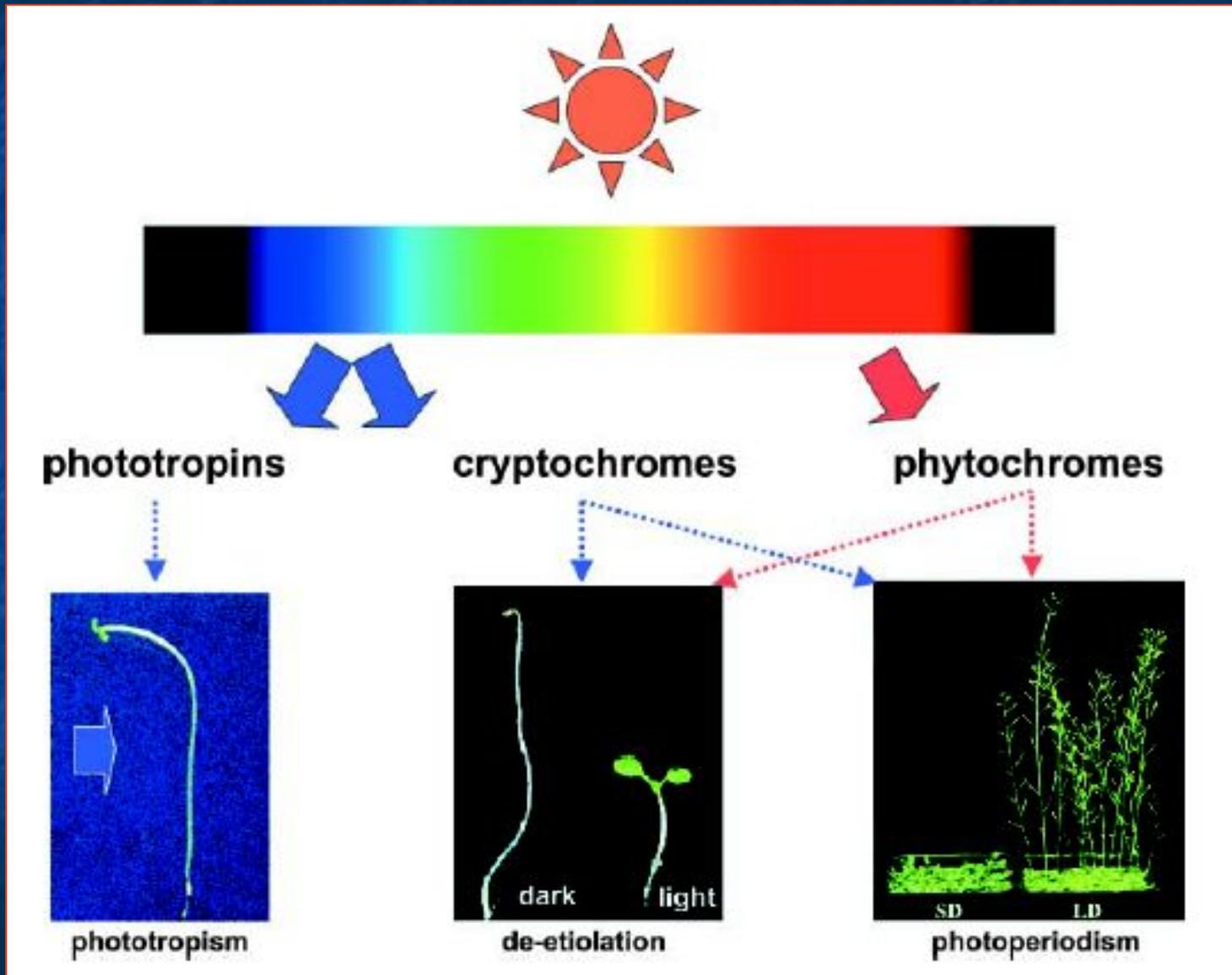
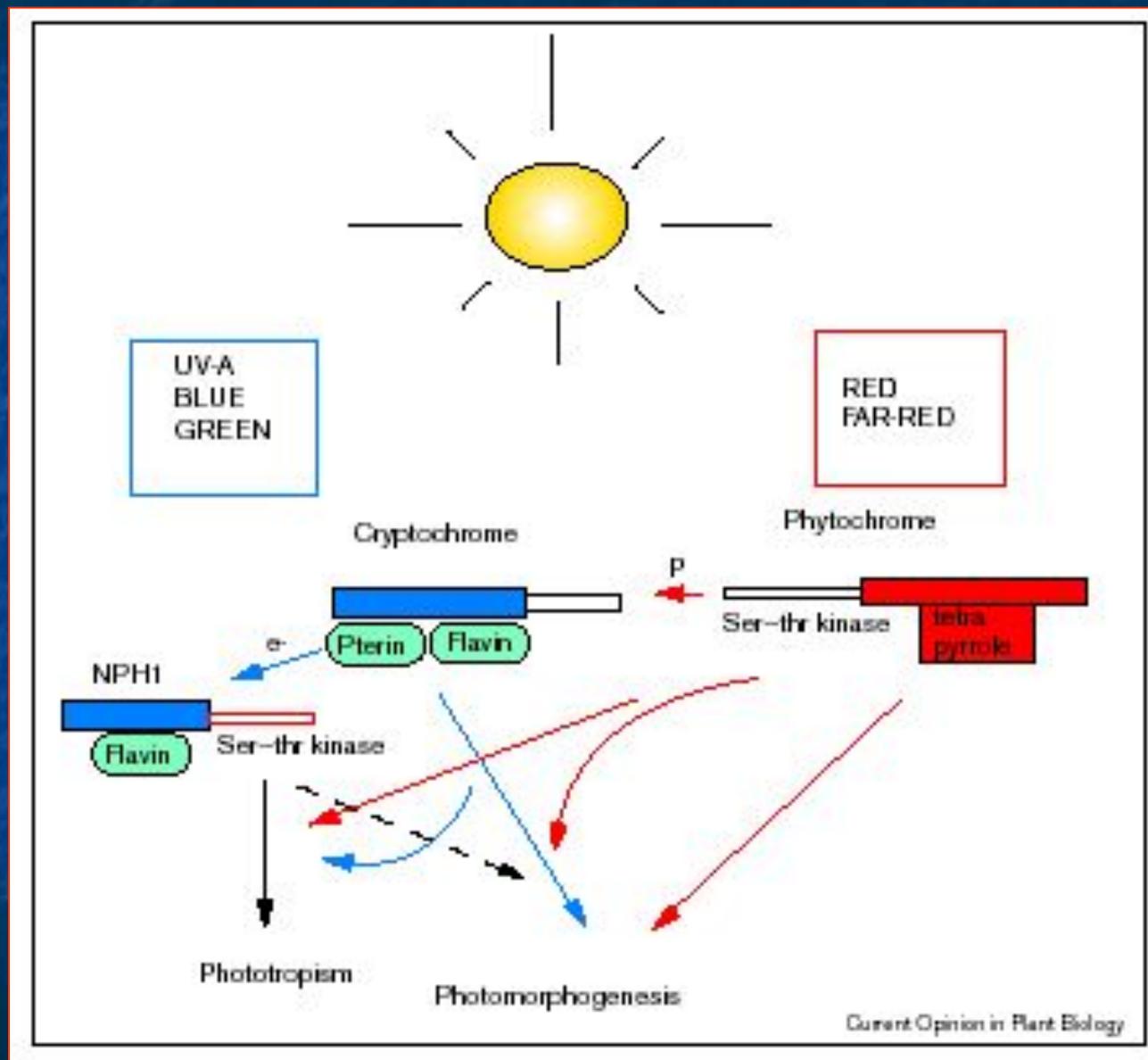


За рецепцию **красного** света отвечают фитохромы  
**синего** криптохромы, фототропины и зеаксантин

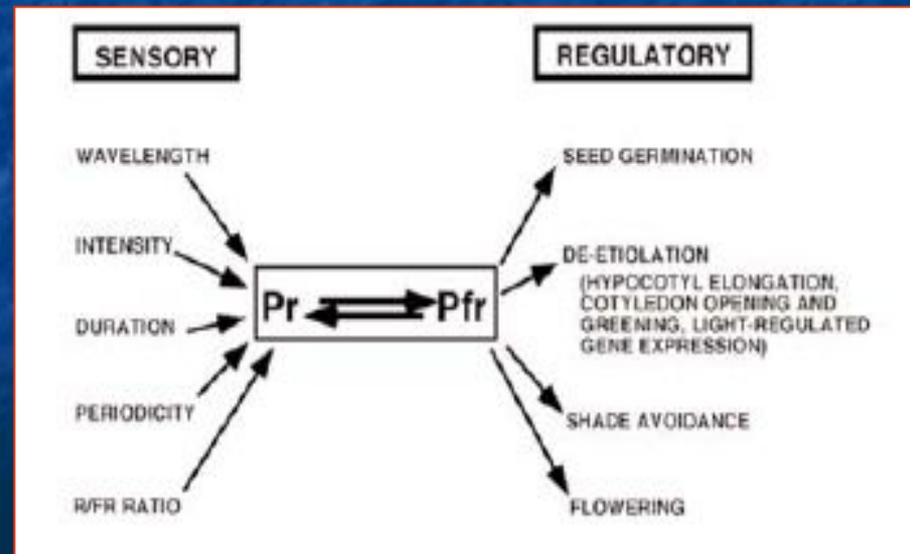
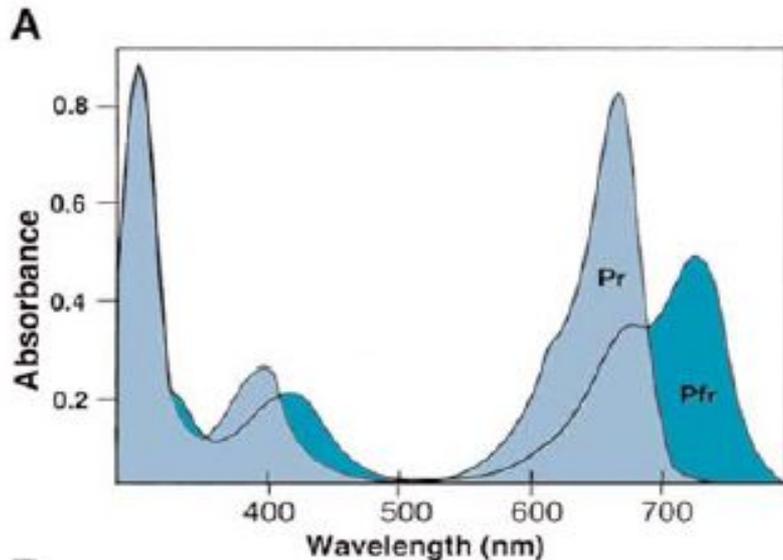
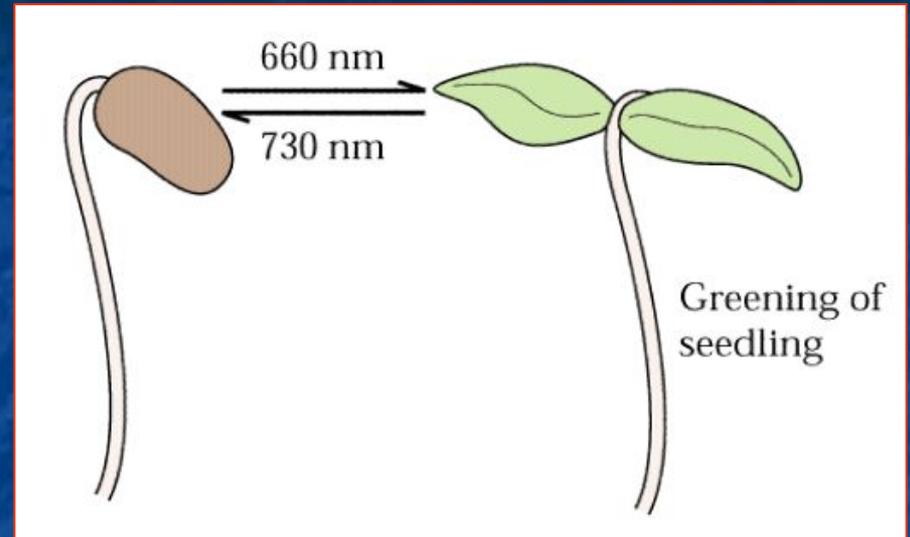
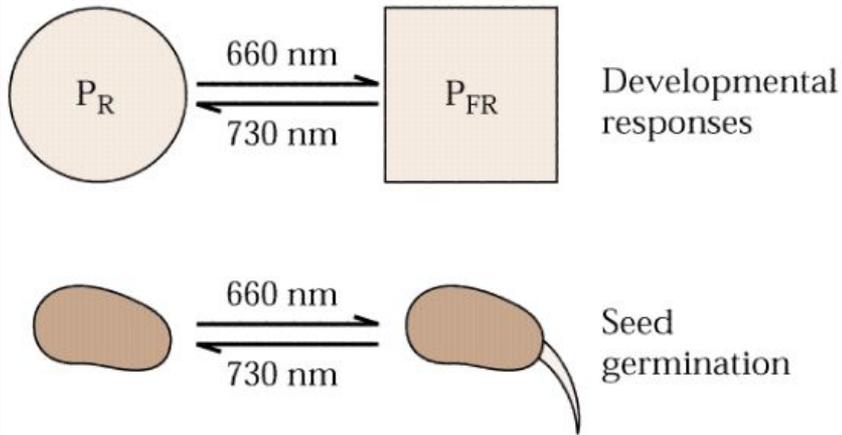


# Системы фоторецепторов тесно взаимодействуют



**Фитохром. Принцип действия.** (Bortwick H., Hendriks S. PNAS, 1952).

(D) Phytochrome activities



## Фотообращаемые эффекты фитохромов.

### Покрытосеменные

салат-латук	семена	Стимуляция прорастания
овес	этиолированные проростки	Стимуляция дээтиоляции
горчица	проростки	Стимуляция формирования листовых примордиев, развития молодых листьев, синтез антоцианов
горох		Ингибирование удлинения междоузлий
дурнишник		Задержка цветения (регуляция фотопериодизма)

### Голосеменные

Сосна		Стимуляция накопления хлорофилла
-------	--	----------------------------------

### Pteridophytes

<i>Onoclea</i>		Активация роста
----------------	--	-----------------

### Bryophytes

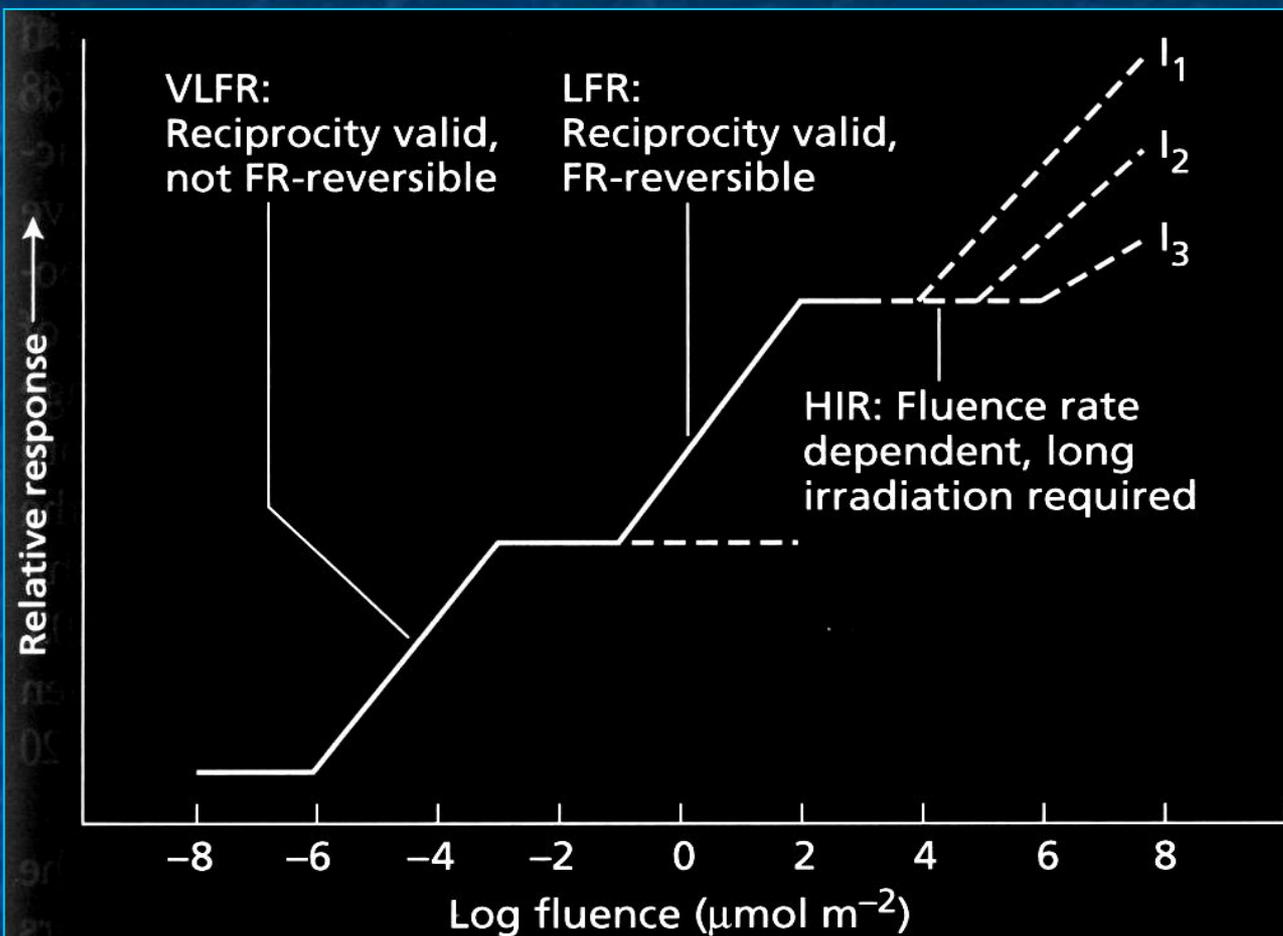
<i>Polytrichum</i>		Стимуляция размножения пластид
--------------------	--	--------------------------------

### Chlorophytes

<i>Mougeotia</i>		Стимуляция ориентации хлоропластов
------------------	--	------------------------------------

по отношению к свету

# Эффекты фитохромов можно разделить по их зависимости от интенсивности света



**VLFR (very low fluence responses)**  
**0,1 – 100 нмоль**  
**квантов/м<sup>2</sup>,**  
**не «фотообращаема»**

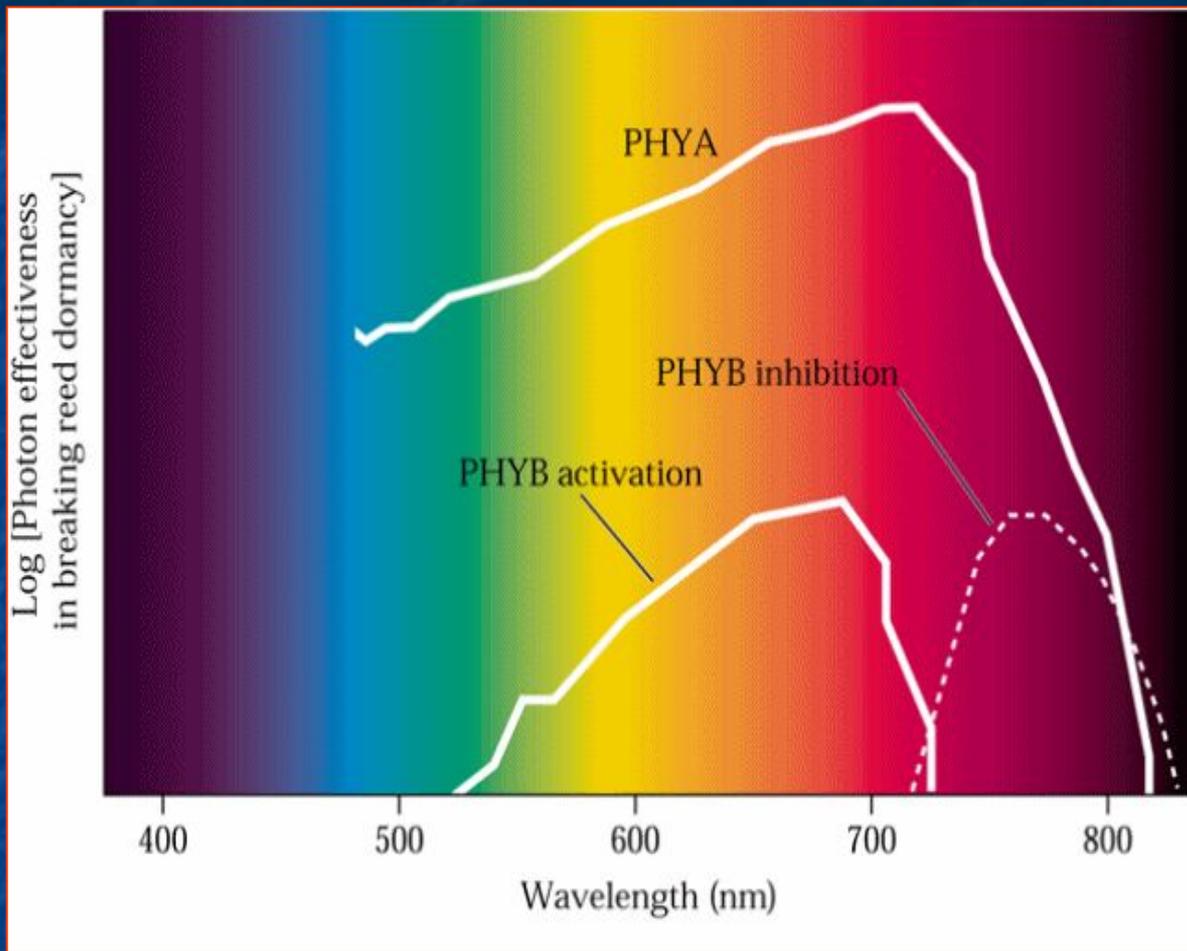
**LFR (low fluence responses)**  
**1 – 1000 мкмоль/м<sup>2</sup>**

**HIR (high irradiance responses)**  
**до 100 ммоль/м<sup>2</sup>**

**Разница в интенсивности**  
**На 10 (!) порядков**

**Действие фитохромов различается также по длительности лаг-периода (от минут до недель), возможности «фотообращения»**

## Фитохромов несколько. Спектры поглощения фитохромов А и В



Соотношение красного и дальнего красного света в разных условиях

	R/Fr
Дневной свет	1.19
Сумерки	0,7 – 0,9
Полог леса	0,2 – 0,7
Вода (1м)	1,2 - 17

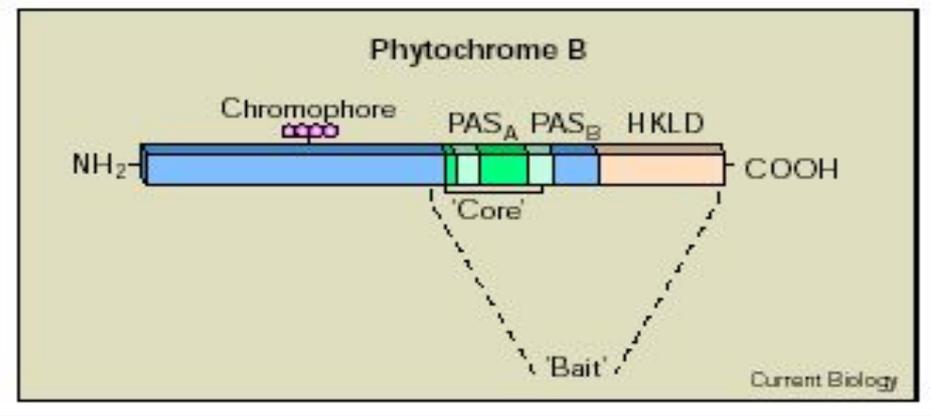
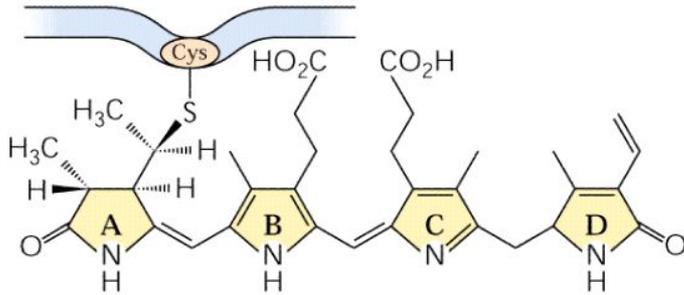
Строго обратимую реакцию имеет фитохром В - PhyВ

Основная часть фитохрома А не имеет обратимой активации ДК и К светом.

PhyА может превращаться в активную форму Pfr под действием ДК...

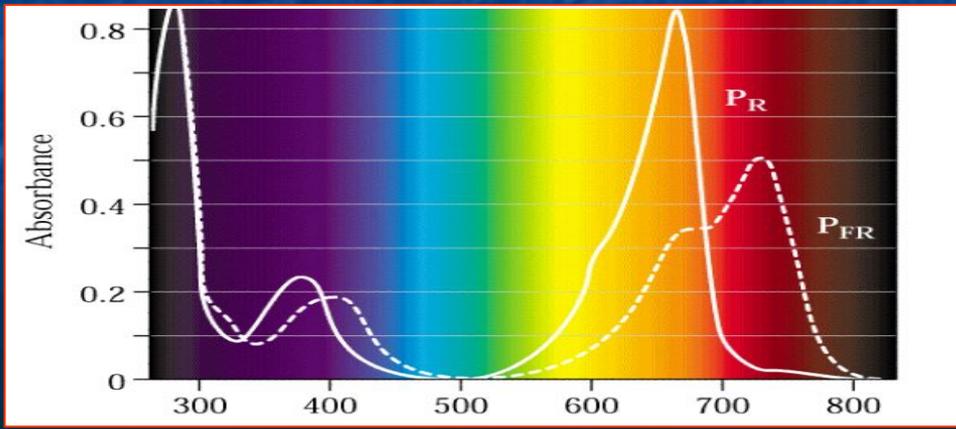
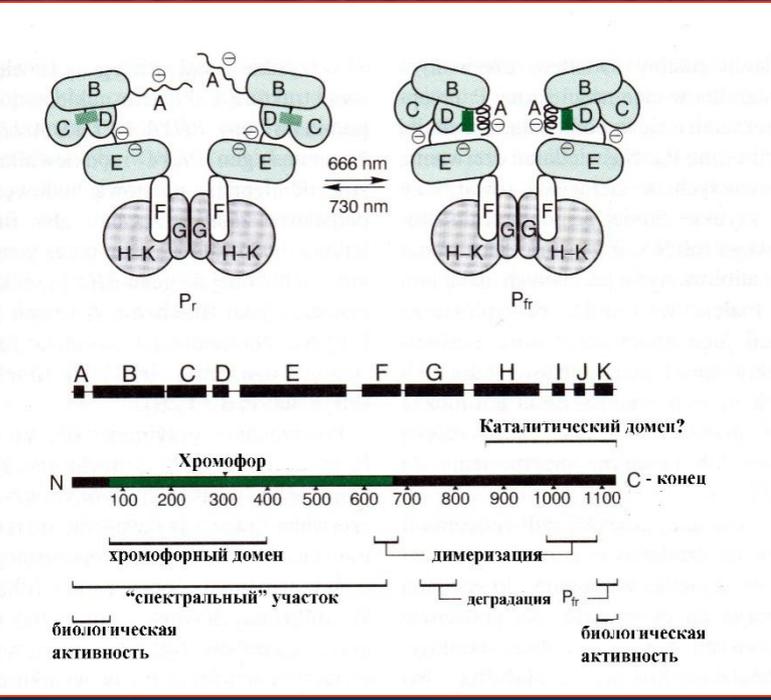
# Фитохромы - структура спектр поглощения

(A) Phytochrome chromophore



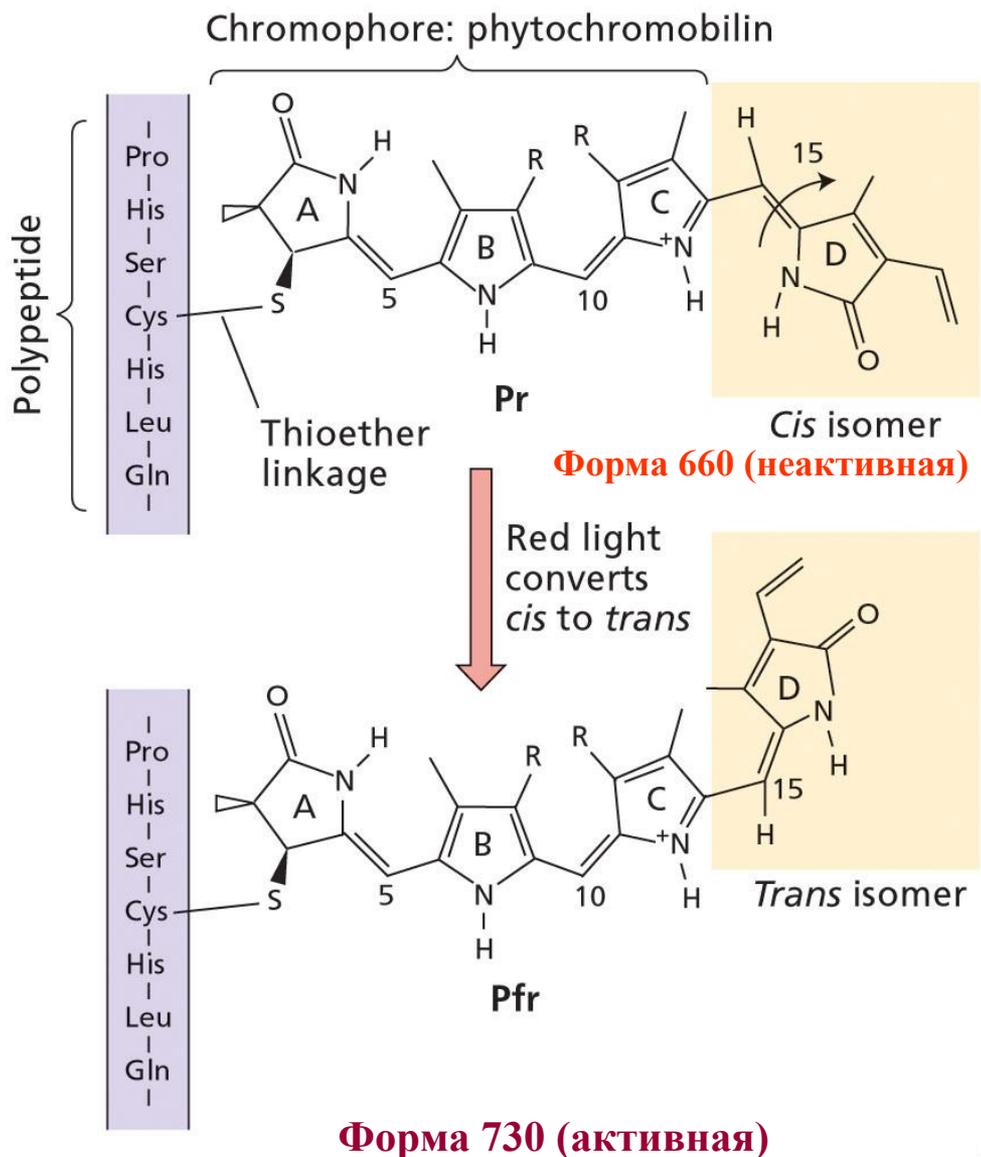
Апопротеин: димер, мономеры ~ 120 kDa  
 N-концевой фотосенсорный домен (~ 70 kDa) соединен гибким участком (H) с C-концевым регуляторным доменом (~ 55 kDa). Его консервативные участки:

- регуляторный центральный участок (Quail box)
- два участка димеризации (D1 и D2),
- два PAS домена (P1 and P2)
- гистидинкиназно-подобный домен (HKRD)



**NB – фотостационарное состояние фитохрома**

# Фотоконверсия фитохрома – цис-транс изомерия под действием света.



**Фитохром А:** имеет две формы:

**А'** (80%, необратимо деградирует после перехода в активную форму ) и **А''** (15%).

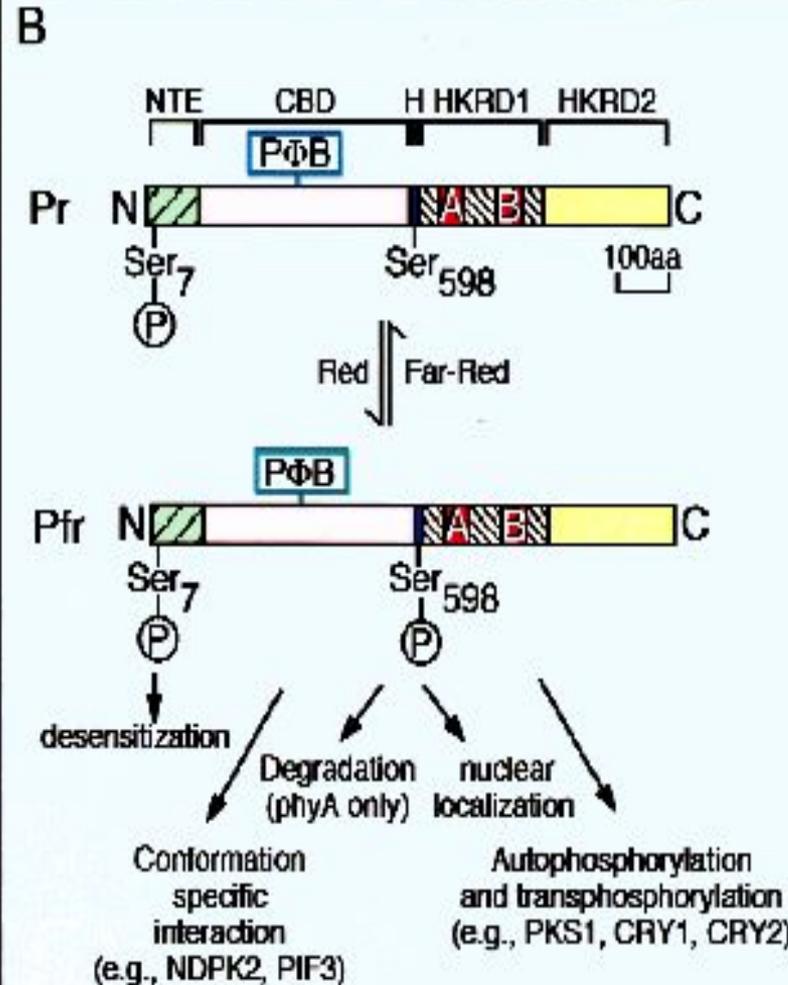
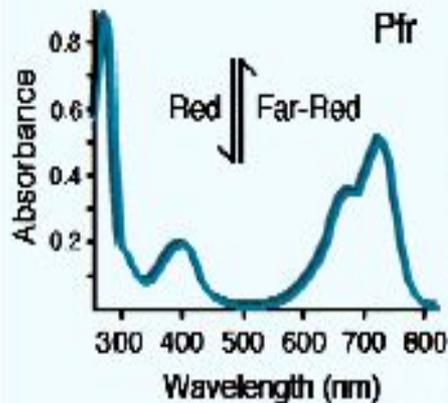
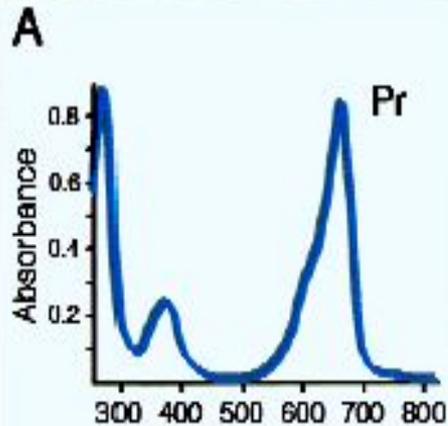
**А'** имеет PEST- мотив (деградация). **Фитохром А** не имеет постоянного синтеза, отвечает за ответ на свет очень низкой интенсивности, переходит в активную форму и при действии ДКС.

**Функции:** прорастание на ДКС, деэтиоляция (**А'**) цветение при низкой интенсивности света (**А''**)

**Фитохром В:** синтезируется постоянно, время полураспада 100 часов. При низких количествах или в неактивной форме включает синтез фитохрома А. Реагирует на свет средней и высокой интенсивности.

**Функции:** прорастание в темноте, деэтиоляция на красном свете, and-of-day-respons, цветение при высоких интенсивностях света.

# Фитохромы – серин-треониновые протеинкиназы, но...



Свойства фитохромов модифицируются светом.

**A.** Спектр поглощения *phyA* овса в Pr и Pfr формах

**B.** Схема строения фитохромов в Pr и Pfr формах:

NTE amino-terminal extension;

CBD - chromophore binding domain;

PΦB - phytochromobilin;

H - hinge region;

HKRD1 - histidine kinase-related domain 1;

HKRD2 - histidine kinase related domain 2;

A, B - PAS домены

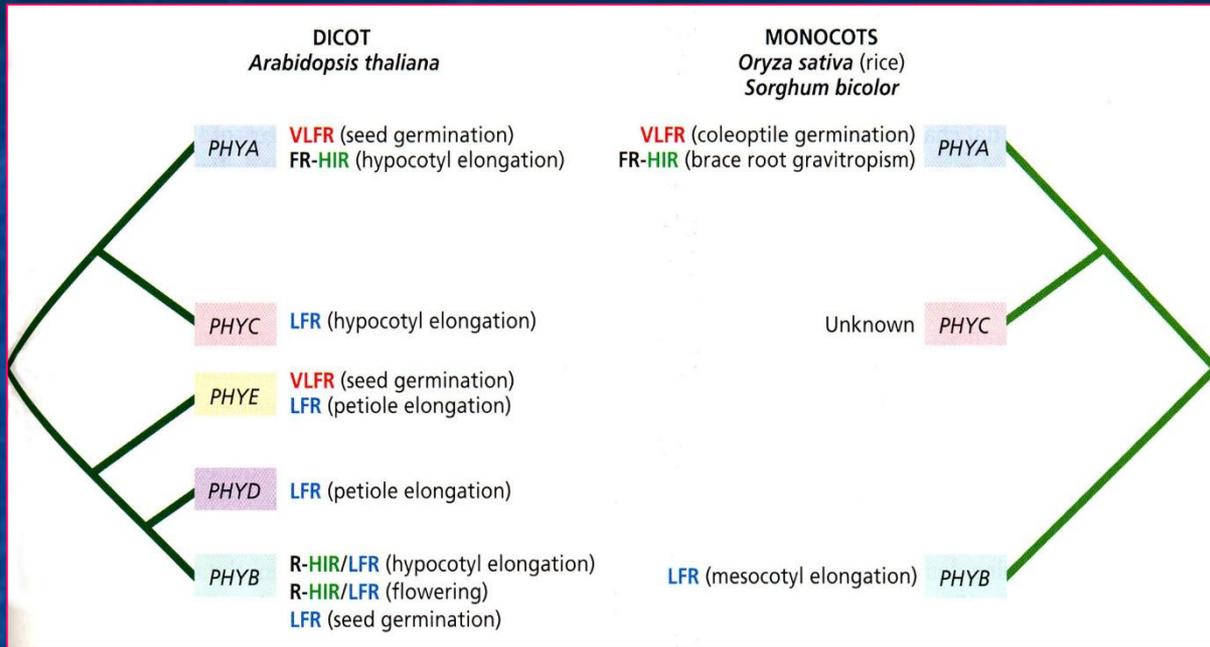
Показаны некоторые свойства фитохромов, регулируемые светом.

**Важно: phyB**

транслируется в ядро в активной форме Pfr;

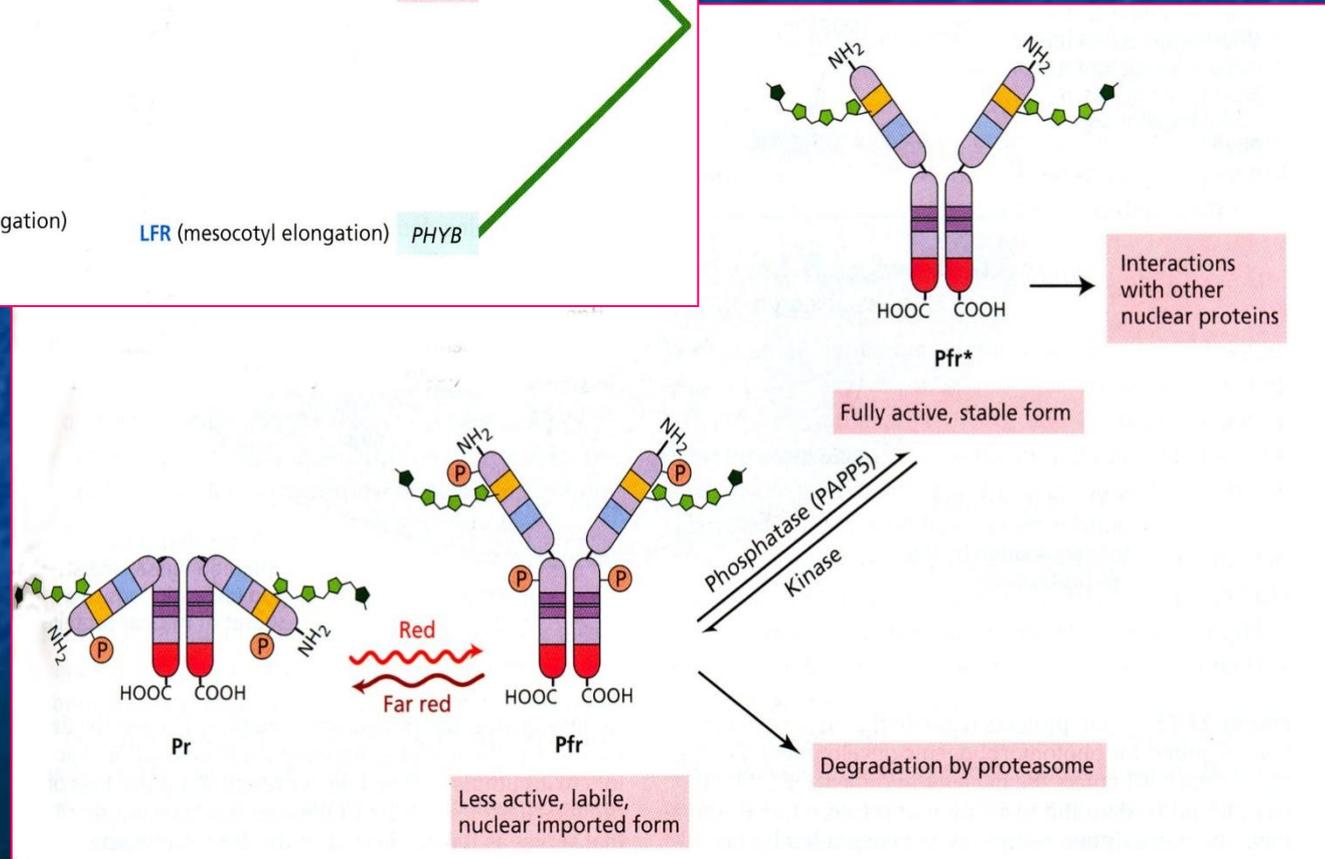
тогда как *phyA* может находиться в ядре в обеих формах - Pr и Pfr

# Фитохромов несколько, их активность регулируется фосфорилированием



Две группы фитохромов – светочувствительные (А и С) и светостабильные (В, D, Е). Главные – PhyА и PhyВ. Разные фитохромы отвечают за разные реакции....

Вслед за активированием красным светом, активность фитохромов регулируется в зависимости от качества и интенсивности света фитохром-ассоциированной фосфатазой PAPP5 и неидентифицированной киназой.



