

развитие проростка («тройной ответ»)



стимуляция развития придаточных корней



Устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам

ЭТИЛЕН

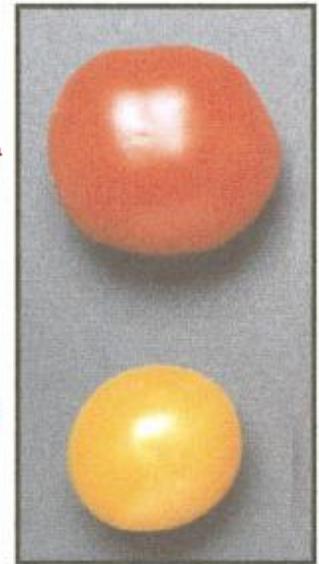


WT



35S::LeEIL1

старение и опадение листьев



wt

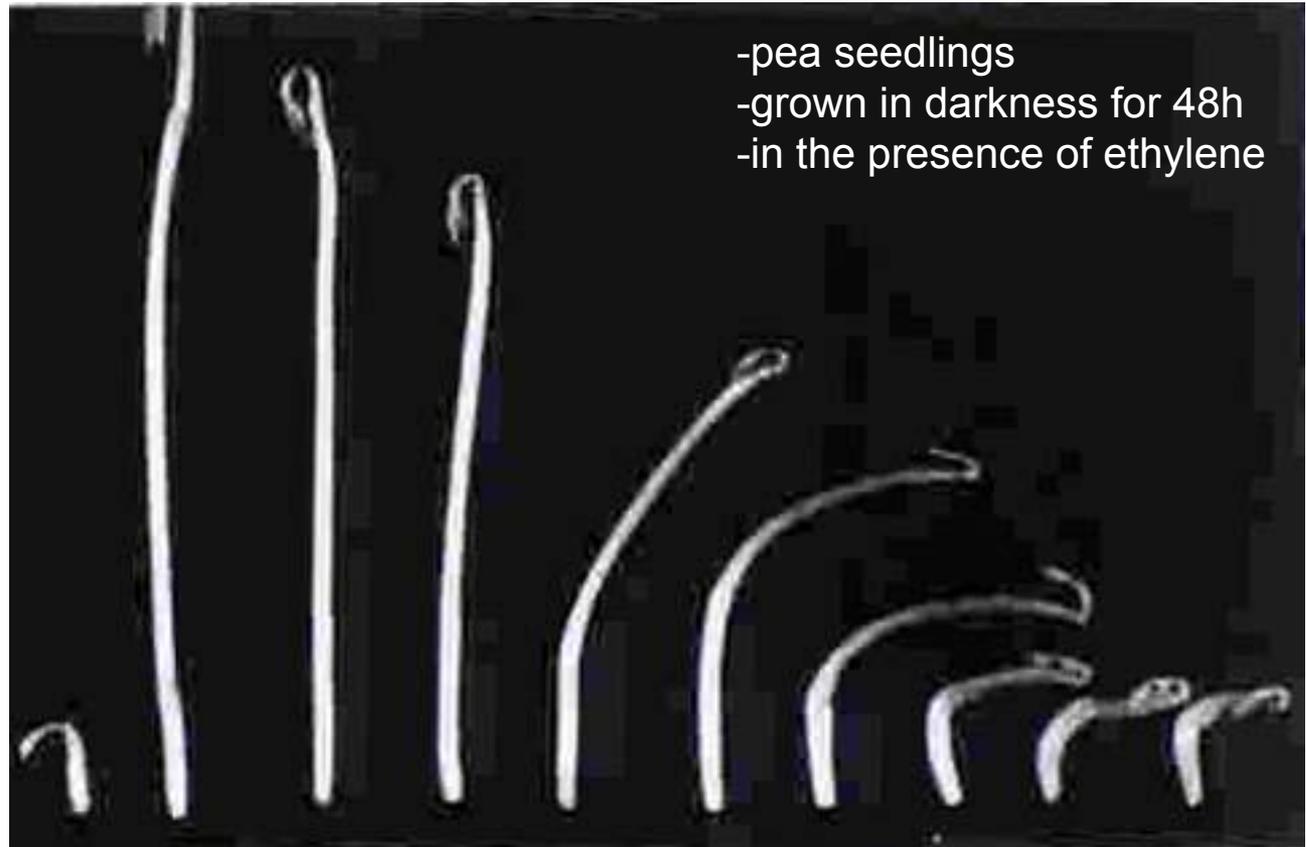
Nr

созревание плодов

Тройной ответ проростков на этилен



Д.Н. Нелюбов

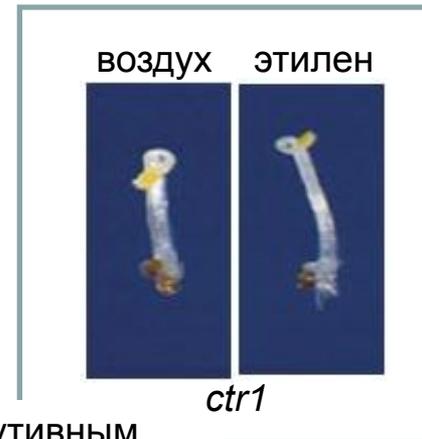


Original size 0 0.012 0.025 0.06 0.1 0.2 0.4 0.8 1.6
saturation

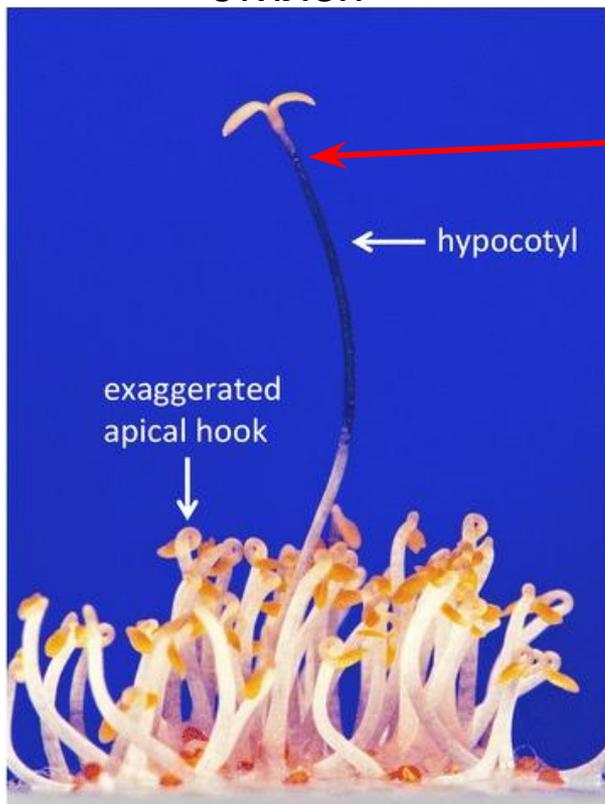
Ethylene concentration $\mu\text{L L}^{-1}$ (ppm)

Выявление «этиленовых» мутантов (по тройному ответу)

Дикий тип



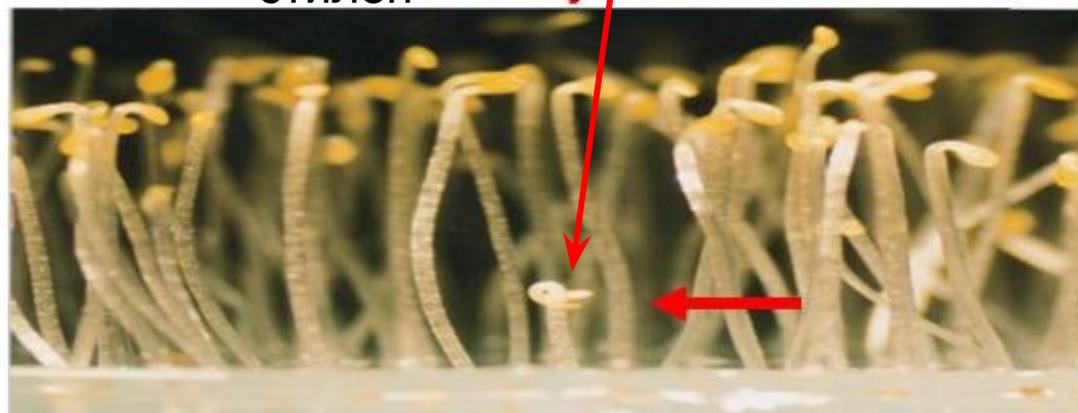
ЭТИЛЕН



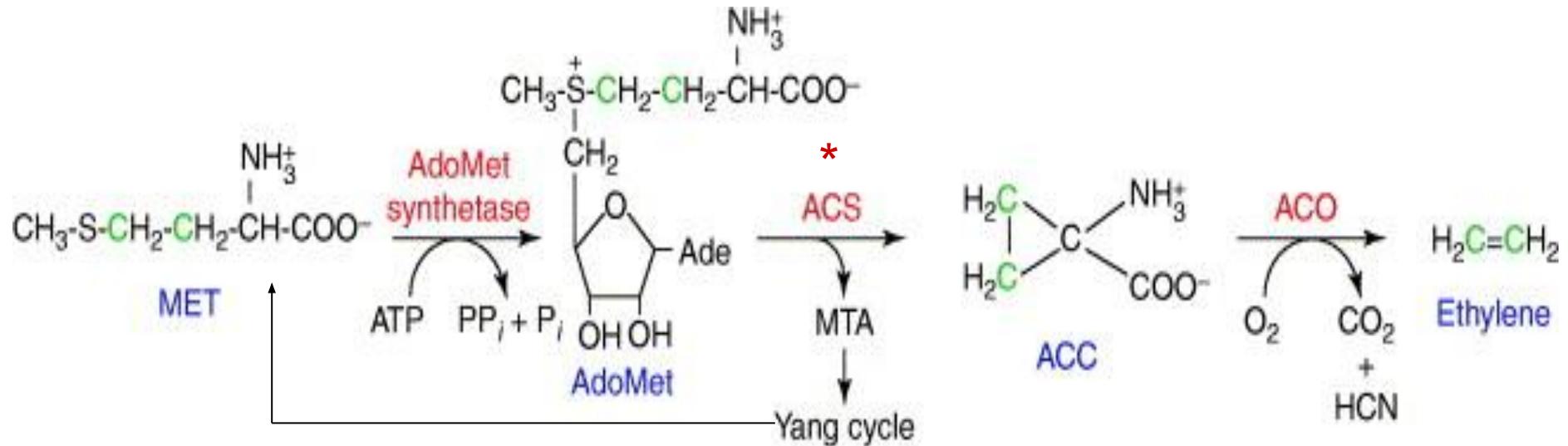
Этилен-нечувствительный мутант (ein, etr)

