин, Тарчевский, 2000]: клетка является многомерным информационным пространством, образованным совокупностью взаимосвязанных сигналь­ных систем и генома; существует постоянный двусторонний обмен "командами" между геномом и сигнальными систе­мами; оперативное управление жизнедеятельностью клет­ки находится под контролем сигнальных систем. Сам по се­бе геном является лишь хранилищем информации, реализу­емой с помощью сигнальных систем в зависимости от изме­нения внутренней и окружающей клетку среды.

**\* \* \***

5-7 июня 2001 г. в Москве был проведен Международ­ный симпозиум по сигнальным системам клеток растений. В решении симпозиума говорится, что в связи с бурным раз-

витием проблемы сигнальных систем клеток растений и с первостепенной ее значимостью не только для фундамен­тальной науки, но и для практических приложений в расте­ниеводстве, биотехнологии и фармакологии необходимо провести следующий симпозиум уже через три года.

Автор надеется, что публикуемая книга привлечет вни­мание представителей различных научных направлений к проблеме информационного поля клеток, и это приведет к более эффективному ее решению.

**СОДЕРЖАНИЕ**

От автора 5

Введение 7

Патогены и элиситоры 14

Рецепторы элиситоров 27

G-белки 35

Протеинкиназы и протеинфосфатазы 40

Факторы регуляции транскрипции 45

Промоторы генов белков сигнальных систем и защитных

белков 49

Аденилатциклазная сигнальная система 53

МАР-киназная сигнальная система 62

Фосфатидатная сигнальная система 67

Кальциевая сигнальная система 72

Липоксигеназная сигнальная система 84

НАДФН-оксидазная сигнальная система 103

NO-синтазная сигнальная система 114

Протонная сигнальная система 123

Механизмы патогениндуцируемои смерти клеток 127

Сигнальная функция цитоскелета 134

Взаимодействие сигнальных систем со стрессовыми фито-

гормонами 139

Регуляция ионных потоков интермедиатами сигнальных

систем 149

Взаимодействие сигнальных систем 153

Патогениндуцируемые белки 170

Использование элиситоров и интермедиатов сигнальных  
систем клеток для создания препаратов, повышающих ус­тойчивость растений к патогенам 190

Трансгенные растения с измененной устойчивостью к пато­  
генам 194

Заключение 208

Литература 212

Научное издание

Тарчевский Игорь Анатольевич

**СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ**

*Утверждено к печати*

*Ученым советом*

*Казанского института биохимии и биофизики*

*Казанского научного центра*

*Российской академии наук*

Зав. редакцией *Н.А. Степанова*

Редактор *Т.И. Белова*

Художник *Е.А. Быкова*

Художественный редактор *В.Ю. Яковлев*

Технический редактор *О.В. Аредова* Корректоры *Г.В. Дубовицкая, А.В. Морозова*

ЛР N° 020297 от 23.06.1997

Подписано к печати 19.04.2002 Формат 60 х 9O'/i6. Гарнитура Тайме

Печать офсетная

Усл.печ.л. 18,5. Усл.кр.-отт. 19,0. Уч.-изд.л. 16,1 Тираж 810 экз. Тип. зак. 3275

Издательство "Наука"

117997 ГСП-7, Москва В-485, Профсоюзная ул., 90 E-mail: secret@naukaran.ru Internet: www.naukaran.ru

Санкт-Петербургская типография "Наука" 199034, Санкт-Петербург В-34, 9-я линия, 12

И. А. Тарчевский

СИГНАЛЬНЫЕ

СИСТЕМЫ

КЛЕТОК

РАСТЕНИЙ



МОСКВА "НАУКА" 2002

За цикл работ по сигнальным системам клеток растений автор удостоен премии им. А. Н. Баха Российской академии наук за 2002 г.