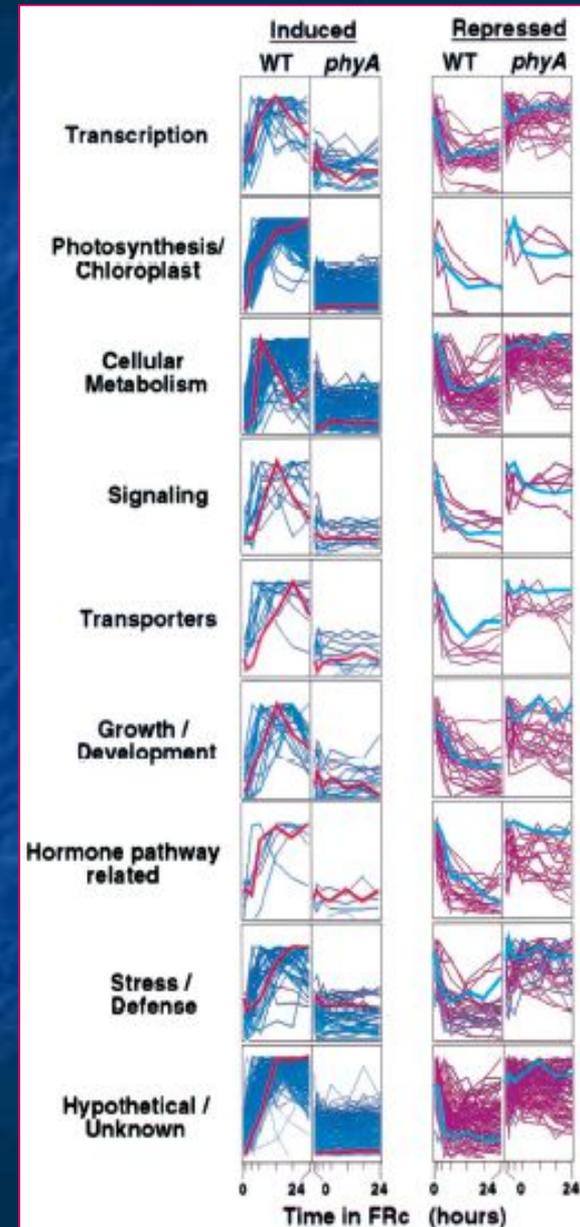
# Фитохром А регулирует около 10% генов арабидопсиса

Table 1. Number of *phyA*-regulated genes categorized by functional class and temporal expression pattern

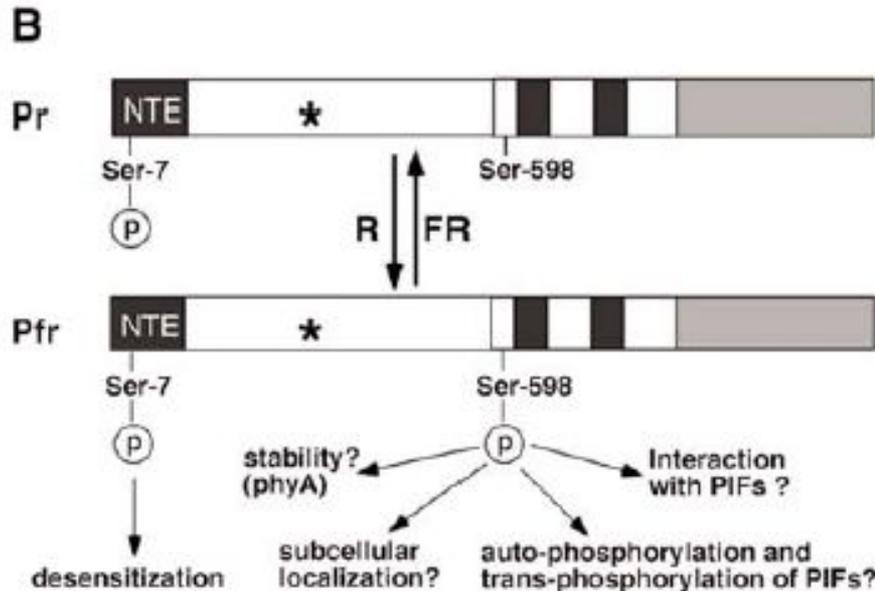
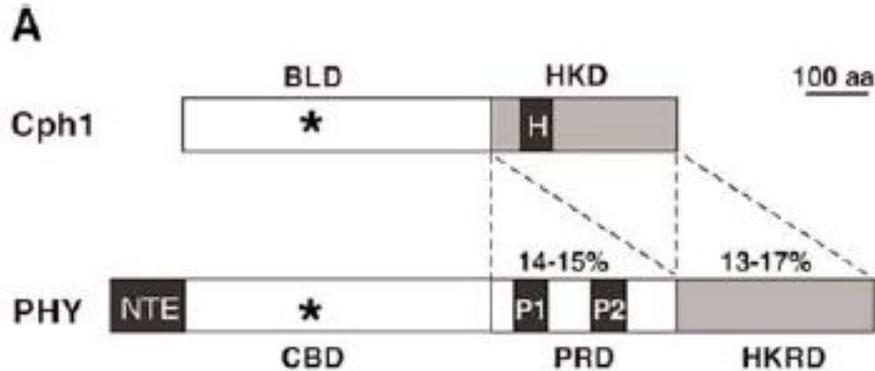
Functional classification	Early-response genes (1 h)		Late-response genes (3–24 h)		Total
	Induced	Repressed	Induced	Repressed	
Transcription (Tx)	18	3	20	29	70
Photosynthesis/Chloroplast (P/C)	7	0	115	4	126
Cellular Metabolism (CM)	5	0	93	54	152
Signaling (S)	4	0	13	8	25
Transporters (Tr)	6	0	11	8	25
Growth and Development (G/D)	0	2	18	25	45
Hormone-pathway related (H)	1	0	6	20	27
Stress/Defense (S/D)	2	0	32	30	64
Hypothetical/Unknown (H/U)	13	1	178	86	278
Totals	56	6	486	264	812

Genes represented on the microarray whose mRNA abundance was either increased (induced) or decreased (repressed) 2-fold or more under *phyA* control within 1 h (early) or between 3 and 24 h (late) of the start of FRc irradiation were scored and classified into the broad functional categories shown, according to established or putative function in the plant.

Всего исследовали активность 8 200 генов – около трети всех генов арабидопсиса



# Откуда взялся фитохром?



## А. Консервативные участки фитохромов цианобактерий (*Cph1*) и *Arabidopsis*.

Консервативный остаток цистеина для связывания хромофора отмечен (\*).

**HKD:** histidine kinase domain;

**PRD:** PAS related domain;

**HKRD:** histidine kinase related domain.

**H** – фосфорилируемый гистидин в гистидинкиназном домене бактериального фитохрома.

Отмечен процент совпадения последовательности аминокислот в HKD у *Cph1* и PRD и HKRD у *Arabidopsis*

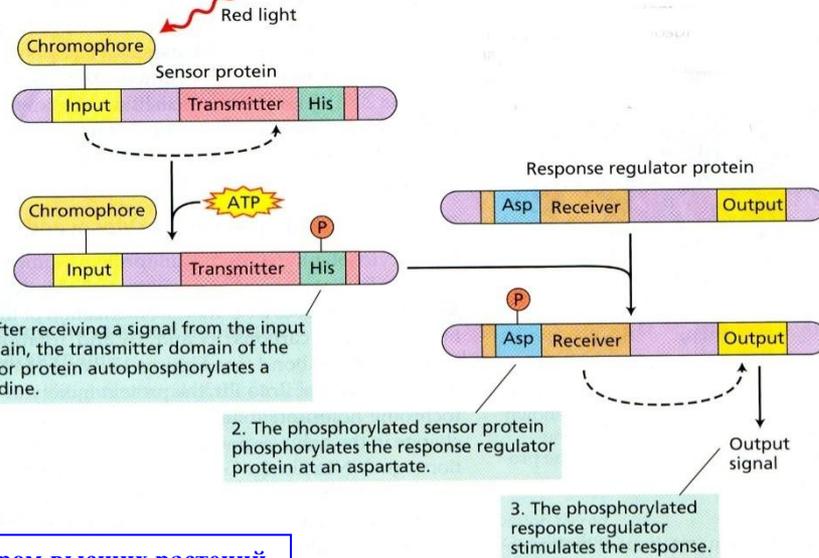
**Фитохром *Arabidopsis* имеет дополнительный N-концевой фрагмент.**

## В. Предполагаемая роль киназной активности фитохрома *Arabidopsis*.

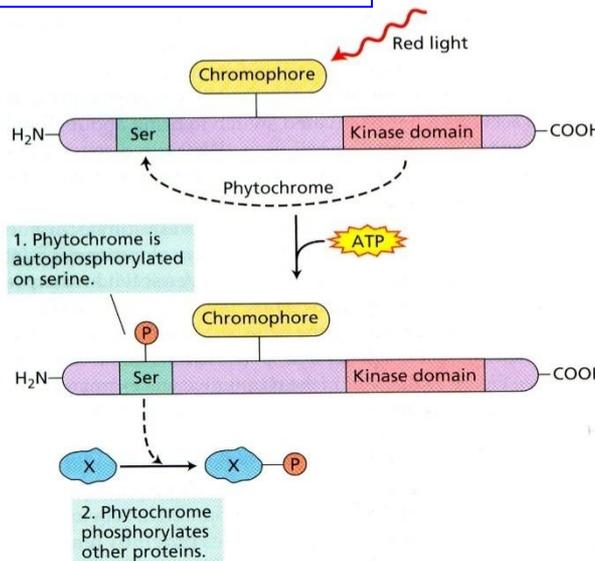
Свет запускает киназную активность фитохрома, которая может приводить как к автофосфорилированию фитохрома, так и к трансфосфорилированию взаимодействующих с ним белков (**PIFs - phytochrom-interactiong factors**) В свою очередь, эти фосфорилирования могут приводить к изменению стабильности самого фоторецептора в случае phyA, субклеточной локализации фитохромов, их способности к взаимодействию с PIFs а также к активации других сигнальных молекул.

# Фитохромы высших растений – серин-треониновая киназа, цианобактерий – гистидинкиназа...

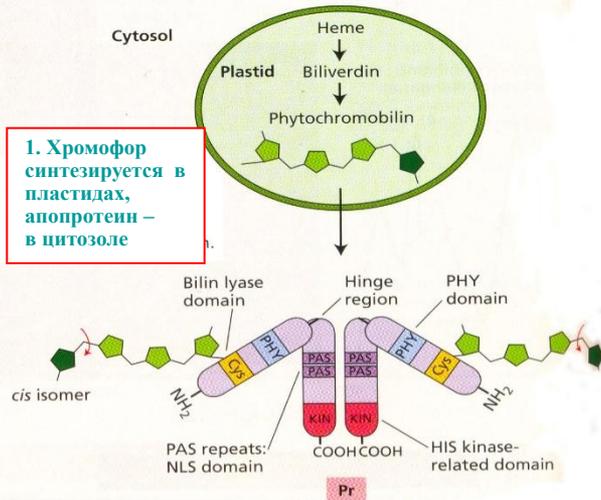
## Фитохром цианобактерий



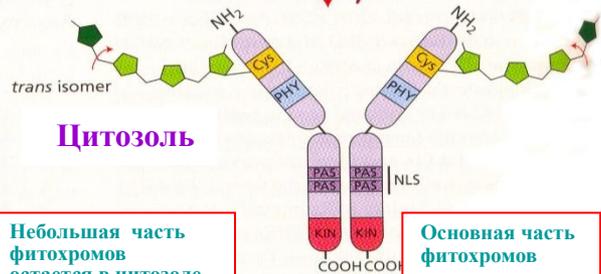
## Цитохром высших растений



1. Хромофор синтезируется в пластидах, апопротенин – в цитозоле



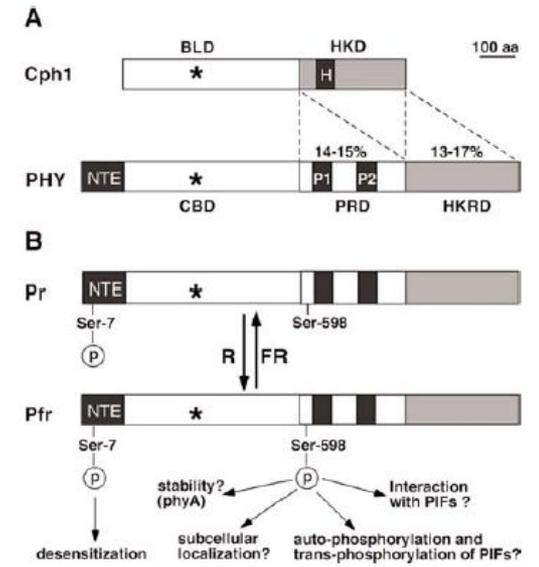
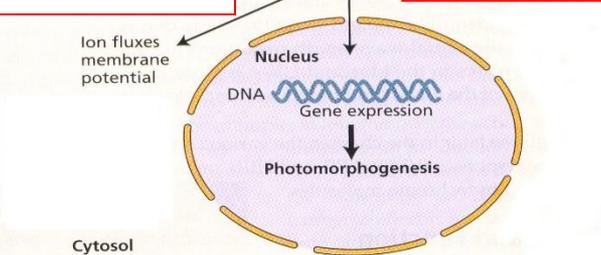
2/ После активации КС открывается NLS-подобный домен (для PhyB)



Цитозоль

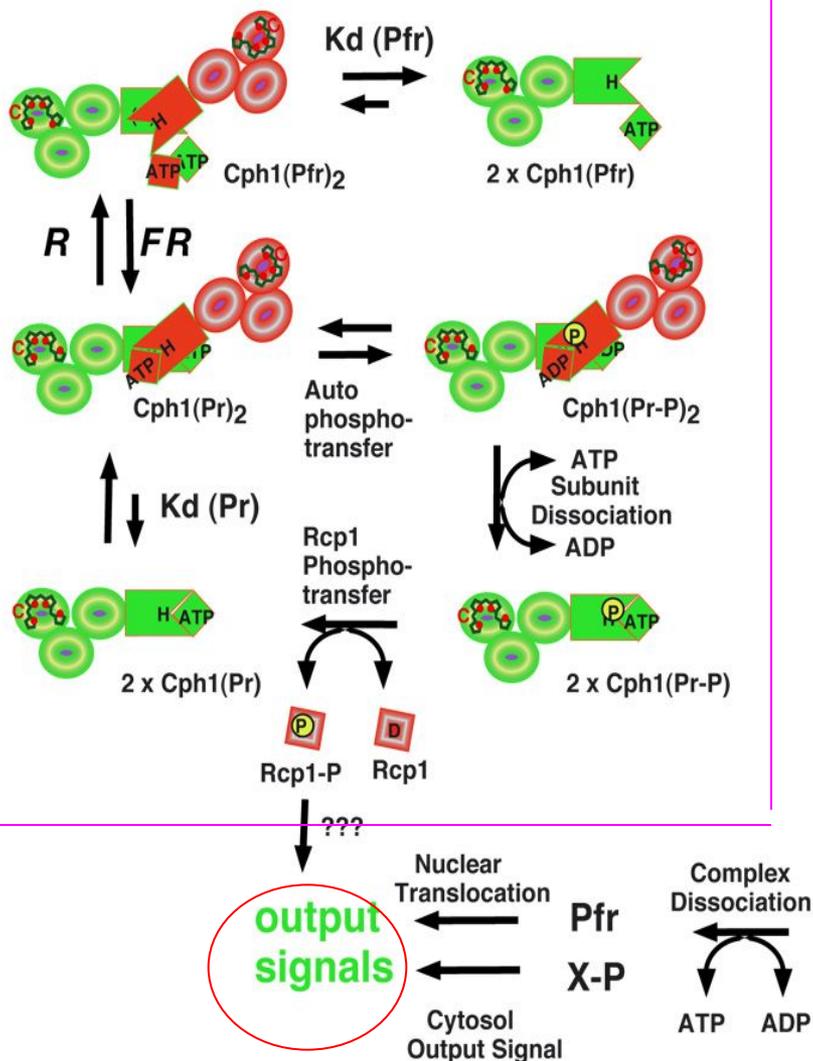
Небольшая часть фитохромов остается в цитозоле для «быстрых» ответов

Основная часть фитохромов перемещается в ядро. PhyA - ?

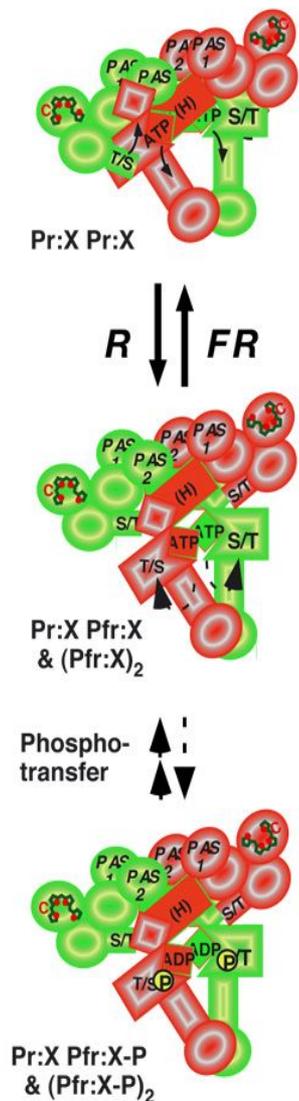


# Схема сигналинга бактериального и эукариотического фитохромов

## Cph1 Signaling



## Phy Signaling



Бактериальный фитохром типичная двухкомпонентная гистидин-киназа, которая под действием Fr переходит из неактивной мономерной формы в активную димерную.

Эукариотические фитохромы всегда находятся в виде димеров, которые связаны с цитозольным «заякоряющим» белком X - (протеинкиназа **PKS1** ?)

Под действием Fr образуются гетеро – или гомодимеры ( $Pr:X Pfr:X$  или  $(Pfr:X)_2$ ), что активирует их Ser/Thr-киназную активность. Это приводит к фосфорилированию **PKS1**. Она отщепляется от фитохрома и запускает цитозольную ветвь сигналинга. Фитохром без **PKS1** получает возможность перемещаться в ядро..

# Сигналинг фитохромов. Основные «игроки» и общие положения

**Два типа ответов** – быстрые (секунды) и «глобальные».

Быстрые ответы связаны с потоком ионов через мембраны. Скорее всего вторичный мессенджер –  $\text{Ca}^{++}$

Глобальные связаны с регуляцией экспрессии генов.

**В цитозоле:**

**Киназы PKK1** (Phytochrome Kinase Substrate 1), усиливает VLFR PhyA, **NDPK2** (nucleoside diphosphate kinase 2). Её ассоциация с phyA усиливает конверсию GDP в GTP.

**PAPP5** – фосфатаза, дефосфорилирует Ser<sub>7</sub> и Ser<sub>298</sub>, делая PhyA активным и стабильным..

**NB.** Транспорт Phy в ядро различен и по механизмам, и по скорости. У PhyA нет NLS, его транспорт обеспечивают два белка FHY1 и FHL. У PhyB есть NLS-like, но...

**В ядре :**

**PIF** – **F**hytochrom-**I**nteractiong **F**actors. 15 штук. Могут физически взаимодействовать с фитохромами, но также фосфорилироваться активными фитохромами., что ведет к их убиквитинированию.

Трансфакторы **HFR1**, **HY5**, **LAF1**.

**Белки генов COP** (**C**onstitutiv **P**hotomorphogenesis)

**DET** (**D**e-**E**tiolated),

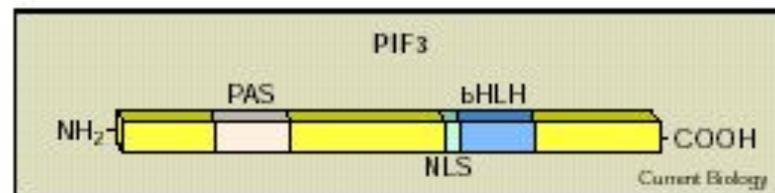
**FUSCA** (накопление антоцианов).

Они – компоненты COP/DAT/FUS комплекса деградации белков.

**COP1** – кодирует E3 лигазу

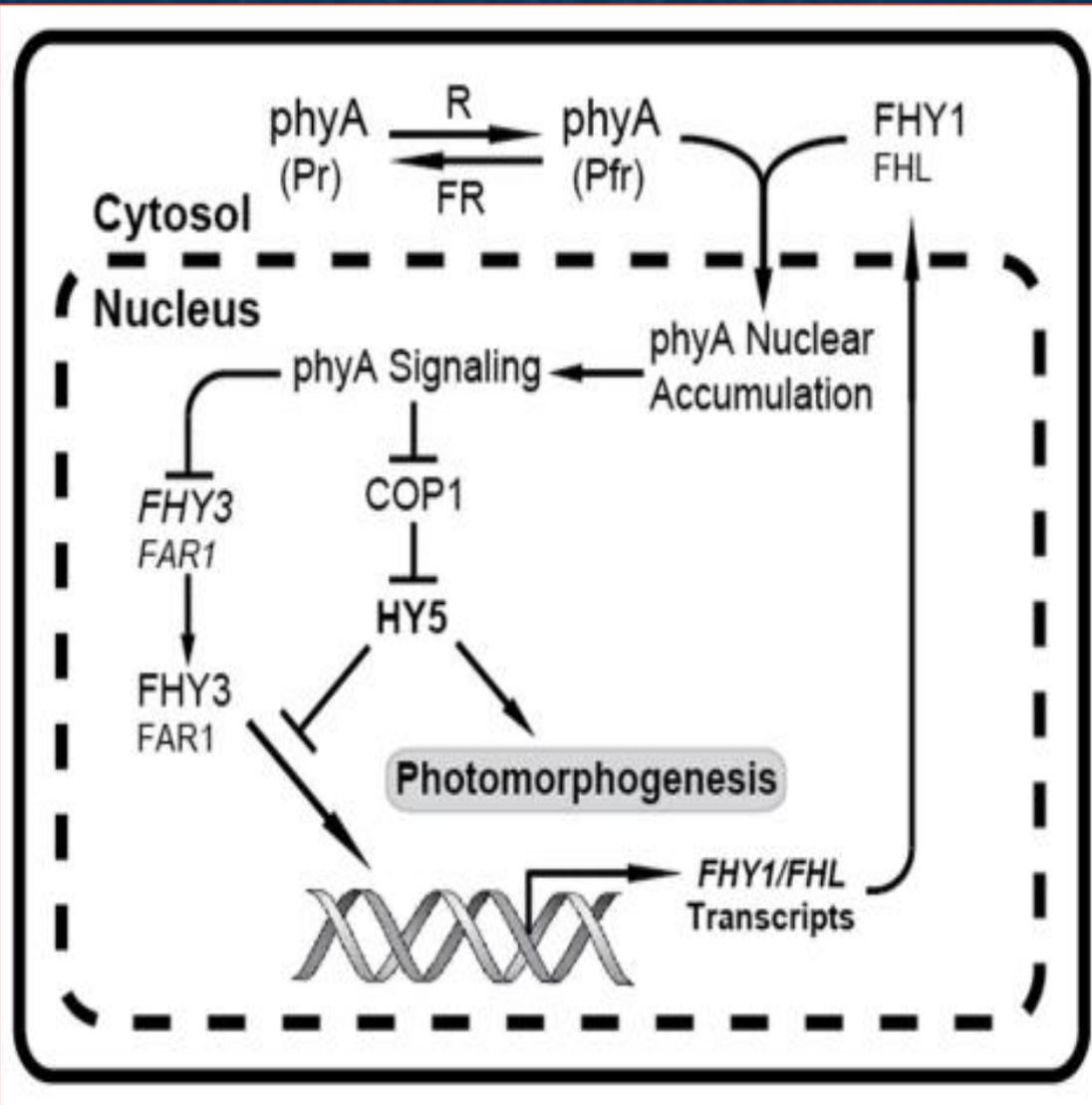
убиквитинового комплекса.

Figure 2



Structural features of the PIF3 protein, depicting the locations of the PAS-like domain, the nuclear localisation signal (NLS) and the basic helix-loop-helix (bHLH) domain.

Как фитохром А перемещается в ядро? Быстро (минуты), свет – красный, дальний красный, синий, **NB - белки, обеспечивающие его транспорт**



Небольшие белки FHY1 (FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 1) и FHL (FHY1-LIKE) необходимы для быстрой транслокации phyA в ядро. Оба белка имеют NLS.

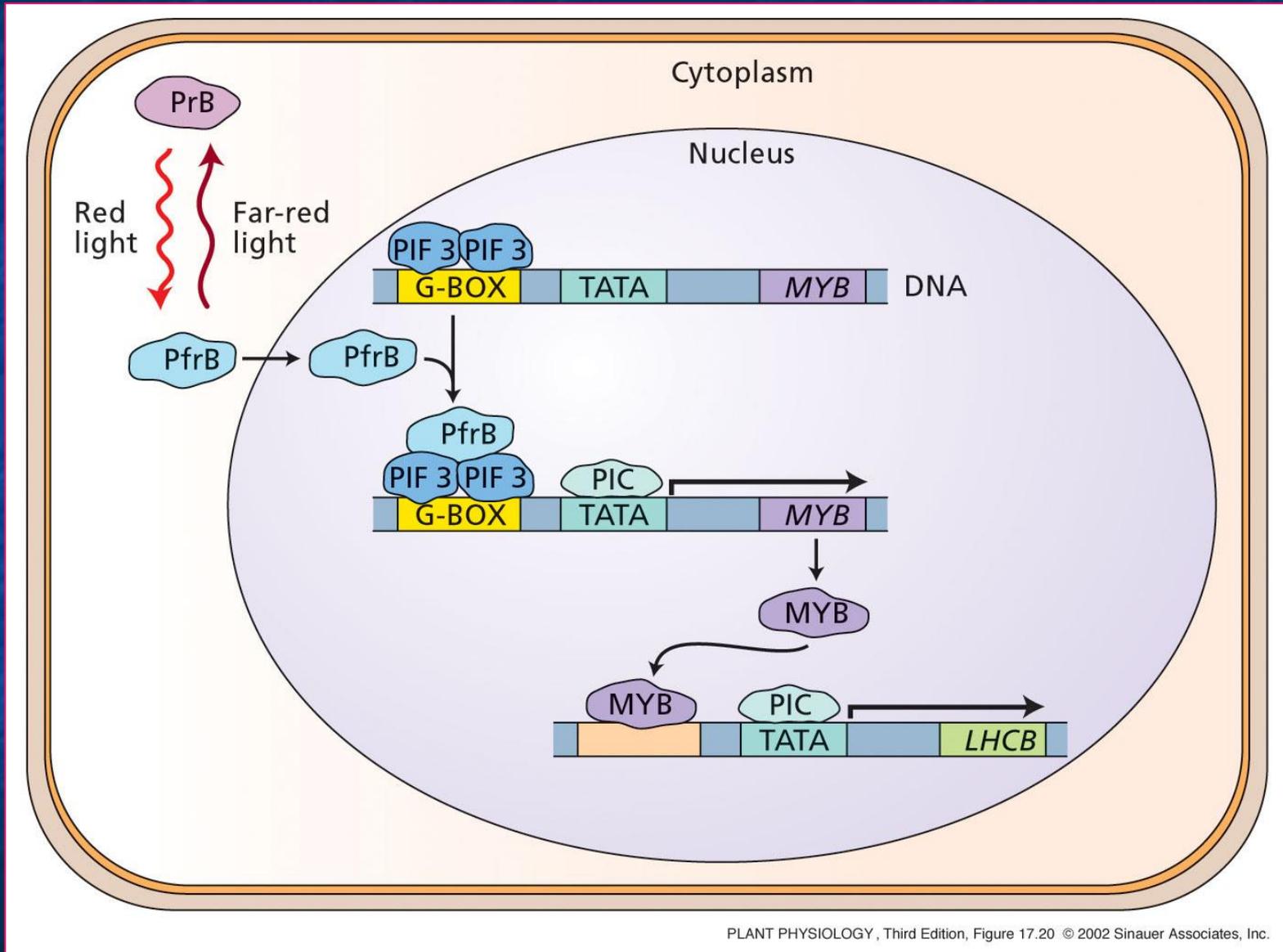
Транскрипция генов FHY1 и FHL активируется трансфакторами FHY3 и FAR1,

Перемещение в ядро phyA активируется красным, дальним красным и синим светом. В ядре phyA в форме Pfr снижает содержание COP1, что вызывает накопление HY5 (LONG HYPOCOTYL5) и по принципу «обратной связи» - тормозит транскрипцию FHY3 и FAR1.

HY5 играет двойную роль - активирует фотоморфогенез и снижает уровень транскрипции FHY1/FHL, что снижает FHY3 и FAR1 и останавливает транспорт

# Перемещение фитохрома В в ядро и схема его сигналинга.

Транслокация в ядро медленно (часы) и только после освещения красным светом



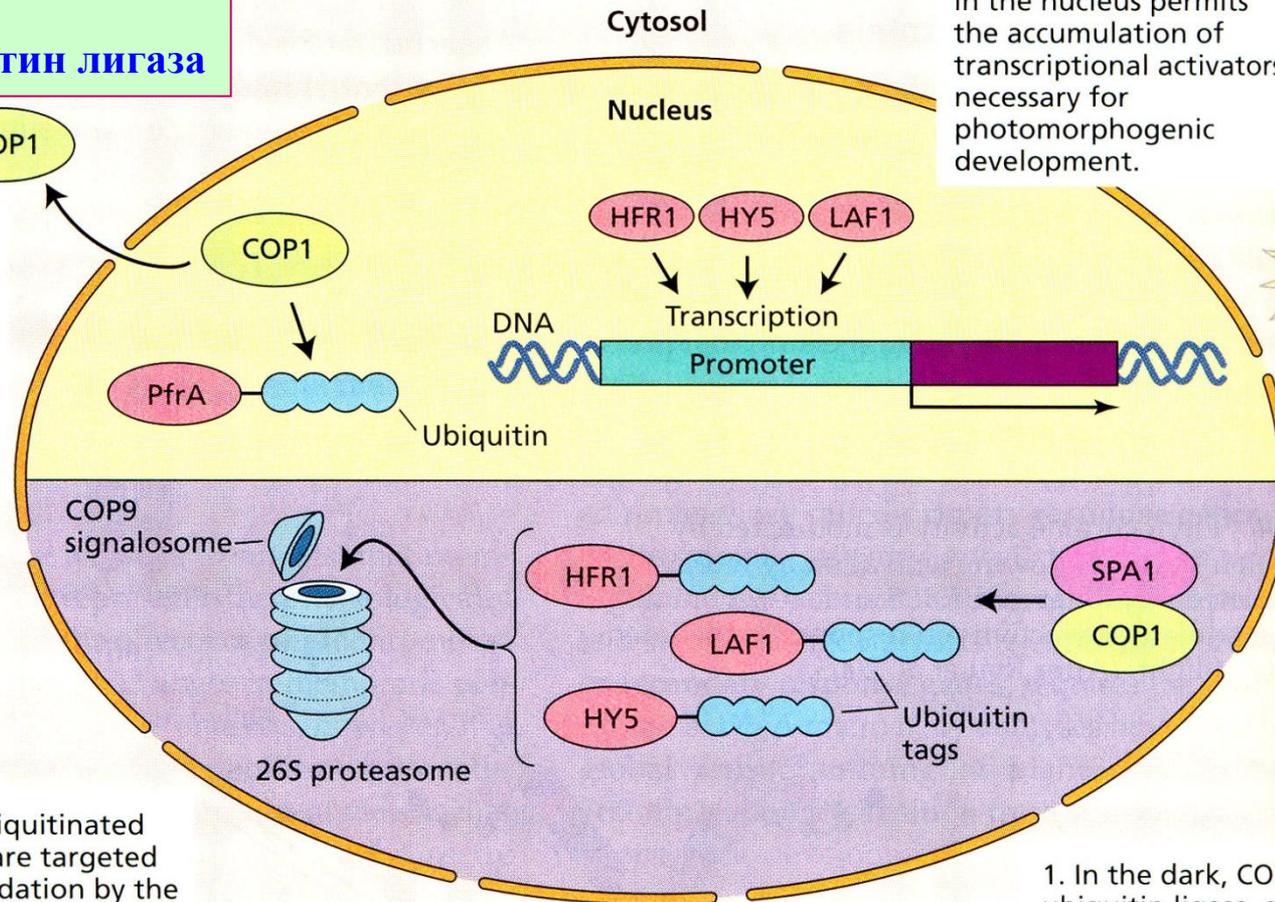
# В сигналинге фитохромов важную роль играет убиквитирование трансфакторов и их развал в протеасоме.

**COP1 – это спец. E3-убиквитин лигаза**

3. In the light, COP1 is slowly exported to the cytosol, but before it leaves the nucleus, it adds ubiquitin tags to PfrA.

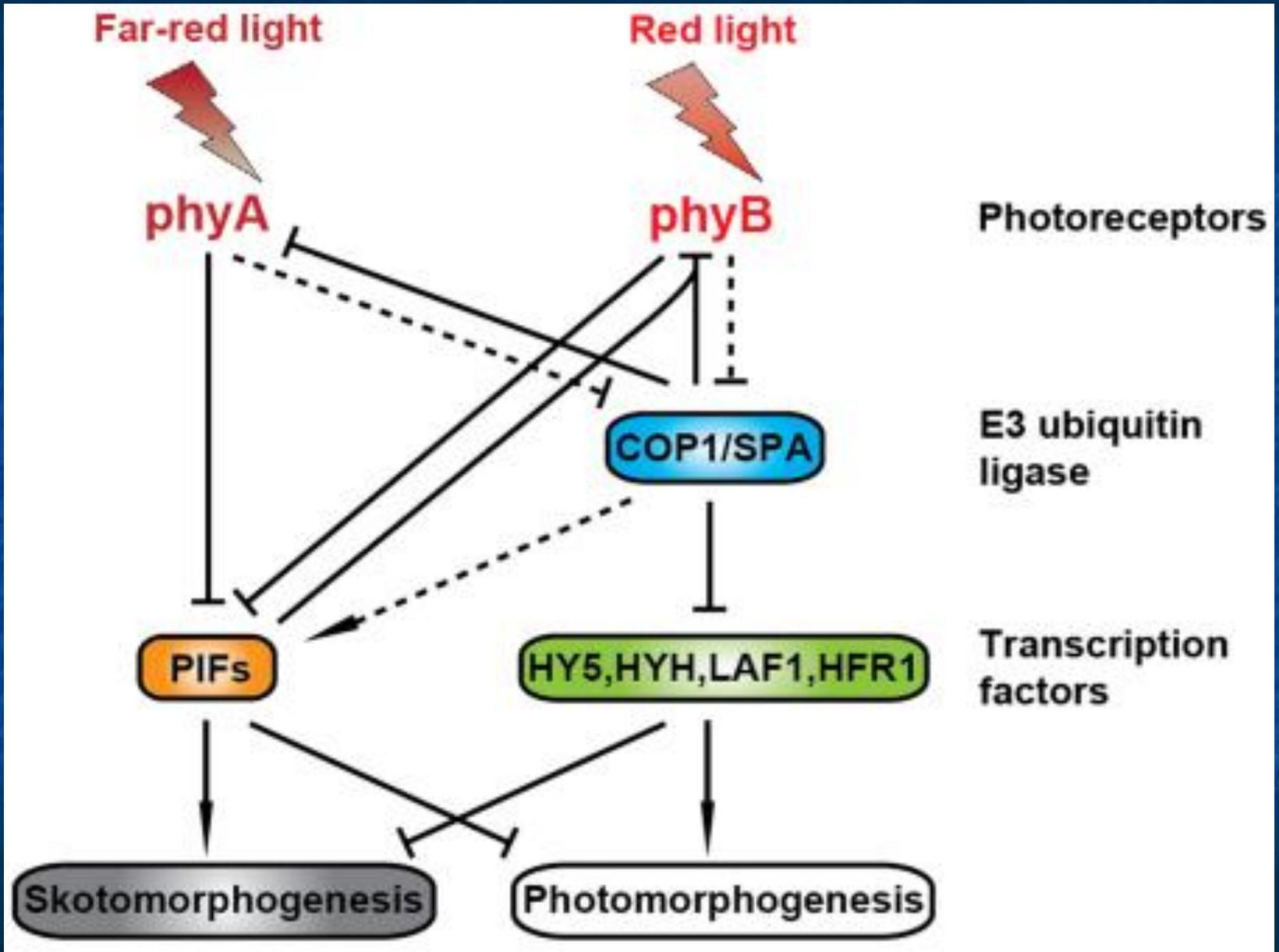
2. The ubiquitinated proteins are targeted for degradation by the 26S proteasome.

4. The absence of COP1 in the nucleus permits the accumulation of transcriptional activators necessary for photomorphogenic development.



1. In the dark, COP1, an E3 ubiquitin ligase, and SPA1 add ubiquitin tags to a subset of nuclear proteins.

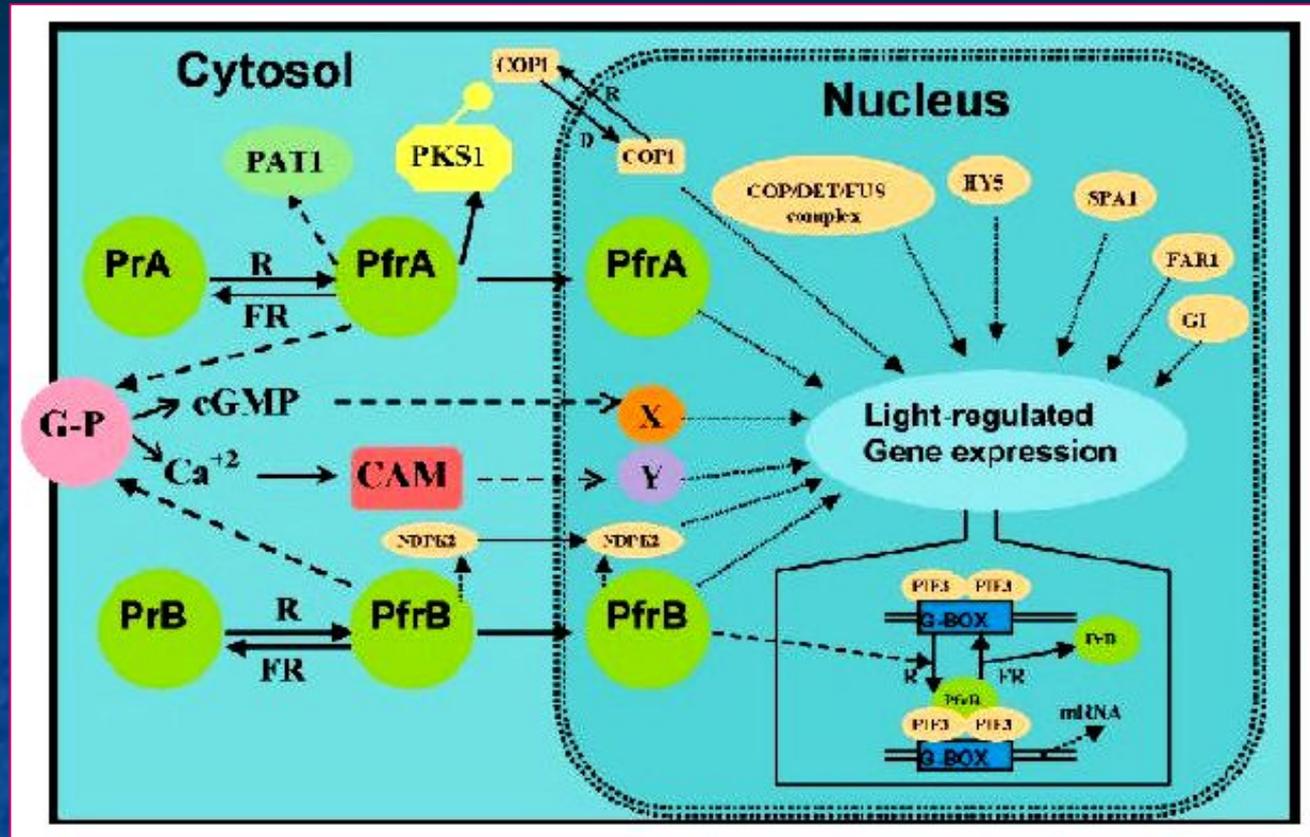
## Упрощенная схема работы фитохромов



# Схема возможных путей трансдукции сигнала от фитохромов

## В цитозоле.

Красный свет (R) переводит Pr в форму Pfr и вызывает перемещение Pfr фитохрома А или В из цитозоля в ядро. Образование Pfr также сопровождается автофосфорилированием фитохрома и трансфосфорилирование PKS1 и белка X в цитозоле. Pfr (белок X?) вызывает активацию G-белков и повышает уровень cGMP и  $Ca^{2+}$ , которые участвуют в регуляции транскрипции светорегулируемых генов.



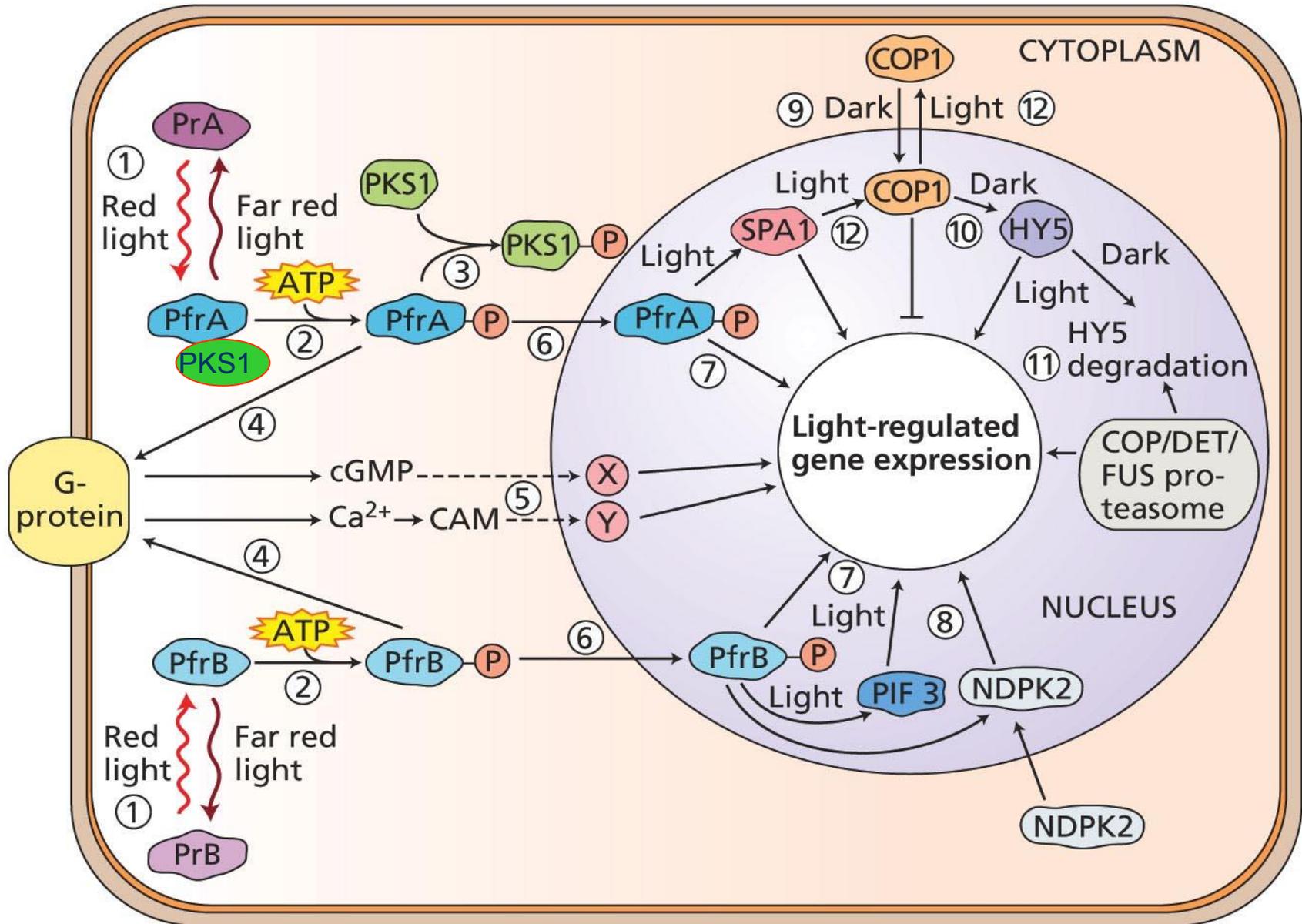
## 2. В ядре.