Мутант с конститутивным тройным ответом (даже без этилена) (ctr)

ЭТИЛЕН



Биосинтез этилена



TRENDS in Plant Science

Промежуточные продукты: MET (метионин), AdoMet (S-аденозил-метионин), ACC (1-аминоциклопропан-1-карбиоксиловая кислота)

Побочный продукт: MTA (метилтиоаденин) – превращается обратно в MET через цикл Янга

Ферменты: AdoMet-синтаза, ACS (ACC-синтаза), ACO (ACC-оксидаза)

* - Лимитирующая стадия – синтез ACC из AdoMet. Регулируется:

- 1). через экспрессию генов ACS – ауксинами, brassinостероидами, поранением
- 2). через стабильность белков ACS (основной путь) - цитокининами

Тканеспецифичность экспрессии генов ACS

A, etiolated seedlings

B, light grown seedlings

1, roots

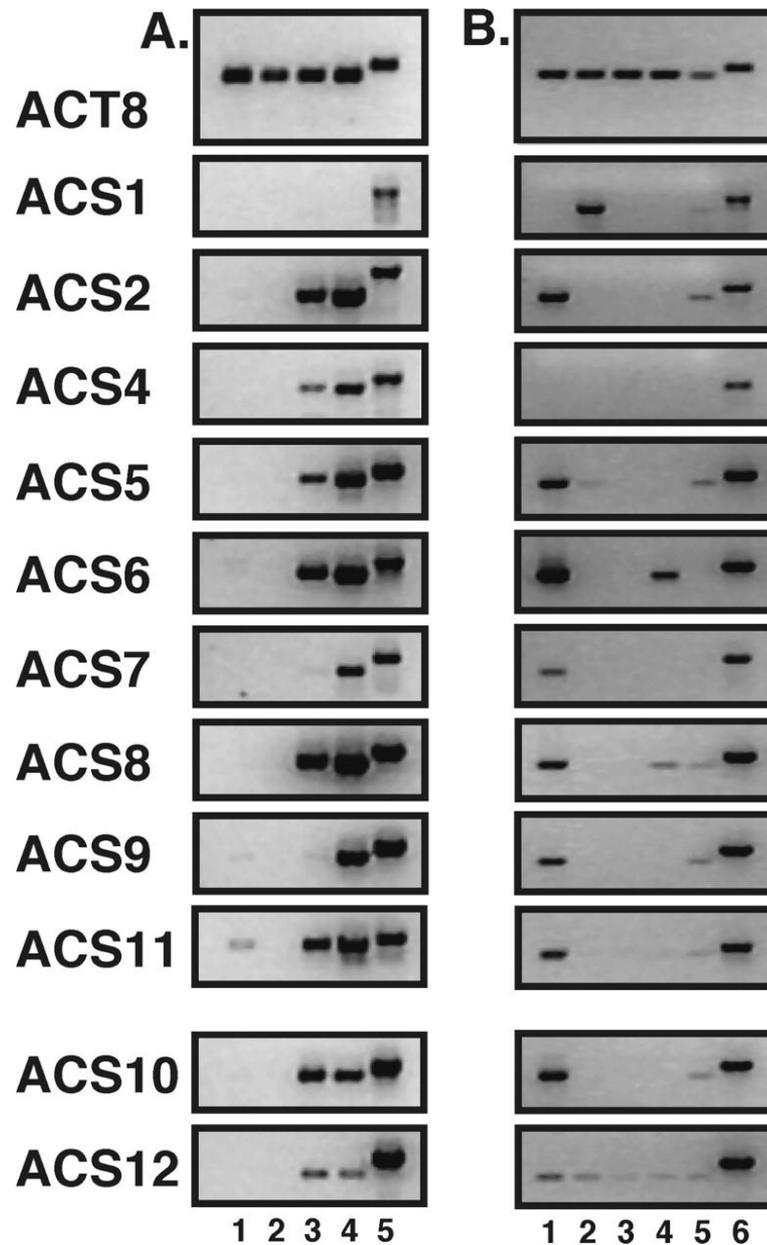
2, leaves

3, stems

4, flowers

5, siliques

6, genomic DNA.



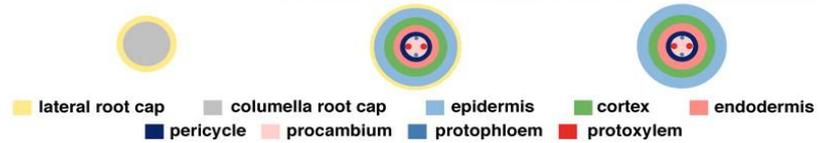
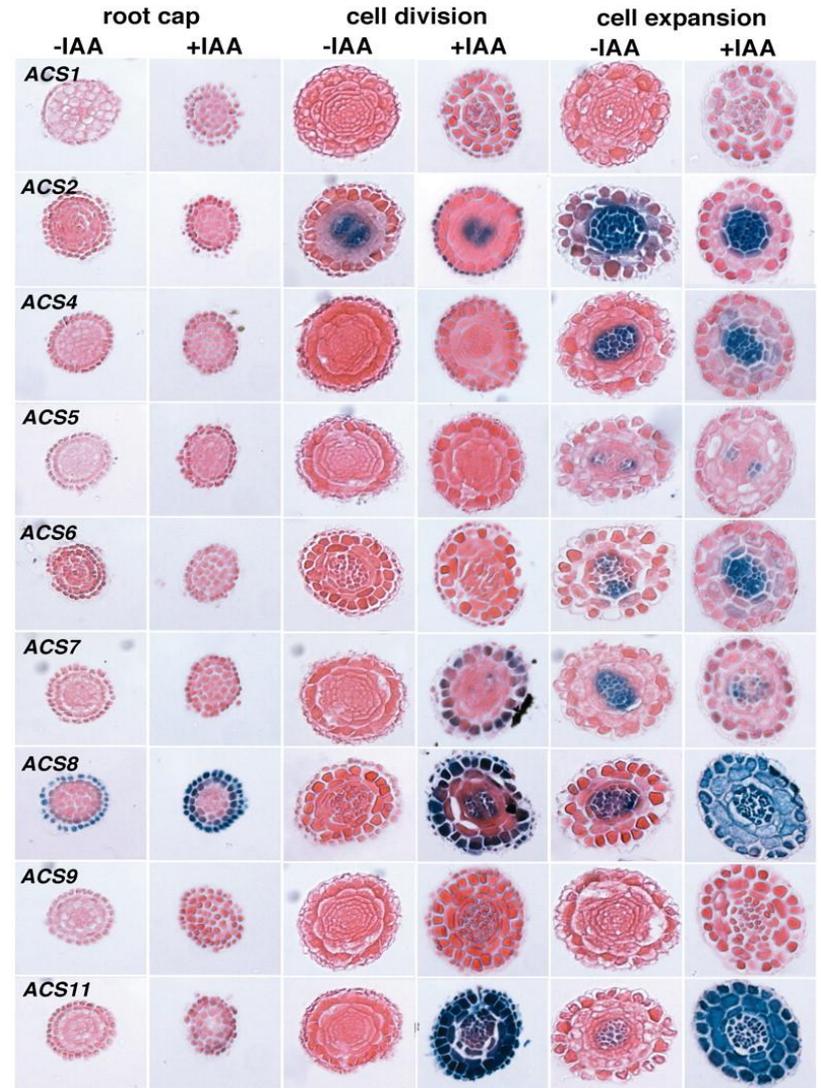
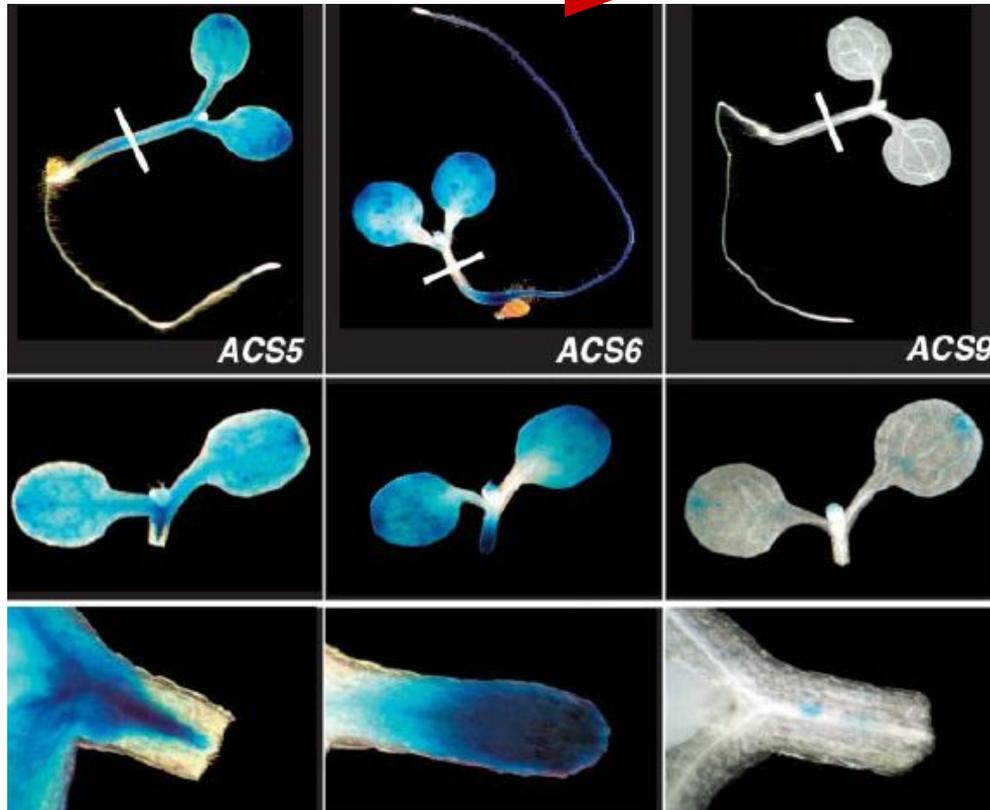
Регуляция экспрессии генов ACS:

А - при поранении

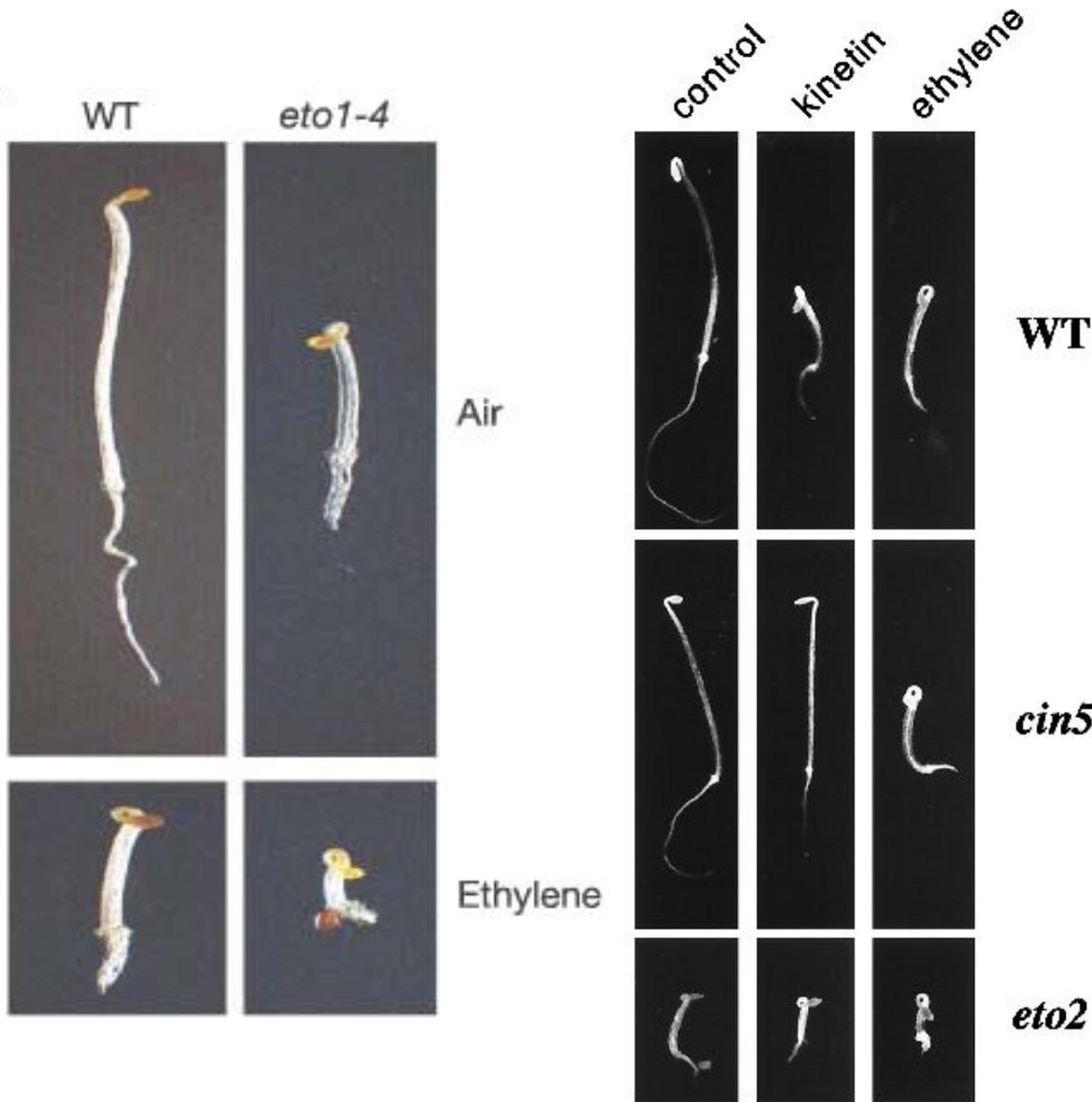
В - при обработке ИУК

А

В



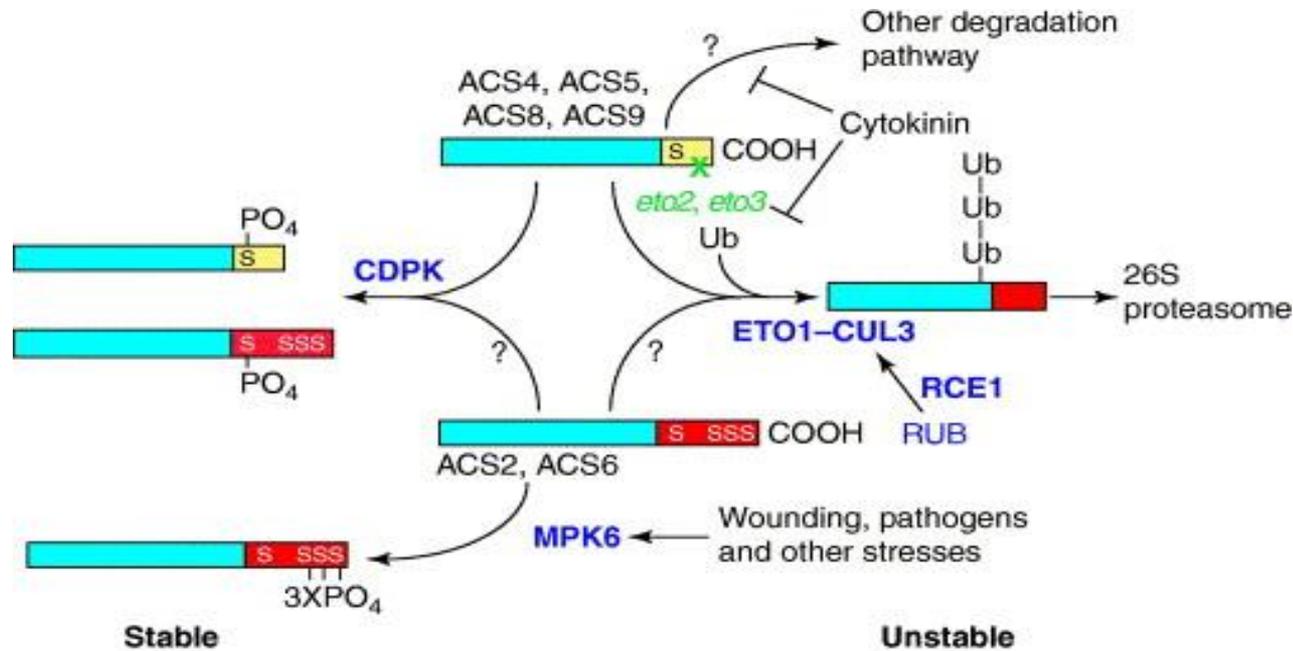
Фенотипы мутантов *eto* (ethylene overproducing) и *cin* (cytokinin insensitive)



- Мутации *cin* – результат потери функции ACS генов

- Мутации *eto* – результат стабилизации ферментов ACS за счет изменения последовательности их С-концевого домена (*eto 2,3*) или снижения активности убиквитин-лигазного комплекса (*eto 1*)