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

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

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

## И обобщающая картинка



# Рецепторы синего света отвечают за многое...

## Реакция фототропизма

Движение хлоропластов

## Циркадные ритмы:

открытие устьиц

«сонные» движения листьев при переходе

«ко дню»

## Деэтиоляцию у проростков

Торможение роста побега растяжением

Раскрытие семядолей

Формирование листьев

Синтез хлорофилла

Синтез каротиноидов

Синтез белков ССК

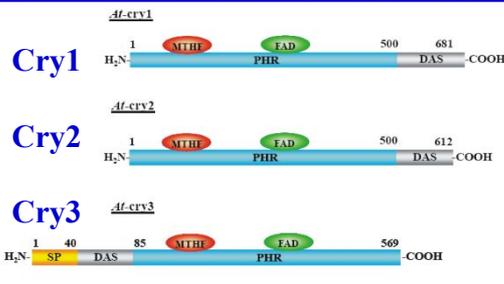
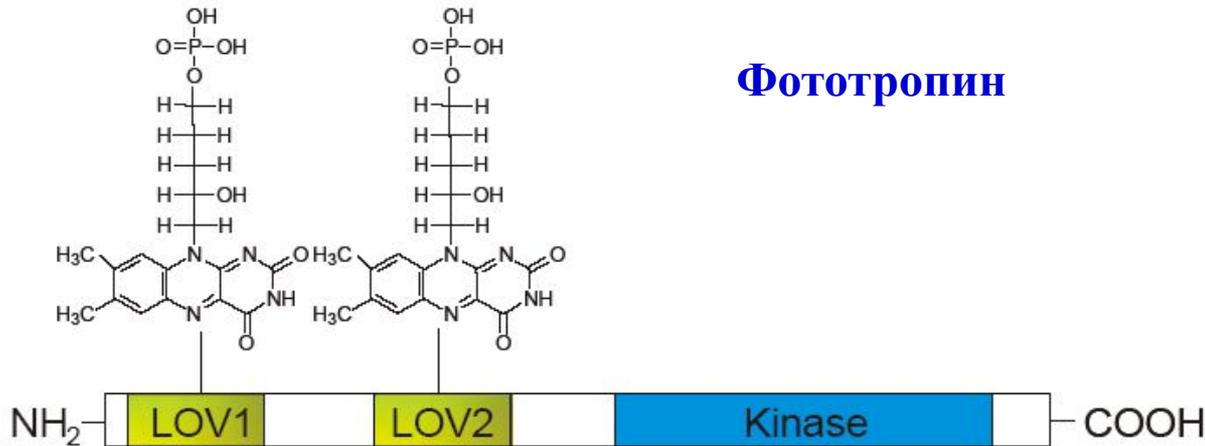
Синтез Рубиско

Синтез флавоноидов и антоцианов

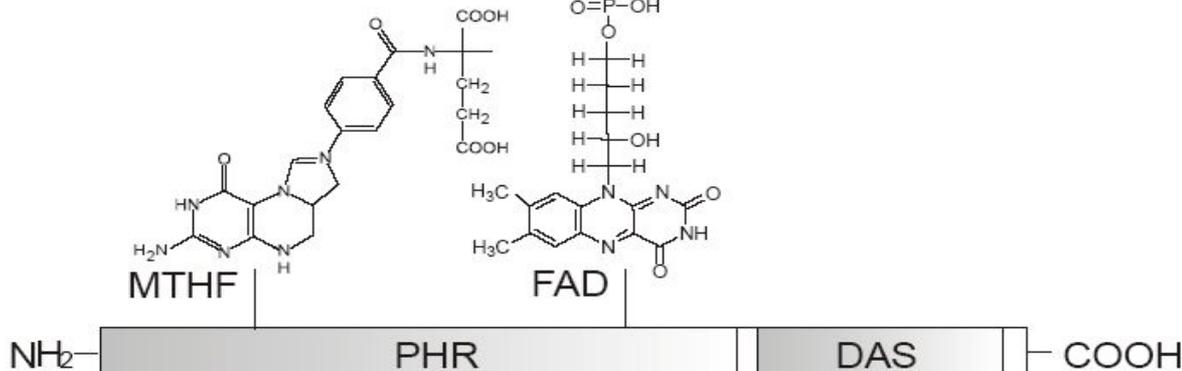
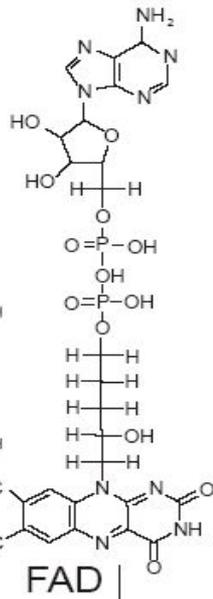
Система криптохрома  
включена в регуляцию цветения

# Структура фототропина и криптохрома.

## Фототропин



## Криптохром



## Фототропины:

мембранносвязанные Ser-Thr- киназы.  
120 kDa. В плазмалемме.

## Криптохромы:

Cry1 – 190 а-к,  
в темноте в ядре, на свету – в цитозоле  
Cry2 – 120 а-к. Постоянно в ядре.  
Cry3 – особое строение...

**PHR** – photolyase related domain

**LOV** - light, oxygen, voltage domains (PAS-domains). Связывают флавин и участвуют в белок-белковых взаимодействиях

**DAS** domain:  
DQXVP-acidic-STAES птерин, флавин (ФМН)

# Фототропин-Phy3 – «гибридный» фоторецептор *Adiantum*.

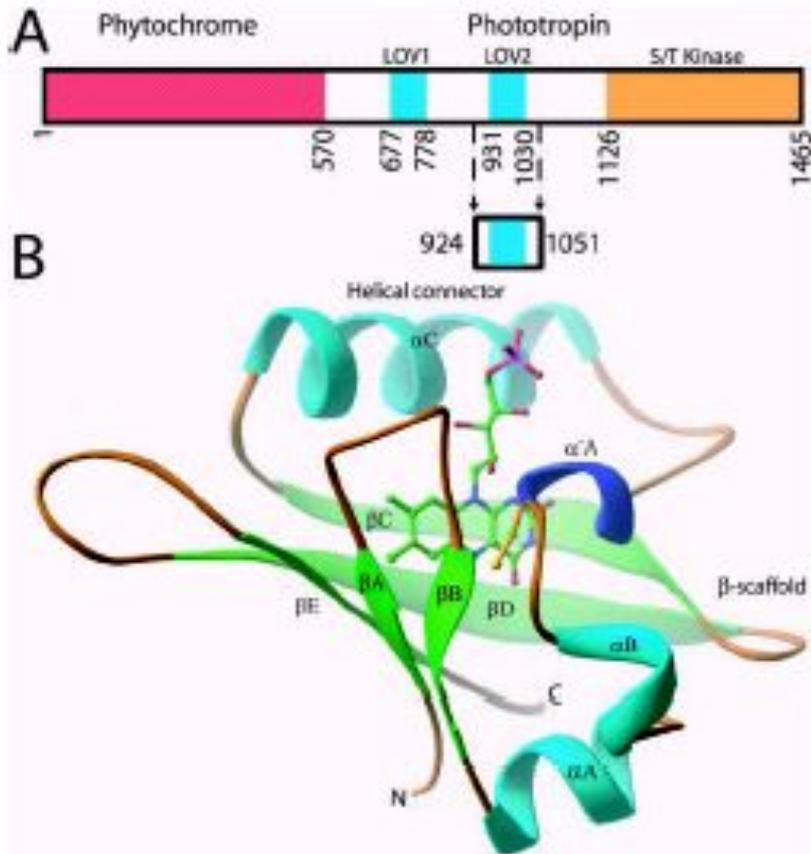


Fig. 1. *Adiantum* phy3 domain and LOV2 structures. (A) *Adiantum* phy3 domain structure showing the N-terminal phytochrome chromophore domain bound to a phototropin. Residues forming the LOV2 construct are marked by arrows. (B) Ribbon diagram of the phy3 LOV2 structure. The FMN cofactor is shown in the chromophore-binding pocket of LOV2 and is colored by elements: carbon, green; nitrogen, blue; oxygen, red; phosphorus, pink. C966 is at the N terminus of  $\alpha'A$  and is colored yellow.

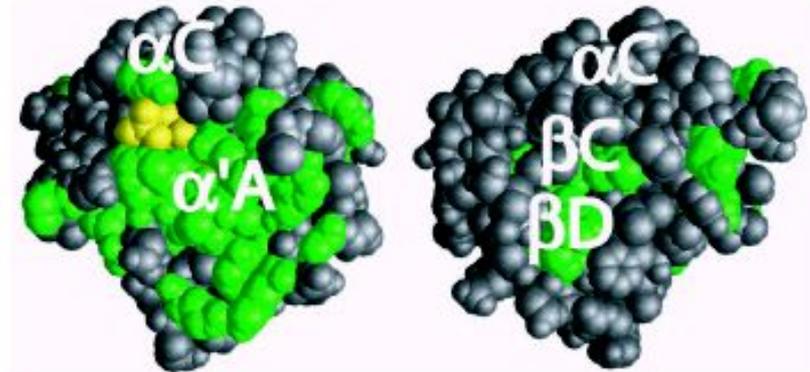


Fig. 6. Space-filling model of phy3 LOV2 showing the surface position of residues conserved in all LOV1 and LOV2 domains (green). Terminal phosphate of FMN is colored yellow. (Left) Model of the conserved face containing the  $3_{10}$ -helix  $\alpha'A$ . (Right) Model is rotated  $180^\circ$  about a vertical axis in the plane of Fig. 1.

# Схема строения фоторецепторов и их взаимодействие

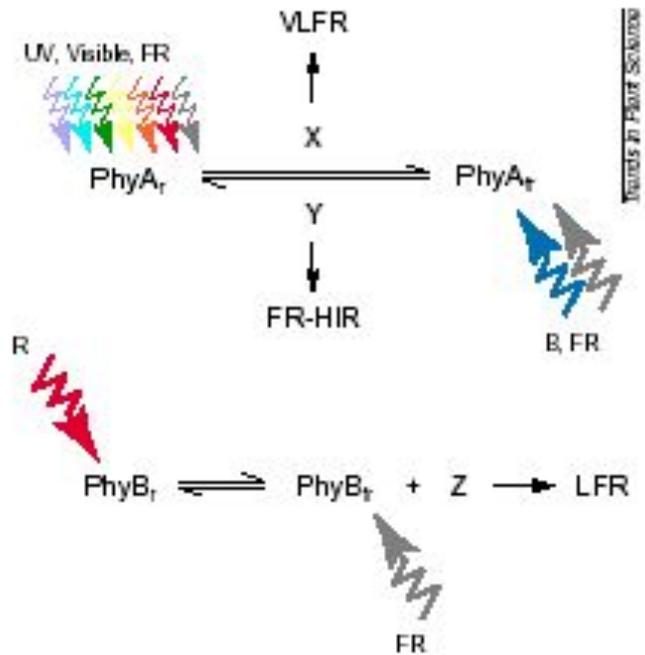
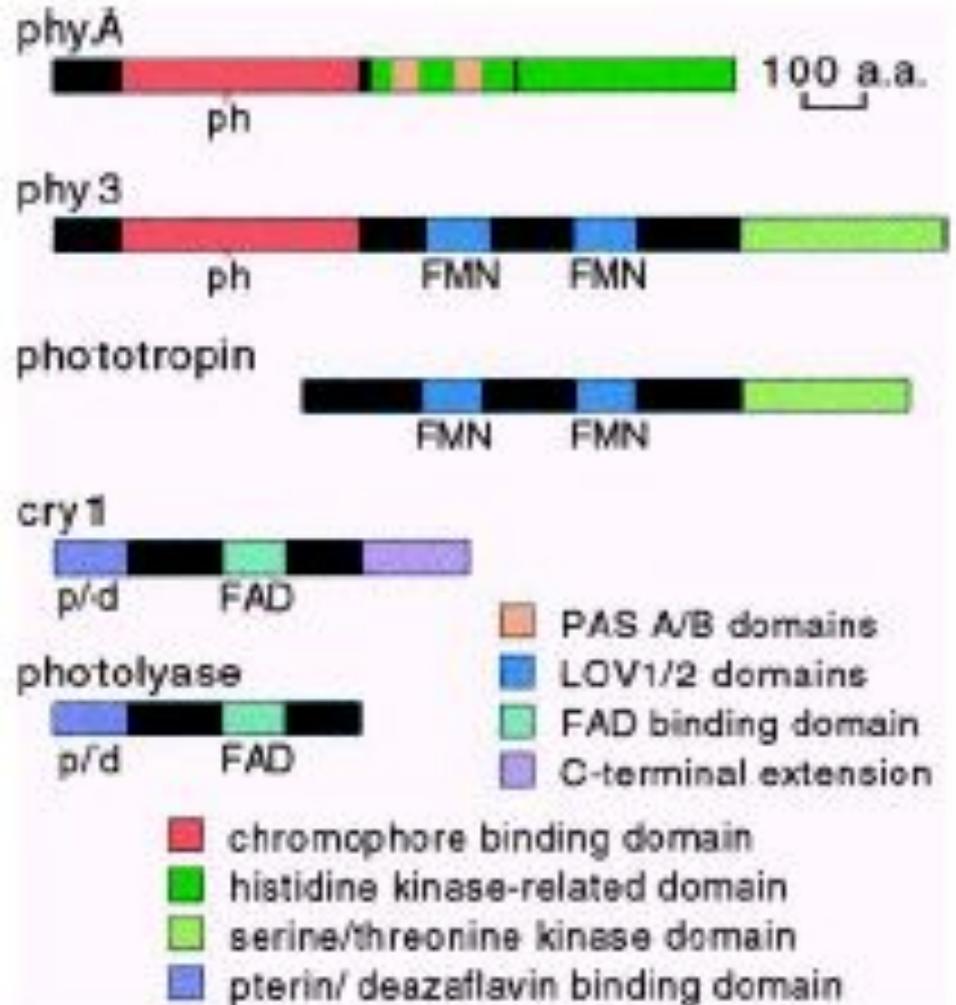


Fig. 1. Different modes of photoperception by phytochrome A (PhyA) and phytochrome B (PhyB). Phytochrome partners are represented by X, Y and Z, which are pathway-specific or shared in the pathways. Abbreviations: B, blue light; FR, far-red light; FR-HIR, far-red-light-mediated high irradiance response; LFR, low fluence response; PhyA<sub>fr</sub>, PhyA in far-red-light-absorbing form; PhyA<sub>r</sub>, PhyA in red-light-absorbing form; PhyB<sub>fr</sub>, PhyB in far-red-light-absorbing form; PhyB<sub>r</sub>, PhyB in red-light-absorbing form; R, red light; VLFR, very low fluence response; UV, ultraviolet light.



## Фототропины участвуют в регуляции разных фотодвижений

- Изгибание колеоптиля
- Движение хлоропластов
- Открывание устьиц

Фототропины влияют на экспрессию ауксин-зависимых генов

Одна из мишеней фототропинов (ARF7) - транскрипционный фактор из системы ответа на ауксин. Мутанты по этому гену имеют нарушенный фототропизм, а также нарушенный гравитропический ответ и экспрессию ауксин-регулируемых генов.

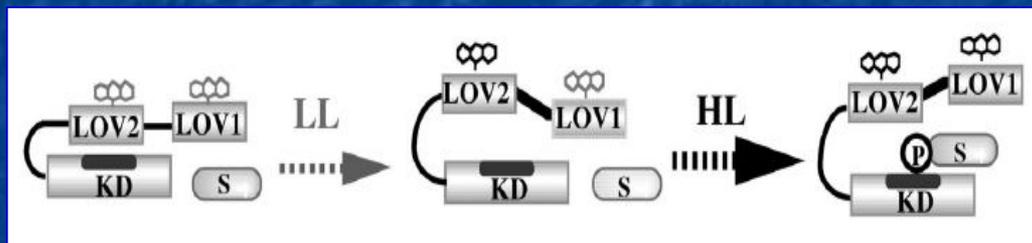
У *Arabidopsis* работают два фототропина с разной чувствительностью – Phot1 (высокочувствительный) и Phot2 – низкочувствительный.

Перераспределения ауксина, по-видимому, регулируется одинаково у разных тропизмов. Различия в экспрессии белков, отвечающих на ауксин.

# Фототропины: строение и локализация



от греч. *τροπος* — поворот, направление и др.-греч. *φως* / *φωτος* — свет

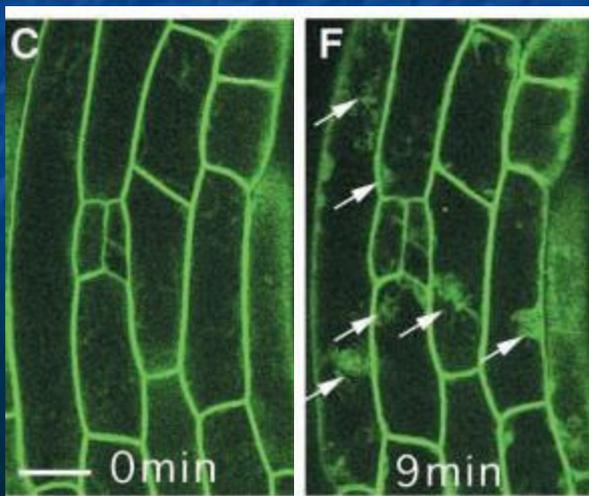


Каждый LOV-домен нековалентно связывает хромофор — FMN, — а также обеспечивает белок-белковые взаимодействия и связывание белков-мишеней.

LOV1 домен, возможно, обеспечивает димеризацию;

LOV2 домен осуществляет восприятие света.

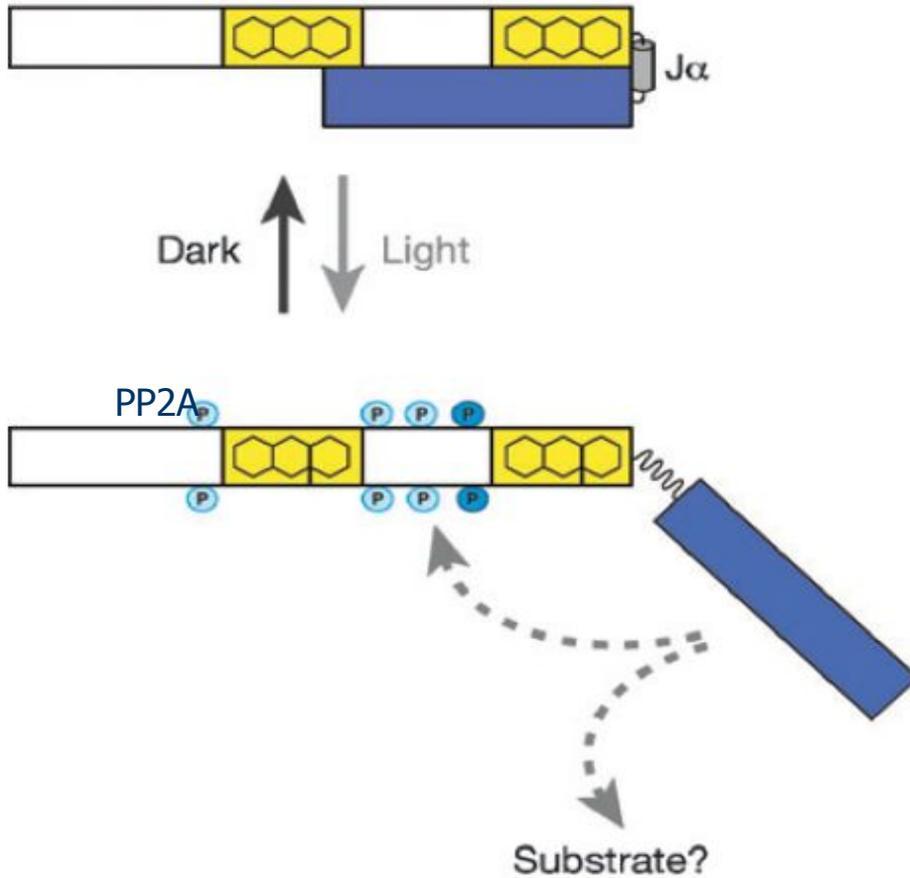
## Локализация фототропинов



**Фототропины** – гидрофильные белки, ассоциированные с плазмалеммой.  
 С – phot1-GFP в темноте равномерно распределён в плоскости плазмалеммы,  
 F – после освещения СС освобождается от связи с мембраной и выходит в цитозоль.

У *Arabidopsis* работают два фототропина:  
 phot1 – высокочувствительный – ответ на СС низкой интенсивности,  
 phot2 – низкочувствительный – ответ на СС высокой интенсивности.

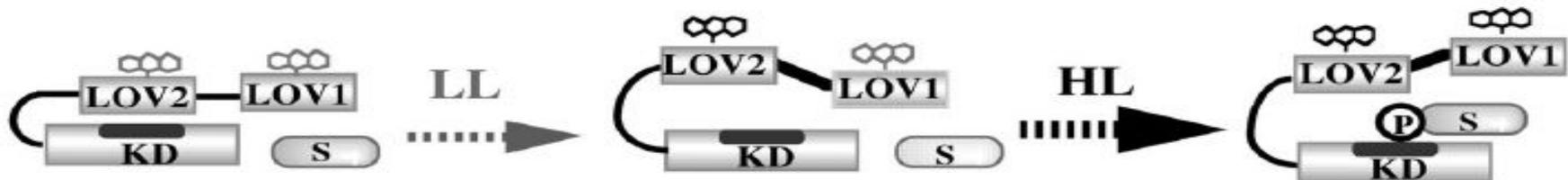
# Фототропины: СИГНАЛИНГ



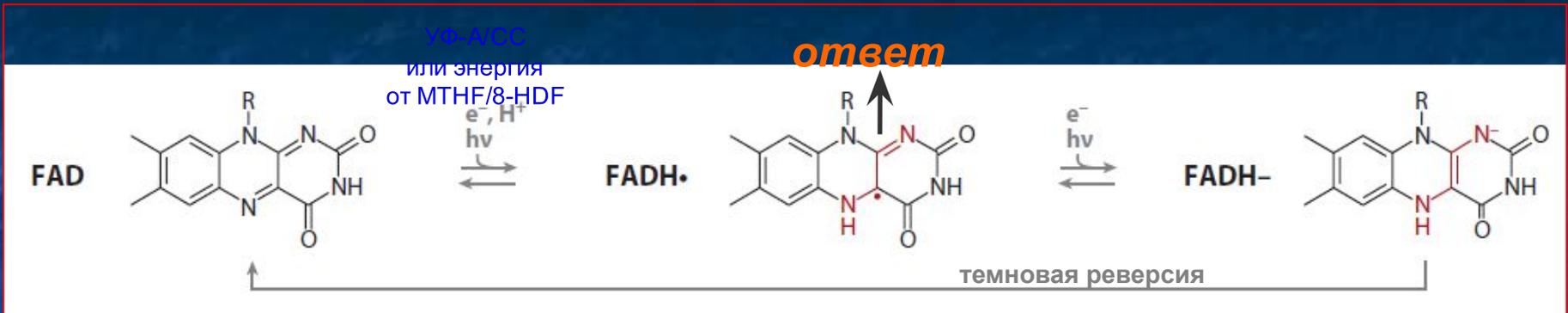
СС/УФ-А зависимое образование тиоаддукта FMN с цистеином LOV 2 домена приводит к изменению конформации апопротеина, снятие репрессии протеинкиназного домена, автофосфорилированию фототропинов по нескольким Ser и связыванию с 14-3-3 белками.

В темноте происходит постепенное дефосфорилирование фототропинов с помощью протеинфосфатаз (PP2A).

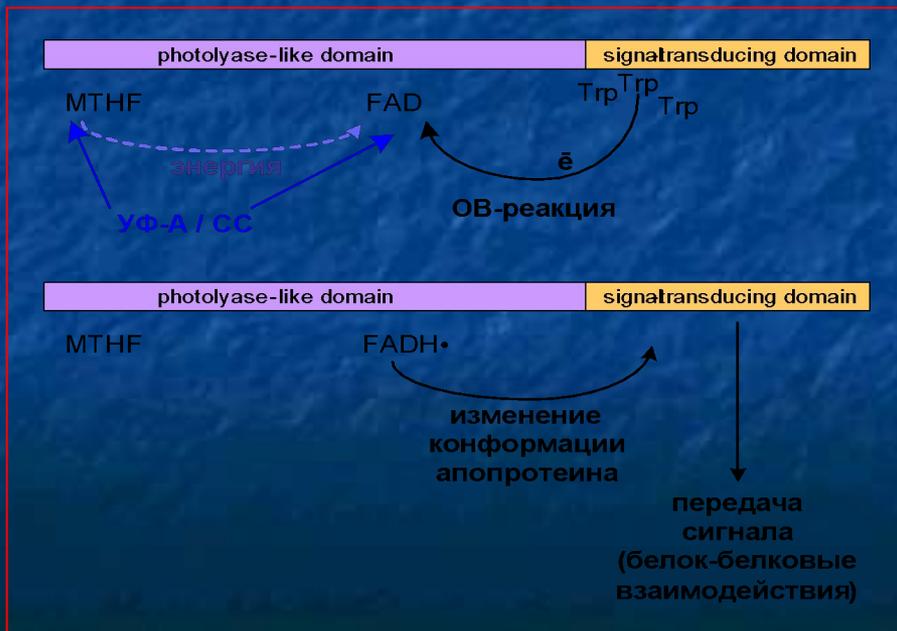
Открытие  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов плазмалеммы (Phot1) и  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов эндомембран (Phot2) → повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  → активация  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулина,  $\text{H}^+$ -АТФазы (плазмалеммы и, возможно, тонопласта) и  $\text{K}^+$ <sub>in</sub>-каналов



# Криптохромы: фотопревращения и передача сигнала

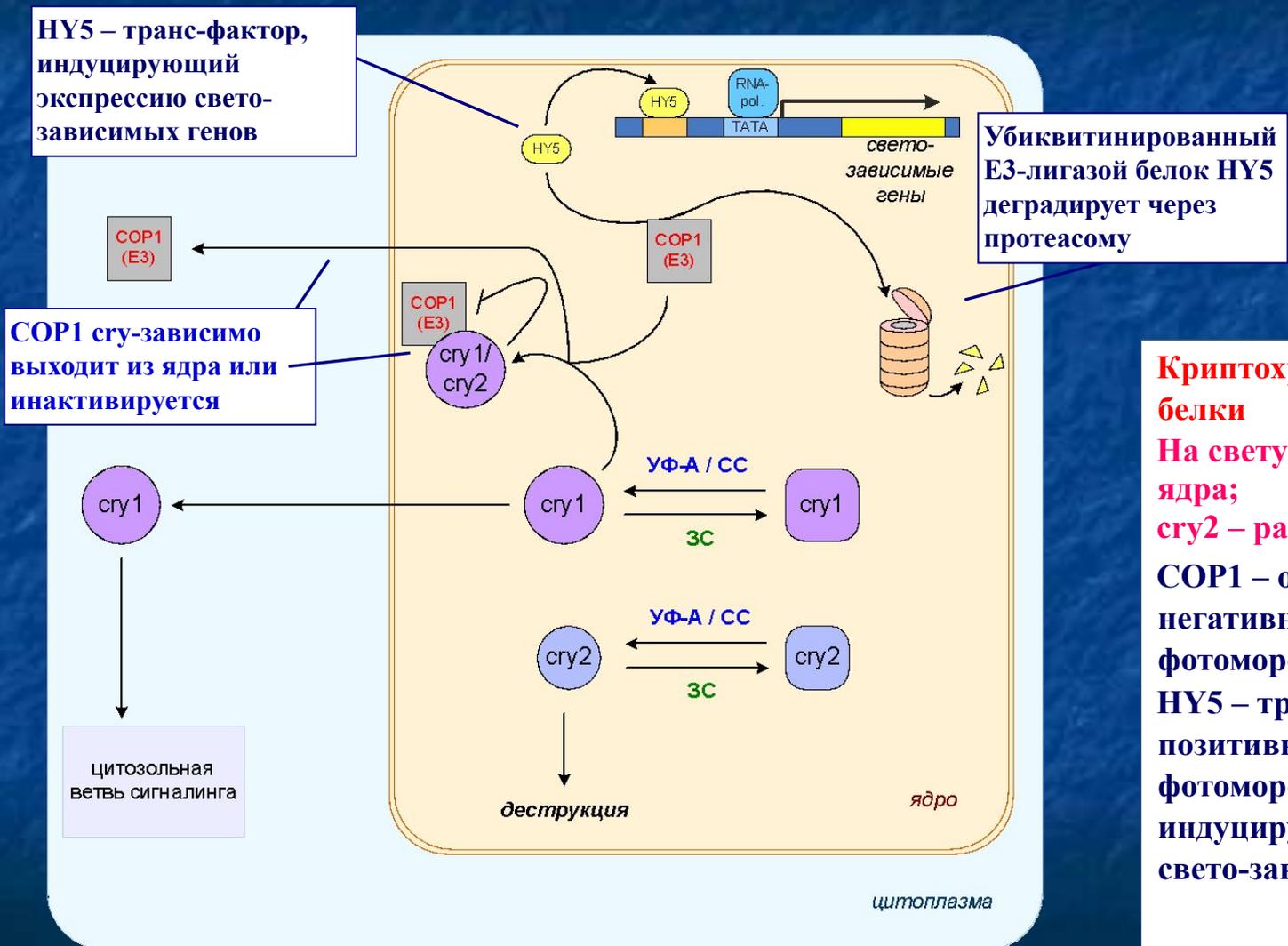


У криптохромов **MTHF** (птерин) поглощает квант **УФ/СС** и передаёт энергию на FAD (резонансный перенос Фёрстера).  
 Результатом фотореакции является внутримолекулярная окислительно-восстановительная реакция с образованием FADH• – физиологически активная форма криптохрома.  
 Поглощение **3С** формой FADH• приводит к восстановлению её до FADH<sup>-</sup> – т.е. выключению сигнала.



**УФ-А/СС** зависимое образование FADH•, вызывает (авто)фосфорилирование в Ser-богатом участке DAS мотива и изменение конформации С-конца. В результате С-конец может взаимодействовать с другими компонентами передачи сигнала и/или стать более доступным для **фосфорилирования** ПКзамами.  
 Так как белки, восстанавливаемые криптохромами, не обнаружены, предполагается, что сигнал от них передаётся через белок-белковые взаимодействия

# Криптохромы: фотопревращения, передача сигнала



HY5 – транс-фактор, индуцирующий экспрессию свето-зависимых генов

COP1 cry-зависимо выходит из ядра или инактивируется

Убиквитинированный E3-лигазой белок HY5 деградирует через протеасому

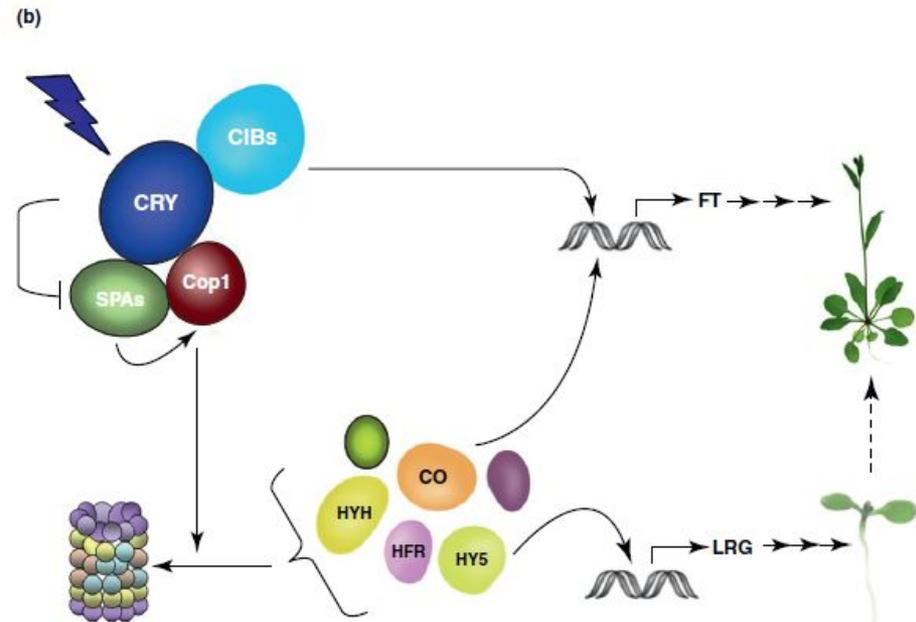
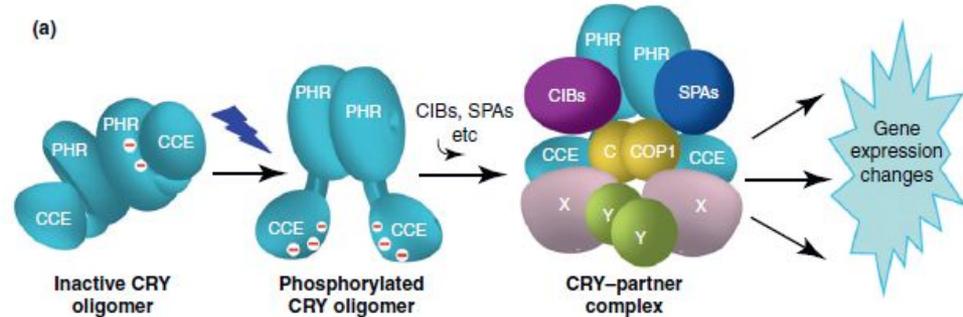
**Криптохромы – ядерные белки**  
**На свете cry1 выходит из ядра;**  
**cry2 – разрушается..**  
COP1 – одна из E3-лигаз, негативный регулятор фотоморфогенеза.  
HY5 – транс-фактор, позитивный регулятор фотоморфогенеза – индуцирует экспрессию свето-зависимых генов..

# Криптохромы: возможный механизм фосфорилирования и трансдукции сигнала

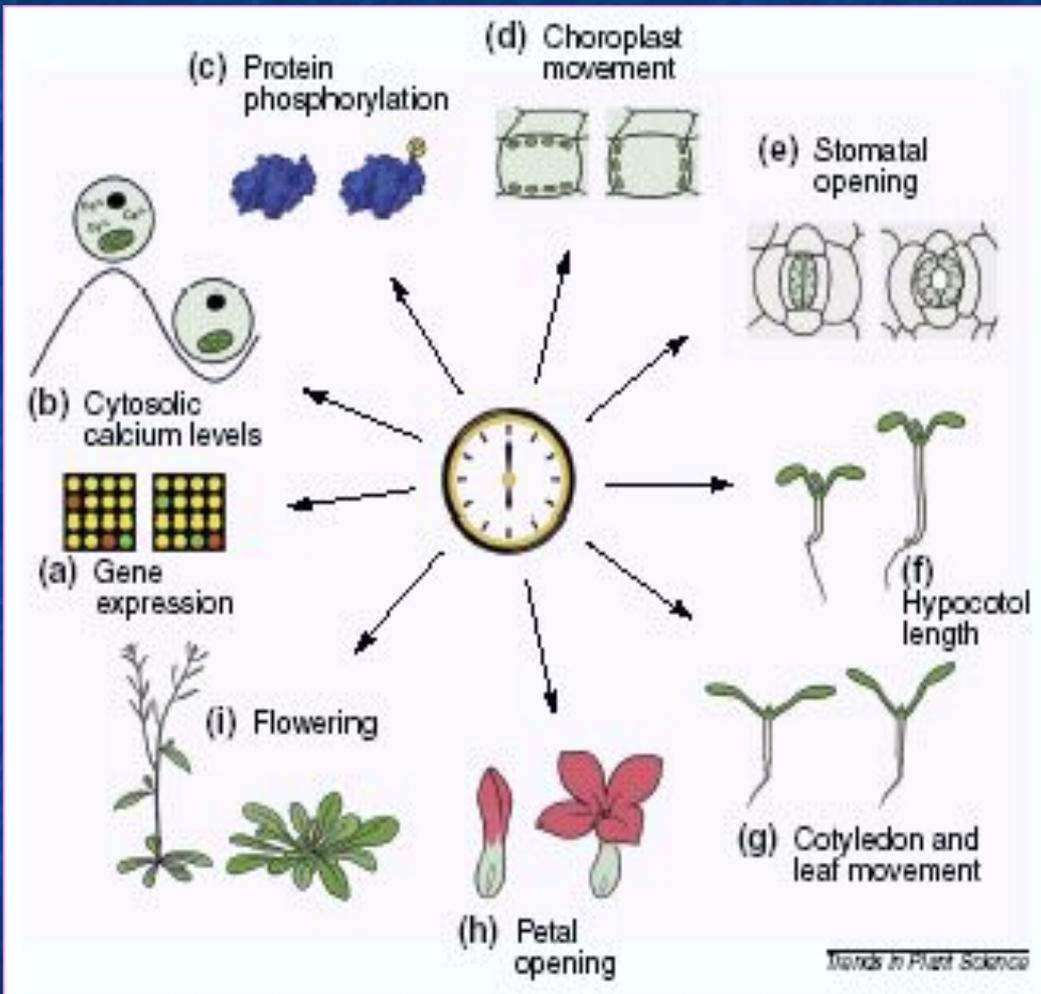
Два возможных варианта передачи сигнала:

1. Через активацию транс-факторов CIBs (только для Cry2) .

2. Через систему убиквитинирования COP1/SPAs. При этом Cry1 и Cry2 связываются с SPA1, но с разными участками, и Cry1 – ингибирует, а Cry2 – активирует их активность

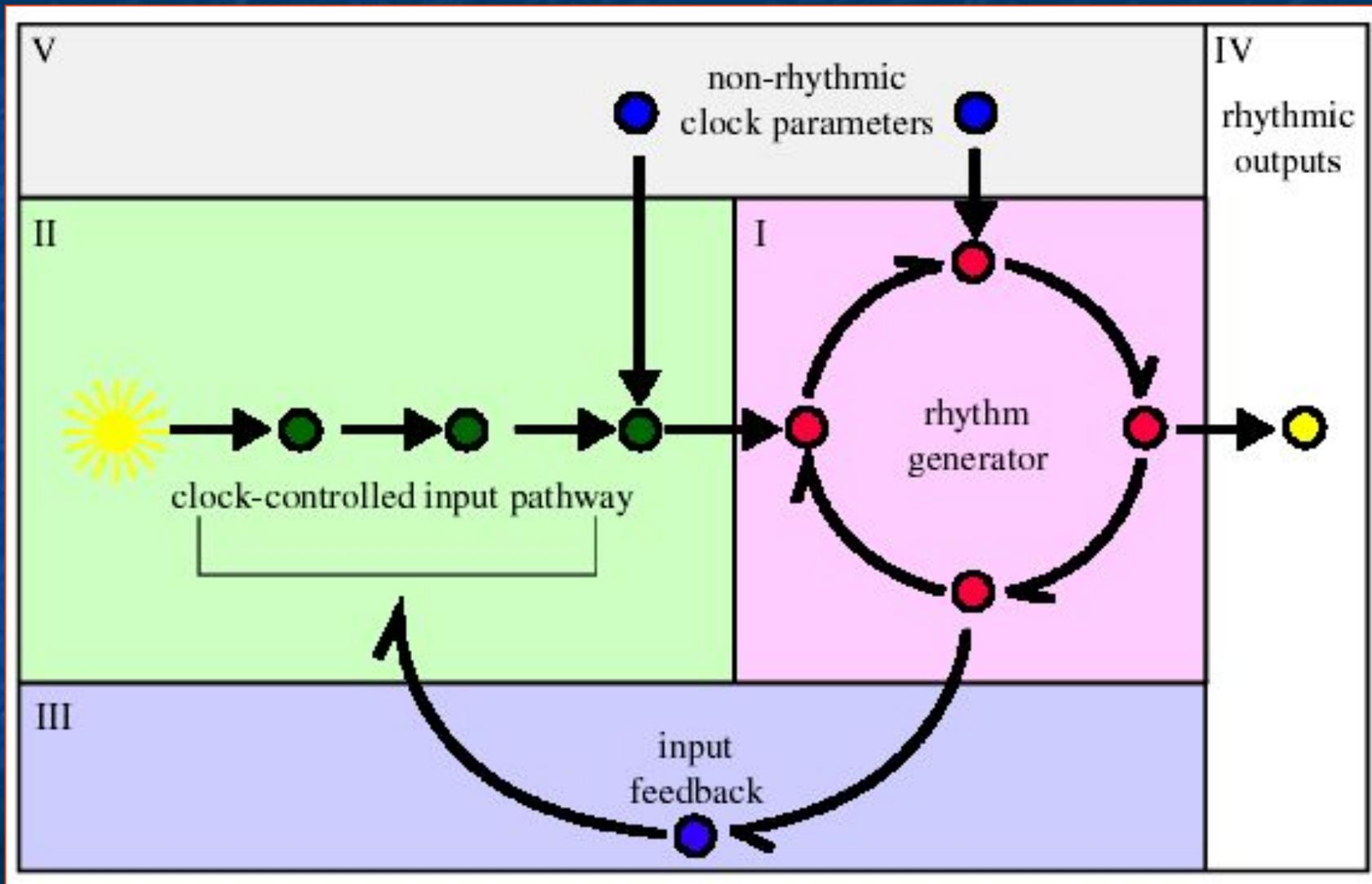


# Роль «биологических часов» в жизни растения

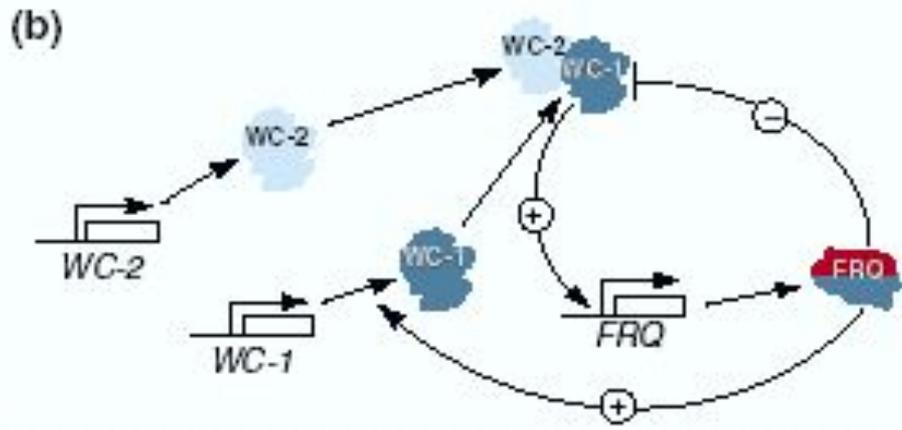
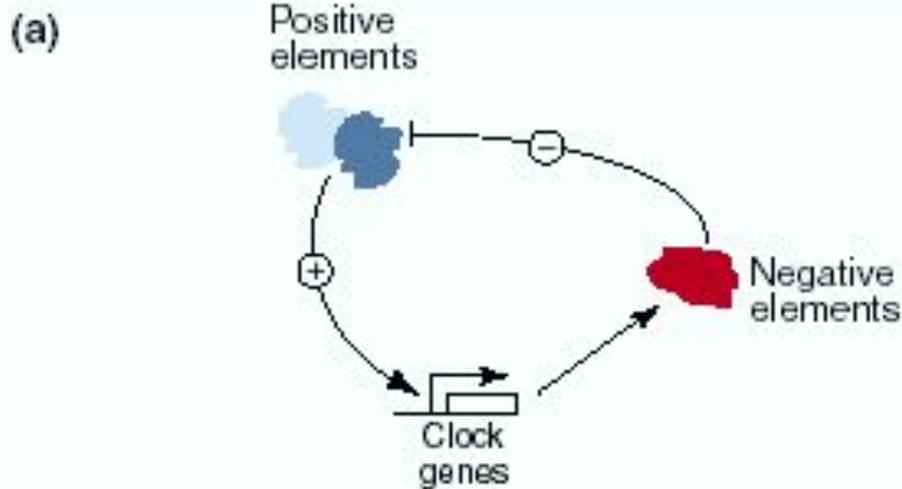


- a. Экспрессия некоторых генов подчинена циркадным ритмам. Гены, кодирующие хлорофилл-а/в-связывающие белки светособирающего комплекса (*Lhcb*, CAB), нитрат-редуктаза (*NIA2*). Часы координируют метаболизм для максимального уровня фотосинтеза.
- b. Цитозольные концентрации свободного кальция осциллируют согласно циркадным ритмам у *Arabidopsis*
- c. Часы регулируют фосфорилирование некоторых белков. Циркадная активность киназы, которая фосфорилирует ФЕП-карбоксилазу (*Kalanchoe fedtschenkoi*)
- d. движения хлоропластов (*Arabidopsis*);
- e. открывание устьиц (*Arabidopsis*);
- f. удлинение hypocotilia (*Arabidopsis*);
- g. Движения семядолей и листьев (*Arabidopsis*);
- h. раскрытие цветков (*Kalanchoe*);
- i. синхронизация процессов, связанных с развитием - например, времени цветения. Мутации в генах, связанных с часами изменили фотопериодический контроль цветения.