Уровень этилена в тканях регулируется через стабильность ACS белков

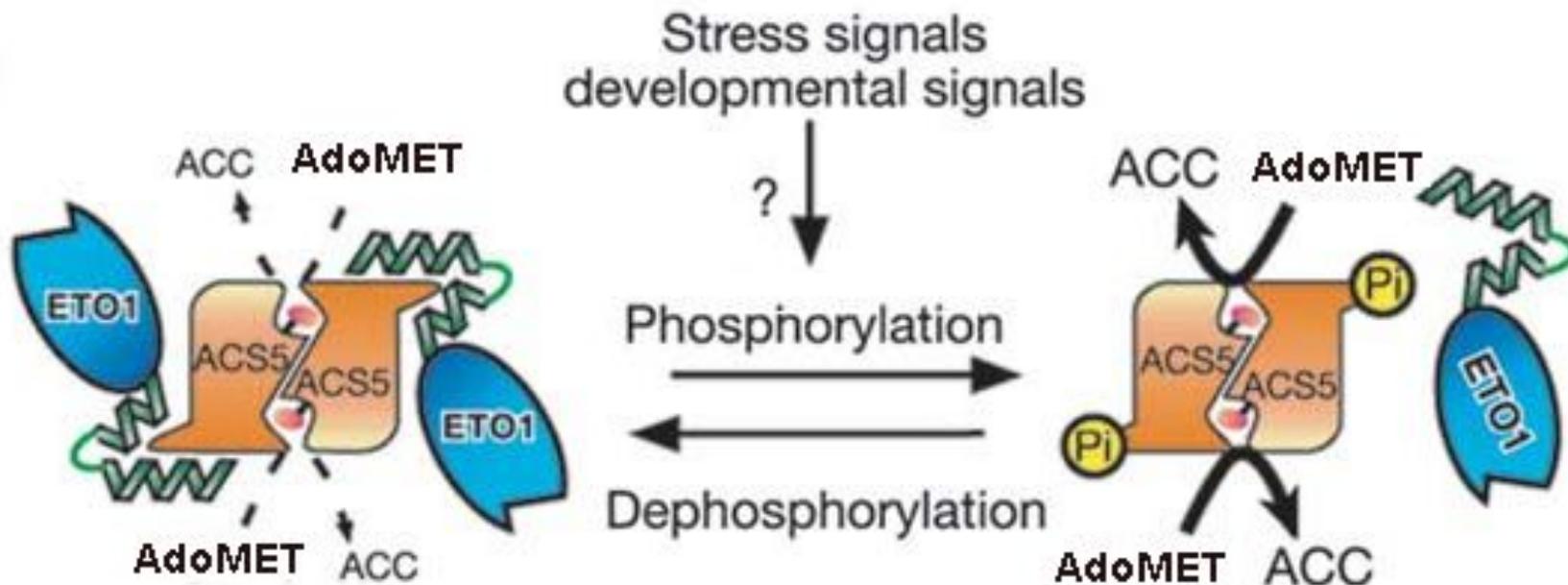


TRENDS in Plant Science

A – Деградация ACS белков с помощью 26S-протеасомы. Начинается с присоединения убиквитин-лигазного комплекса ETO1-CUL3 к С-концевой последовательности ACS. Мутации по С-концу ACS (*eto2*, 3) дают стабильный ACS белок

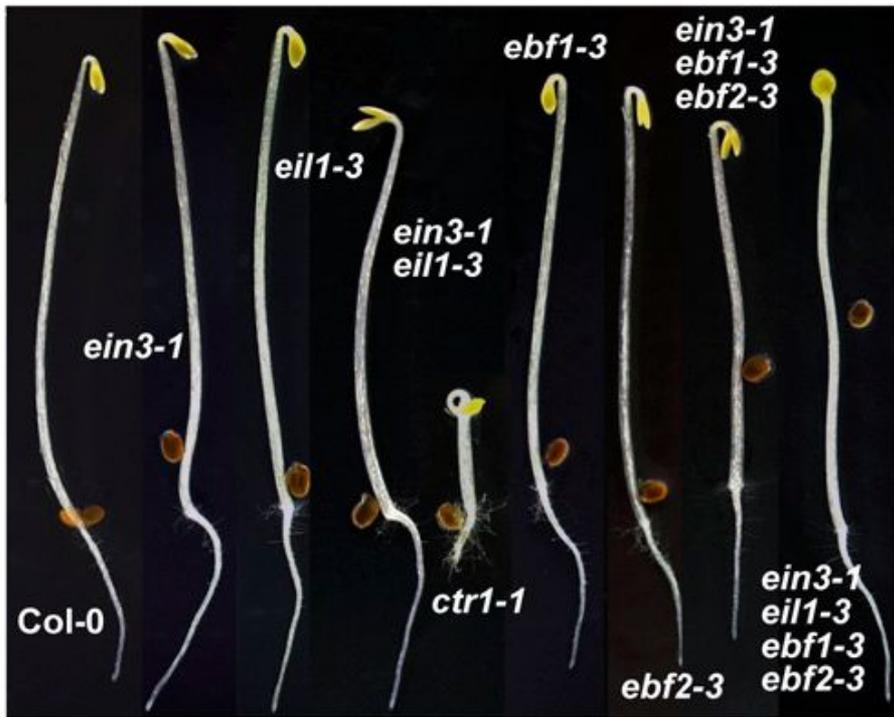
B – Стабилизация ACS белков путем фосфорилирования по консервативным остаткам серина: с помощью Ca²⁺-зависимых киназ CDPK (все ACS) и MAPKK киназы MPK6 (ACS2 и 6).

Регуляция биосинтеза этилена через стабильность ACS белков

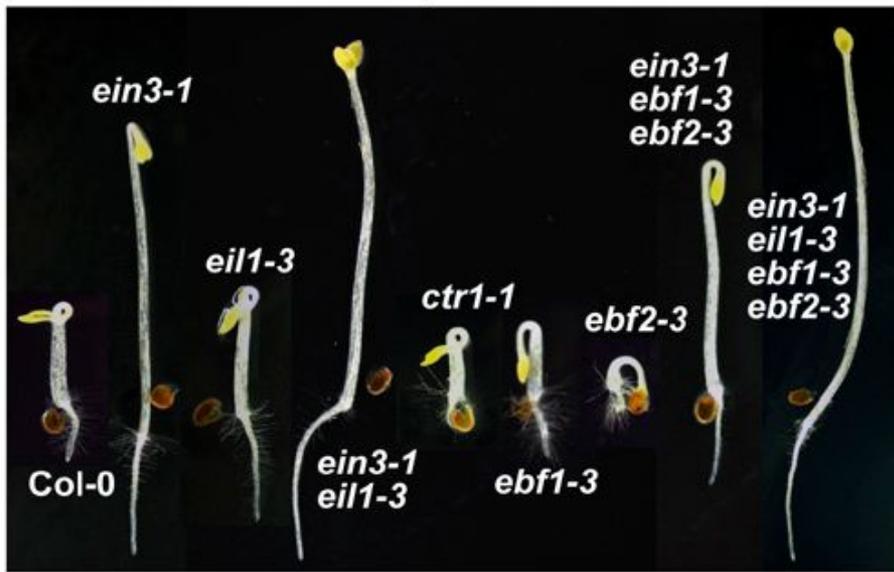


ETO1 – субъединица убиквитин-лигазного комплекса CUL3-ВТВ

air



ethylene



Компоненты этиленового сигналинга были выявлены при изучении мутантов *A.thaliana* с измененным «тройным ответом»:

1. Мутанты нечувствительные к этилену (*etr1*, *etr2*, *ers1*, *ers2*, *ein4* - доминантные); *ein2*, *ein3*, *ein5* - рецессивные);

2. Мутанты с конститутивным тройным ответом при отсутствии этилена (*ctr1* – рецессивный).

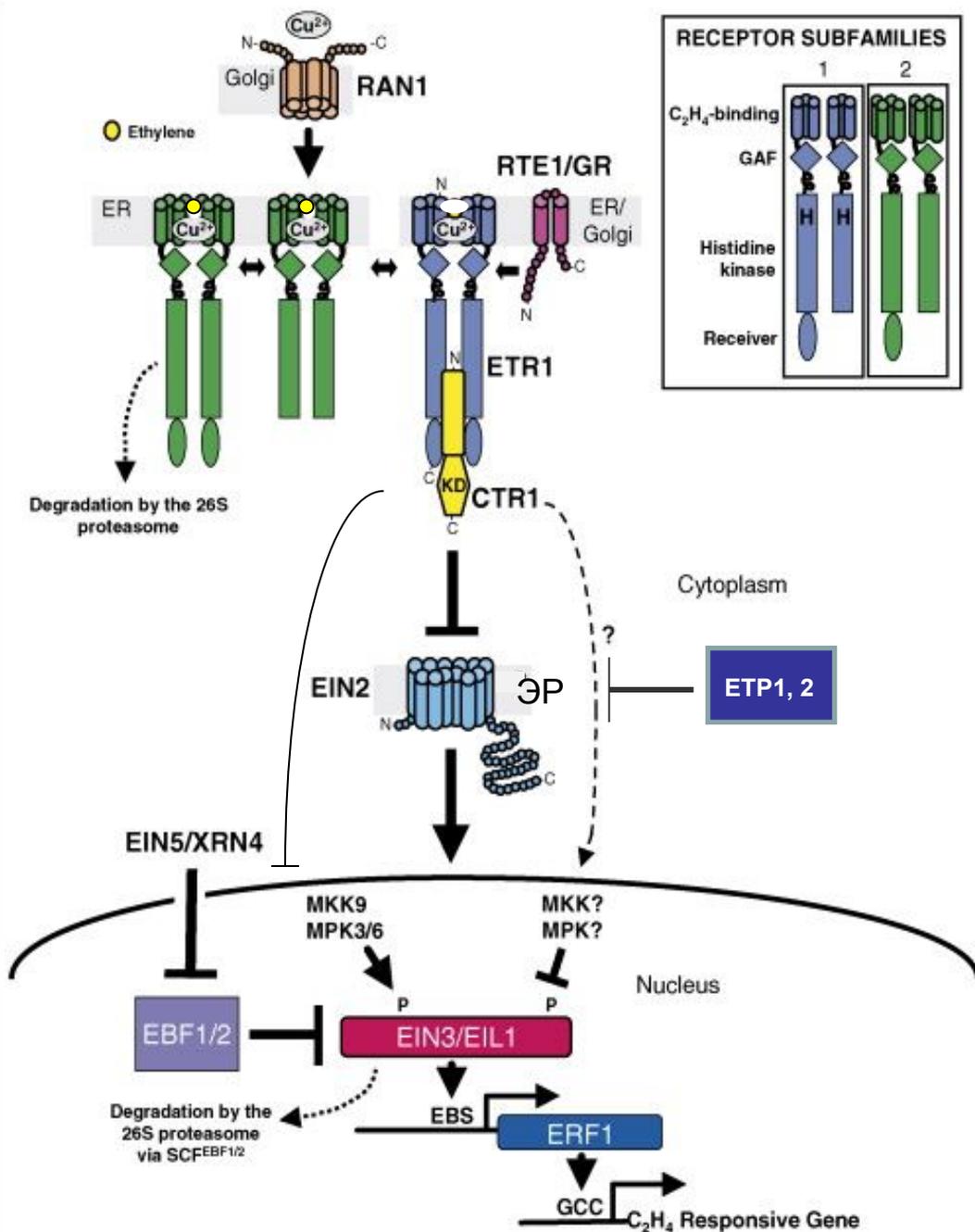
Изучение эпистатического взаимодействия мутаций □
 порядок действия генов:



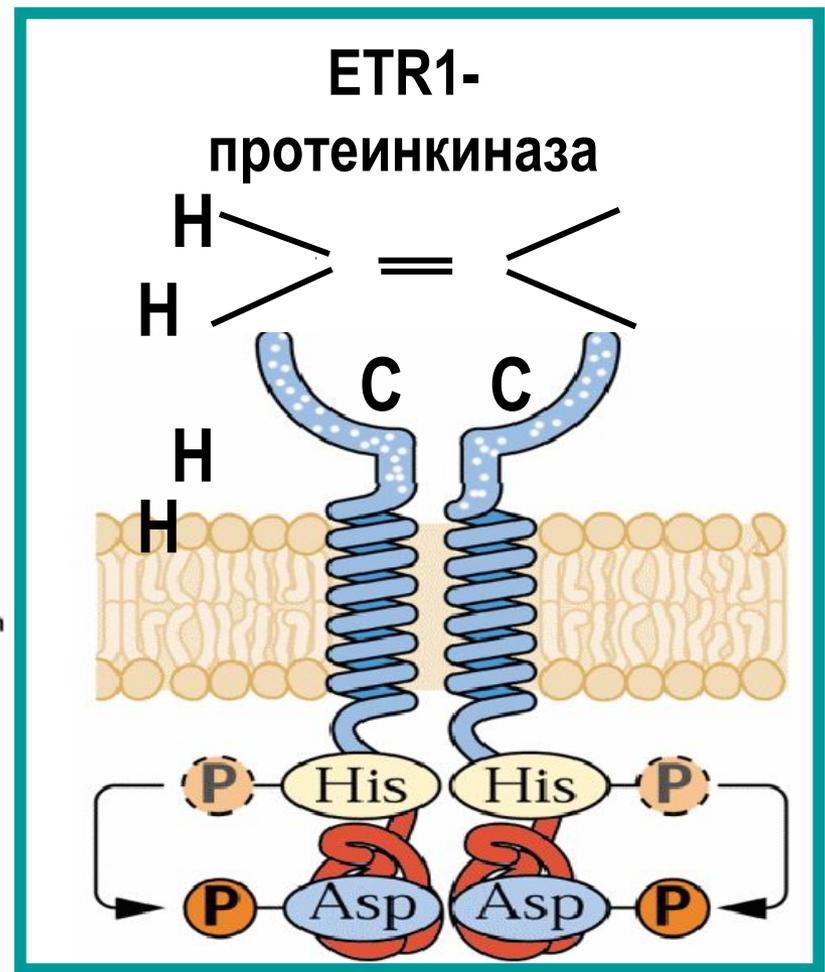
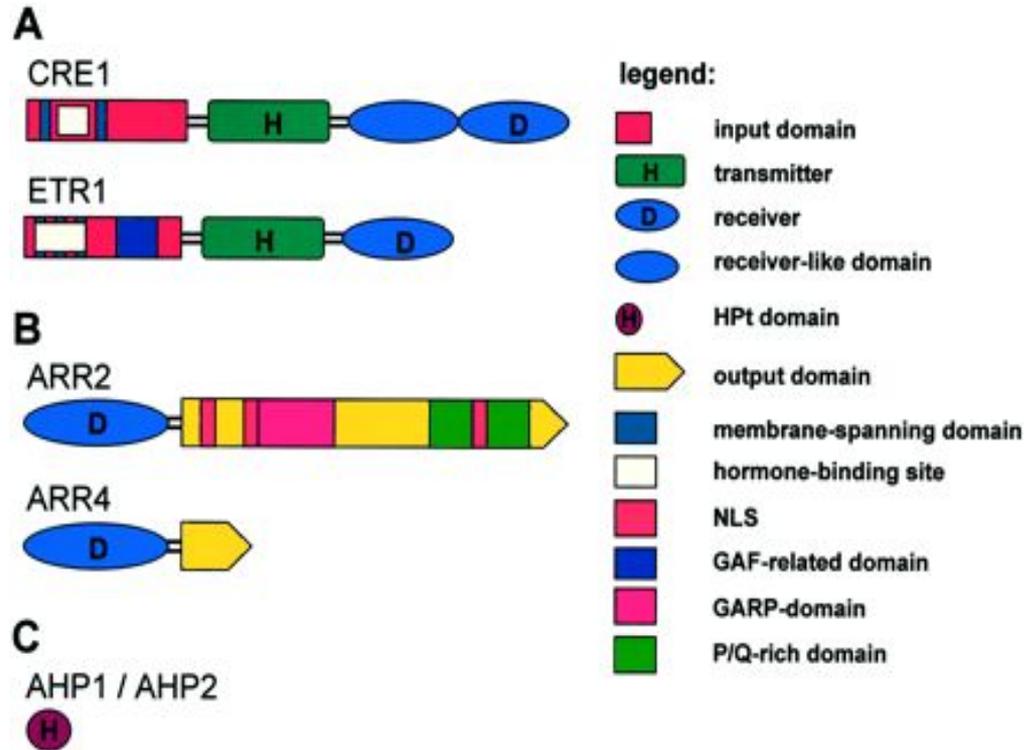
Передача сигнала при ответе на этилен

Основные компоненты:

1. Рецепторы этилена: **ETR1** и **2**, **ERS1** и **2**, **EIN4**
2. Металлотранспортер **RAN**
3. Киназа **MAPKKK CTR1**, нижележащие компоненты MAP-киназного каскада
4. Мембранный белок **EIN2**
5. Транскрипционные факторы **EIN3-like**
6. Компоненты убиквитин-лигазных комплексов **ETP1, 2**; **EBF1, 2** (действуют на разных этапах сигналинга)
7. 5'-3'-экзорибонуклеаза **EIN5**
8. Транскрипционные факторы **ERF**



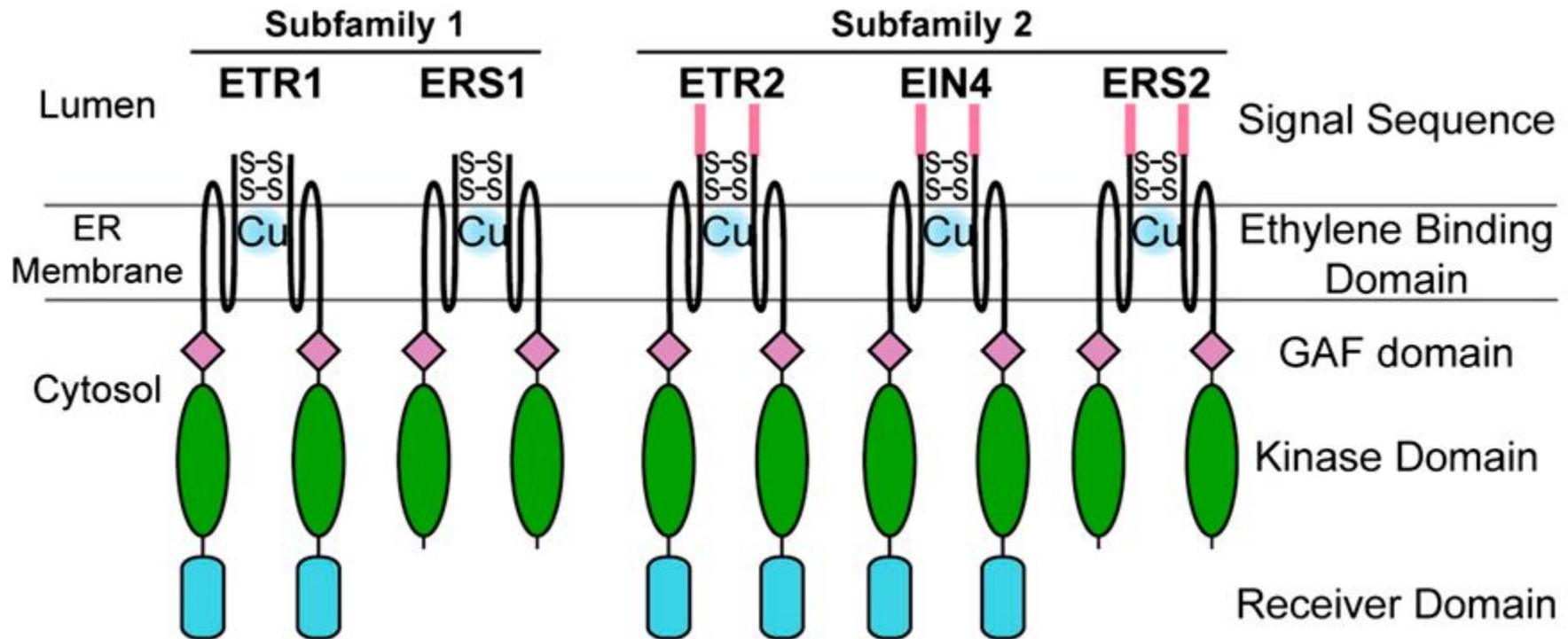
Белки двухкомпонентных систем передачи сигнала у *Arabidopsis*



- A** - Гибридные сенсорные гистидин-киназы АНК4/CRE1 (рецептор цитокинина) и ETR1 (рецептор этилена)
- B** - ARR- регуляторы ответа (передача сигнала цитокинина): В-типа (ARR2) – транскрипционные факторы и А-типа (ARR4) – репрессоры транскрипции
- C** - AHP – гистидин-содержащие фосфотрансферазы (передача сигнала цитокинина)

Консервативные а/к остатки: Н – His, D - Asp.