# Компоненты системы «биологических часов»



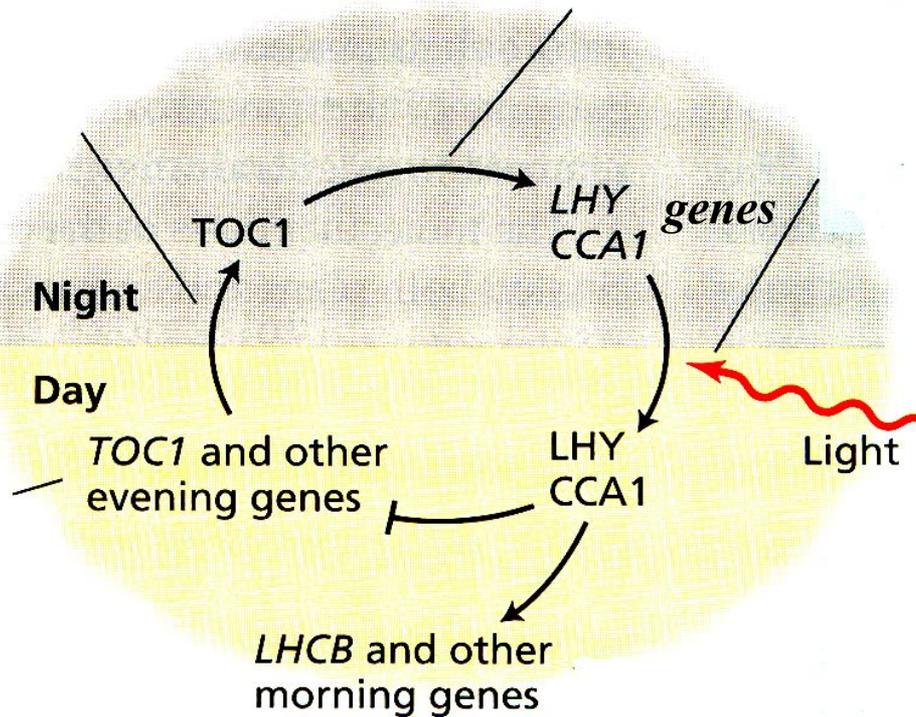
# Молекулярная модель эукариотического циркадного осциллятора



а. Общая схема, показывающая главную петлю обратной связи - основу для эукариотического циркадного генератора. Пара "плюсовых" элементов (CLOCK и CYC в дрозофиле, WC1 и WC2 в *Neurospora*, CLOCK и BMAL в мышке) формируют гетеродимеры, которые действуют как активаторы транскрипции, вызывающие экспрессию гена «часов». Белковые продукты ("минусовые" элементы) генов часов (PER и TIM в *Дрозофиле*, FRQ в *Neurospora*, mCRYs и mPERs в мышке) блокируют действие "плюсовых" элементов, подавляя их выражение.

б. Модель циркадной системы *Neurospora*. WC-1-WC-2 гетеродимер активирует экспрессию гена часов *FRQ*. *FRQ* белок играет две роли. В одной регуляторной петле он действует как отрицательный регулятор WC-1-WC-2 гетеродимера. В другой петле *FRQ* действует как положительный регулятор синтеза белка WC 1 через *WC 1* mRNA. "Плюсовые" элементы изображены синим, "минусовые" - красным. Поскольку *FRQ* действует и как положительный и отрицательный элемент, он изображен и красным и синим.

## Упрощенная модель циркадного осциллятора *Arabidopsis*.

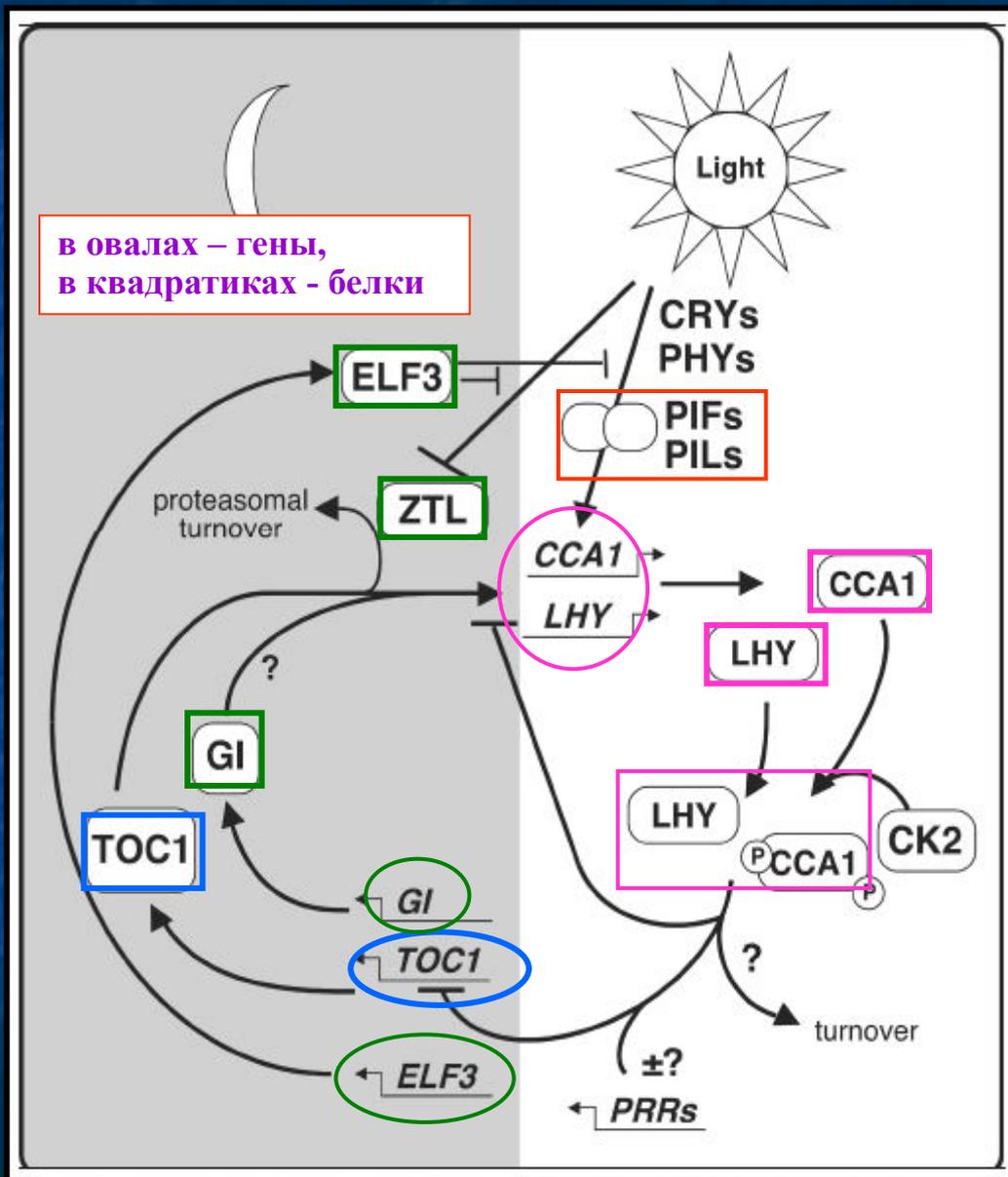


Центральный осциллятор состоит из генов LHY (late elongated hypocotyl), TOC1 (timing of cab expression1) и CCA1 (circadian clock associated1), соответствующих мРНК и белков. Белок TOC1 содержит специфичный для растений домен ССТ, который вовлечен в белок - белковые взаимодействия, а так же определяет ядерную локализацию белка.

Модель основана на обратной связи между LHY, CCA1 и TOC1.

LHY и CCA1 образуют гетеродимерный транскрипционный фактор, подавляющий транскрипцию гена белка TOC1, который является стимулятором экспрессии LHY/CCA1. Свет активизирует экспрессию комплекса LHY/CCA1, он накапливается в цитоплазме и подавляет экспрессию TOC1-гена, что в свою очередь вызывает снижение уровня экспрессии LHY/CCA1. Понижение уровня LHY/CCA1 ведет к повышению уровня транскрипции TOC1 и пик концентрации его мРНК приходится на конец светлого времени суток. В результате трансляции мРНК TOC1 в цитоплазме повышается уровень белка TOC1, стимулирующего экспрессию LHY/CCA1. Пик концентрации LHY/CCA1 приходится на начало светлого времени суток, в результате чего цикл запускается снова.

## Модель циркадной системы *Arabidopsis*



Входной сигнал - **Cry1** и **Cry2** – криптохромы, **PhyA**, **PhyB** - фитохромы

Белок **ZTL** (**ZEITLUPE**) взаимодействует с **PhyB** и **Cry1** и принимает участие в трансдукции светового сигнала.

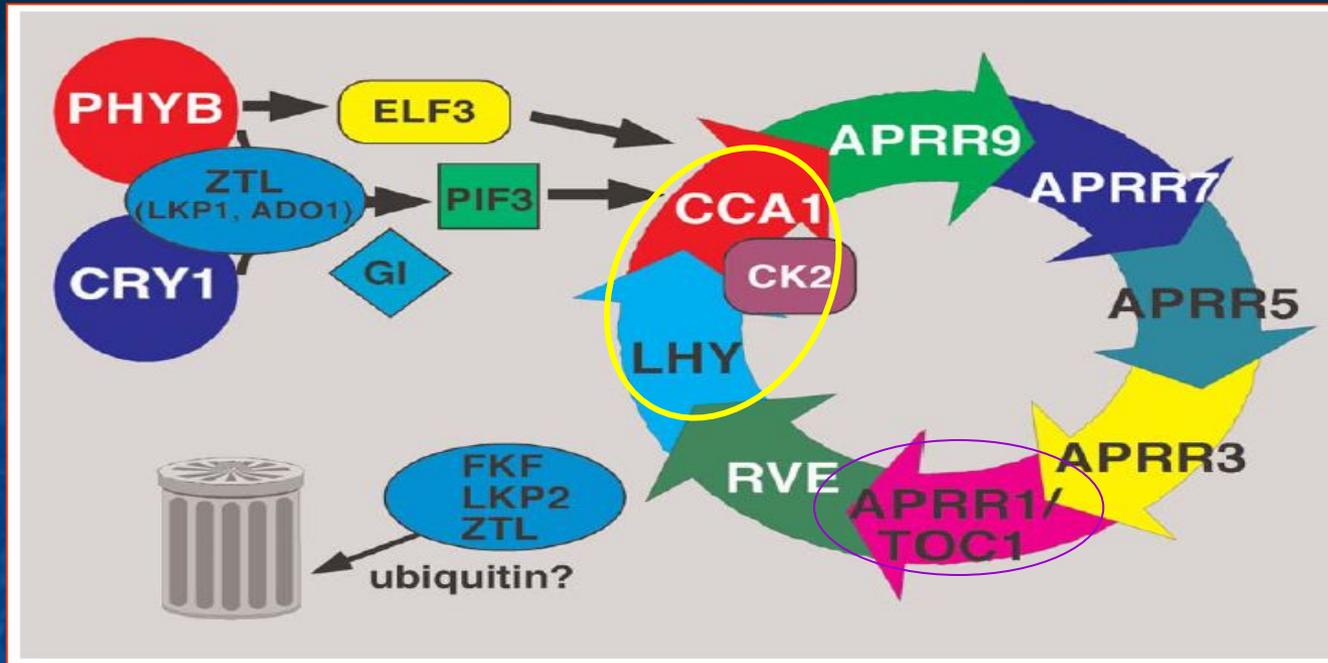
Белок **ELF3** (**EARLY FLOWERING 3**) противодействует фототрансдукции взаимодействуя с **PhyB** в темное время суток и заставляет всю систему самоосциллировать.

**ZTL** и **FKF1**, работающие на "входе" сигнала, могут взаимодействовать с фосфорилированными белками осциллятора, определяя их деградацию

Белки осциллятора могут быть фосфорилированы **CK2** – метка для убиквитирования.

**TOC1** активирует экспрессию **LHY/CCA1** путем взаимодействия с **PIF3** (**PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR3**), белком, содержащим домен helix-loop-helix и способным связываться с промоторами **LHY** и **CCA1**. Важно – это «пункт взаимодействия» с фитохромами, т.е. «настройка часов».

## То же , но в другом виде и с некоторыми вариациями...



*ARR - ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR genes.*

Многие из них - *ARR5, ARR6, ARR7, ARR15* участвуют в петле отрицательной регуляции цитокининового сигналинга...

- Вход светового сигнала осуществляется через фитохромы и криптохромы (для простоты, показаны только PHYB и CRY1). Медиаторы входа - ZTL, ELF3 и GI (PIF3. ZTL/ADO1 связаны с PHYB и CRY1). PIF3 связывается с промоторами CCA1 и LHY и возможно с другими компонентами часов. Для простоты показан единственный центральный осциллятор, ассоциированный с многими предполагаемыми его компонентами. Компоненты на круглых стрелках осцилируют на уровне mRNA. Нельзя вывести причинные отношения среди предполагаемых компонентов на круге из-за недостаточности экспериментальных данных.
- LKP2 - вероятный кандидат на участие в осцилляторе, поскольку его mRNA осциллирует.
- CCA1 и LHY фосфорилируются CK2. В фосфорилированном виде они становятся субстратами для белков F-бокса (ZTL, FKF и LKP2) и последующего убиквитинирования и деградации в протеосоме. Выходные сигналы могут идти от каждого из предполагаемых компонентов осциллятора.
- CCA1, LHY, RVEs и TOC1/APRR1 являются ДНК-связывающими белками, CCA1 может связываться с промотором *LHCB*.
- Другие выходные сигналы от осциллятора могут образовывать обратные связи с "входными" компонентами, типа PHYA, PHYB и CRY1, которые регулируются часами на уровне транскрипции и mRNA.

## Стратегии развития животных и растений различны.

**У животных:** развитие – серия сложных преобразований, которые ведут к быстрому превращению недифференцированных клеток к строго дифференцированным. Развитие животных ведет к жесткому ограничению потенциала развития отдельной клетки. Когда организм сформировался, клетки и ткани окончательно дифференцированы и, как правило, не могут дедифференцироваться. Нарушение этого принципа приводит к раковым заболеваниям.

**У растений:** клетки истинно тотипотентны. Практически любая клетка растения может дедифференцироваться, «войти» в клеточный цикл и в конечном счете сформировать целое растение.

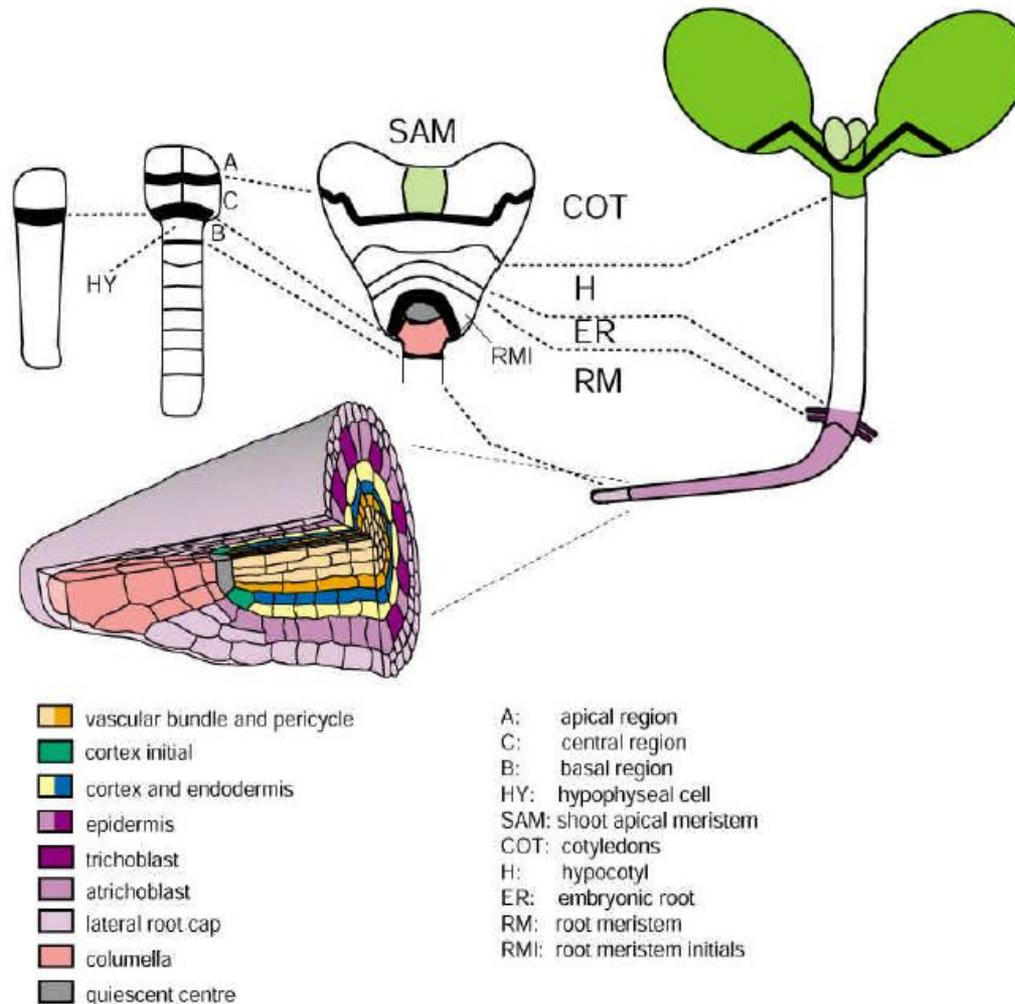
Меристемы работают в течение всей жизни растения и формируют новые органы (боковые корни, новые побеги и др.)

**У животных** репродуктивные органы закладываются на ранней эмбриональной стадии развития.

**У растений** – после длительного вегетативного существования, и не во всех случаях.

**NB – стадийность процесса развития у растений**

# Этап 1. От зиготы до семени. Эмбриогенез у арабидопсиса



Установление оси «корень – побег».

Зигота делится ассиметрично, образуются суспензор и зародышевая клетка. Деление зародышевой клетки приводит к формированию меристем (рядом с суспензором – корневая).

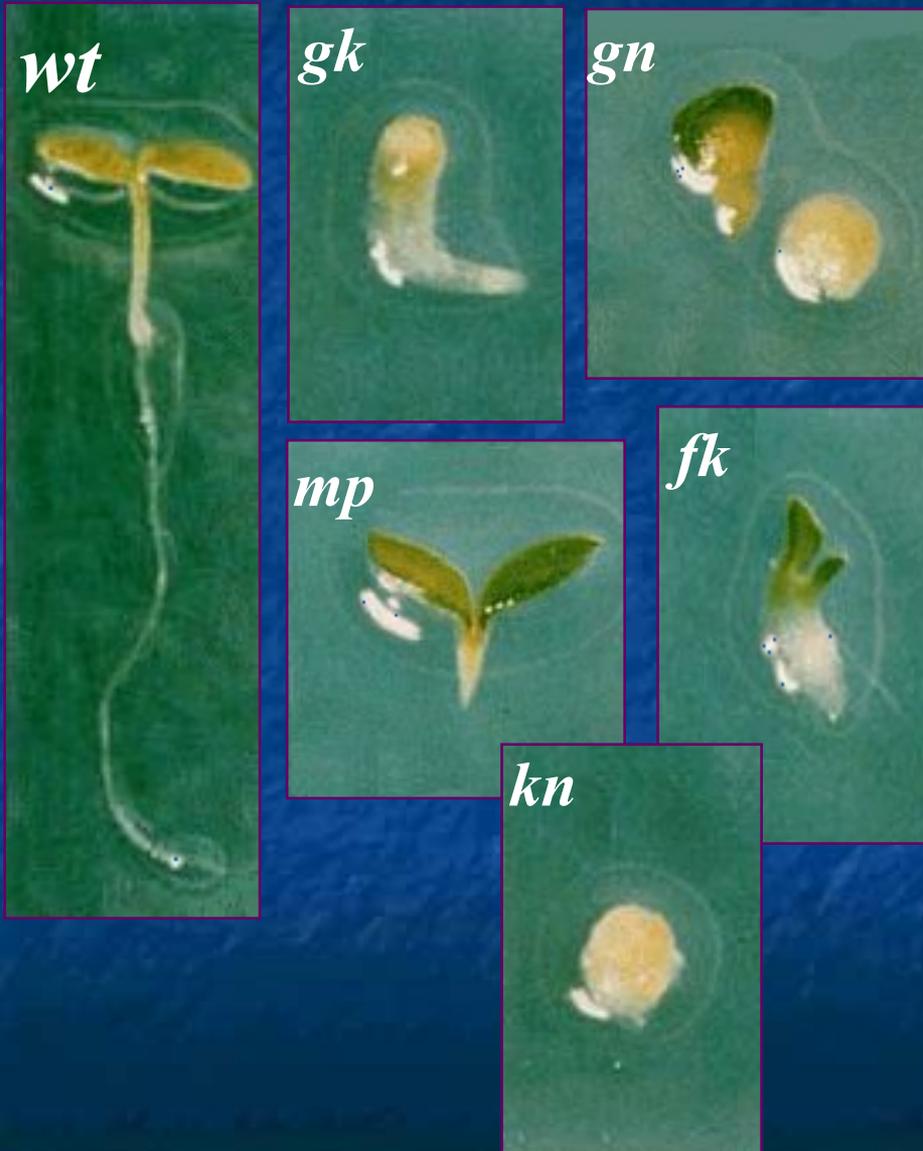
Формируется сосудистый камбий – связь меристем.

Из апикальной меристемы стебля формируются зародышевые листья (семядоли).

Наконец, все это «упаковывается» в семя.

# Особенности и механизмы эмбрионального развития растений

## Мутанты по эмбриогенезу



Формирование зародыша у растений происходит за счет изменения скорости и направления делений клеток.

Перемещения клеток не происходит.

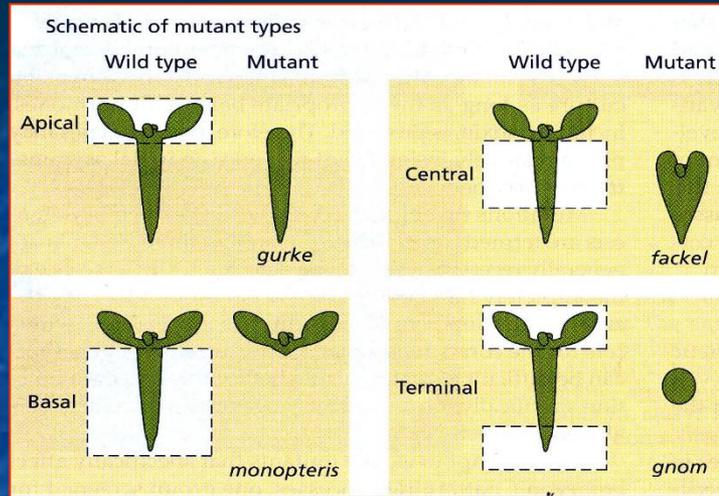
Основные факторы:

- скорость деления клеток
- асимметричность деления
- полярность клеток

Дифференцировка тканей происходит раньше и независимо от морфогенеза. До начала дифференцировки судьба клетки не определена.

Экспрессия «эмбриональных» генов пространственно специфична. Клетки, формирующие определенные зоны зародыша автономны – мутации, затрагивающие одну часть зародыша, как правило, не проявляются в другой его части.

# Главную роль в регуляции эмбриогенеза играет ауксин



## Мутанты по эмбриогенезу у *Arabidopsis*

***GURK*** – отсутствуют апикальная меристема и семядоли. Кодировать ацетил-СоА карбоксилазу

***FAKEL*** – отсутствует гипокотиль. Кодировать стерин С14 редуктазу

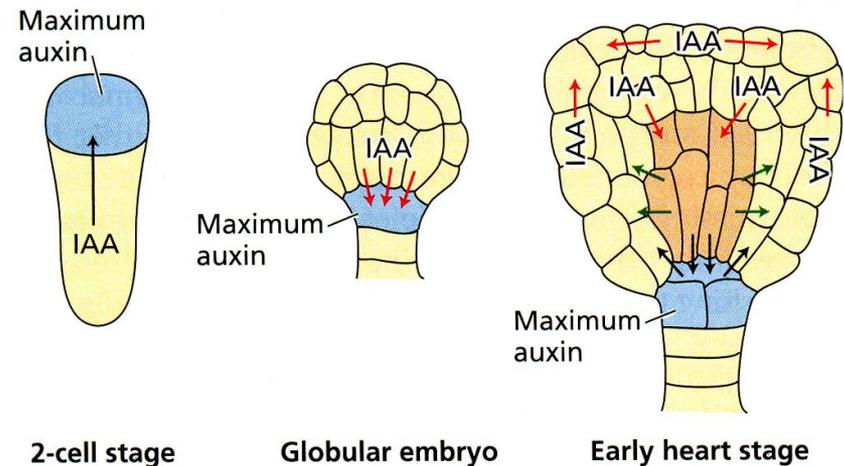
***MONOPTEROS (MP)*** – отсутствуют гипокотиль и корни. Кодировать трансфактор ауксинового ответа ARF

***GNOM (GN)*** – редуцированы апикальные побеговая и корневая меристемы. Кодировать GEF – фактор обмена гуаниновых нуклеотидов. GEF важен для распределения транспортеров ауксина PIN.

## В овалах – «ауксиновые» гены

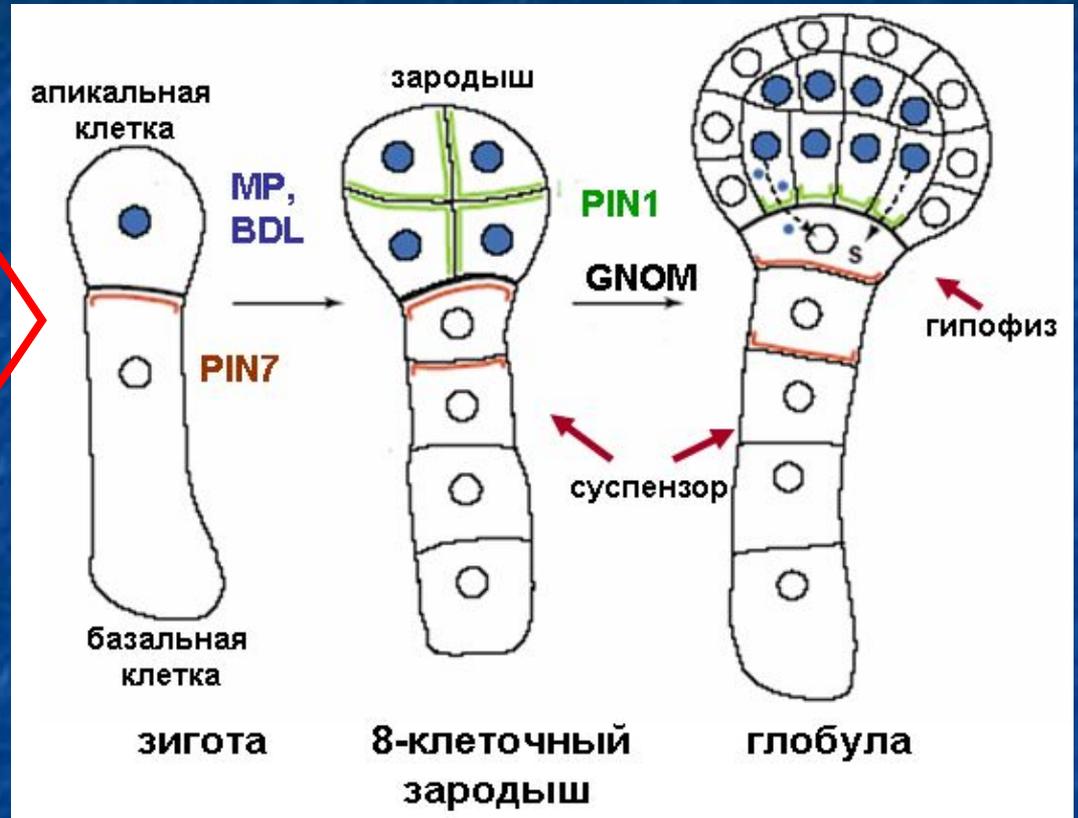
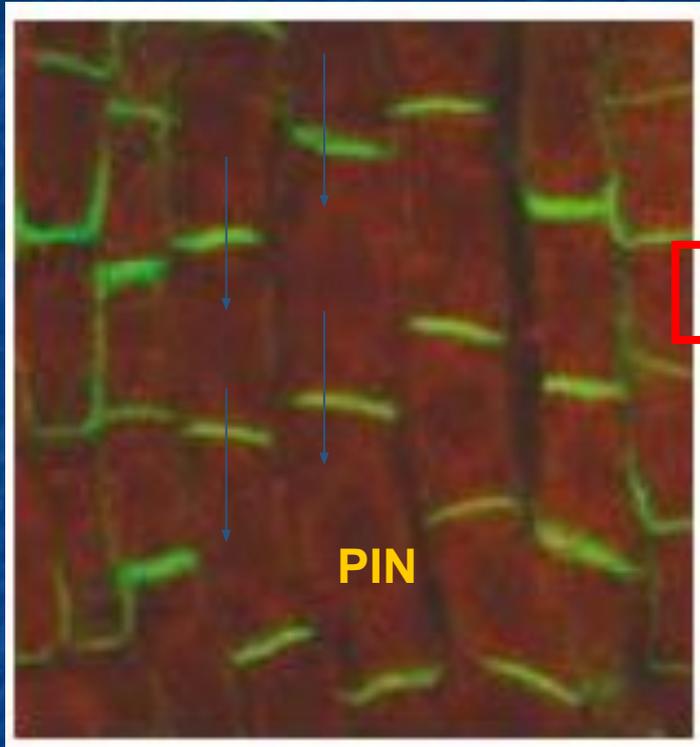


Транскрипция разных генов в процессе эмбриогенеза



Потоки ауксина в ходе эмбриогенеза, регулируемые распределением PIN

Наиболее «ранние» регуляторы эмбриогенеза:  
гены, контролирующие полярный транспорт ауксинов



- полярность развития зародыша со стадии 2х клеток определяется направлением полярного транспорта ауксина (за счет белка PIN7)
- на стадии глобулы происходит обособление базального домена за счет изменения локализации белков PIN7 и PIN1

# Гены-регуляторы упорядоченного деления клеток в эмбриогенезе

**Синтаксин** - трансмембранный белок, компонент молекулярной машины экзоцитозного белкового комплекса (SNARE комплекса). Содержит SNARE домен - последовательность из 60-70-аминокислот.

**Кинезины** - суперсемейство моторных белков, движутся по микротрубочкам, участвуют в везикулярном транспорте

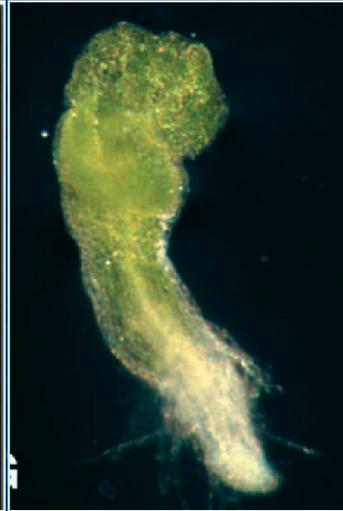
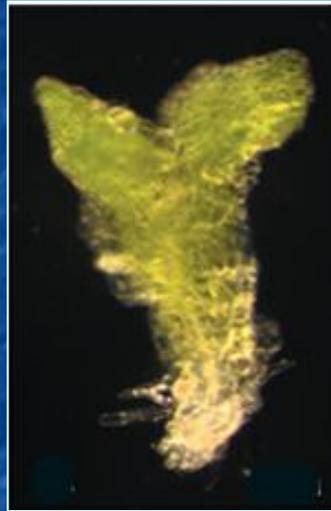
*gnom*

*knolle*

*keule*

*hinkel*

*tsd1,2*



активатор  
ГТФаз

синтаксин

белок  
SNARE  
комплекса

кинезин

эндо-1,4-  
 $\beta$ -D-  
глюканаза

пектин-  
метил-  
трансфе-  
раза

везикулярный транспорт

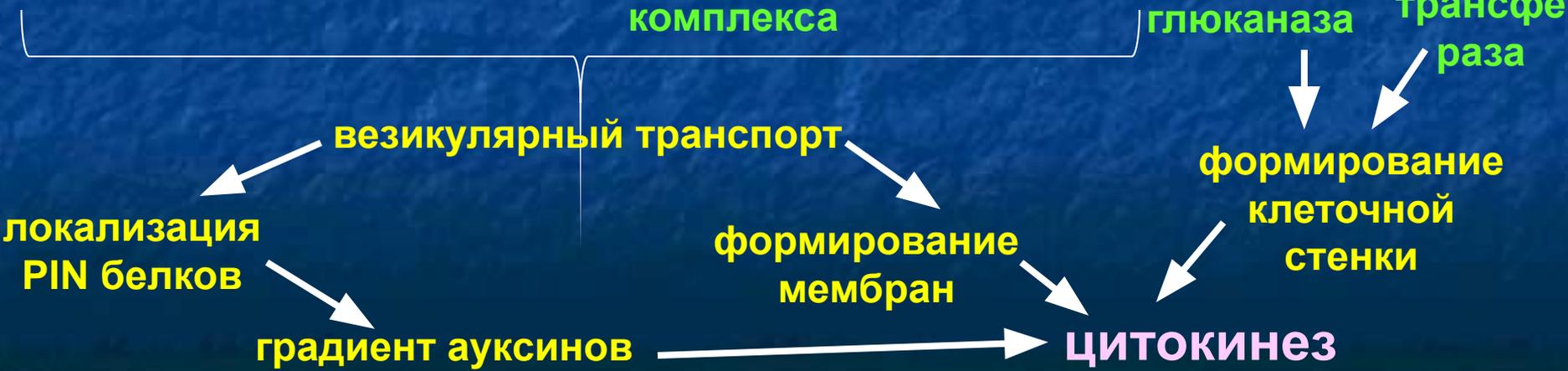
формирование  
клеточной  
стенки

локализация  
PIN белков

формирование  
мембран

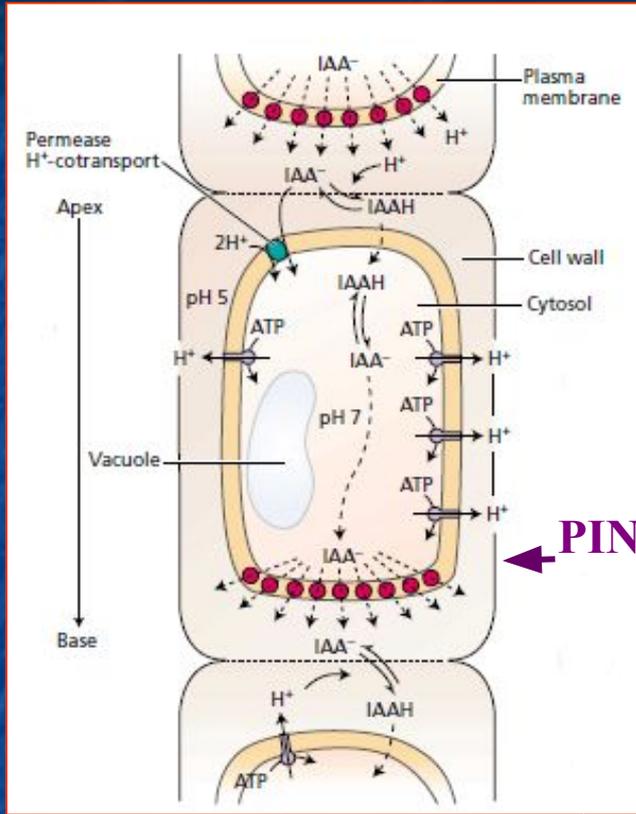
градиент ауксинов

**ЦИТОКИНЕЗ**

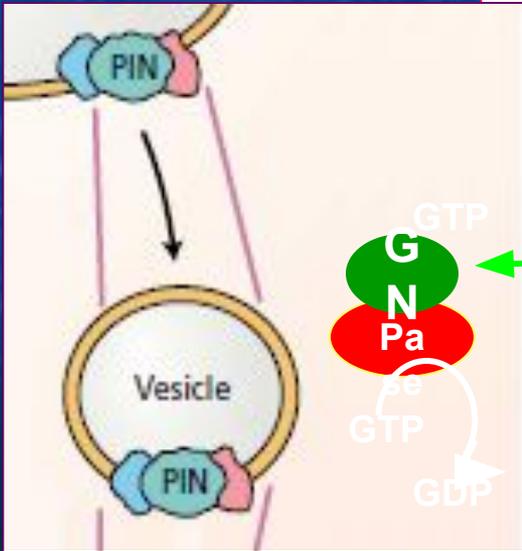
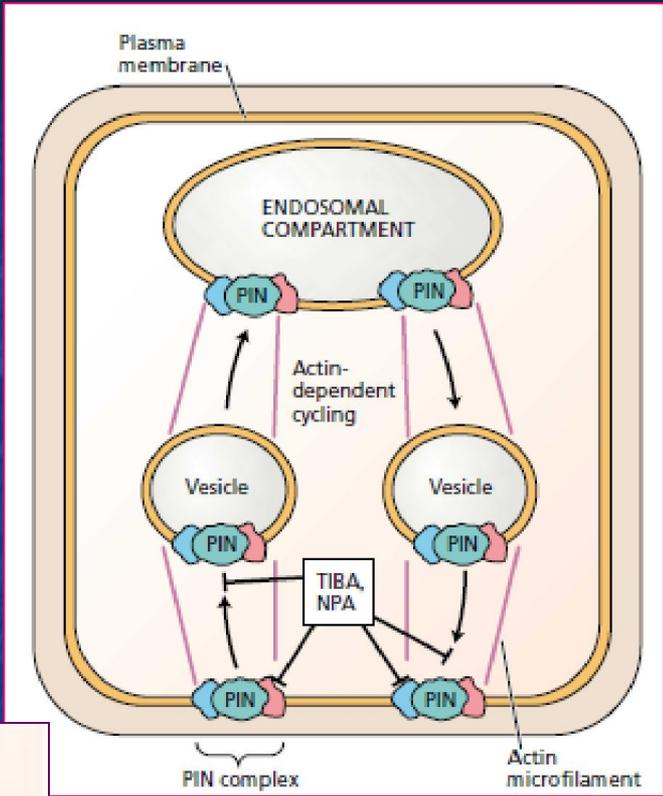


# GNOM (GN) – регулятор локализации PIN белков

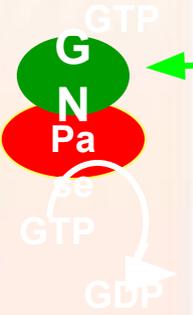
## Полярный транспорт ауксинов (ПАТ)



**Направленный  
везикулярный  
транспорт PIN  
белков**



**GNOM/GEF  
(Guanosine  
Exchange Factor) –  
необходим для  
движения везикул**



**Направление полярного  
транспорта ауксинов**

**Направление растяжения  
клеток**

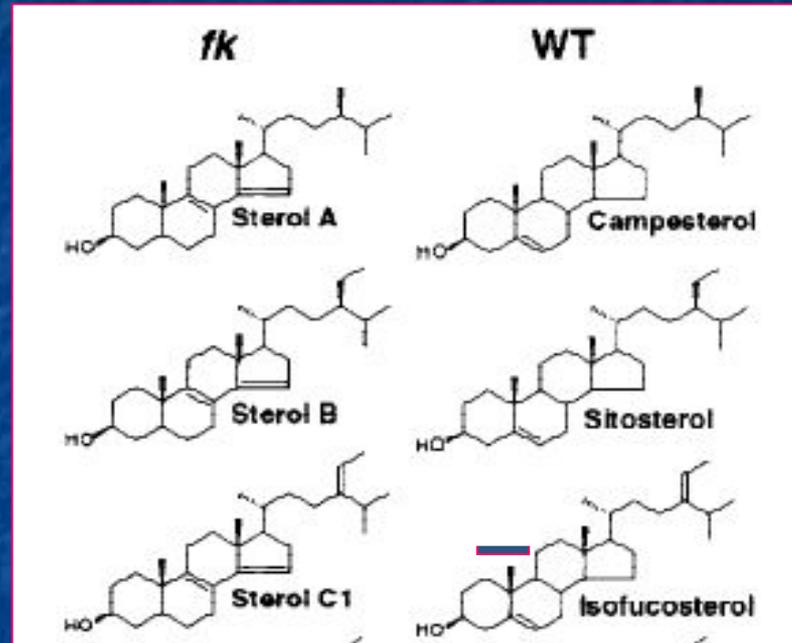
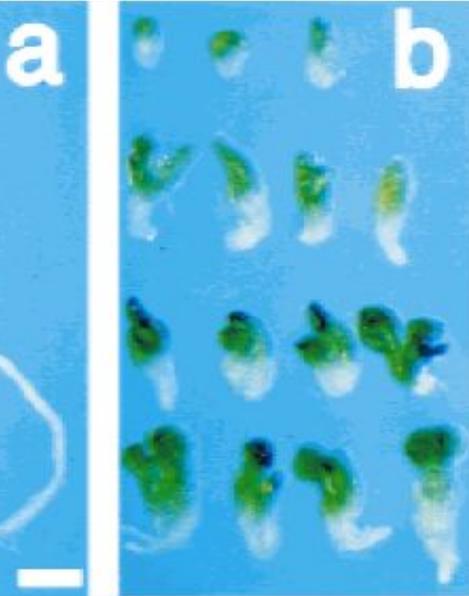
**Направление деления  
клеток**

# Гены- регуляторы развития центрального домена зародыша

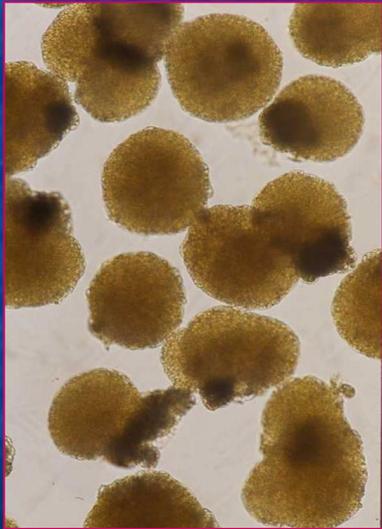
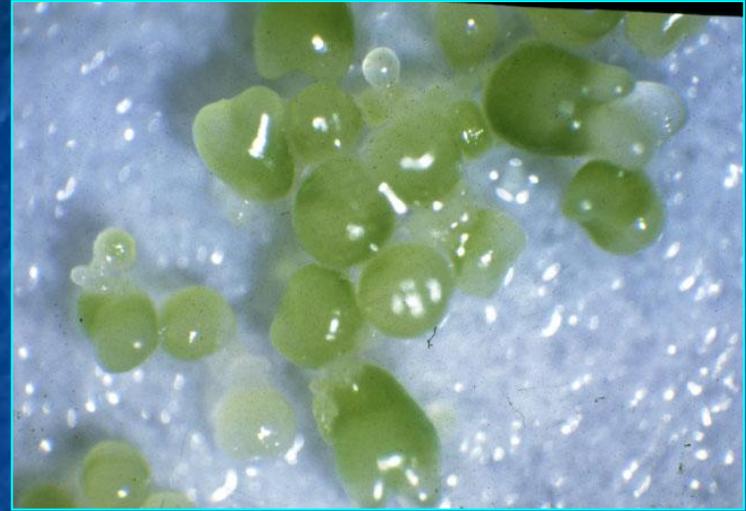
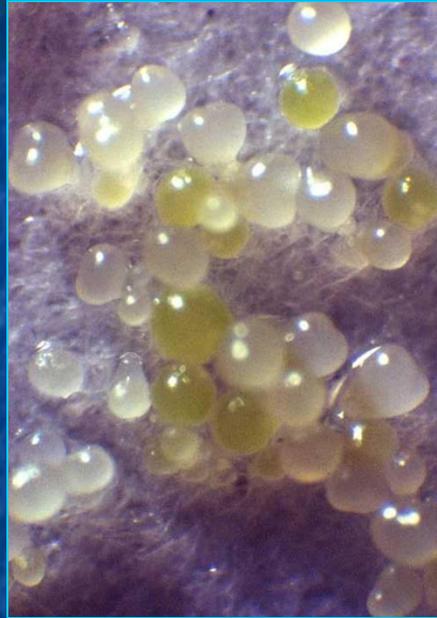
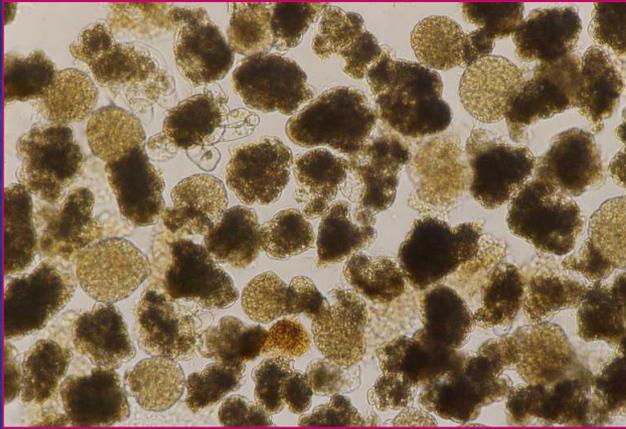
*fk (fackel),  
hyd (hydra),  
cephalopod (cph)*

редукция гипокотиля + нарушение биосинтеза стероидов

WT

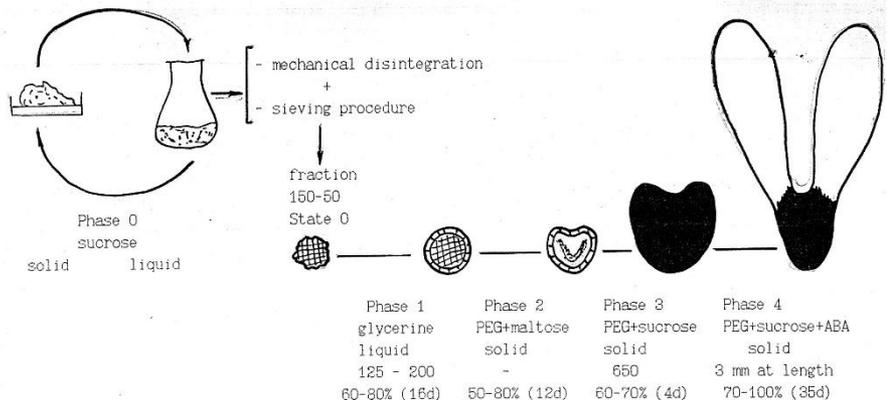
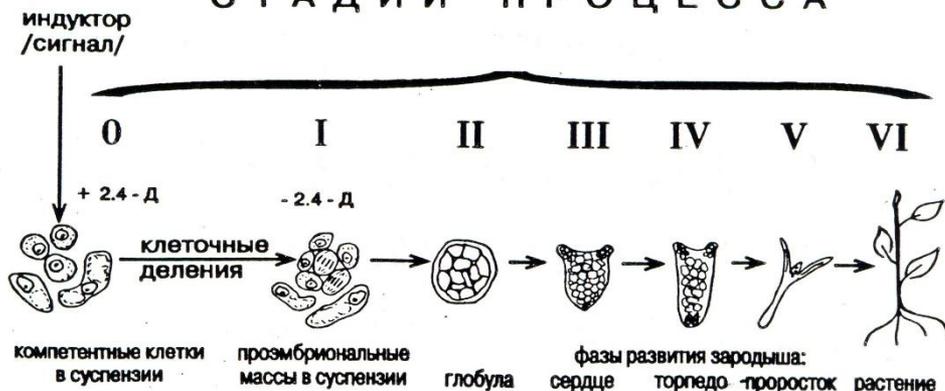


Соматический эмбриогенез – модель для изучения механизмов эмбриогенеза *in vivo*



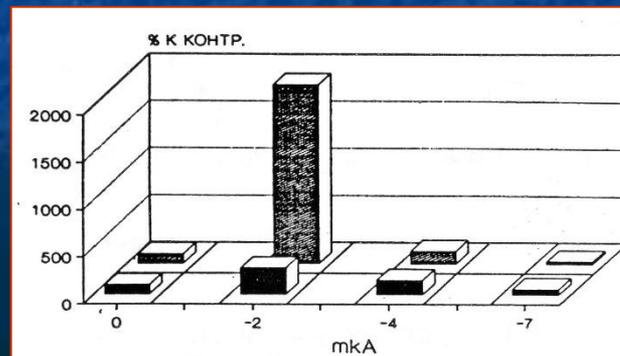
# Соматический эмбриогенез этапы и факторы

## СТАДИИ ПРОЦЕССА



Содержание глобулярной (Г) и филаментной (Ф) форм актина в эмбрионной и неэмбрионной суспензии моркови

Суспензии	Содержание актина				
	общий актин, мкг/мг белка	%	мономерный Г-актин, мкг/мг	полимерный Ф-актин, мкг/мг	%
0.063 эмбрионная (стадия 1)	9,9±0,42	1,0	2,3±0,17	7,6±0,17	76,0
0.063 неэмбрионная (стадия 0)	82±0,46	0,8	4,6±0,29	3,2±0,29	3,0



## Этап 2. Покой и прорастание семян

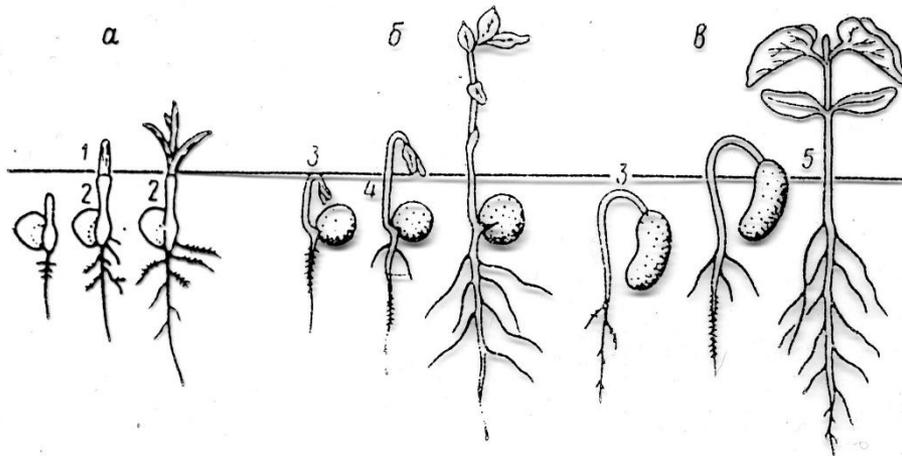


Рис. 3.4. Особенности прорастания семян кукурузы (а), гороха (б) фасоли (в).

1 — coleoptиль, 2 — мезокотиль, 3 — крючок, 4 — эпикотиль, 5 — гипокотиль.

**Прорастание: NB – вода.**

Активируются гидролазы – за счет ГК (L-amy12 – в промоторной области имеется GARE.

ИУК - активирует  $H^+$ -помпу.

Первым появляется корешок.

**Покой семян:** АБК, этилен. В состоянии покоя могут выдерживать –  $196^{\circ}C$  (криохранение семян).

**Виды покоя семян:**

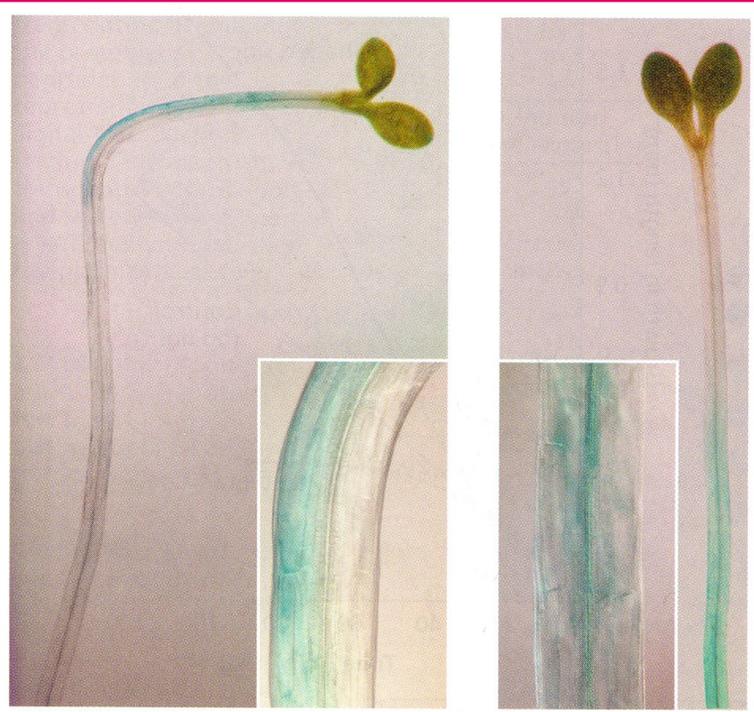
- **вынужденный** – внешние факторы (недостаток  $O_2$ ,  $H_2O$ ). До нескольких тысяч лет. Преодоление – скарификация.

- **физиологический** – внутренние факторы (АБК, фенольные соединения). Преодоление – стратификация.

Светозависимые семена – для выхода из покоя - фитохромы.

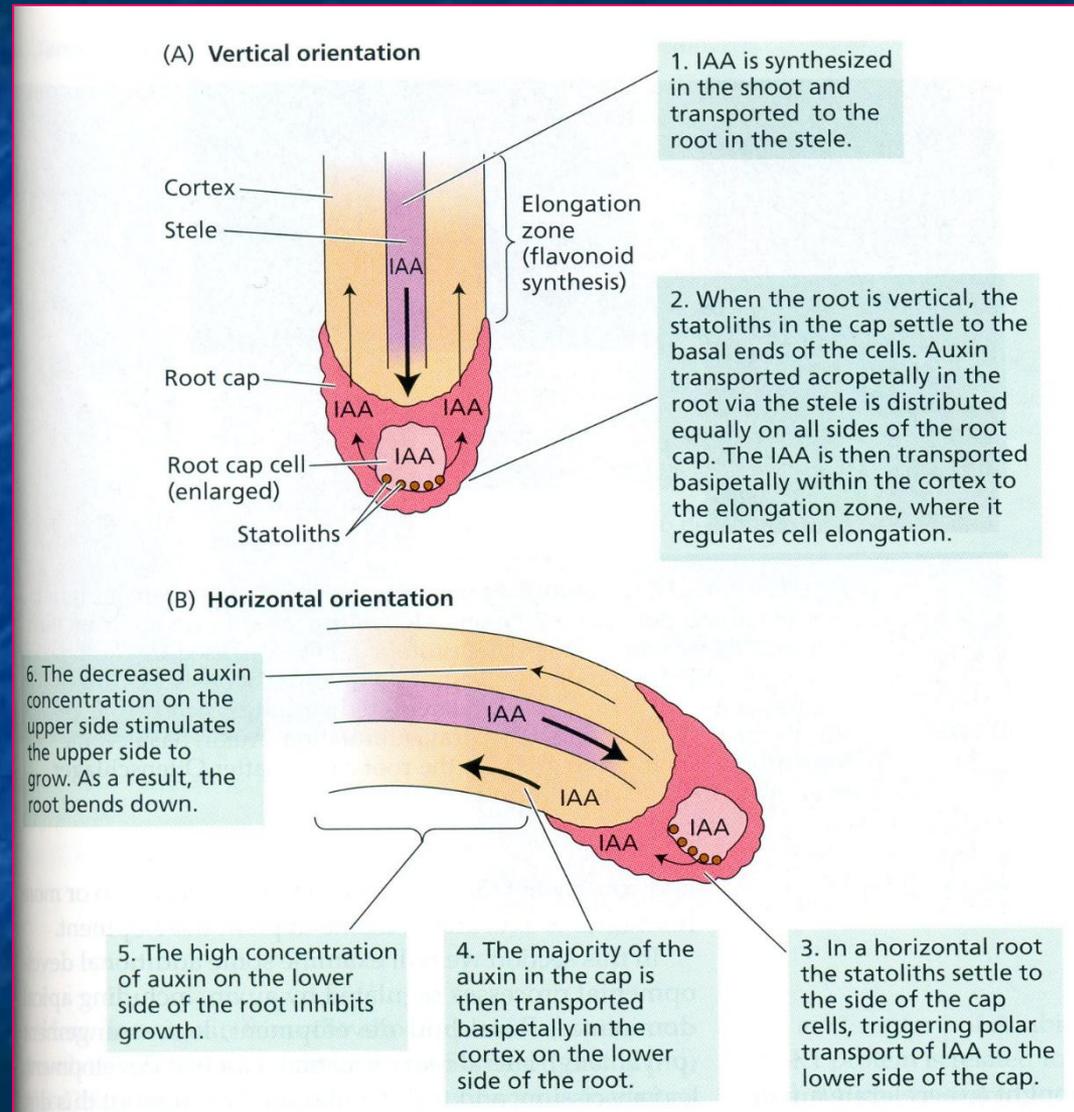
Яровизация – для двулетников обязательна

# Гравитропизм и фототропизм - неравномерное распределение транспортеров ИУК

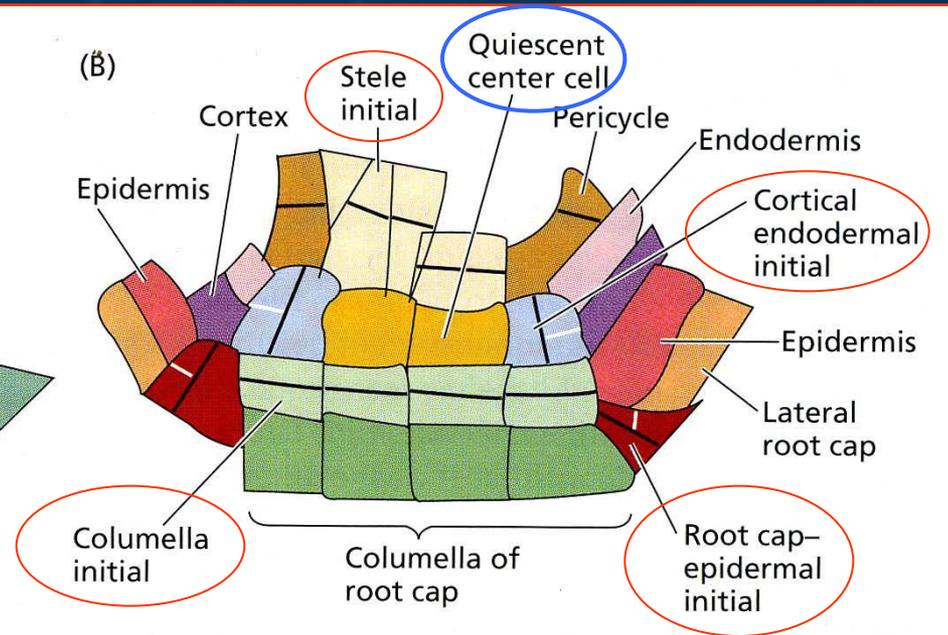
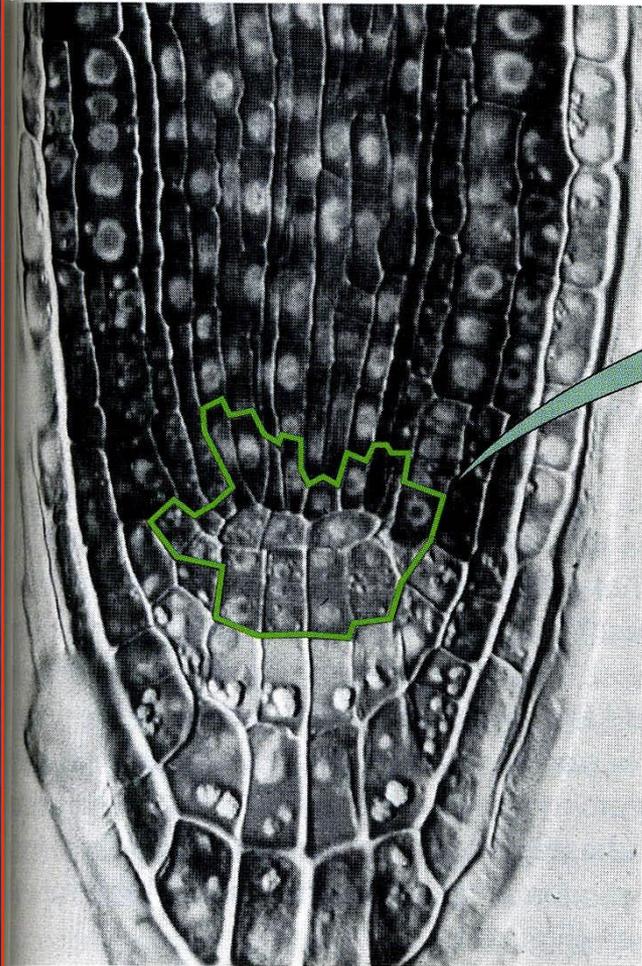


**Основа действия - изменения латерального транспорта ауксинов.**

**Но – при преграде – механическое давление – образование этилена – переориентация микротрубочек – изменение полярности делений – рост в толщину и «раздвигание» почвы.**

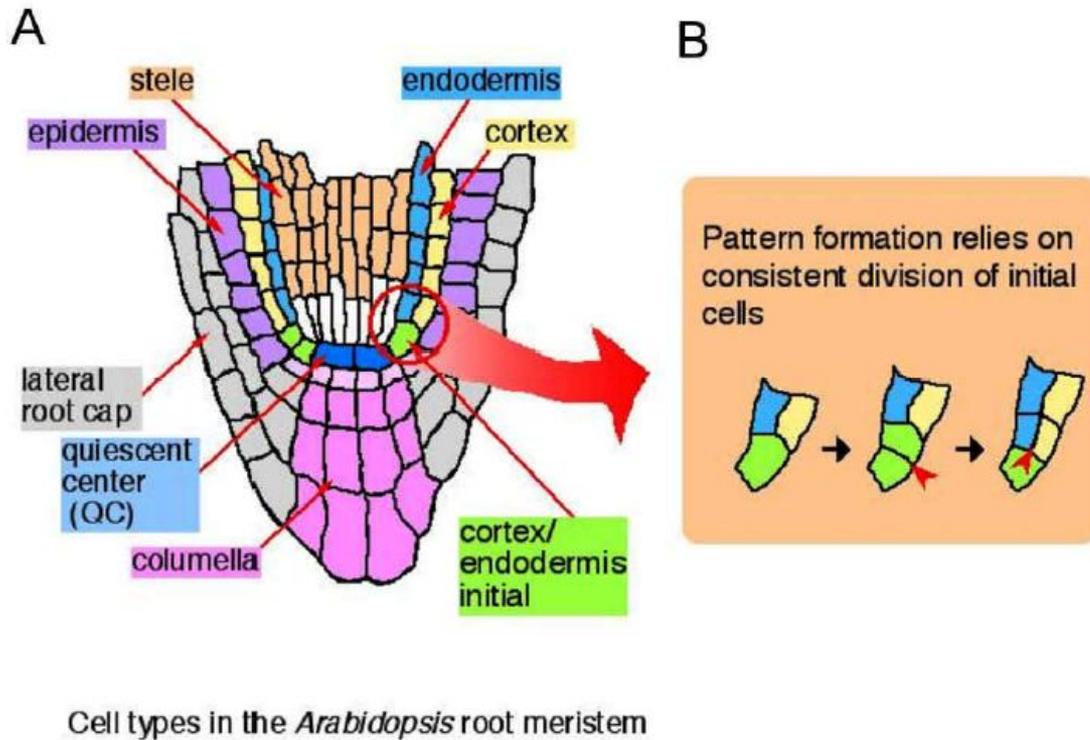


# Что важно при формировании тканей корня – «история» или «позиция»?



**Ткани корня формируются из 4 типов инициальных клеток. Значит, важна «история»?**

## И все же главное – «позиция»...



«История» тканей: 4-е инициальные клетки:

1. Кора/эндодерма
2. Стела (перицикл/проводящая система)
3. Эпидермис
4. Колумела (корневой чехлик)

И все же основную роль в морфогенезе корня играет позиционный контроль, который определяет специфику дифференцировки.

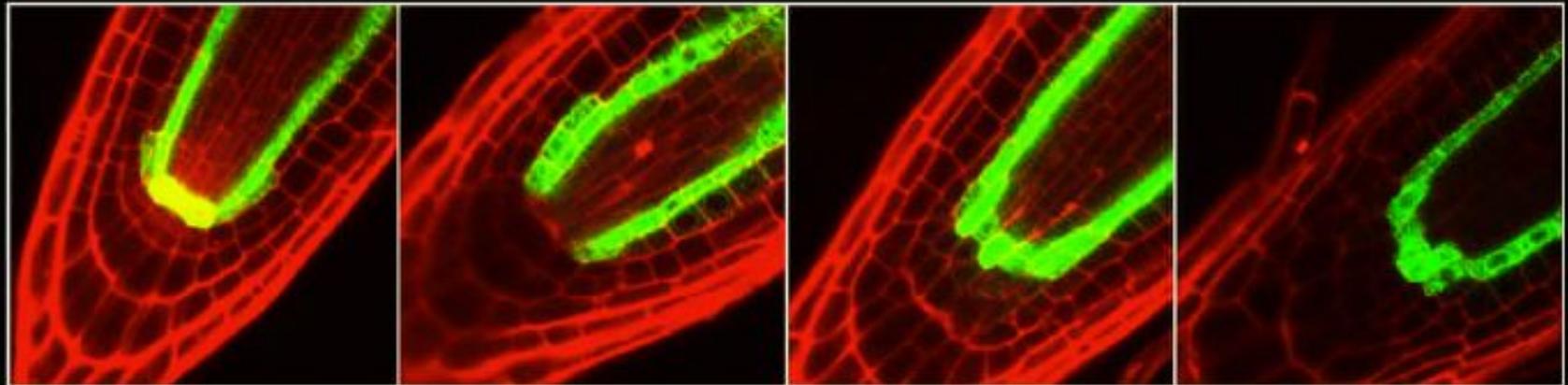
«Убийство» отдельных клеток и анализ мутантов показали, что для дифференцировки «история» клеток и тканей менее важна, чем их позиция.

Позиционные сигналы поступают из уже дифференцированных клеток. Клетки, которые контактируют с покоящимся центром, поддерживаются в дедифференцированном состоянии.

## Позиционный контроль – основной механизм развития корня

**«Убийство» лазером  
покоящегося центра и его  
последующее восстановление  
за счет клеток колумеллы.  
(*SCARECROW* промотор слитый  
с GFP).**

**Формирования нового QC не  
происходит у мутантов по  
транспорту ауксинов или AUX  
/ IAA – белкам.**



0 days

1 day

3 days

5 days

## Роль ауксина и покоящегося центра в развитии корня

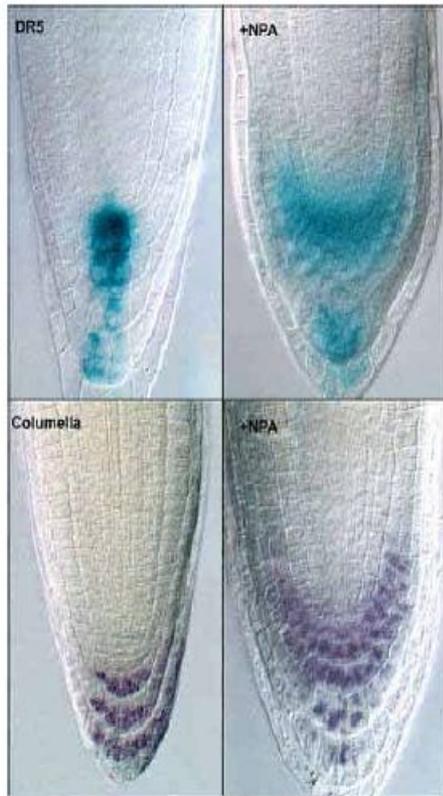
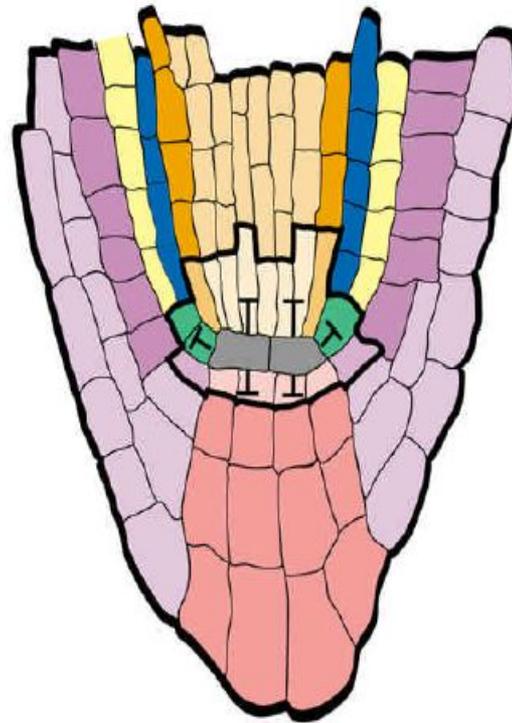


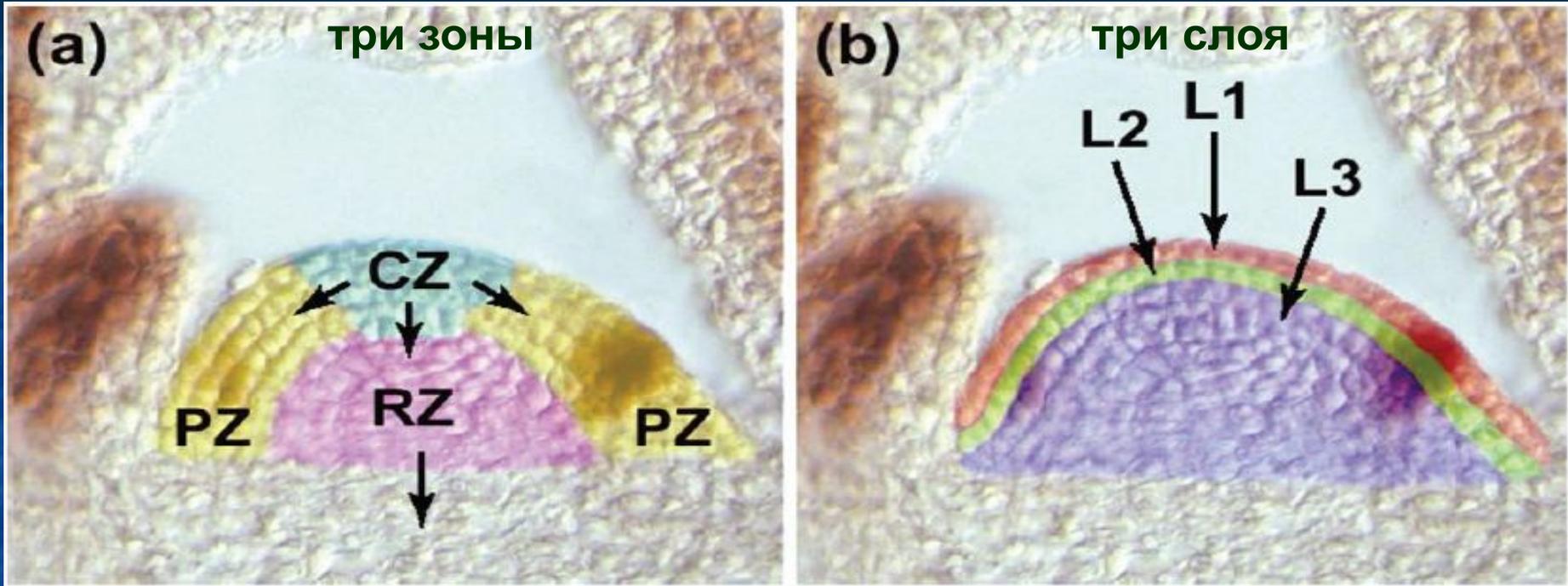
Figure 7A. The synthetic auxin response element DR5::GUS marks the distal-most cells of the root tip, and its location is changed dramatically by the addition of polar auxin transport inhibitors such as naphthylphthalamic acid (NPA). Treatment with NPA also changes the size and shape of the columella root cap domain, visualized here by their characteristic starch granules.

Figure 7B. Model for maintenance of stem cells that surround the quiescent center by short-range signals that suppress progression of cell differentiation.



- Клетки покоящегося центра ингибируют дифференцировку окружающих клеток.  
**Стволовые клетки?**
- Формирование меристемы контролируется балансом между сигналами, ингибирующими дифференцировку и сигналами, определяющими «судьбу» клетки, поступающими из уже дифференцированных клеток.

# Структурно и функционально различные зоны меристемы побега (АМП)



**CZ** – центральная зона - флоральная меристема или меристема ожидания.  
- Область недифференцированных клеток, которые медленно и с постоянной скоростью делятся, обеспечивая постоянство развития.

**Стволовые клетки?**

**RZ (Rib zone)** – стержневая или колончатая меристема

**PZ** - периферическая зона - латеральная или органогенная меристема  
- Дочерние клетки **CZ**. Скорость и направление делений клеток **PZ** не постоянно; клетки способны к дифференцировке

**L1 + L2** – туника, **L3** – корпус -

АМП большинства цветковых растений ~ 800-1200 клеток, у арабидопсис - 50-70

# Генетический контроль структуры и функции АМП («классическая генетика»)

Выявлены два класса мутантов, имеющих альтернативный фенотип:

мутанты с  
увеличением размера АМ  
(*clv1*, *clv2*, *clv3*, *fas1*, *fas2*)



wild type



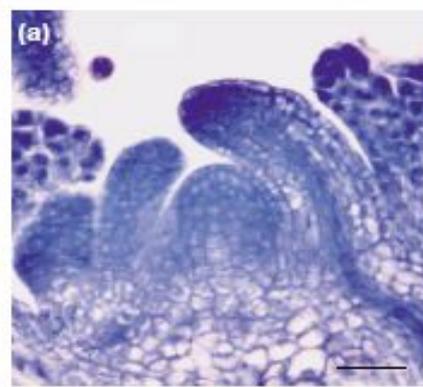
*clv1*



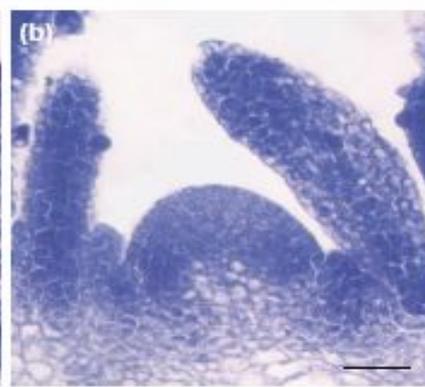
*WUS*



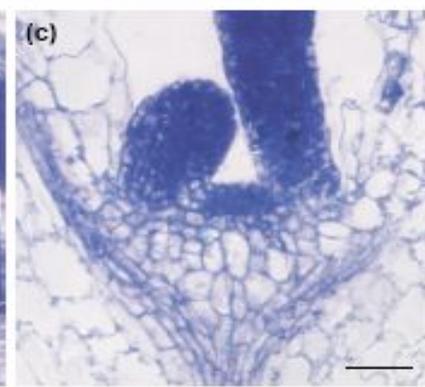
*stm*



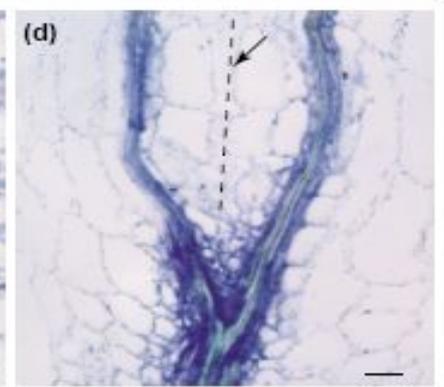
WT



*clavata1*  
(*clv1*)

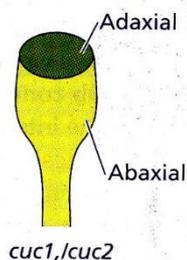
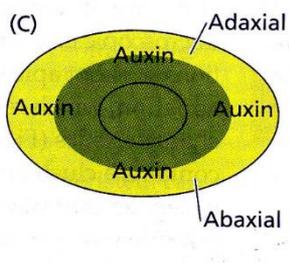
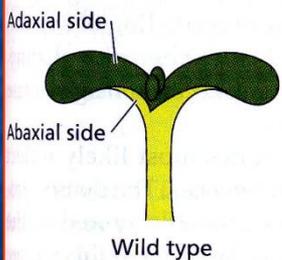
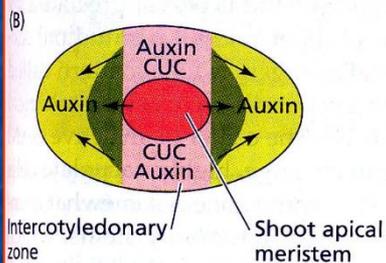
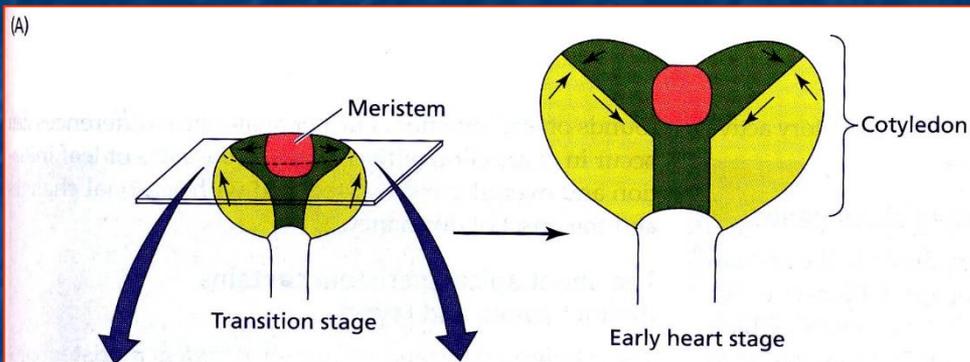


*wuschel*  
(*wus*)



*shootmeristemless*  
(*stm*)

# Ауксин играет ключевую роль и в формирование побеговой апикальной меристемы и билатеральной симметрии

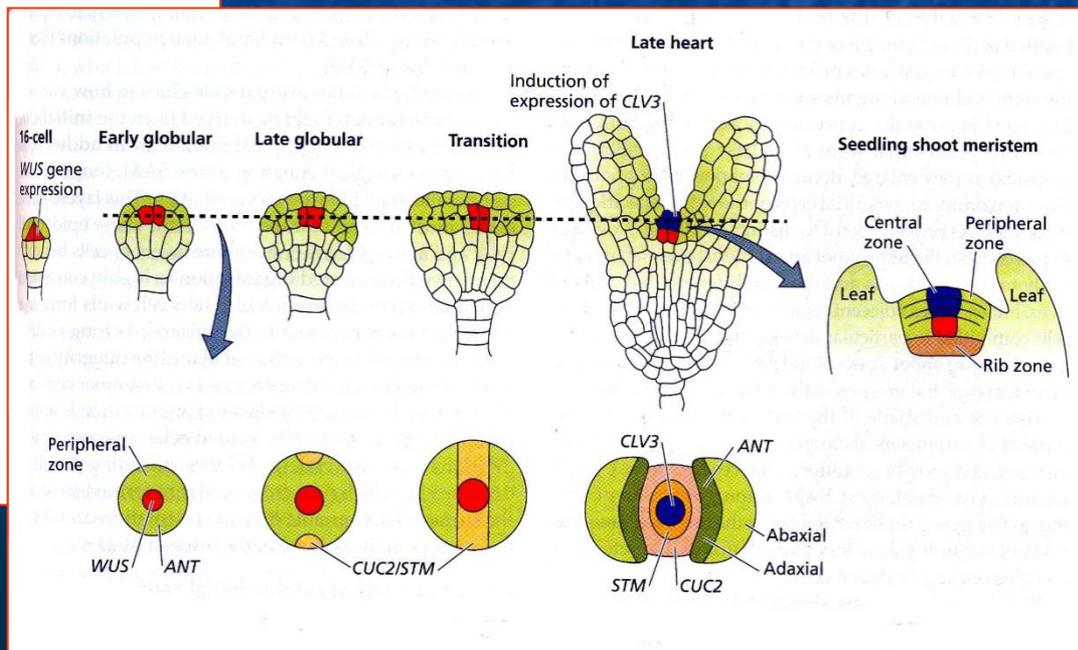


## CUP-SHAPED COTYLEDON

(«чашевидные семядоли»)

(CUC) 1,2,3 – гены, кодирующие три близких трансфактора.

CUC влияют (тормозят) транспорт ауксина.



# Развитие побега и работа апикальной меристемы

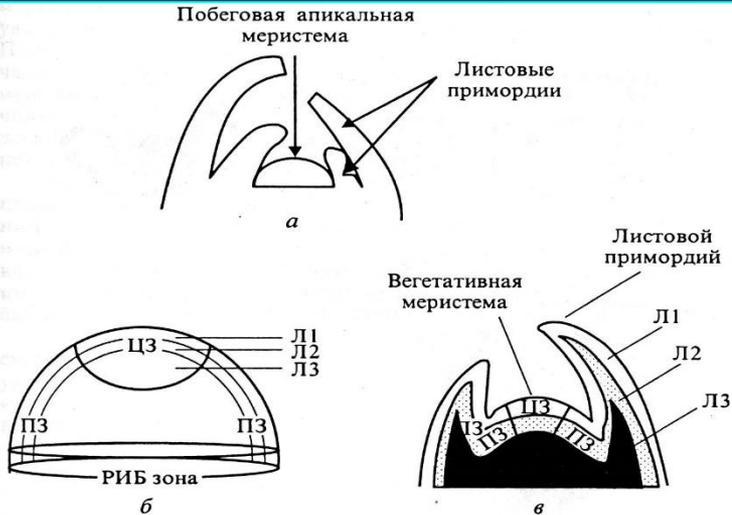


Рис. II.8. Структура апекса и побеговой апикальной меристемы.

*а* — апекс, включающий побеговую меристему и листовые примордии; *б* — зоны и слои побеговой апикальной меристемы; ЦЗ — центральная зона; ПЗ — периферическая зона; РИБ зона; Л1, Л2 — туника; Л3 — корпус; *в* — организация вегетативной меристемы.

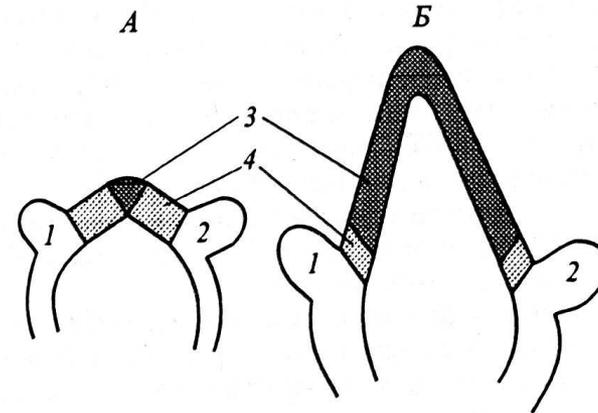
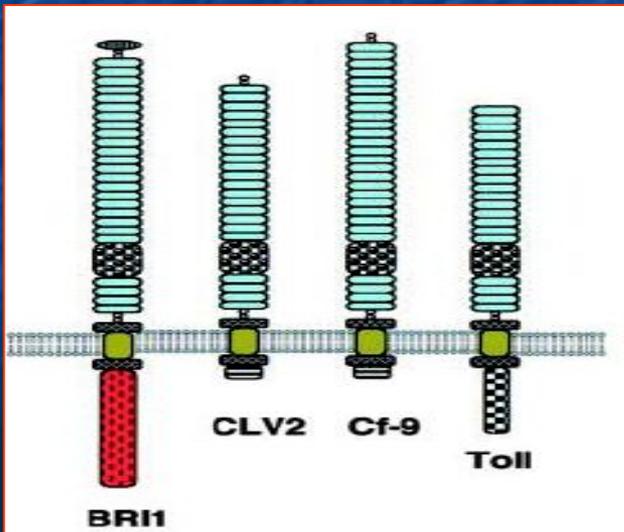


Рис. II.11. Строение побеговых апикальных меристем (ПАМ).

*А* — дикий тип; *Б* — мутант *clv*; 1, 2 — листовые зачатки; 3 — недифференцированные стволовые клетки; 4 — район формирования органов проростка.



**STM** – поддержание стволовых клеток SAM в недифференцированном состоянии

**WUS** - поддержание клеточных делений в SAM

**CLV-1** – формирование органов и тормоз делений; имеет LRR участок из повторяющихся лейцин-обогащенных фрагментов из 24 а-к. на N-конце

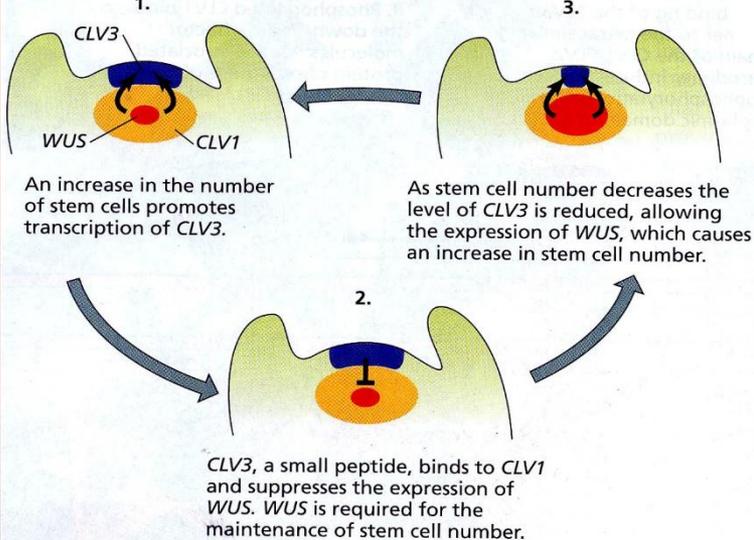
**ZLL** (ZWILLE, «рогатка») – организация SAM.

**STM** и **CLV-1** – антагонисты. Баланс между ними регулирует соотношение дифференцированных и недифференцированных клеток в ответ на эндо- и экзогенные факторы.

**WUS** регулируется как **STM**, так и **CLV-1**

# Развитие SAM регулируется по типу отрицательной обратной связи

## Stem cell autofeedback loop



1. Трансфактор, кодируемый геном *WUS*, активирует деление клеток апекса стебля. Увеличение числа клеток апекса стебля увеличивает транскрипцию *CLV3*.

2. *CLV3*, маленький пептид, может легко транспортироваться, связывается с *CLV1*, что подавляет экспрессию гена *WUS*, который необходим для поддержания клеток апекса стебля

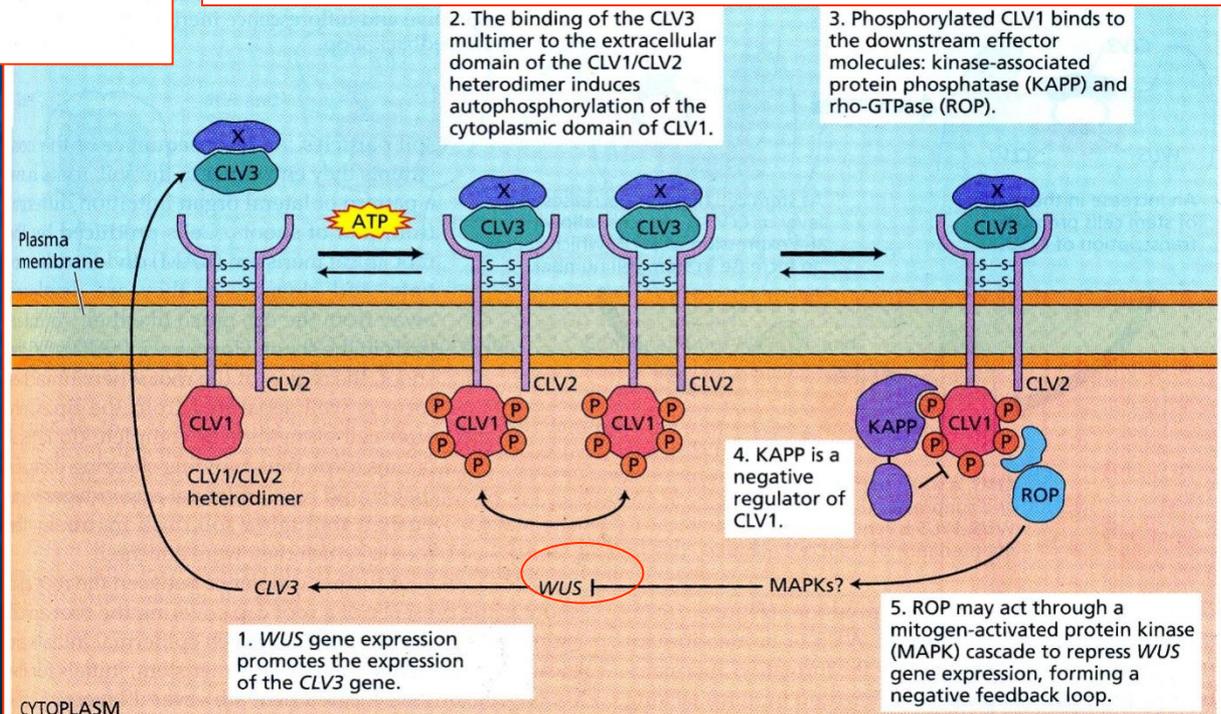
3. В результате число клеток апекса стебля уменьшается, что приводит к снижению уровня *CLV3*, что вызывает увеличение экспрессии *WUS*, что активизирует деление клеток апекса стебля.