Пять этиленовых рецепторов *Arabidopsis*

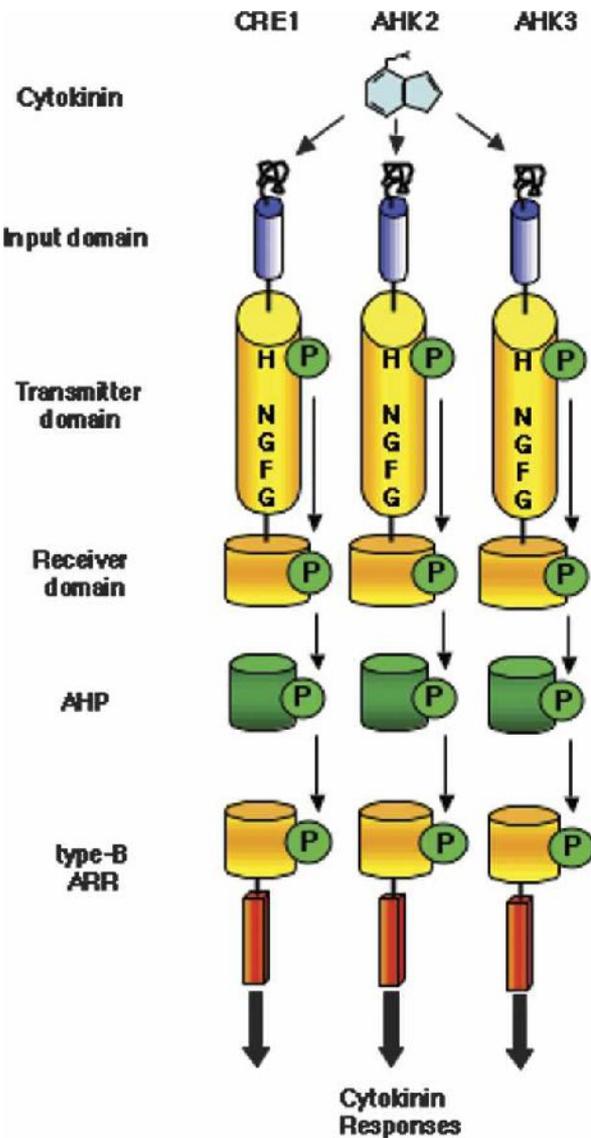


Домены:

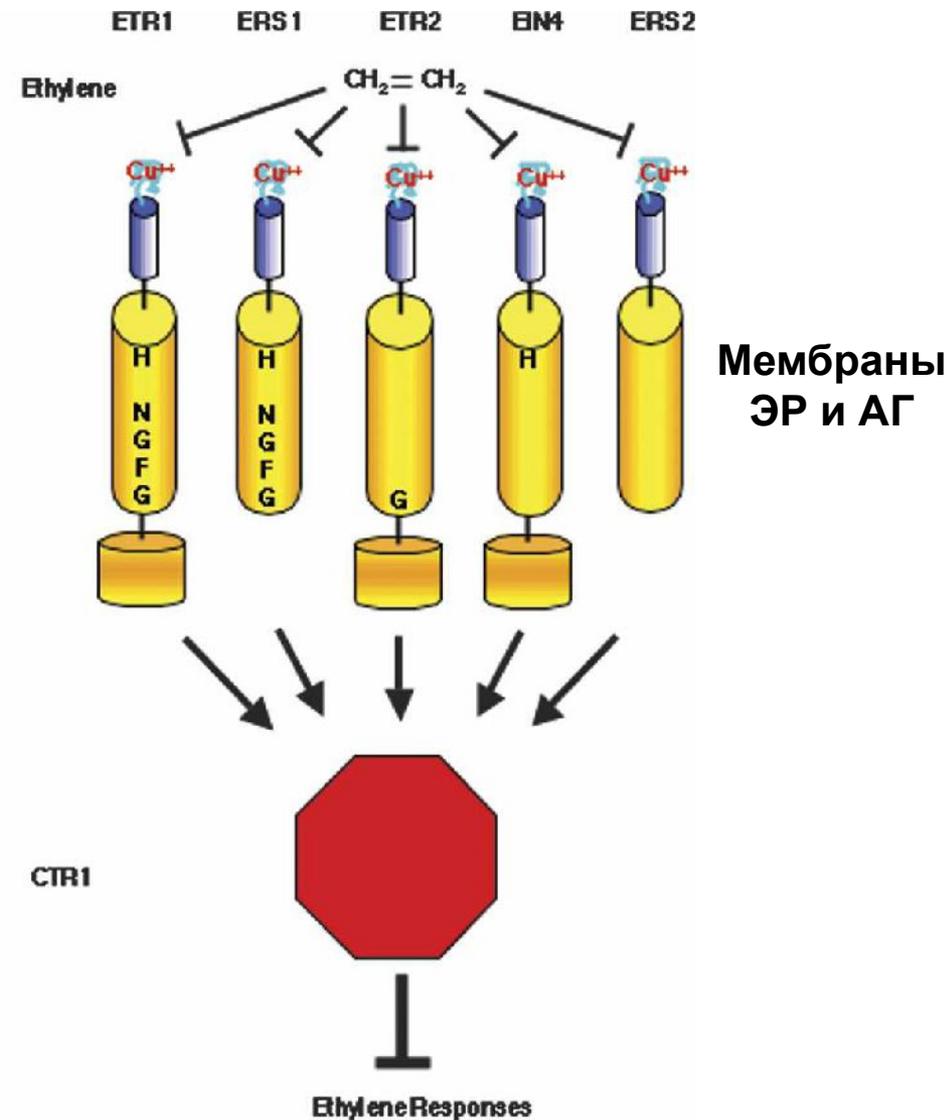
- Трансмембранный (ТМ) домен – связывает этилен в присутствии кофактора (Cu^{1+}) три раза пронизывает мембрану. У рецепторов подсемейства 2 содержит экстраклеточную сигнальную последовательность (не важна для функции)
- **GAF** домен – содержит мотив coiled coil, служит для образования гомо- и гетеродимеров рецепторов
- Гистидин-киназный (НК) домен – 1. автофосфорилируется при связывании этилена (киназная активность не важна для функции рецепторов). 2. взаимодействует с CTR1 (важно для функции рецепторов!)
- **Receiver** домен – у ETR1, 2 и EIN4. Не важен для функции рецепторов!

Сравнение систем передачи сигнала цитокинина и этилена

Плазма-
лемма

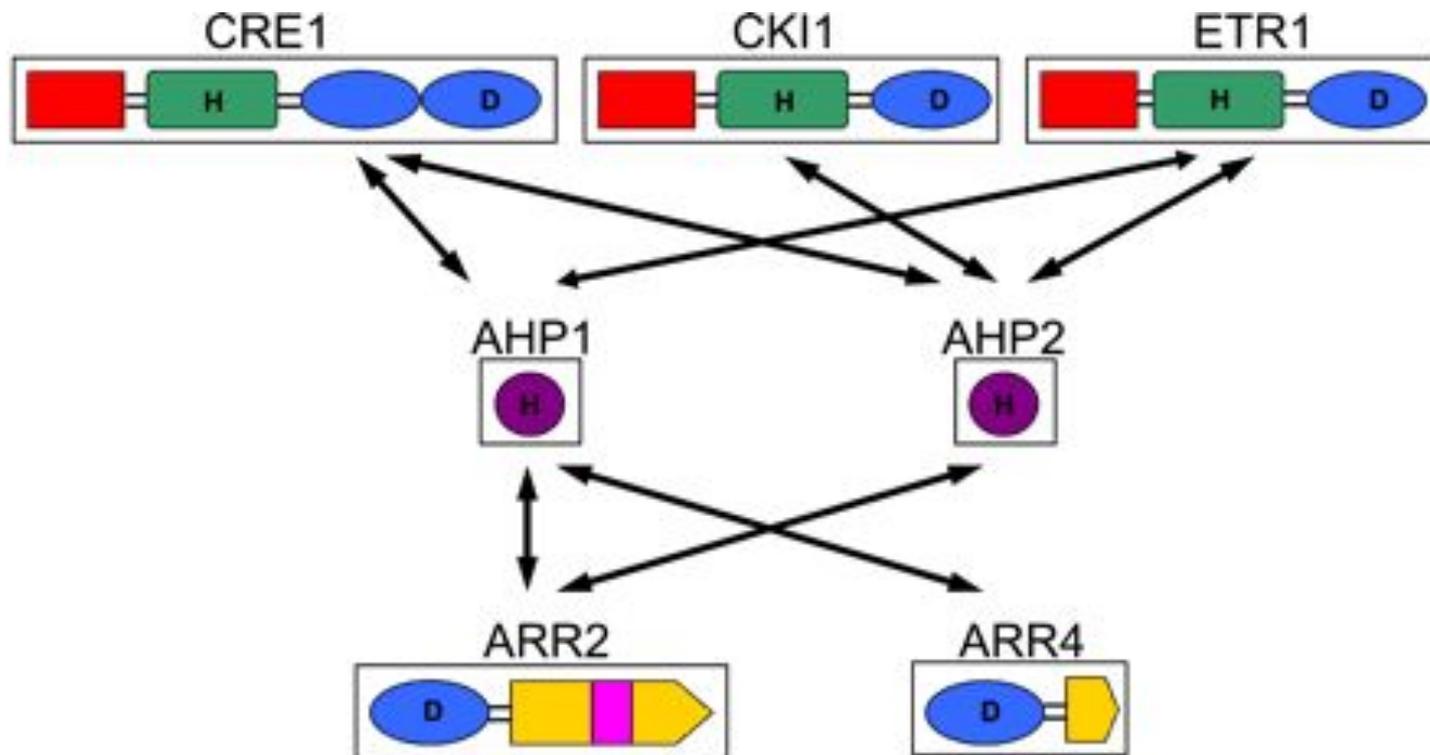


- Фосфореле
- Активация каждого последующего компонента предыдущим



- Нет передачи фосфатных групп
- Инактивация рецепторов при связывании лиганда (этилена)

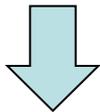
Взаимодействие белков, входящих в двухкомпонентные системы передачи сигналов у *Arabidopsis*:



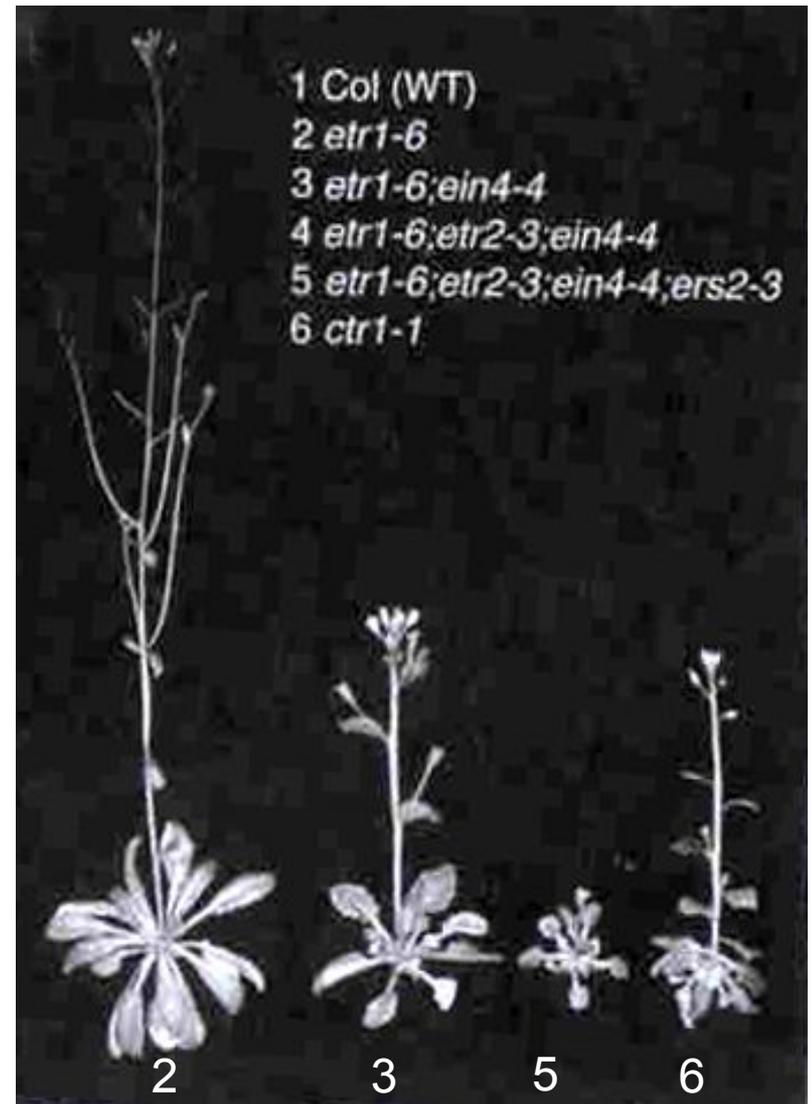
Гибридные гистидин-киназы CRE1 и CKI (рецепторы цитокинина), а также ETR1 (рецептор этилена) могут передавать фосфатную группу на фосфотрансферазы AHP1 и AHP2 □ активация регуляторов ответа на цитокинин ARR2 и ARR4.

Рецепторы являются негативными регуляторами этиленового сигналинга

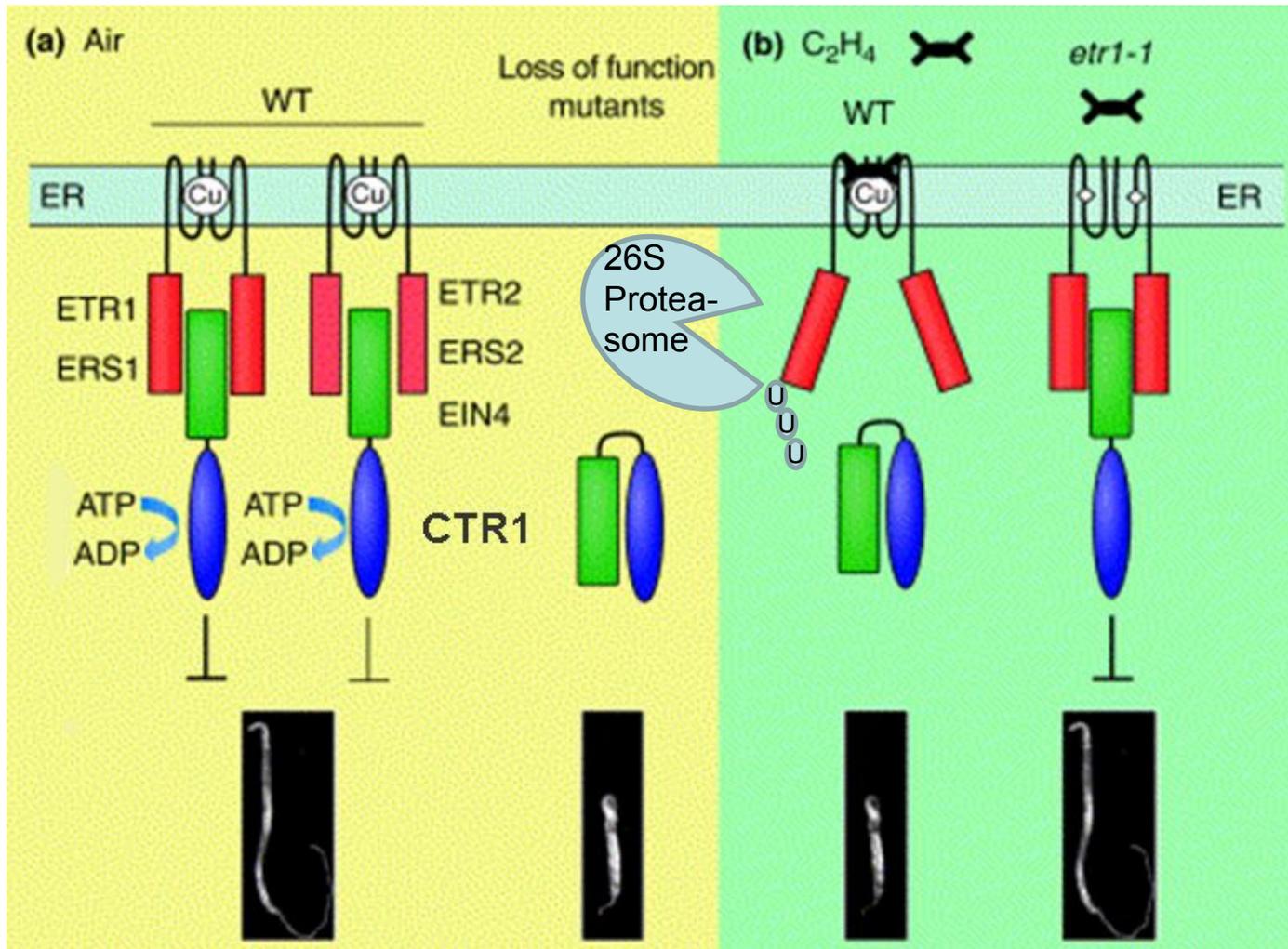
- Мутации с потерей функции одного из этиленовых рецепторов не имеют проявления, множественные мутанты характеризуются конститутивным ответом на этилен



1. Функции рецепторов перекрываются
2. Рецепторы негативно регулируют ответ на этилен



Инактивация рецепторов при связывании этилена



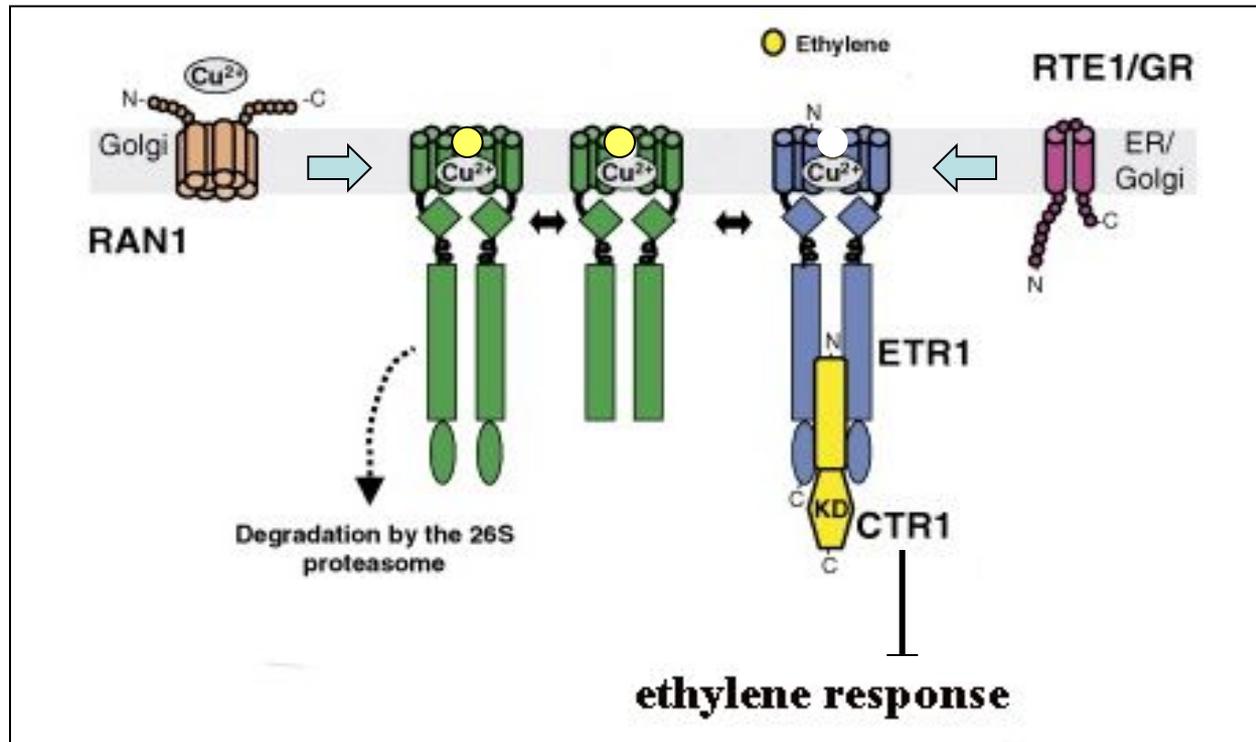
В воздухе (без этилена):