**WUSCHEL (*WUS*)** – дурачок, юродивый – кодирует трансфактор с гомеодомен-боксом. Активизирует деление клеток SAM. Может напрямую ингибировать экспрессию генов *ARR* (*Arabidopsis Response Regulator*), многие из которых (*ARR5*, *ARR6*, *ARR7*, *ARR15*) участвуют в петле отрицательной регуляции цитокининового сигналинга

**CLAVATA (*CLV*) 1,2,3**, - функционально связанные гены. *CLV1* – LRR киназа, *CLV2* – LRR-белок.

***CLV3*** – небольшой (11 kDa) водорастворимый белок.

**KAPP** – фосфатаза.



## Система WOX - CLE

**WOX = WUSCHEL related homeobox OX – семейство белков – гомеодомен-содержащие трансфакторы (ТФ), более 30.** ТФ WOX можно разделить на три клады:

- древнюю, или WOX13 - кладу (WOX10, 13 и 14), - у всех растений начиная с зеленых водорослей,
- промежуточную, или WOX9-кладу (WOX8, 9, 11 и 12), впервые появляются у плаунов,
- современную, или WUS-кладу (ТФ WUS и WOX1-7) – только у семенных растений.

ТФ WOX современной ветви могут быть как активаторами так и репрессорами

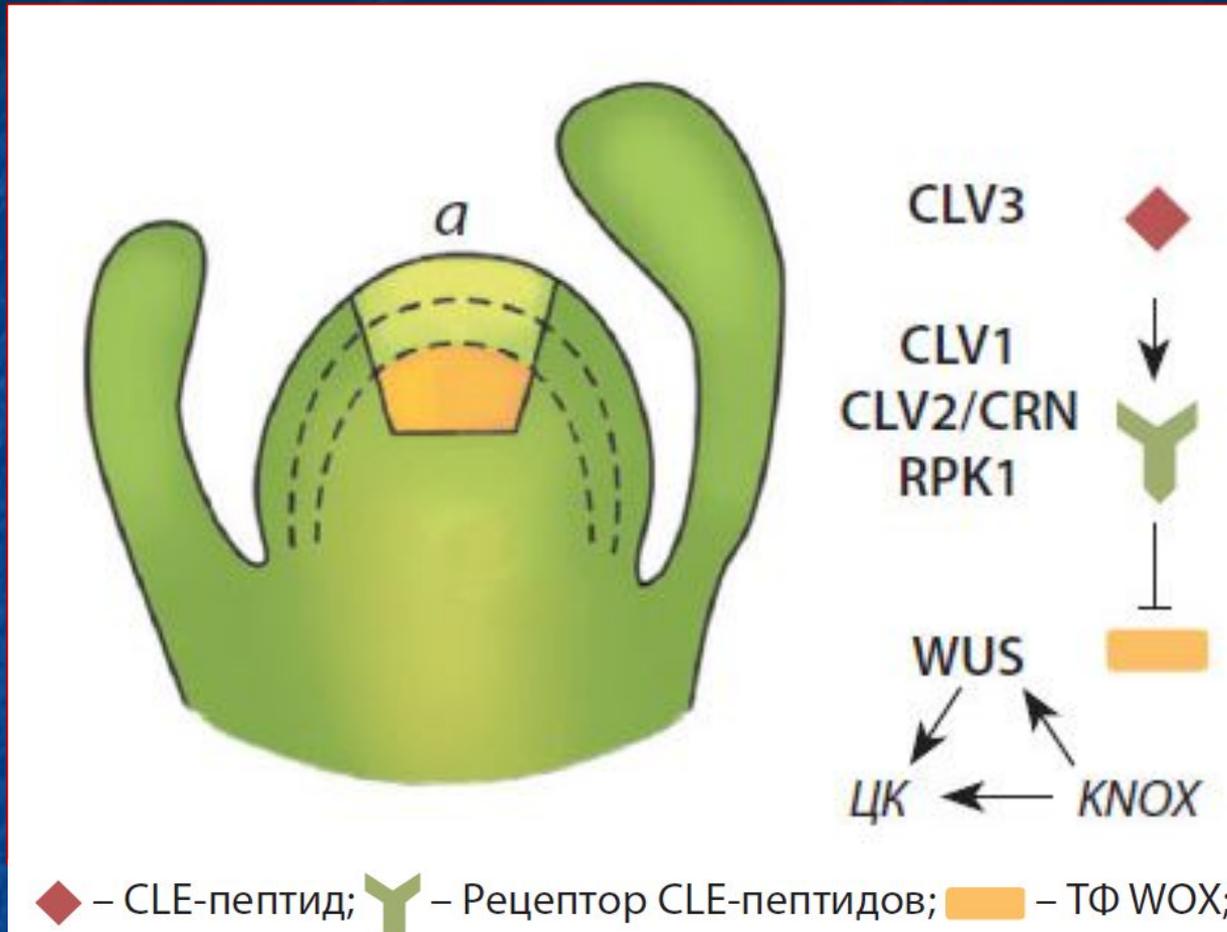
**В меристемах корня и побега – поддержание дедифференцированного состояния.**

Часто работают в паре с их кофакторами - ТФ НАМ (Hairy Meristem), относящиеся к семейству GRAS. Для каждой из меристем характерен свой узкоспецифичный ТФ группы НАМ: в АМП - НАМ1, взаимодействующий с WUS, в АМ корня – НАМ2, специфично связывающийся с WOX5, в камбии – НАМ4, взаимодействующий с WOX4..

**CLE**-белки – семейство (минимум, 25 штук) небольших (80 – 120 а-к) регуляторных белков в растениях. У арабидопсиса – 32 гена, у риса – 47. Имеют у С-конца консервативный участок из 14 а-к (CLE-домен) – «визитная карточка» этих белков. Их рецепторы – LRR-RLK. В меристемах – антагонист (выключатель) WOS. (CLV3 – в АМП, АМ корня – CLE40, в прокамбии – TDIF) Делятся на три филогенетические ветви (CLE1 – CLE7, CLE9 – CLE13, CLE41 – CLE44

Любопытно, что CLE-домен есть у нематод, паразитирующих на сое и картофеле – скорее всего для «управления» метаболизмом растения («мимикрия» CLV3?)

# Схема регулирования развития меристемы побега.



## Система WOX - CLE

CLE - CLAVATA3  
(CLV3) /  
ENDOSPERM  
SURROUNDING  
REGION (ESR)  
-related

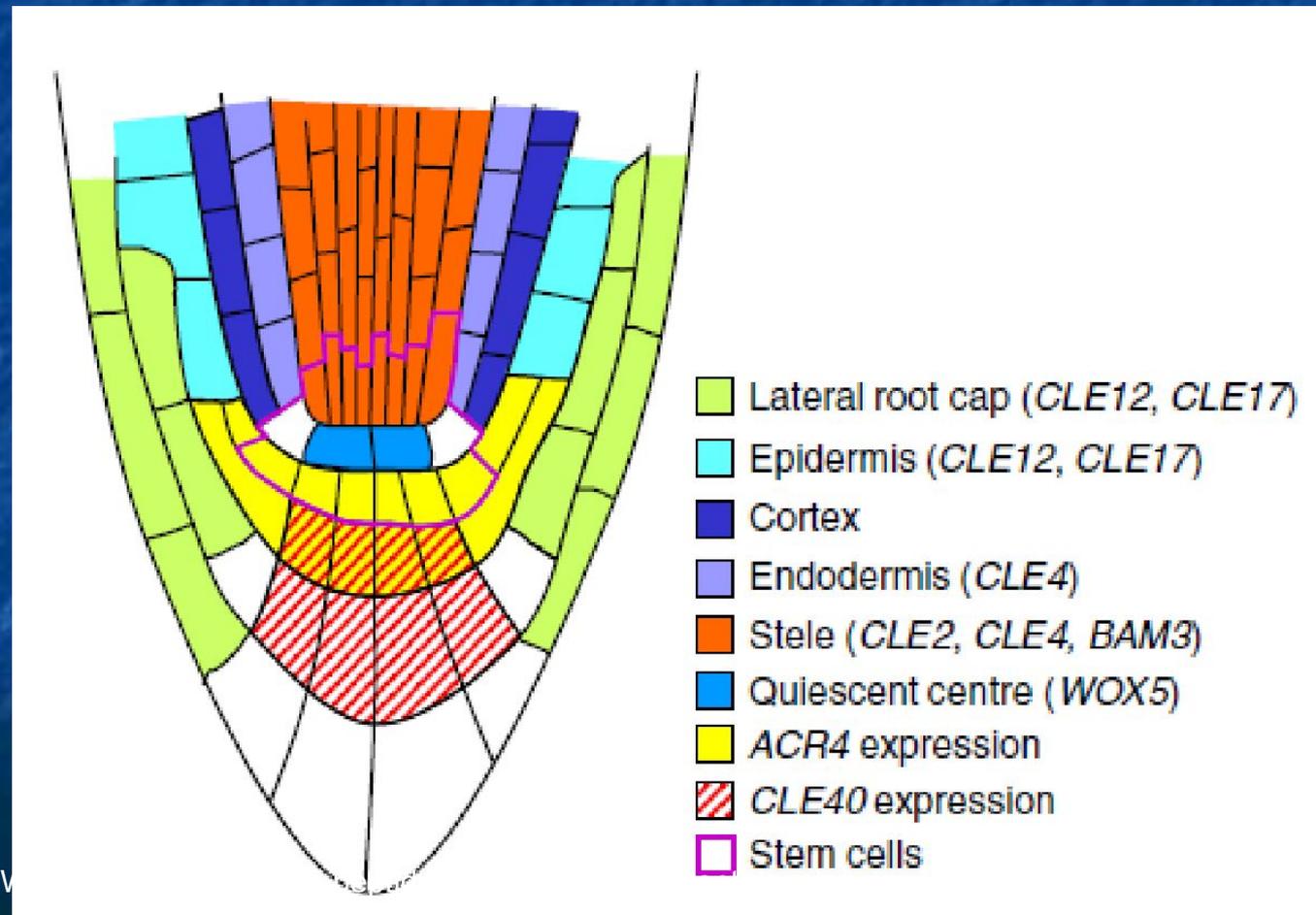
WOX = WUSCHEL  
related homeobOX

Экспрессия гена **WUS** в организующем центре негативно регулируется пептидом **CLV3** при его связывании с рецепторными протеинкиназами **CLV1**, **CLV2/CRN** и **RPK1**. Транскрипционные факторы **KNOX** и цитокинины необходимы для закладки ПАМ в эмбриогенезе и поддержания пролиферации ее клеток в постэмбриональном развитии;

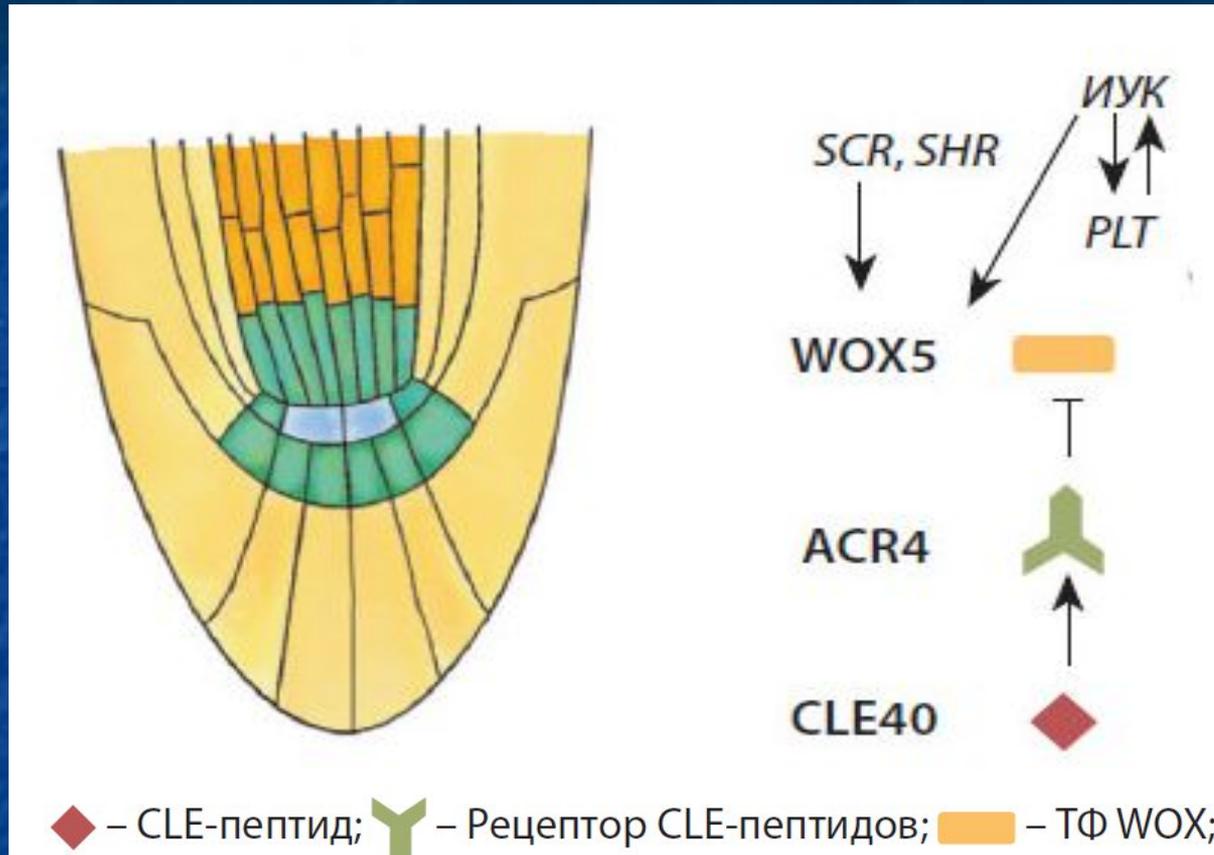
## CLE - пептиды участвуют в определении судьбы клеток меристем

**CLE**-белки – наиболее изученное семейство (минимум, 25 штук) небольших (80 – 120 а-к) регуляторных белков в растениях. Имеют у С-конца консервативный участок из 14 а-к (CLE-домен) – «визитная карточка» этих белков.

Любопытно, что CLE-домен есть у нематод, паразитирующих на сое и картофеле – скорее всего для «управления» метаболизмом растения («мимикрия» CLV3?)



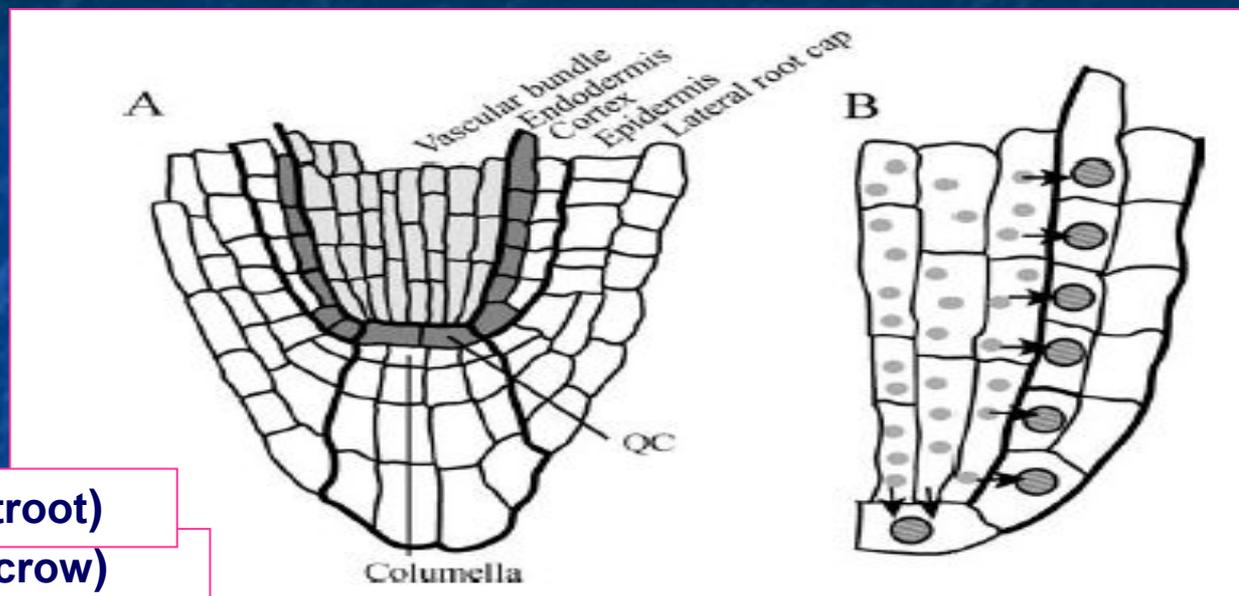
## Схема регулирования развития меристемы корня:



Та же система  
WOX – CLE

Экспрессия гена **WOX5** в организующем центре негативно регулируется пептидом **CLE40** при его связывании с рецепторной протеинкиназой **ACR4**; для закладки организующего центра необходимы ауксины и активность транскрипционных факторов **SCR** и **SHR**, транскрипционные факторы **PLT** необходимы для создания локального максимума концентрации ауксинов

# Распределение факторов транскрипции между клетками определяет радиальное строение корня



SHR (shortroot)

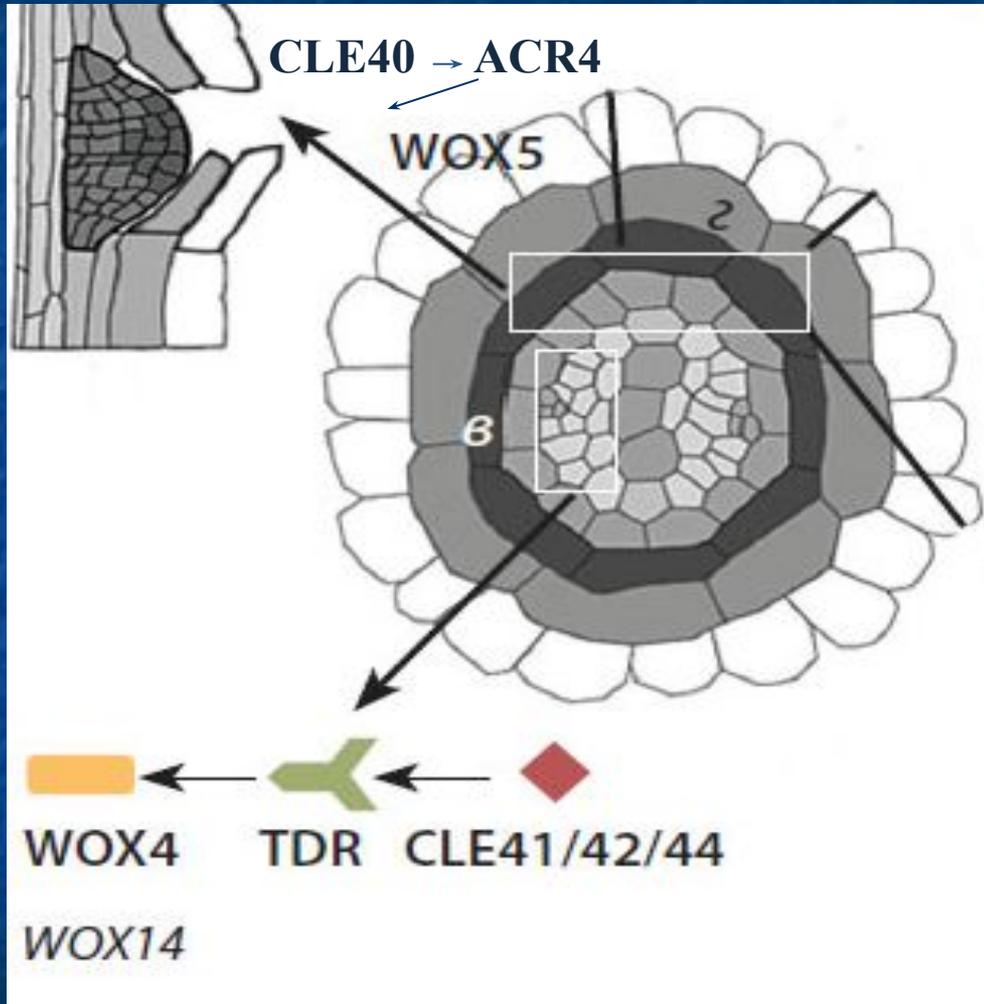
SCR (scarecrow)

область транскрипции  
МРНК

белок *SHR* движется из  
«проводящих тканей» в эндодерму,  
где экспрессируется *SCR*

**SHR** – фактор транскрипции. Регулирует активность **SCR** и участвует в радиальном сигналинге. Эктопическая экспрессия **SHR** – активация клеточных делений и аномальная специализация клеток в коревой меристеме. Основная роль **SHR** – организация сигнал-регулируемых клеточных делений **SCR** («пугало») – фактор транскрипции. Необходим для работы покоящегося центра и работы окружающих его клеток, - для ассиметричных делений клеток при формировании радиальной структуры корня. Необходим для поддержания клеточных делений, но не дифференцировки клеток. Необходим для гравитропизма. Регулирует также радиальную организацию побегов. Связывается с промоторами **MGR**, **NUC**, **RLK** и **SCL3**. Снижает подвижность **SHR** и ограничивает его работу в ядре клеток эндодермы.

# Схема регулирования развития камбиальной меристемы и меристемы бокового корня



Та же система  
WOX – CLE

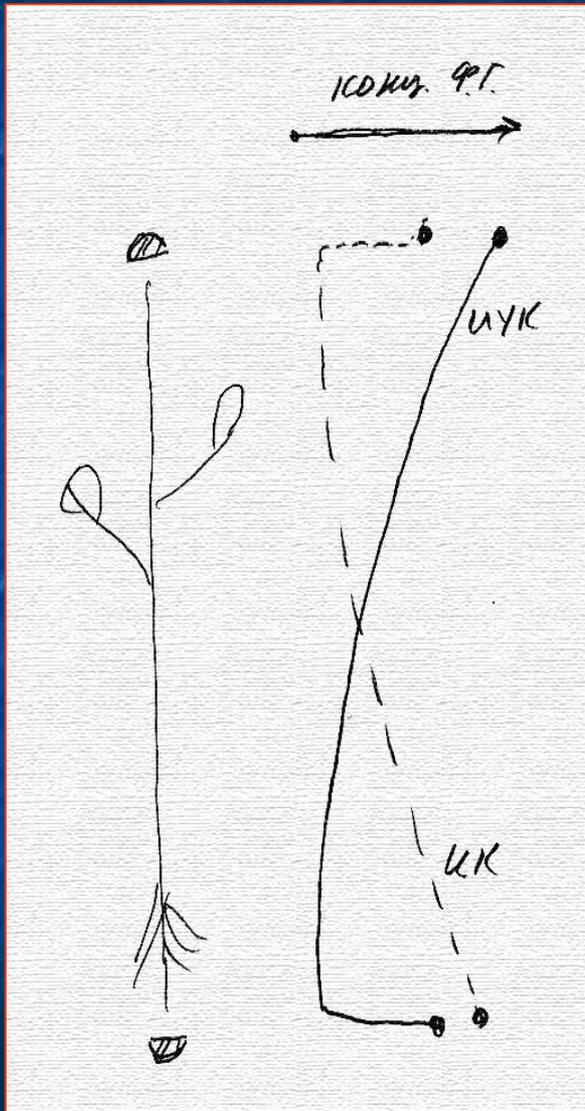
В прокамбии а затем камбии экспрессия гена WOX4 позитивно регулируется пептидами CLE41/42/44 при их связывании с рецепторной протеинкиназой TDR.

Меристемы боковых корней регулируются системой CLE40-ACR4-WOX5

◆ – CLE-пептид; Y – Рецептор CLE-пептидов; □ – ТФ WOX;



### Этап 3. Ювенильный этап развития – «самоускорение» ростовых процессов



С появлением апексов корня и побега и сосудистого камбия начинается полярный транспорт ИУК и ЦК.

**«Плюсовый контур»:**

**Апекс побега → синтез ИУК → транспорт ИУК → активация корнеобразования → синтез ЦК → транспорт ЦК → активация роста побега → Синтез ИУК → ....**

**«Самоускорение» роста за счет положительной обратной связи приводит к накоплению вегетативной массы.**

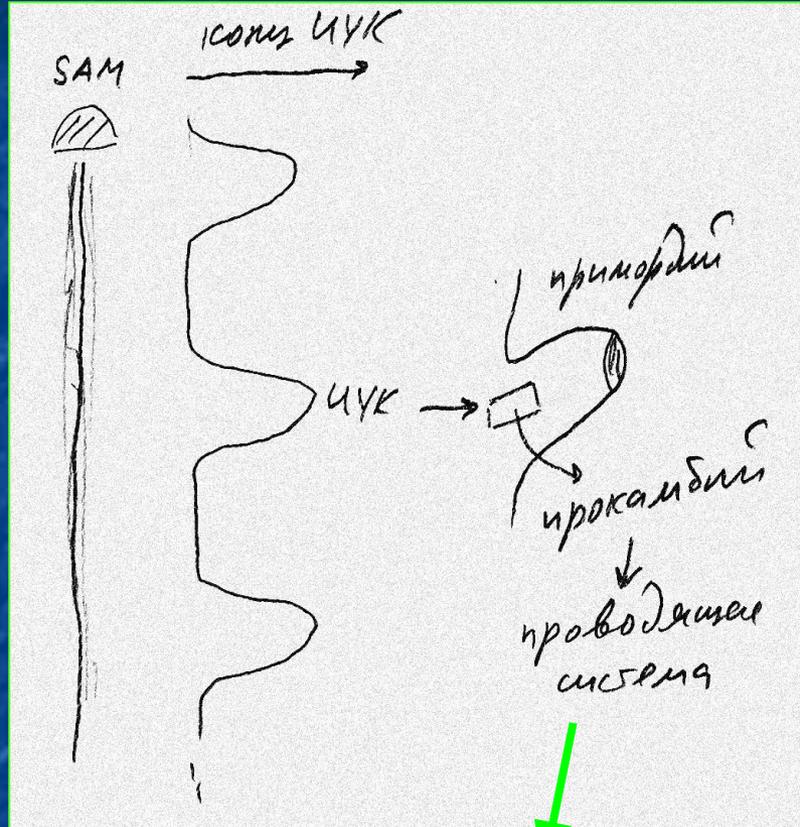
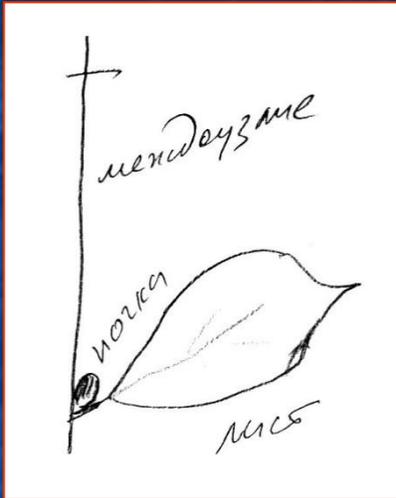
**«Компьютерное» растение.**

**Конечно все не так просто, но все же...**



# Подпрограммы развития: закладка и развитие листа.

Разметка закладки – *knotted*-гены с гомеобоксом у кукурузы, *stm* – у арабидопсиса.



## Подпрограммы развития:

- **закладка и развитие листа**
- **Закладка почки**
- **Рост междоузлия**

Ауксины - формирование сосудистых пучков – как минимум, два гена ARF (*MP* и *NP4*)  
Цитокинины – формирование флоэмы - ген *WOL*

На каллусных культурах:  
ИУК + > 4% сахарозы  
формирование флоэмы  
ИУК + < 2% сахарозы  
формирование ксилемы

«Импульс ауксина – закладка листового примордия.

«Импульс» - за счет распределения PIN3.

ИУК → прокамбий → примордий → проводящая система → поступление ЦК → активация маргинальной и интеркалярной меристем → рост листовой пластинки → синтез ГК → рост листа до нормального размера.

Внешние факторы: фитохромы, криптохромы

## Очаги деления клеток при развитии листа *Arabidopsis*:

Трансгенное растение с *cyclin1At:GUS* репортерным геном. Циклин1At – маркер G2/M фазы клеточного цикла.

C – G - разные срезы на различных стадиях развития листа

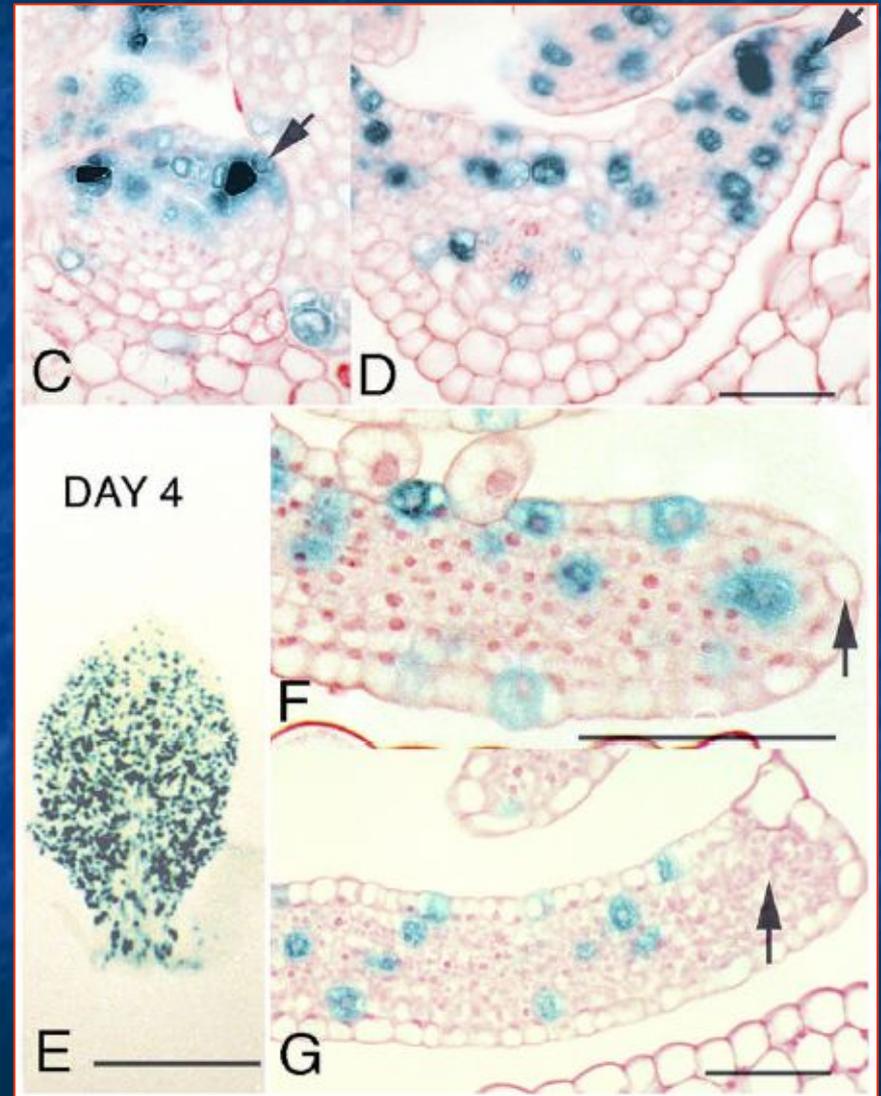
Анализ мутантов:

Процессы **инициации** листа и его **формирования** генетически контролируются **независимо**.

Координированная экспрессия этих двух групп генов определяют время появления определенного типа листа.

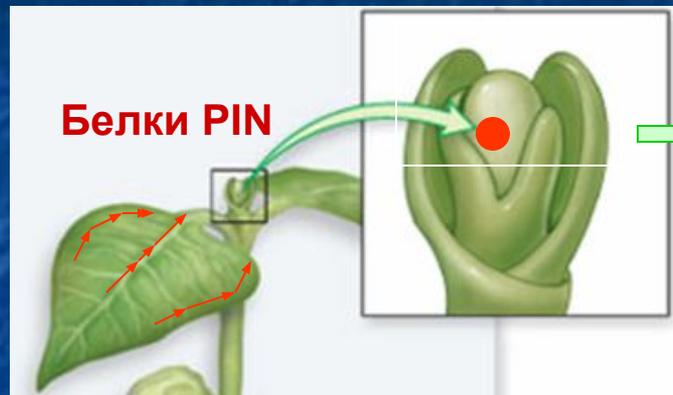
Образование листа начинается с изменений ориентации и скорости делений в L1, L2 и L3 слоях.

**Скорость делений** (определяет размер листа) и **направление делений** (определяет форму листа) также генетически детерминированы **независимо**.



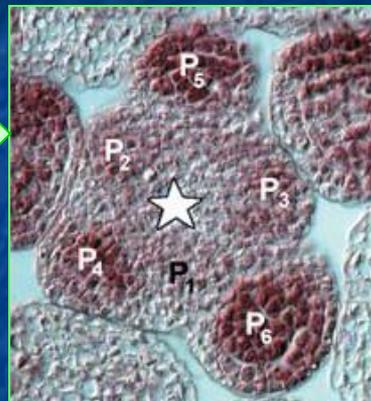
# Ауксины – ключевые регуляторы инициации листа

Транспорт ауксинов в ПАМ



Белки PIN

Локальные максимумы концентрации ауксинов



Рецепция и передача сигнала ауксинов

Синтез ауксинов в молодых листьях

гены H-АТФаз, гены экспансинов

растяжение клеток

изменение направления деления

ген AS2

репрессия генов KNOX

дифференцировка клеток

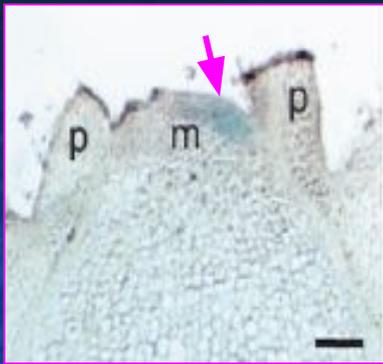
ТФ ARF (Auxin Response Factors)

???

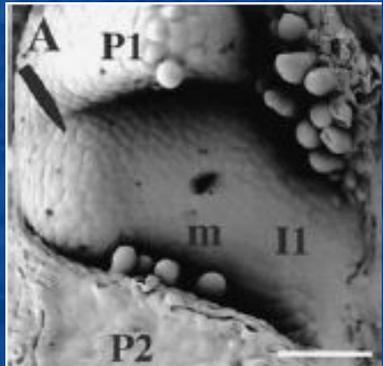
ограничение зон экспрессии AS и ANT

отделение примордиев от ПАМ

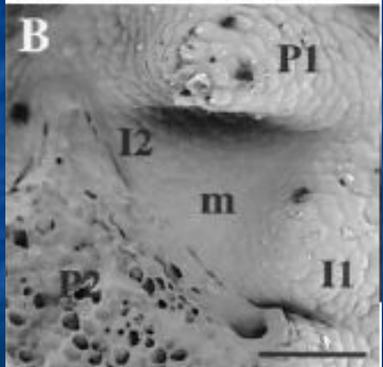
Ауксины стимулируют закладку листьев через активацию мембранных H-АТФаз и экспансинов



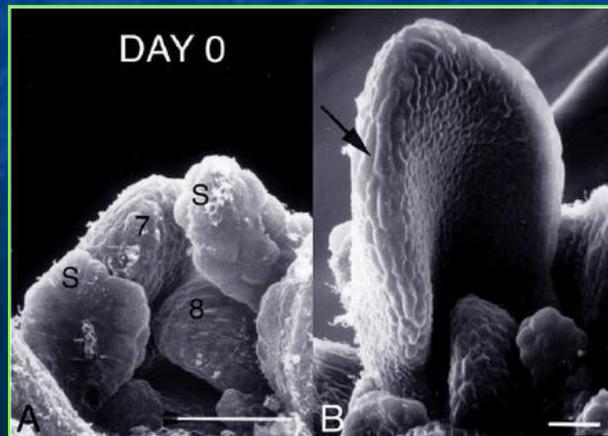
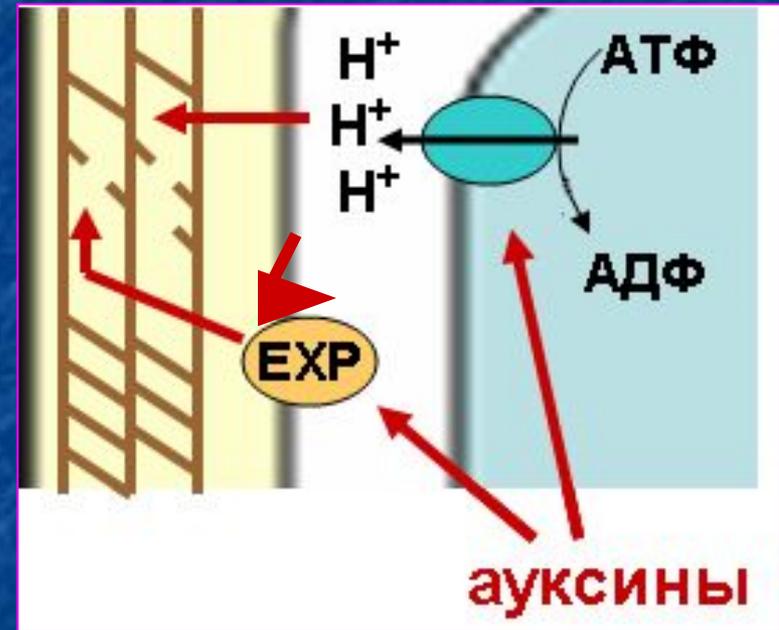
Локальная индукция экспрессии гена *EXP1*



Закладка листовых примордиев



Формирование листьев



Ранние стадии развития листьев *Arabidopsis*. Развитие примордия восьмого листа. Также показаны седьмой лист и прилистники (S) предыдущих листьев. Для закладки опять же важно распределение ауксинов, определяемое неравномерным распределением PINов..

## Гомеозисные гены

**Гомеозисные гены** — гены, определяющие процессы роста и дифференцировки в организме. Кодируют транскрипционные факторы, контролирующие программы формирования органов и тканей. Мутации в гомеозисных генах могут вызвать превращение одной ткани или органа в другую.

У высших растений наиболее хорошо изучены два типа генов-регуляторов развития: гомеобоксодержащих и генов с **MADS-боксом**

### Гены, содержащие гомеобокс

Имеют характерную последовательность ДНК – гомеобокс (около 180 пн)), кодирующей гомеодомен— консервативный участок ряда транскрипционных факторов..

Первым клонированным геном растений был **KNOTTED1 (KN1)** кукурузы. У мутантов **kn1** вокруг уже дифференцированных клеток листа появляются группы делящихся клеток, расположенные вдоль сосудистых элементов, которые образуют «узлы» (**knots**). Позднее было обнаружено целое семейство генов, подобных **KN1**, названное **KNOX (KNOTTED1-like HOMEBOX)**. Сверхэкспрессия генов семейства **KNOX** также искажает развитие листа.

Среди **KNOX**-генов растений - гены, регулирующие деятельность апикальной меристемы побегов и развитии листьев: **KN1** и **RS1** у кукурузы, **KNAT1**, **KNAT2** и **STM** у *Arabidopsis thaliana*

Гены **KN1**, **STM** и их функциональные аналоги отвечают за поддержание деления клеток меристем, репрессирова их дальнейшую дифференцировку.

### Гены, содержащие MADS-боксы

Термин «**MADS-боксы**» образован начальными буквами четырёх генов: **MCM1** дрожжей, **AG** арабидопсиса, **DEF** львиного зева и **SRF** млекопитающих. К генам, содержащим **MADS-боксы**, относятся, в частности, **AG (AGAMOUS)**, **DEF (DEFICIENCE)**, **AP1 (APETALA1)** и **AP3 (APETALA3)**, **TFL1 (TERMINAL FLOWER)**, **PI (PISTILLATA)**.

Гены этого типа регулируют флоригенез и определяют судьбу клеток в семяпочке; их экспрессия выявлена в зародыше, корнях и листьях. К **MADS-боксы**-генам относится большинство гомеозисных генов растений, в частности гены идентичности органов цветка.

***KNOX (Knotted-like homeobox)* гены, активирующиеся при развитии листа и форма листьев при их эктопической (смещенной) экспрессии**



***WUS***



***CLV3***



***CUC1*  
*CUC2***



***STM*  
*KNAT1***



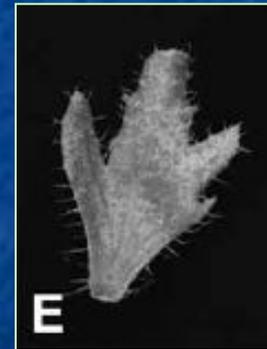
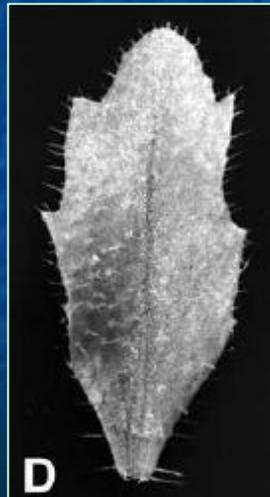
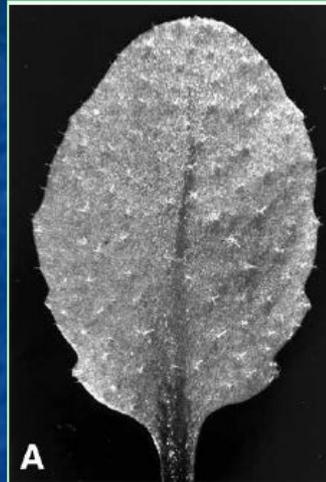
***AS1***



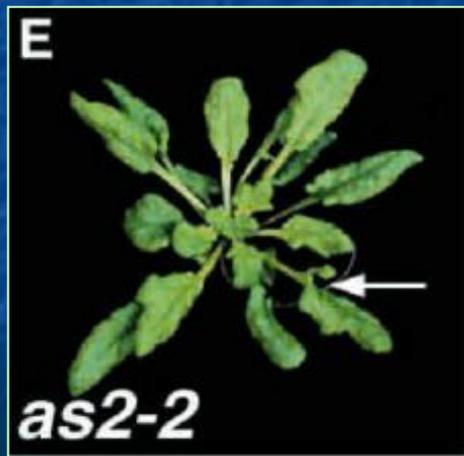
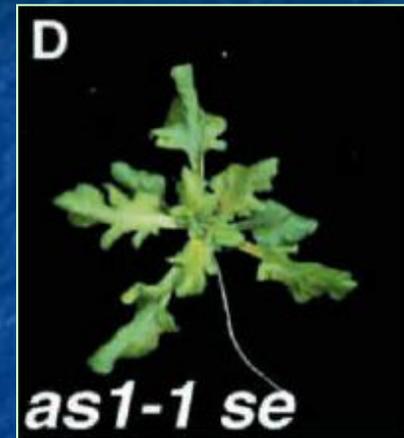
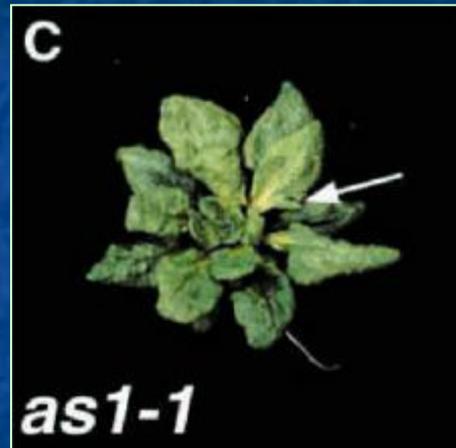
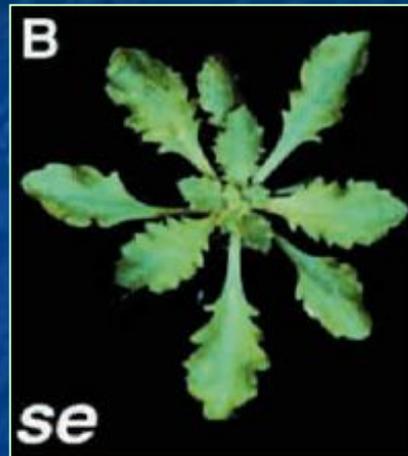
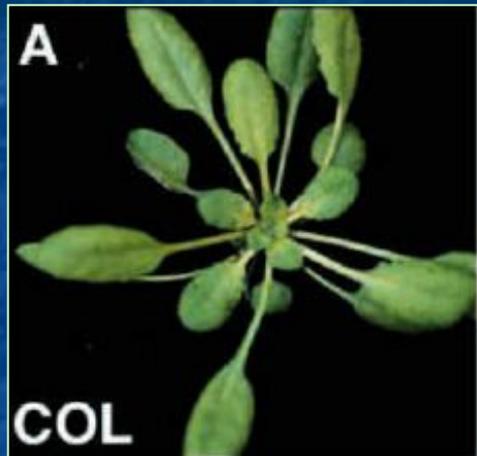
***FIL1*  
*YABBY*  
*KAN1***



***PHB*  
*PNH***



# Форма розеточных листьев у мутантов по *KNOX* - генам

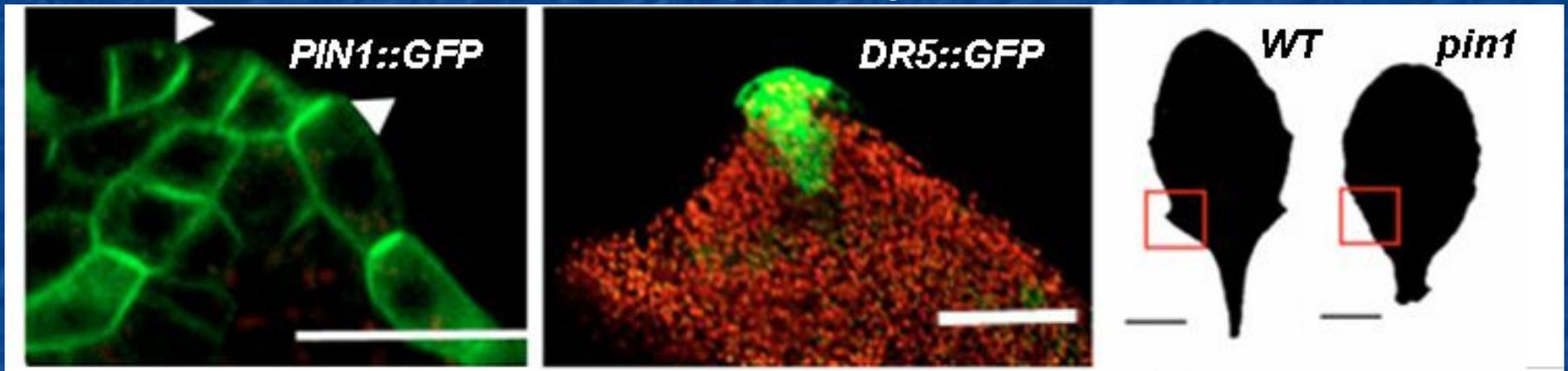


Для развития сложного листа необходимо возникновение локальных максимумов концентрации ауксинов в краевых доменах

**PIN**



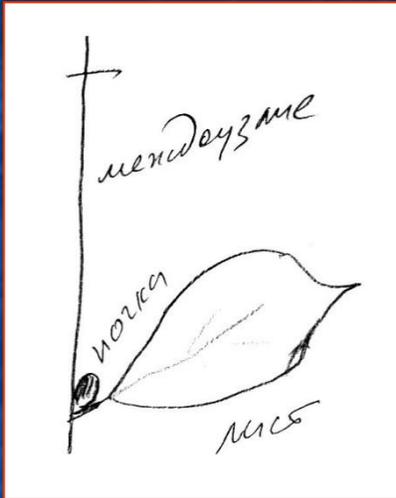
транспорт ауксинов → локальный максимум концентрации ауксинов → закладка лопасти



активация экспансинов,  
рост клеток,  
изменение направления деления



## Подпрограммы развития: закладка пазушных почек и ветвление



### Подпрограммы развития:

- закладка и развитие листа
- **Закладка почки**
- Рост междоузлия

После образования листа (но никогда одновременно с листовым примордием!) происходит **закладка пазушных почек**.

Обычно почка в пазухе 2, 3 или 4-го листа не развивается в побег - явление **апикального доминирования**

**Почечный апекс → прокамбий → проводящий пучок → изменение баланса гормонов в апексе пазушной почки (ИУК, ГК, ЦК ↓ АБК ↑) → тормоз развития почки.**

Если темновой период прервать КС – покой развития почки не наступает

Если изолировать почку (надрез или в условия *in vitro*) – почка развивается в побег.

Более широкая программа развития: если листовой примордий изолировать на ранней стадии развития он развивается в побег, если на более поздней – в лист.

**Ветвление (активация пазушных почек) - снятие апикального доминирования. Причины апикального доминирования :**

- Торможение высокими концентрациями ИУК
- Трофические факторы (атрагирующее действие)
- Конкуренция за цитокинин (нанесение ЦК на пазушную почку активировывает рост, но временно).

## Подпрограммы развития: рост междоузлия



**Формирование листа → синтез ГК → транспорт в междоузлие → ГК активизирует рост растяжением,**

**ГК + ИУК (из апекса побега) активизируют интеркалярные меристемы стебля.**

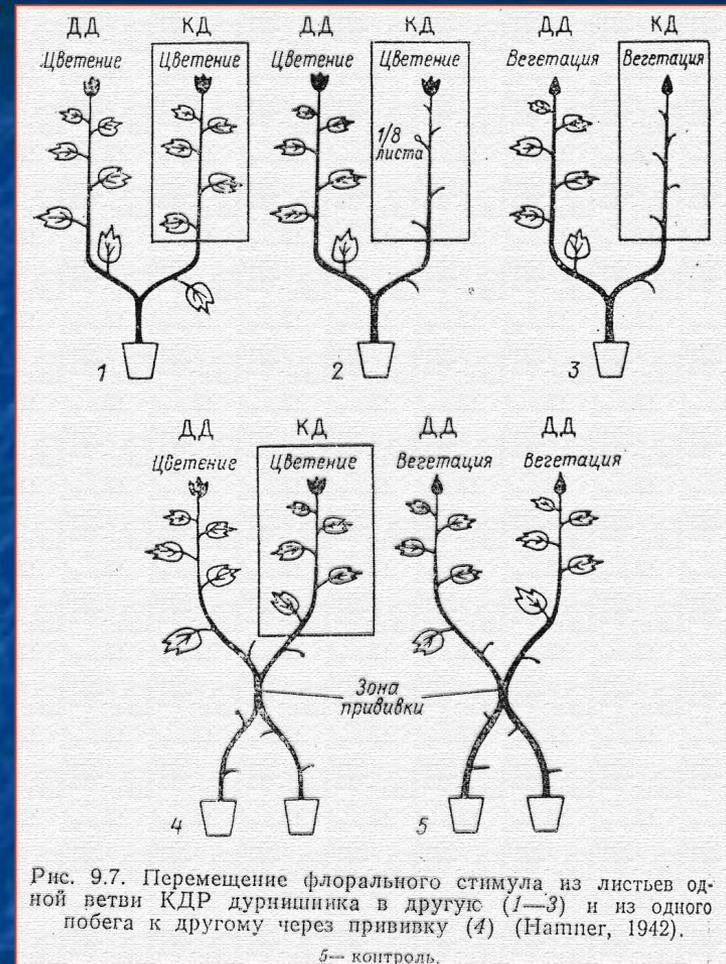
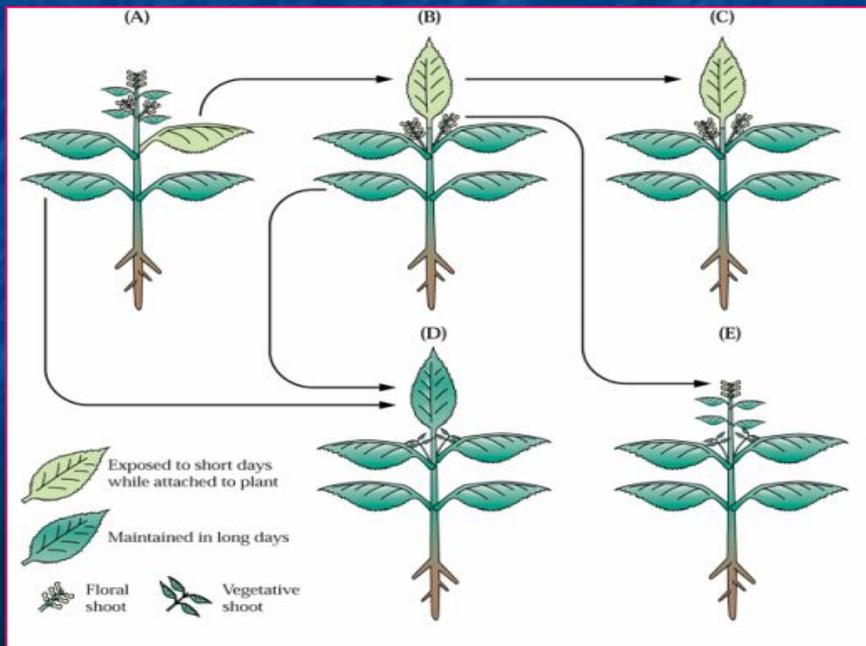
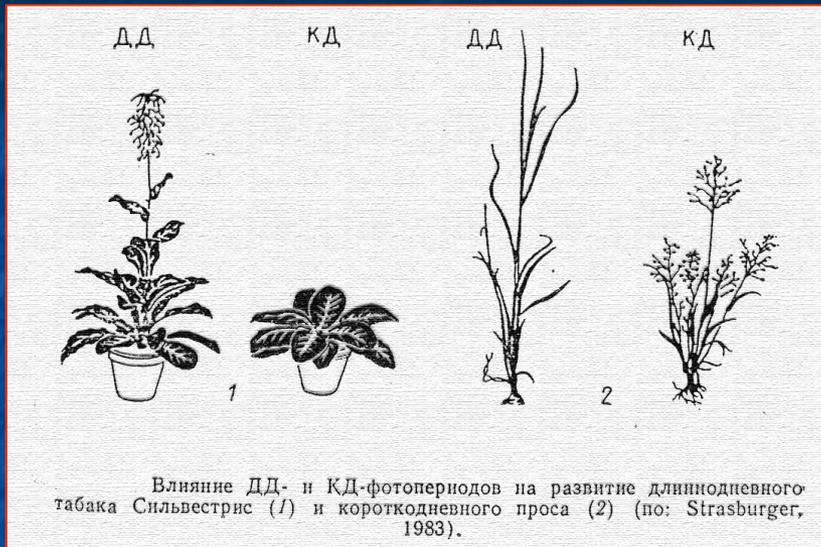
**Этилен определяет утолщение междоузлия.**

**Подпрограммы развития:**

- **закладка и развитие листа**
- **Закладка почки**
- **Рост междоузлия**



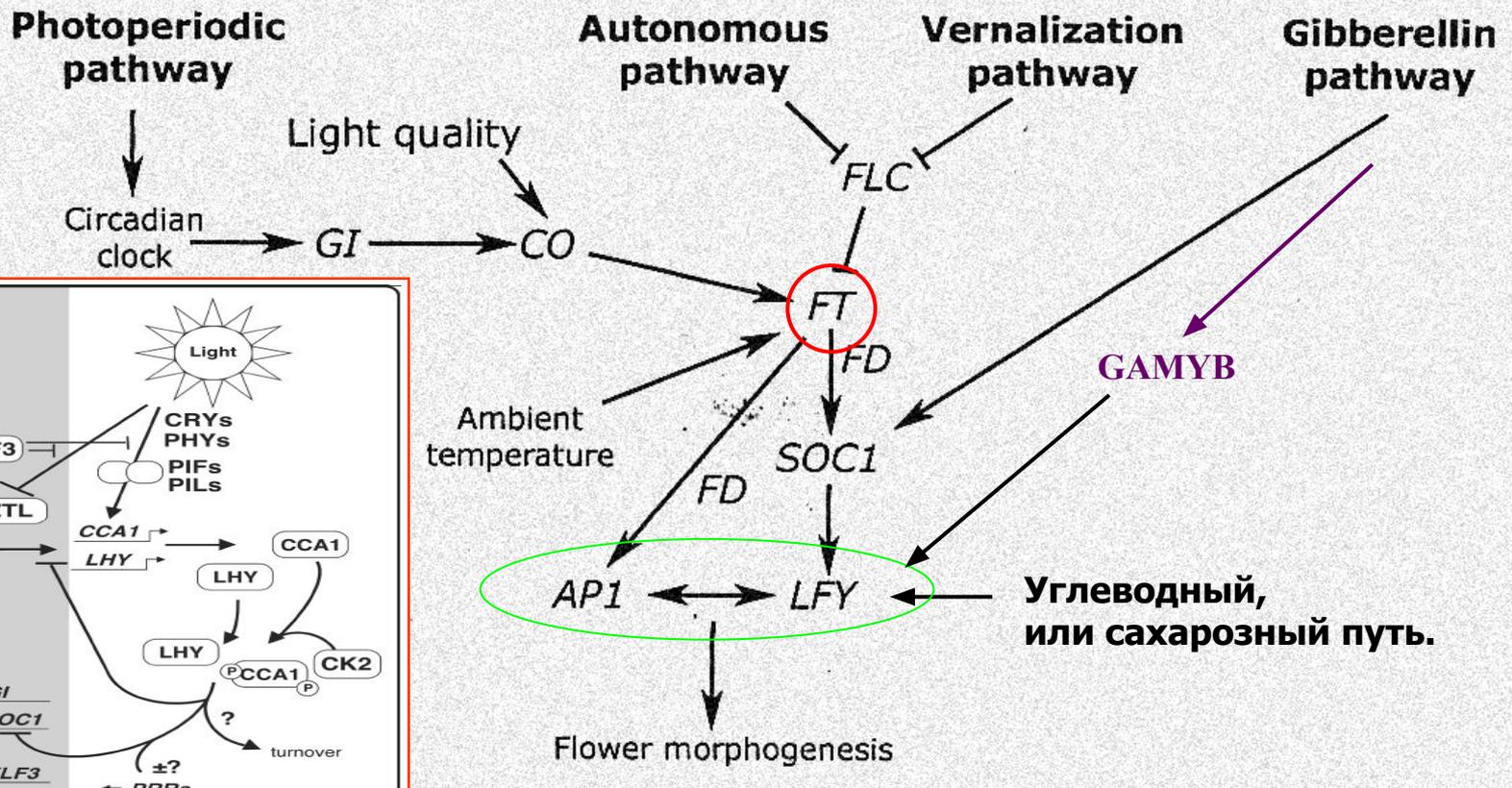
# Флоральный стимул. Гипотеза М.Х.Чайлахяна



## Гипотеза:

У ДД растений нет гббереллинов, но есть антезины.  
У КД растений – наоборот.

# Регуляция индукции цветения. «Генетическая модель».



**GI – Gigantea.** Кодирован большой белок неизвестной функции, локализованный в ядре.

Консервативен, найден у голо- и покрытосеменных. У животных нет.

**CO – Constans.** Кодирован трансфактор – «В-бок - цинковые пальцы», активирует гены определяющие время цветения

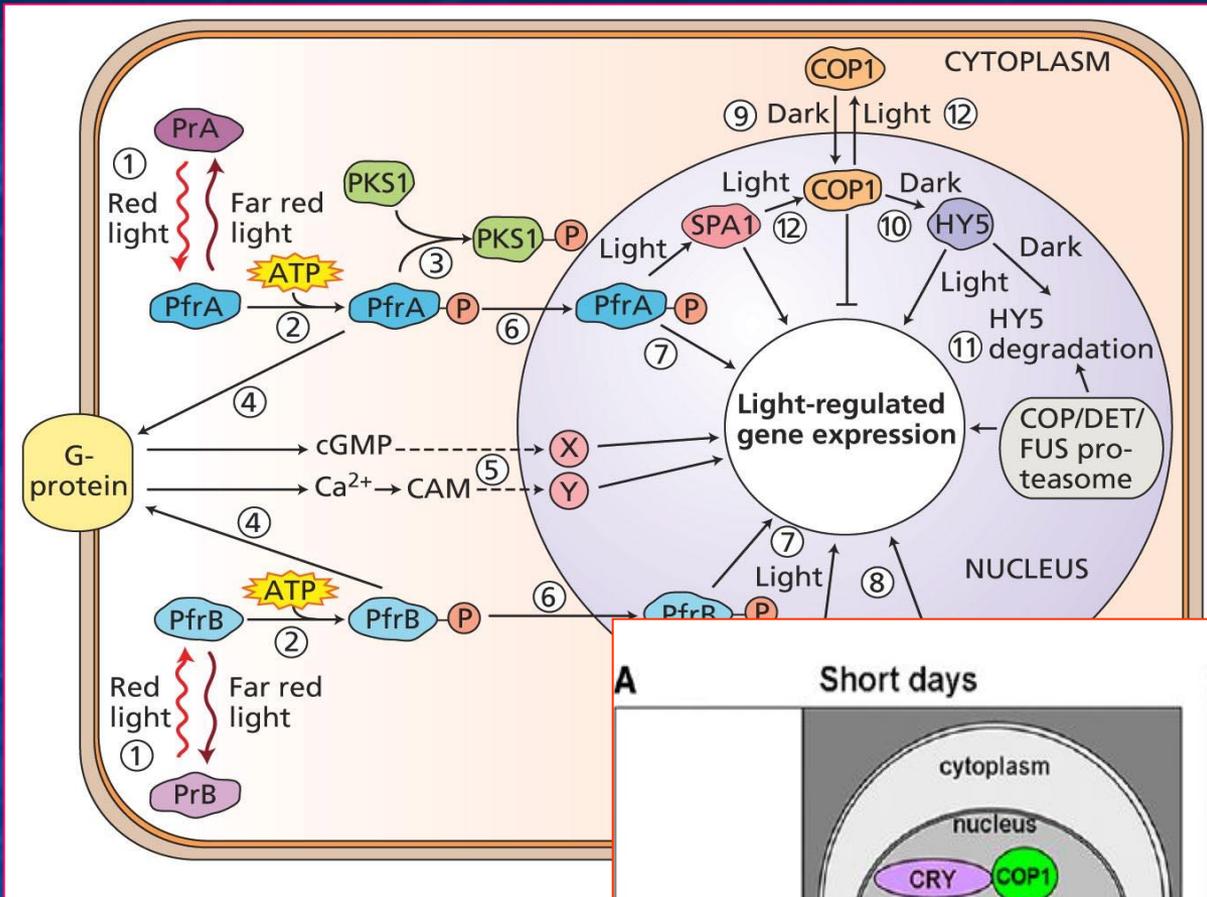
**FLC – Flowering locus C.** Трансфактор с MADS боксом. Мощный репрессор цветения. Регулируется и АБК.

**FT - Flowering locus T.** Небольшой белок 23 kDa. Он может транспортироваться по флоэме. **Флориген?**

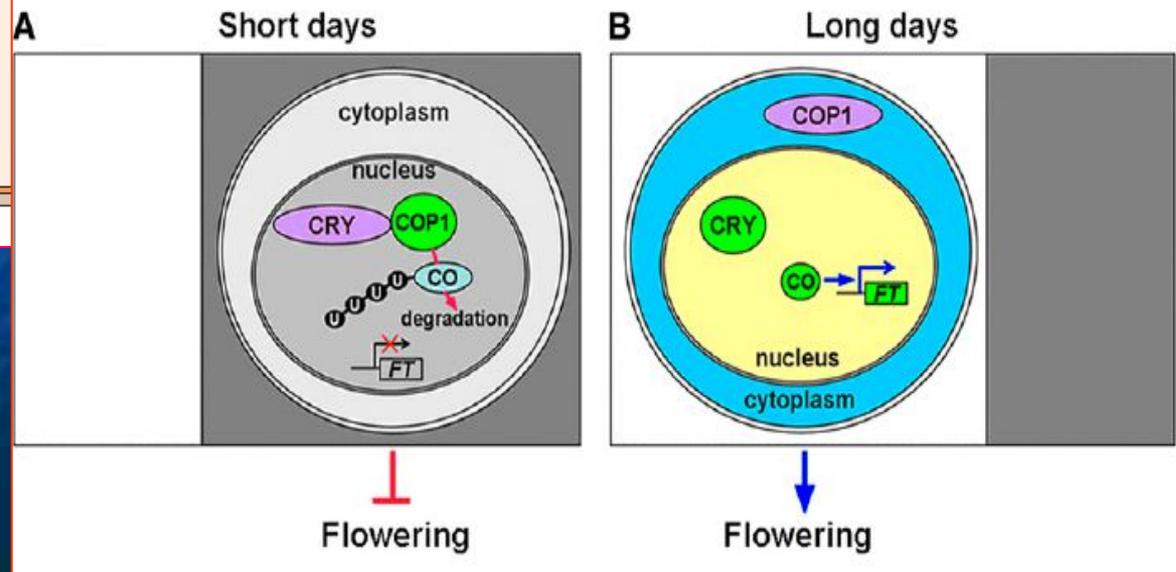
**FD –** трансфактор с bZIP

**SOC1 – Suppressor of overexpression of CO1.** MADS-бокс содержащий трансфактор.

# Как фоторецепторы могут влиять на индукцию цветения

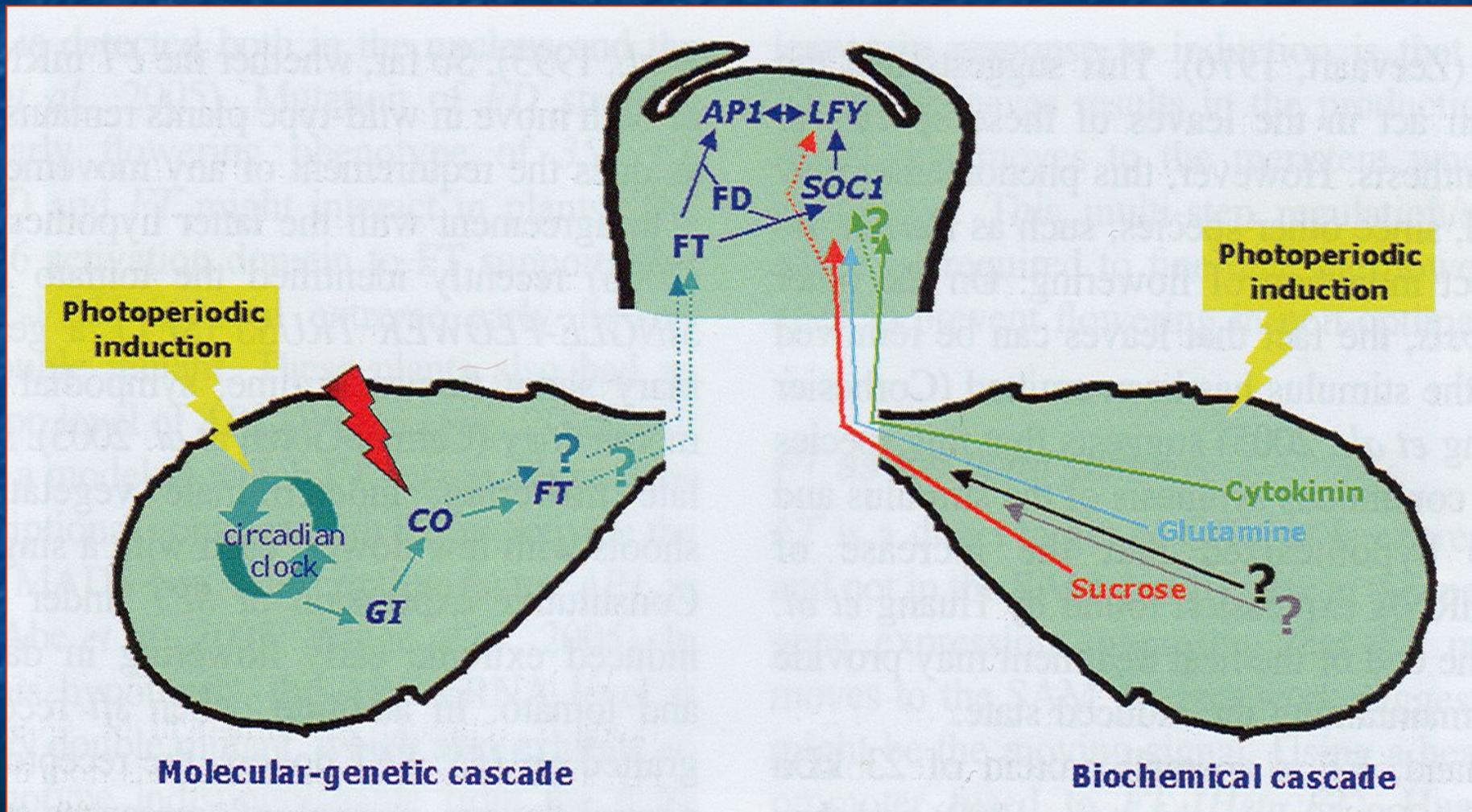


**COP1 – специальная E3-убиквитин лигаза. опосредует убиквитин-зависимую деградацию белка CO**





# Как совместить «биохимическую» и «молекулярно-генетическую» модели индукции цветения?



## Четыре пути регулирования цветения...

**Фотопериодический путь.** Начинается в листьях. Участвуют фитохромы и криптохромы.

*Различно для ДДР и КДР.*

*В ДДР* на длинном дне взаимодействие фоторецепторов с циркадными часами инициирует экспрессию CO в клетках-спутницах флоремы листа. CO – трансфактор («цинковые пальцы»), активирует FT-ген, продукт которого (**флориген!!**) транспортируется по флоэме в апикальную меристему и инициирует цветение. При этом FT белок взаимодействует с трансфактором FD (bZIP). FT/FD комплекс активирует ряд генов - SOC1, AP1, LFY, которые запускают гомеозисные гены формирования флоральной меристемы.

*В КДР* присутствует гомолог CO – Heading-dat1 (Hd1), который работает как ингибитор цветения. В течение индуктивного короткого дня HD1 не синтезируется. Его отсутствие стимулирует экспрессию Hd3a гена в клетках-спутницах (гомолог FT белка ДДР), который транслоцируется в апикальную меристему и запускает цветение.

**При автономном пути и вернализации,** цветение запускается в ответ на внутренний сигнал – наличии определенного количества листьев (автономный путь) или низкой температуры (вернализация). У арабидопсиса – все гены автономного пути работают в меристеме..

При автономном пути происходит выключение экспрессии ингибитора цветения – FLOWERING LOCUS C (FLC), который ингибирует экспрессию SOC1 (MADS-бокс содержащий трансфактор), но возможны различные механизмы ( например, «эпигенетический включатель»).

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

**Гиббереллиновый путь.** Необходим для раннего зацветания или для зацветания при неиндукционном коротком дне. В гиббереллиновый путь вовлечены в качестве промежуточных GAMYB трансфакторы, которые запускают экспрессию LFY. GA может также взаимодействовать с SOC1 независимым путем.

## «Круговое» строение цветка

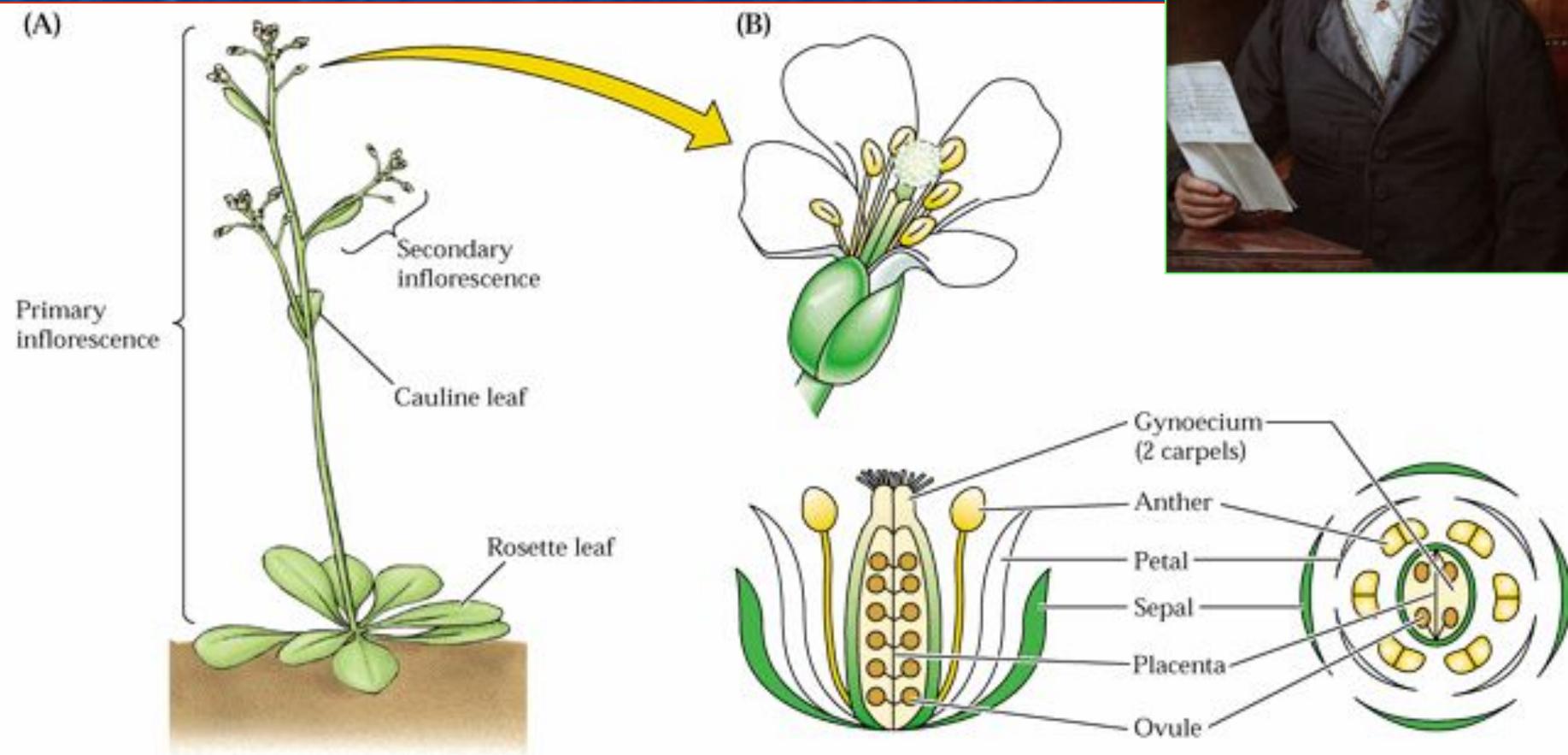
Иоганн Вольфганг Гете – фолиарная теория морфогенеза цветка.

Эссе «Опыт объяснения метаморфоза растений» -

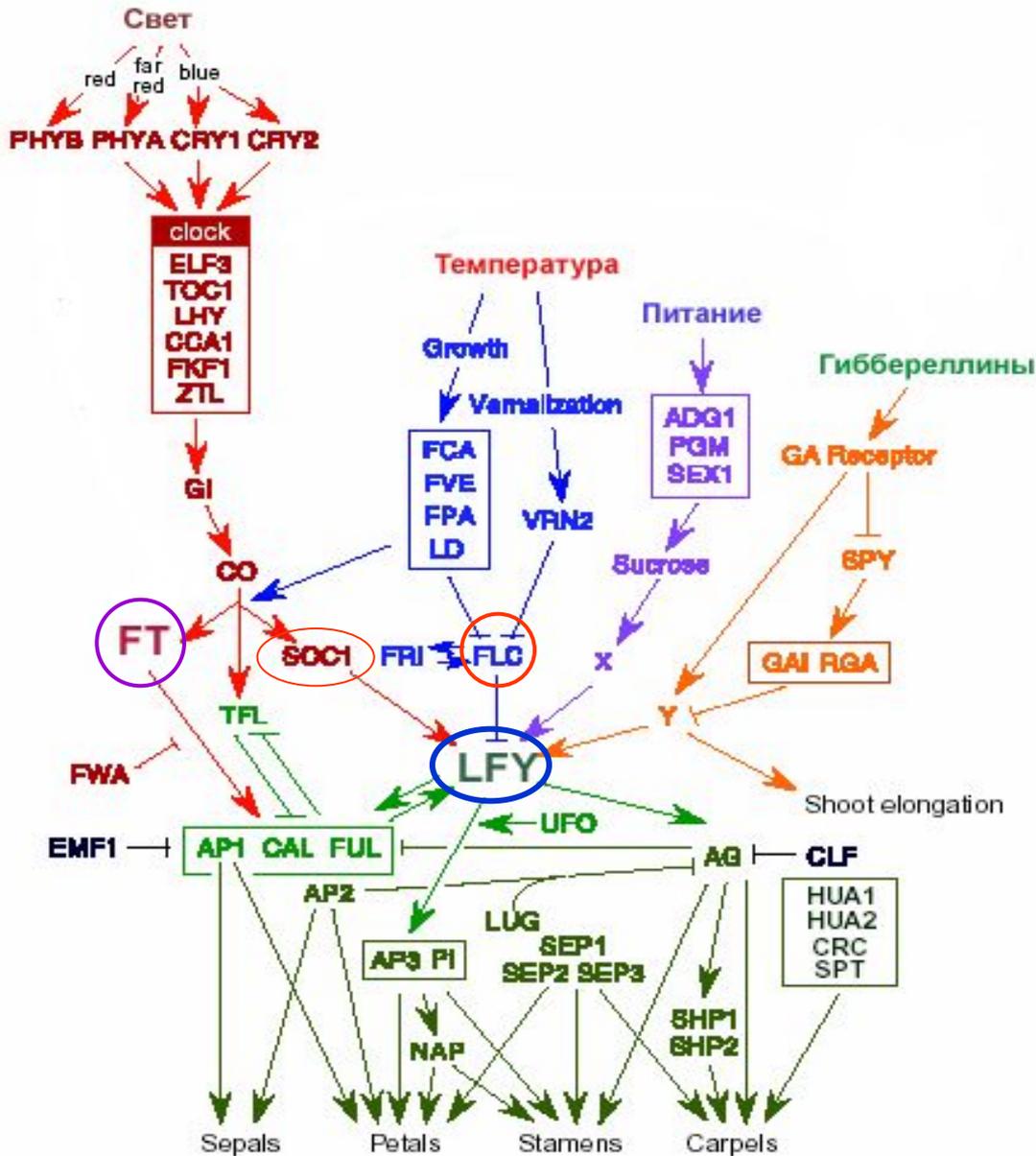
«Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu erklären», 1790г.

Цветок- видоизсененный побег.

Органы цветка – видоизмененные листья...



## Общая схема индукции и эвокации цветения.



Ген *LEAFY* (*LFY*) – интегратор информации от разных путей индукции цветения.

Трансфактор, но довольно специфичный. Похож на HLH (helix-turn-helix).

Ген *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*) – белок, содержащий F-бокс, корегулятор гена *LFY*

**Ортологи гена LFY**  
*FLORICAULA* (*FLO*) – *Antirrhinum majus*

*NFL* – *Nicotiana tabacum*

*ALF* – *Petunia hybrida*

*ALSIFLORA* – *Lycopersicon esculentum*

*UNIFOLIATA* (*UNI*) – *Pisum sativum*

*ELF1* – *Eucalyptus globules*

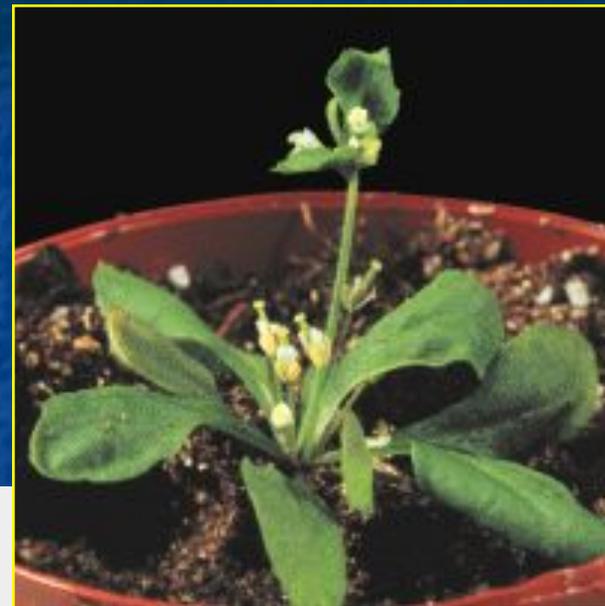
*NEEDLY* (*NLY*) – *Pinus radiata*

## Фенотип мутации *lfy* у арабидопсиса

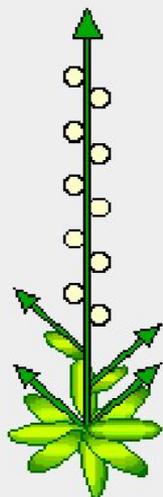
*lfy*



Вместо цветков в пазухах листьев формируются боковые побеги.



«Трансгенное» подтверждение роли *LFY* в формировании флоральной меристемы: у растений *35S::LFY* ген *LFY* экспрессируется и в АМ, что приводит к ее превращению во ФМ и формированию терминальных цветков



wild type

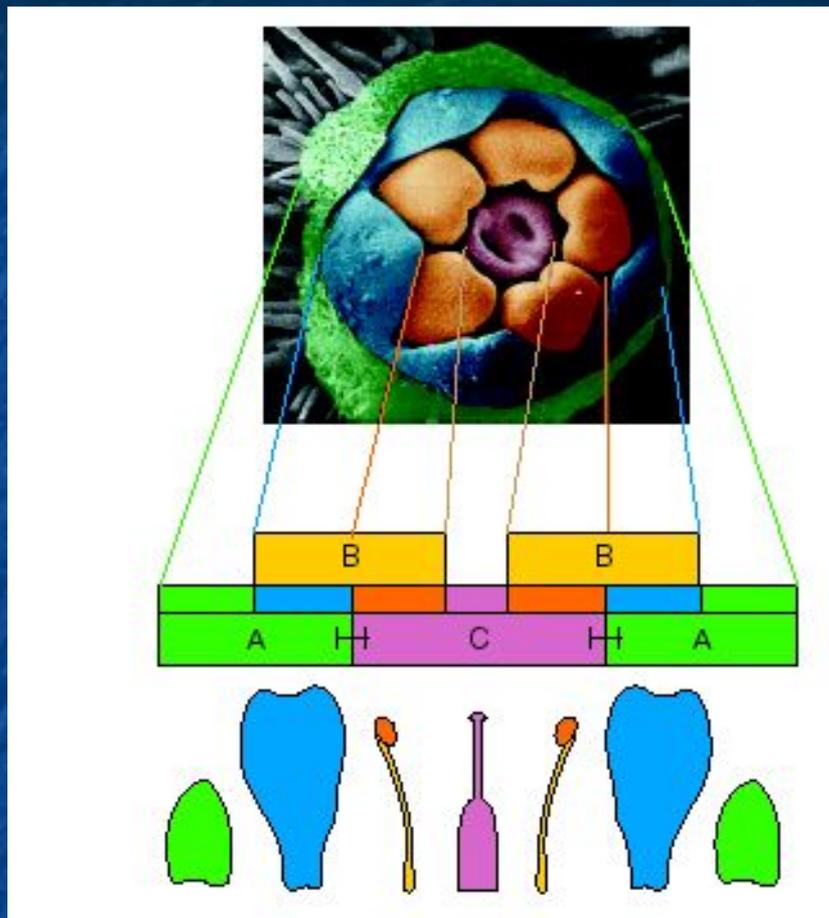


*leafy*



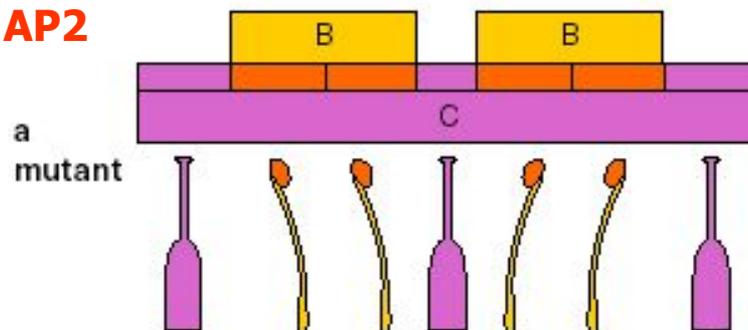
*35S::LFY*

# ABC-схема генетики развития цветка (теория «войны позиций»)

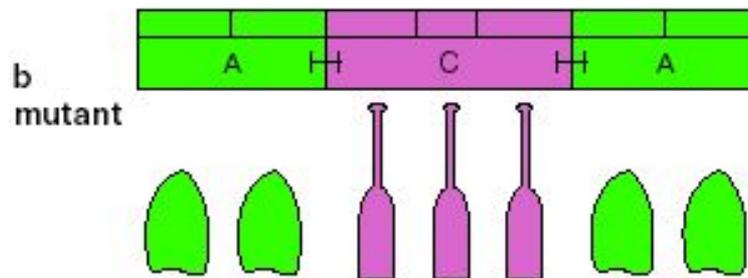


Ap1, Ap2 (4-я хромосома) – вместо чашелистиков – карпелы, вместо лепестков – тычинки.  
 AP3 (3-я хр), Pi (5-я хр.) – вместо лепестков – чашелистики, вместо тычинок – карпелы.  
 AG (4-я хр.) – вместо тычинок – лепестки, вместо карпел – чашелистики.

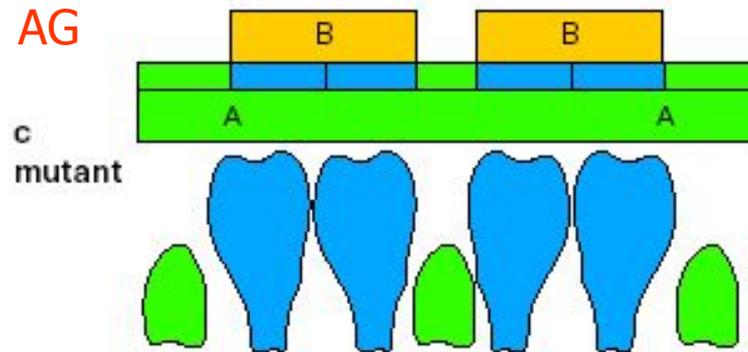
## AP2



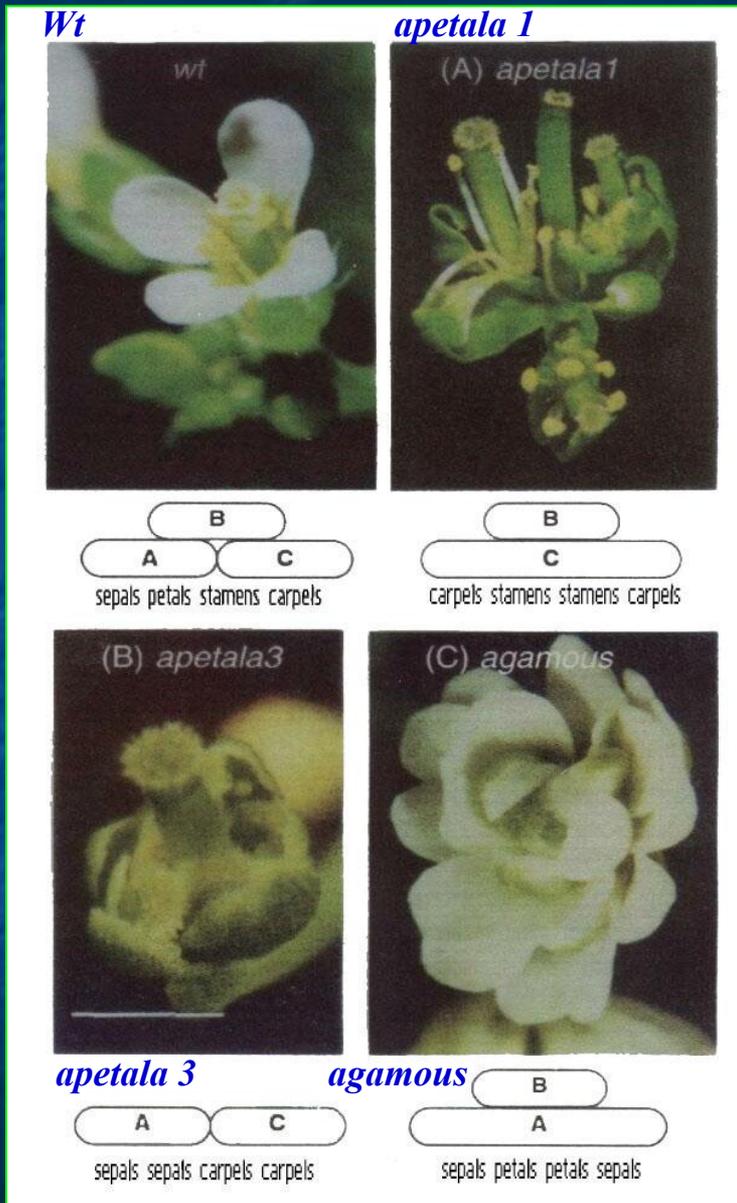
## AP3. Pi



## AG



# Мутанты арабидопсиса с точки зрения ABC-системы и гены.



**AP1, AP2** – функция A,  
трансфакторы, AP1 с MADS-боксом.

**AP3, PI** – функция B,  
трансфакторы с MADS-боксом

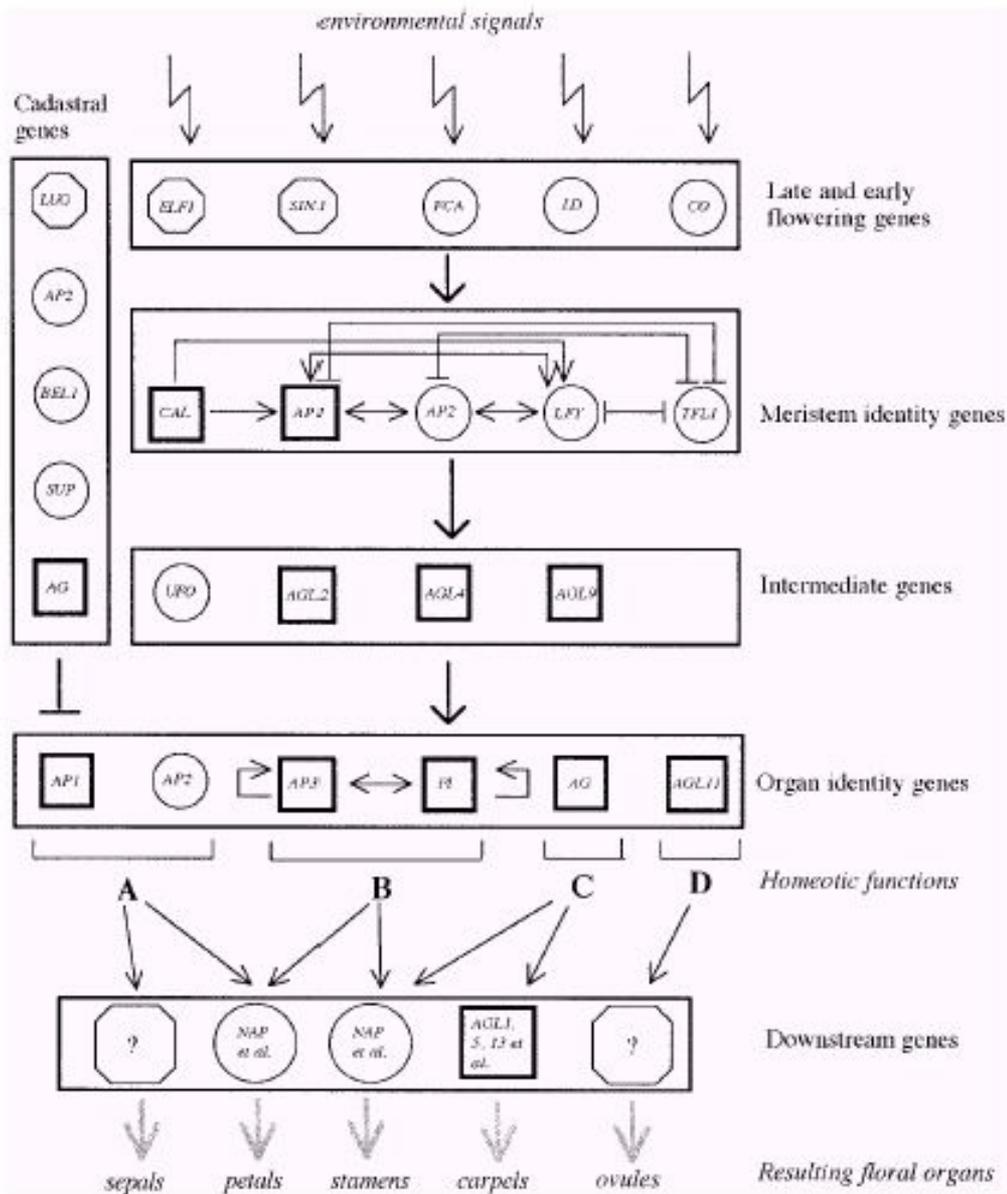
**AG** - функция C,  
трансфактор с MADS-боксом

«MADS-бокс» - 56 аминокислот,  
(MCM1 из *Saccharomyces cerevisiae*,  
AGAMOUS из *Arabidopsis thaliana*,  
DEFICIENS из *Antirrhinum majus*,  
SRF из *Homo sapiens*)

У растительных белков следует сразу за метионином после инициаторного кодона.  
У арабидопсиса – более 80 штук.

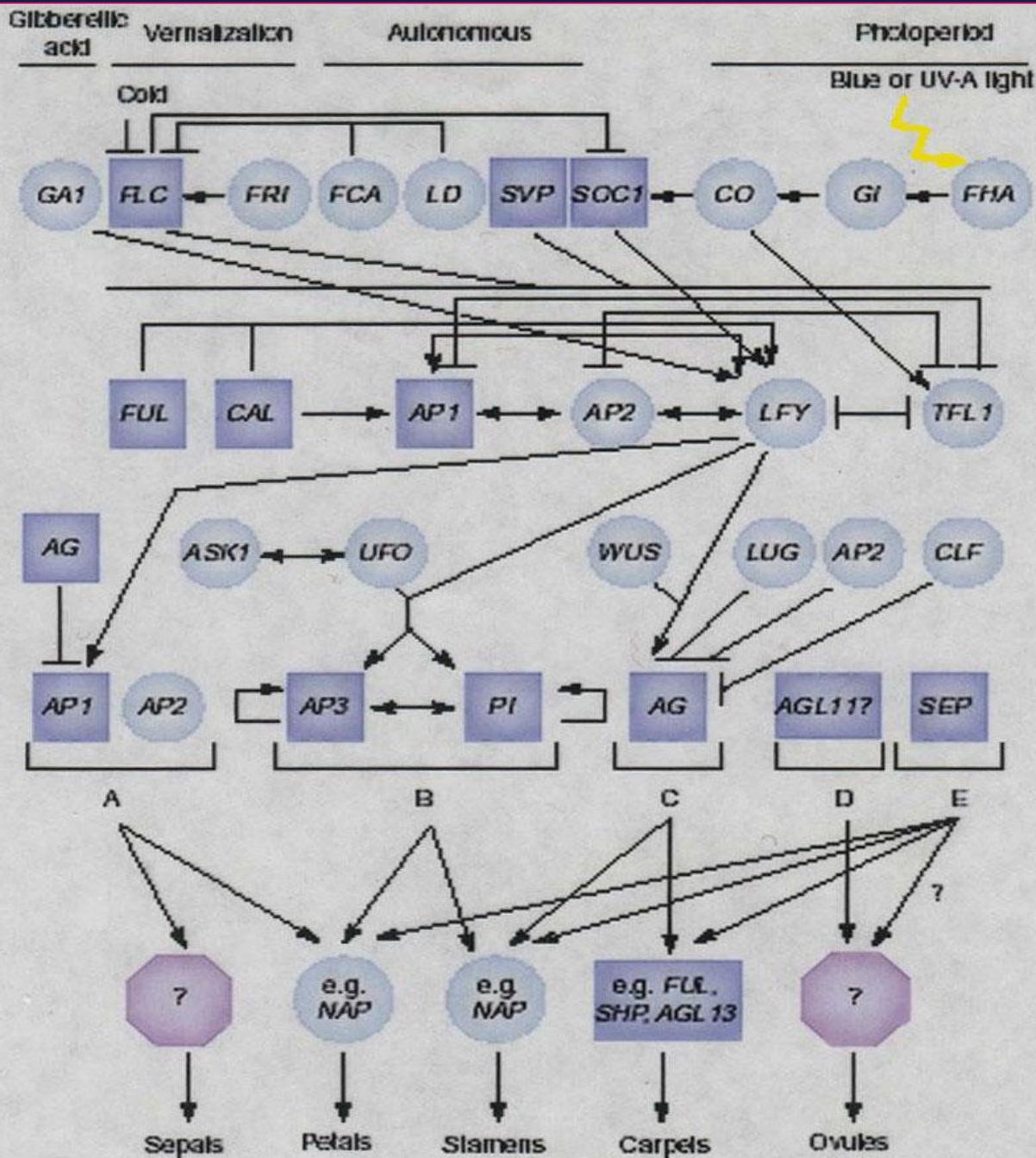
Факторы транскрипции.  
образуют гетеродимер,  
связывающийся с участком  
CC(A/T)6GG – CArG-бокс – в промоторе  
генов.

# Сильно упрощенная схема иерархии генов флорального морфогенеза



Гены с MADS-боксом изображены в квадратиках.

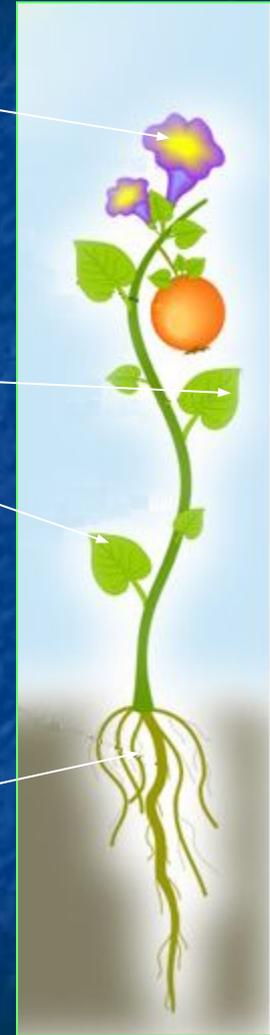
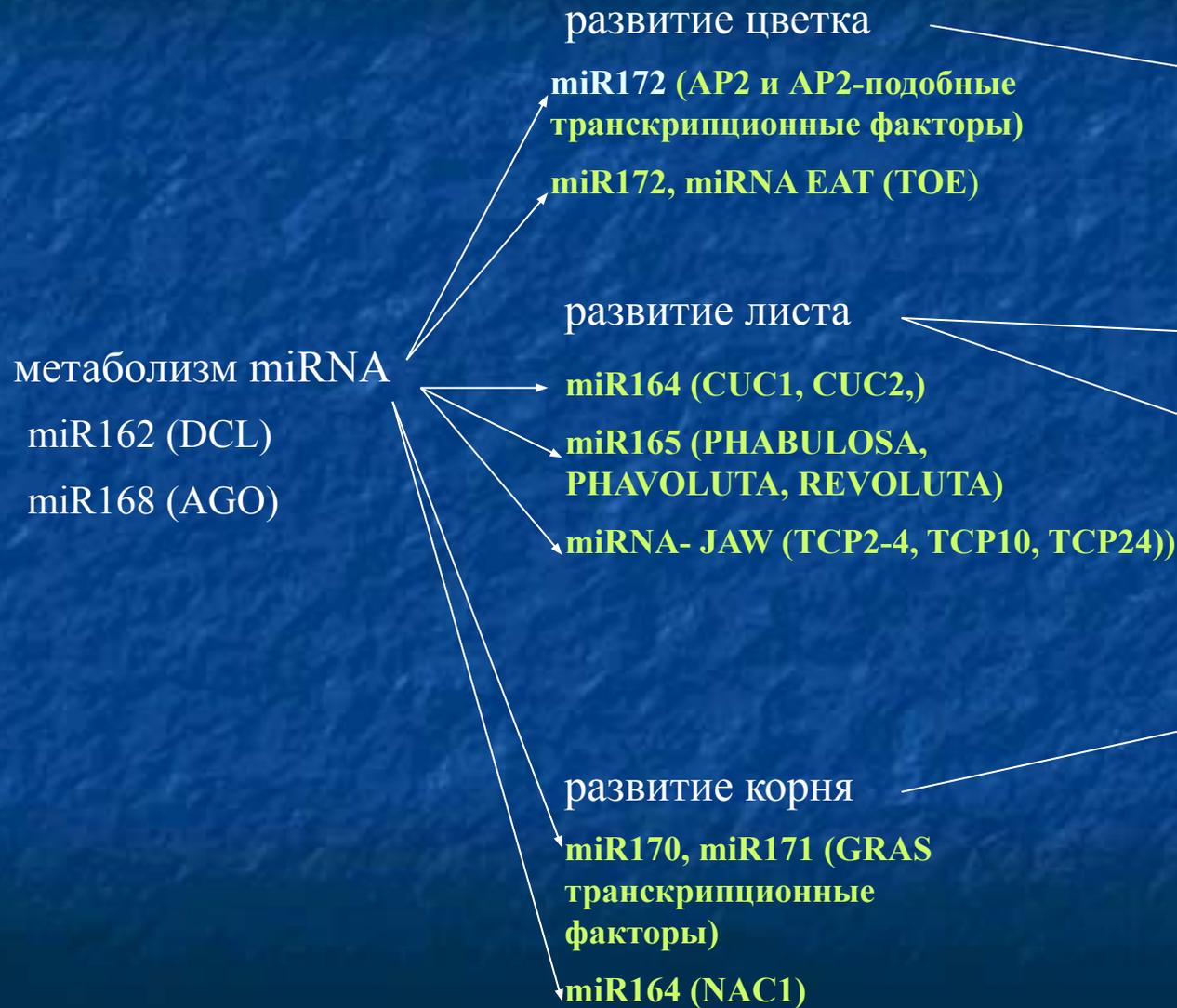
- AG - AGAMOUS;
- AGL - AGAMOUS-LIKE;
- AP - APETALA
- BEL1 - BELL
- CAL - CAULIFLOWER;
- CO - CONSTANS;
- ELF1 - EARLY FLOWERING1;
- LD - LUMINIDEPENDENS;
- LFY - LEAFY;
- LUG - LEUNIG;
- NAP - NAC-LIKE,
- PI - PISTILLATA;
- SIN1 - SHORT INTEGUMENTS1;
- SUP - SUPERMAN;
- UFO - UNUSUAL FLORAL ORGANS;
- TFL - TERMINAL FLOWER



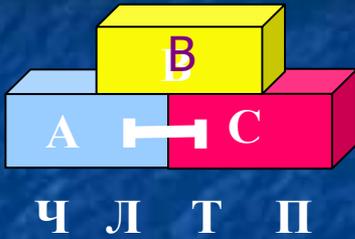
То же, но чуть подробнее.

В квадратиках – гены с MADS-боксом

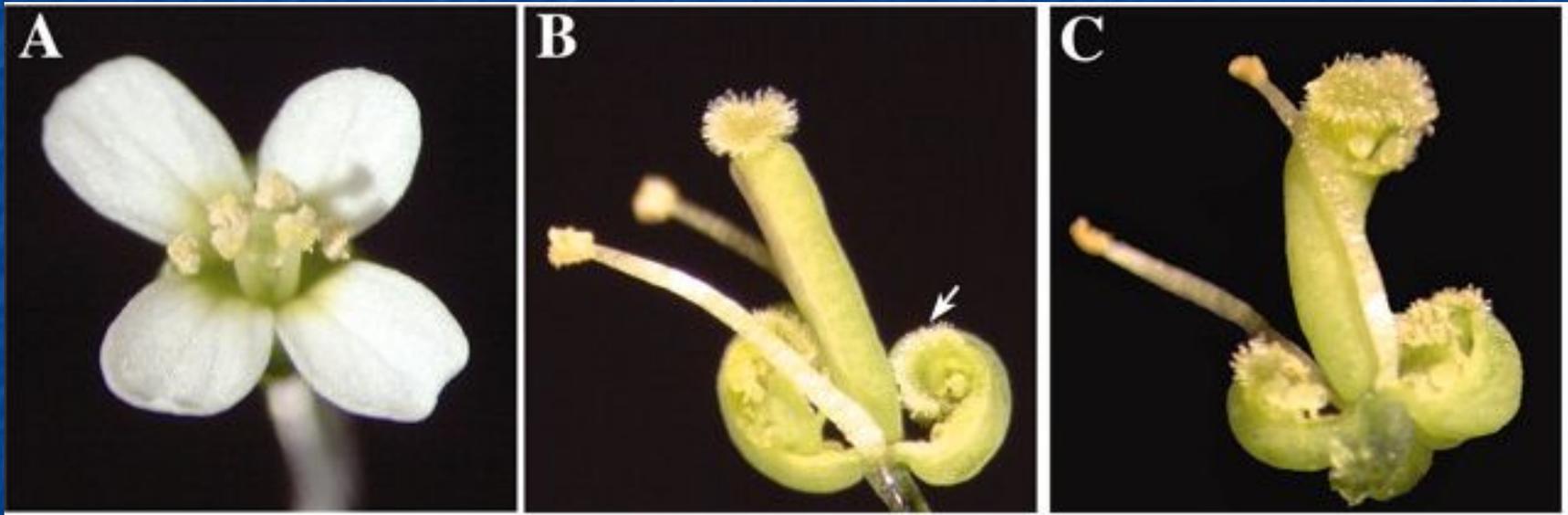
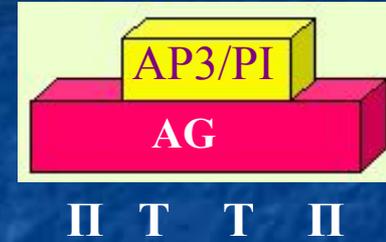
# Роль miRNAs в развитии растений



# miR172 регулирует экспрессию гена AP2



Мутация *ap2*:



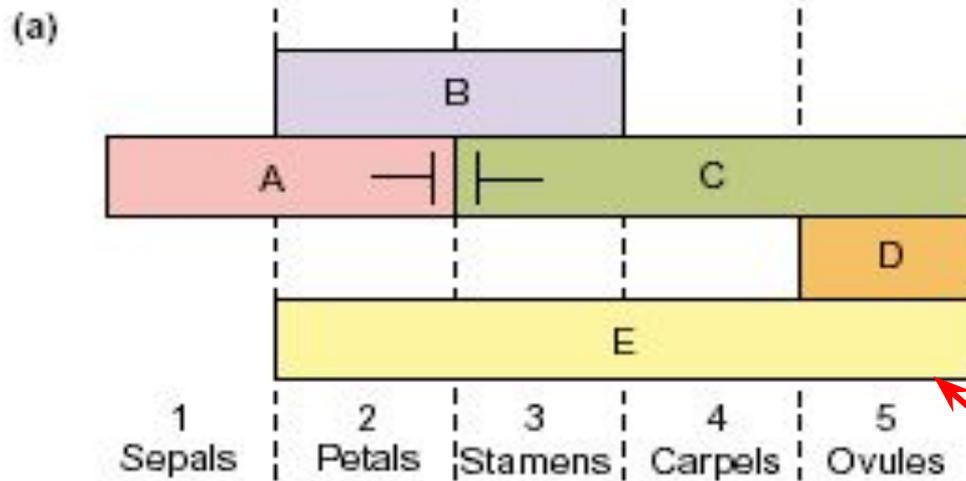
A. wt

B. *ap2-9*

C. 35S::MIR172a-1

Фенотип трансгенных растений 35S::MIR172a-1 повторяет фенотипическое проявление мутации *ap2-9*

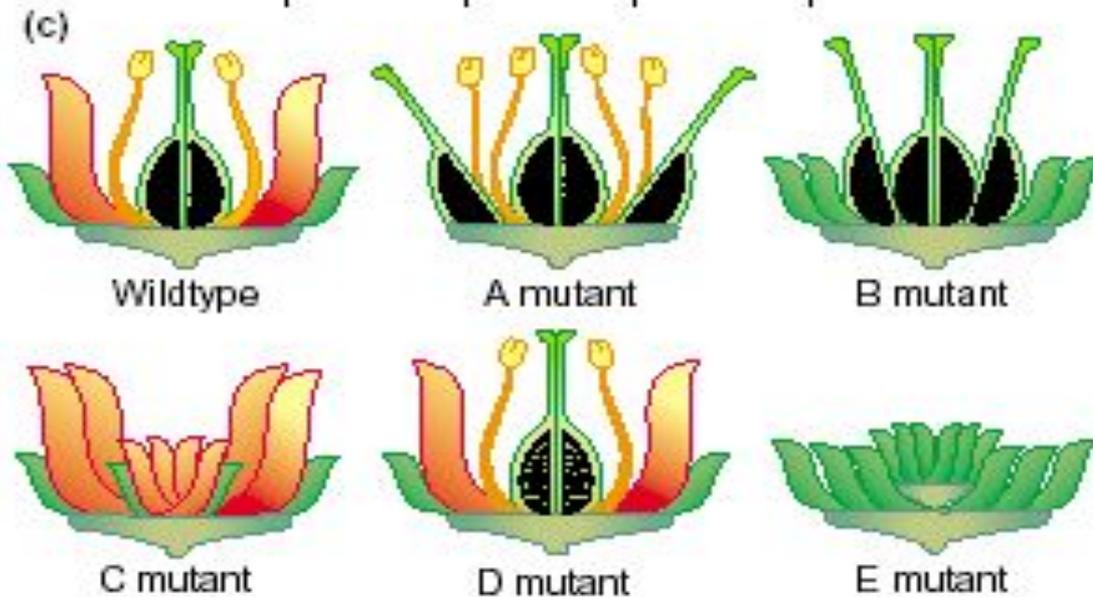
Дополненная модель  
развития цветка



*SHATTERPROOF 1, 2,*  
*SEEDSTICK*



*SEPALLATA 1, 2, 3, 4*



## «Модель квартета»:

продукты генов идентичности органов цветка функционируют в виде гетеротетрамерных белковых комплексов (Гюнтер Тайссен, 2001г)

Известно, что MADS-белки взаимодействуют с ДНК, образуя димеры. Поскольку для развития цветка необходимы пять классов генов (А, В, С, D и Е), то идея Тайссена - продукты этих генов функционируют в виде гетеротетрамерных белковых комплексов..

Продукты генов необходимы:

**А+Е** - для образования чашелистиков,

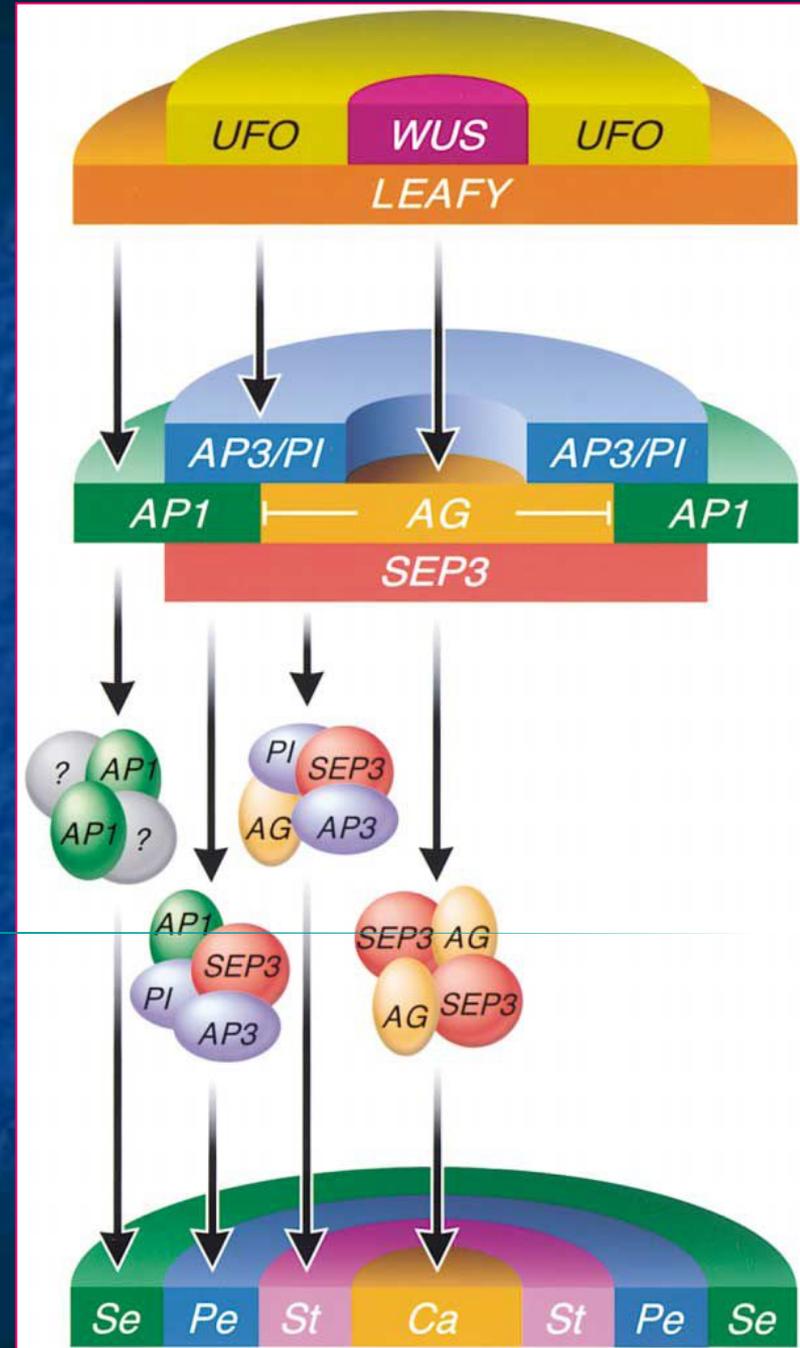
**А+В+Е** — лепестков,

**В+С+Е** — тычинок,

**С+Е** — плодолистиков

**Д+Е** — семяпочек.

Каждая пара MADS-трансфакторов связывается с ДНК, в которой есть последовательность  $CC[A/T]_6GG$  (CArG-box), поэтому предполагается, что квартет белков связывается сразу с двумя CArG-боксами на разных участках ДНК, заставляя его свернуться в петлю. В зависимости от состава квартета включается или подавляется экспрессия генов с каждого из участков ДНК. Считается, что гены класса Е важны для обеспечивая связывание двух димеров в тетрамер. Подобная система сейчас обнаружена у всех модельных растений.

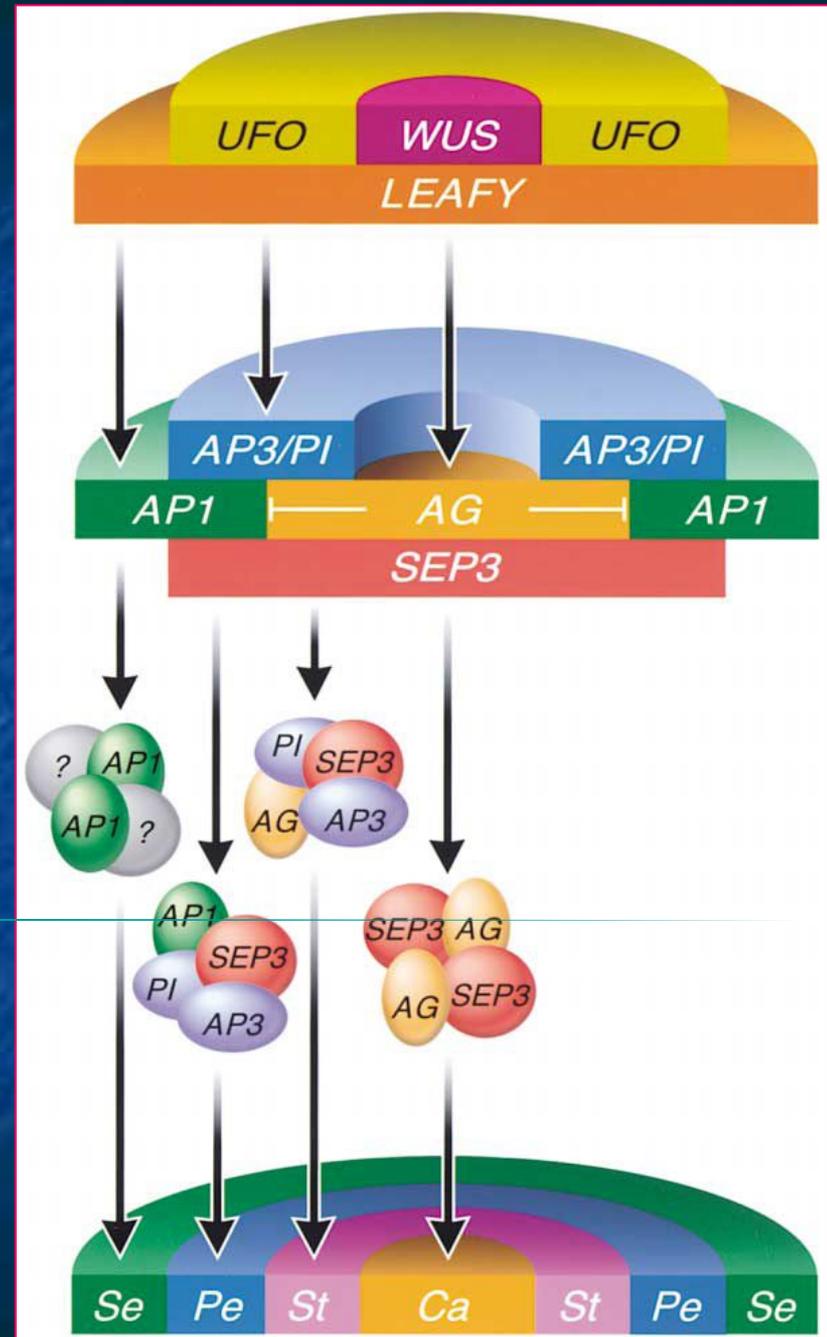


## «Модель квартета»:

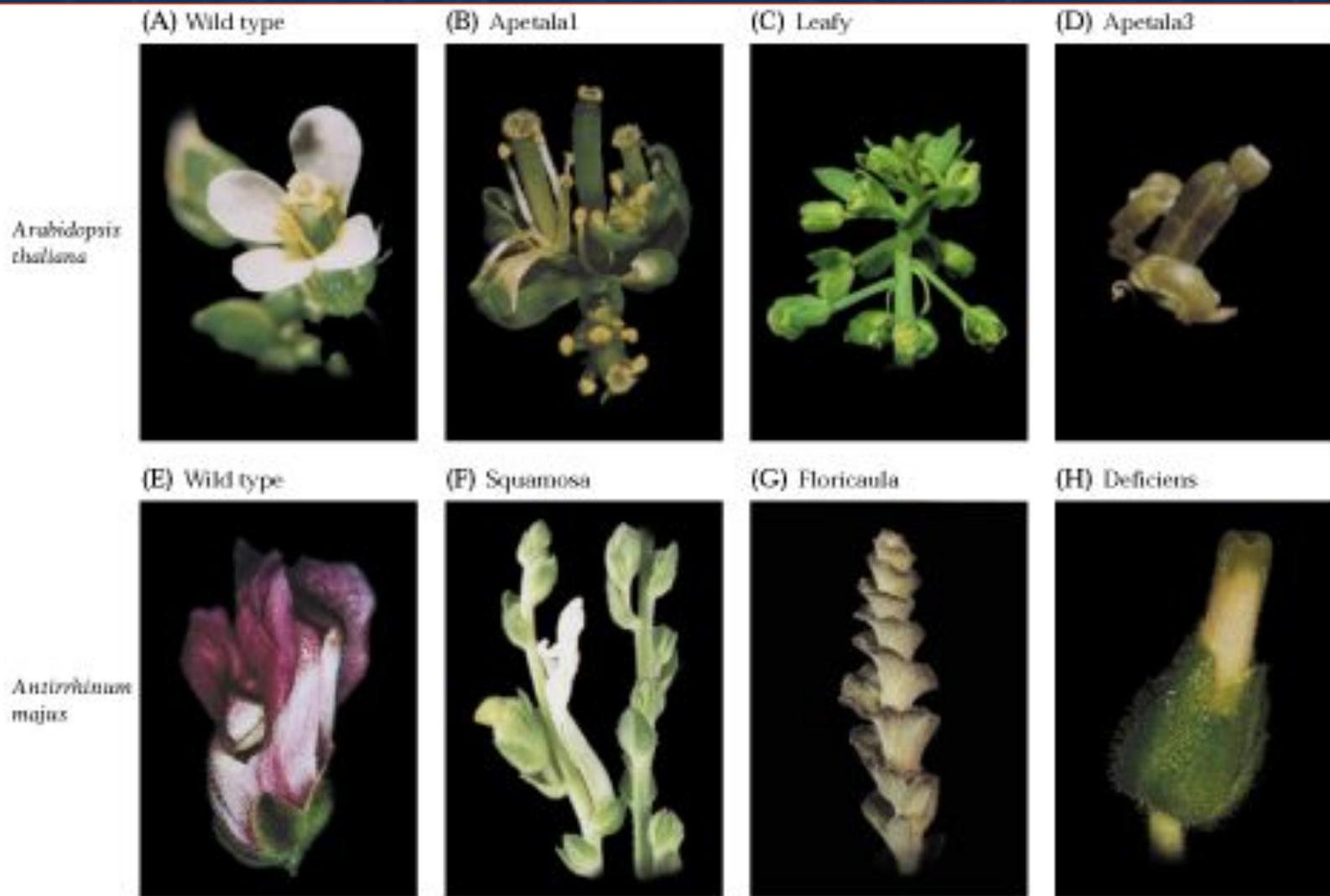
продукты генов идентичности органов цветка функционируют в виде гетеротетрамерных белковых комплексов (Гюнтер Тайссен, 2001г)

На данный момент для *A. thaliana* выявлено пять белковых комплексов, отвечающих за развитие определённого органа цветка:

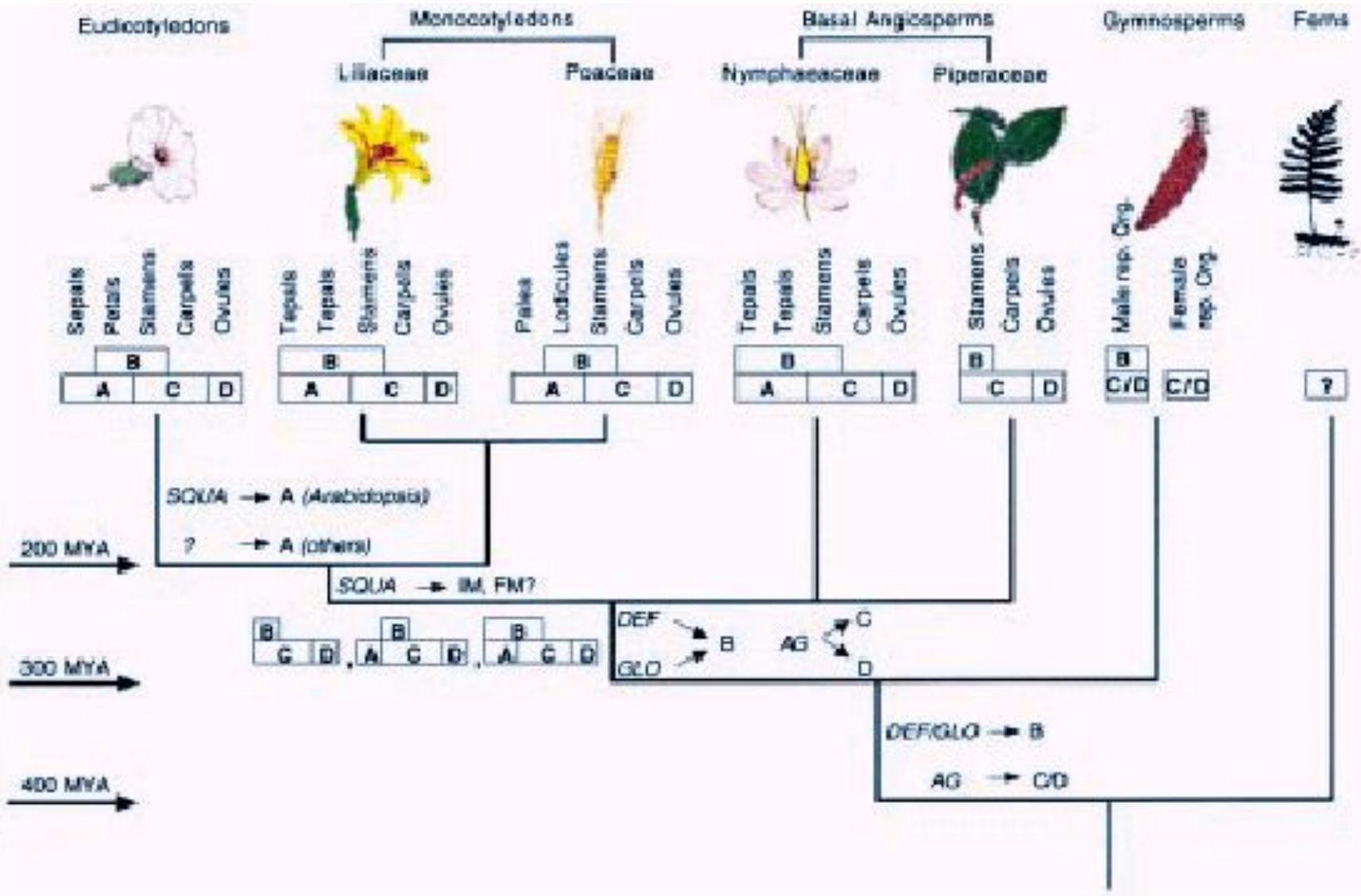
чашелистики (A+E)	AP1/AP1/SEP/SEP
лепестки (A+B+E)	AP1/AP3/PI/SEP
тычинки (B+C+E)	PI/AP3/AG/SEP
плодолистики (C+E)	AG/AG/SEP/SEP
семяпочки (C+D+E)	AG/SHP/STK/SEP



## Мутанты по структуре цветка сходны у разных растений



# Предполагаемая схема эволюции ABC-системы у растений



## Детерминация пола у растений

Определение (детерминация) пола у растений - формирование признаков пола у клеток, органов или особей под воздействием, как генетических факторов (*генетическое определение пола*), так и условий внешней и внутренней среды (*фенотипическое определение пола*).

По наличию и степени развития генеративных органов цветки делят на **обоеполые (гермафродитные)** и **однополые (раздельнополые)**.

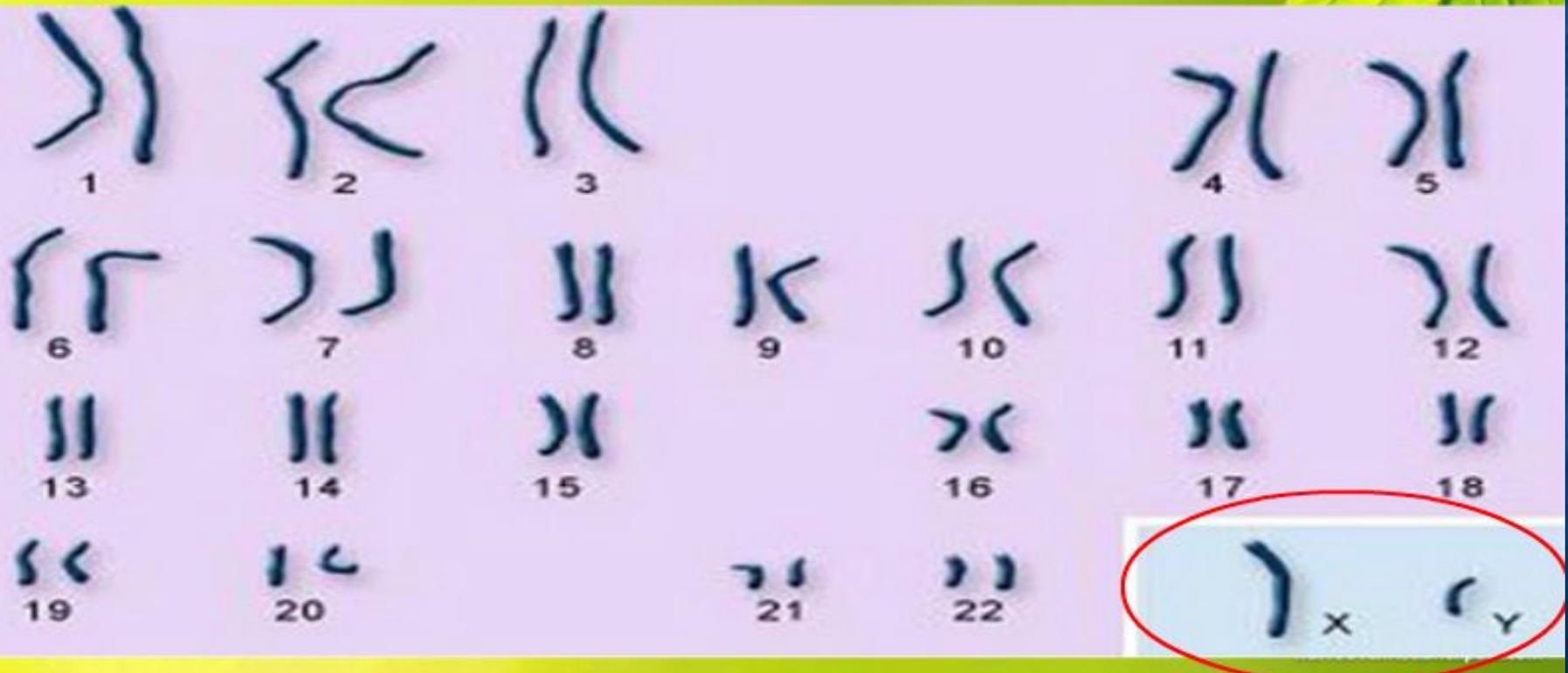
Последние бывают пестичными (женскими) или тычиночными (мужскими). На одном растении могут находиться цветки разных типов.

**Однодомные растения** - цветки формируются на одних и тех же организмах,

**Двудомные растения** (хмель, конопля, тополь) имеют на одних экземплярах пестичные цветки, а на других — тычиночные

Растения с гермафродитными цветками составляют более 70% видов, только 4—5% видов растений двудомны.

**Алосомы или sex-хромосомы - хромосомы отличающиеся по морфологии и количеству в мужской и женской особи и содержащие гены, ответственные за определение пола**



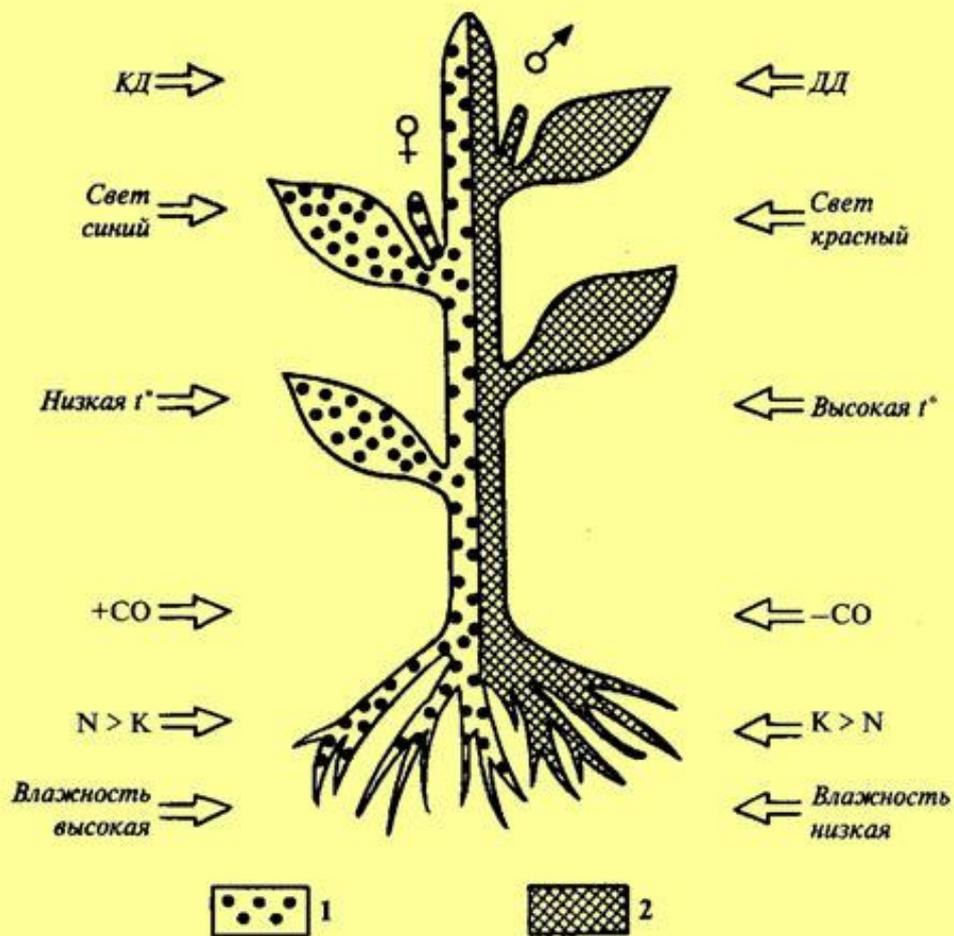
## Хромосомное определение пола у растений

Большинство видов растений, у которых определение пола определяется хромосомами, могут быть сформированы в две категории

**Гомоморфные:** а) XX женская особь, XY - мужская особь  
б) XY женская особь, XX мужская особь

**Гетероморфные:** а) XX женская особь, XY мужская особь  
б) XX женская особь  $XY_1Y_2$  мужская особь  
в)  $X_1X_1X_2X_2$  женская особь,  $X_1X_2Y_1Y_2$  мужская.

# Факторы, определяющие фенотипическое определение пола



Роль факторов внешней среды и фитогормонов в проявлении пола