Рецепторы связывают и активируют протеинкиназу CTR1, которая негативно регулирует ответ на этилен

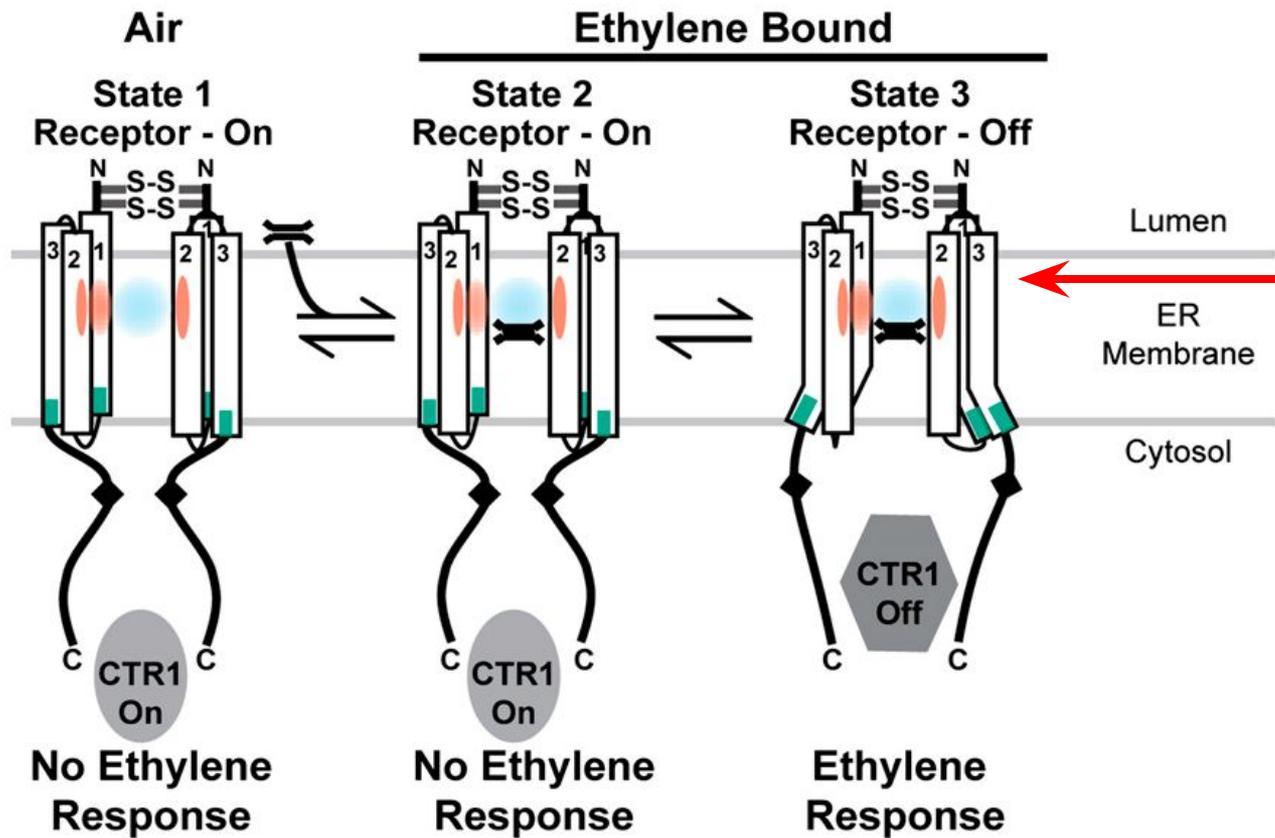
При связывании этилена:

Происходит высвобождение CTR1 □ нет подавления ответа на этилен. Убиквитинирование и протеасомная деградация рецепторов

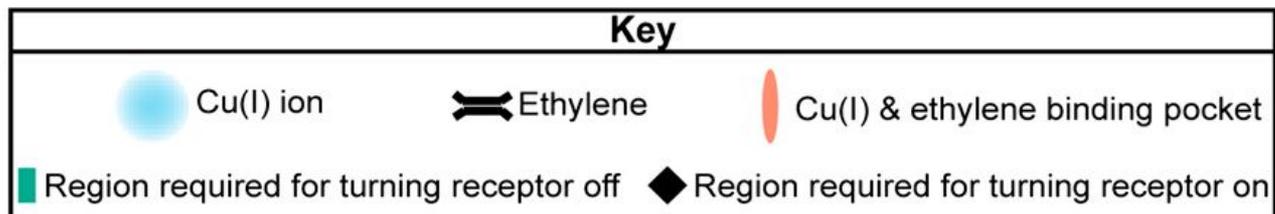
Кофакторы этиленовых рецепторов



- Ионы Cu^{+} - связывание этилена происходит только при их присоединении к рецептору
- Трансмембранный белок **RAN1** (Response to ANtagonist 1) – осуществляет транспорт ионов Cu^{+} . Локализован в аппарате Гольджи. RAN1 действует в сигналинге этилена **ВЫШЕ** рецепторов
- Трансмембранные белки **RTE** (Reversion to Ethylene sensitivity) арабидопсиса и **GR** (Green-Ripe) томата – взаимодействуют с рецептором ETR1. Локализованы в аппарате Гольджи и ЭР.

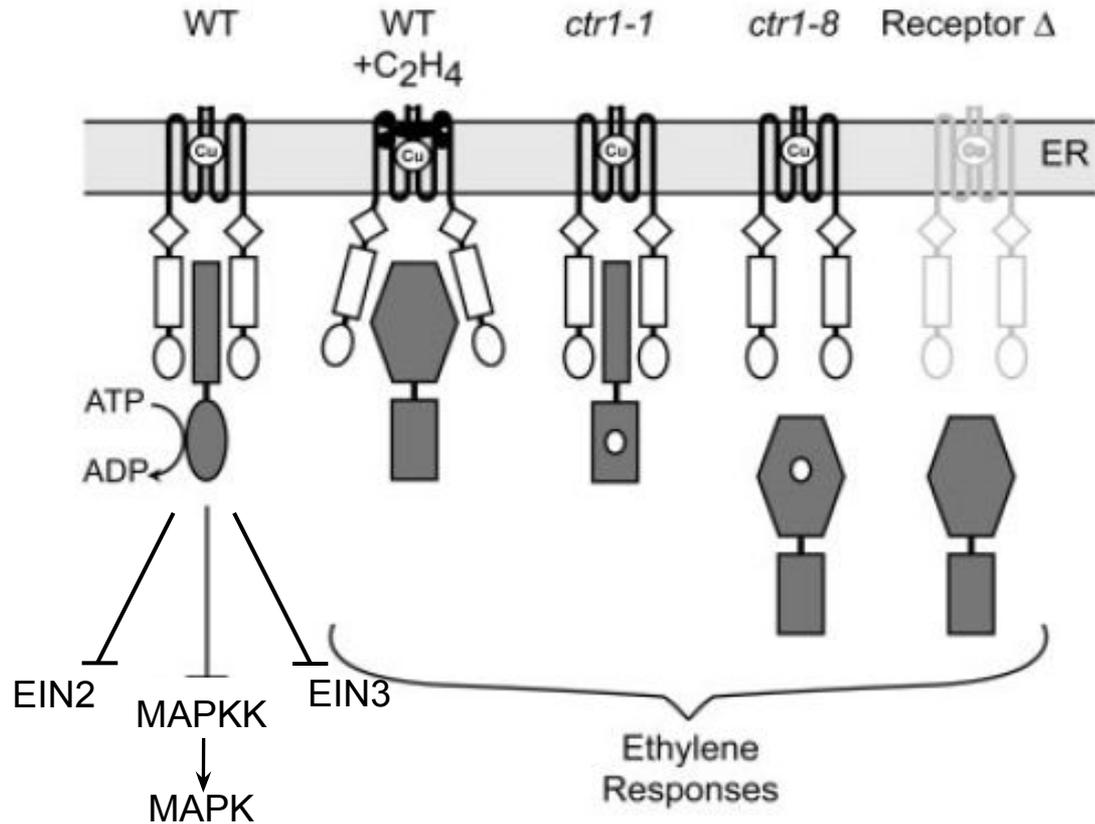
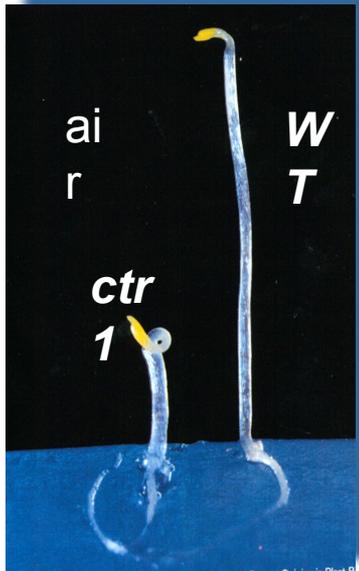


3 трансмембранные α-спирали лиганд-связывающих доменов – важны для связывания иона меди и конформационных изменений



- Важные мотивы лиганд-связывающих ТМ доменов: 1. мотивы из 7 консервативных аминокислот, необходимых для связывания меди (самая важная - Cys65, координирующая присоединение иона меди), 2. мотивы из 13 консервативных аминокислот, нужные для конформационных изменений рецептора
- «Включение» этиленового сигналинга – массовый переход рецепторов в «состояние 3»

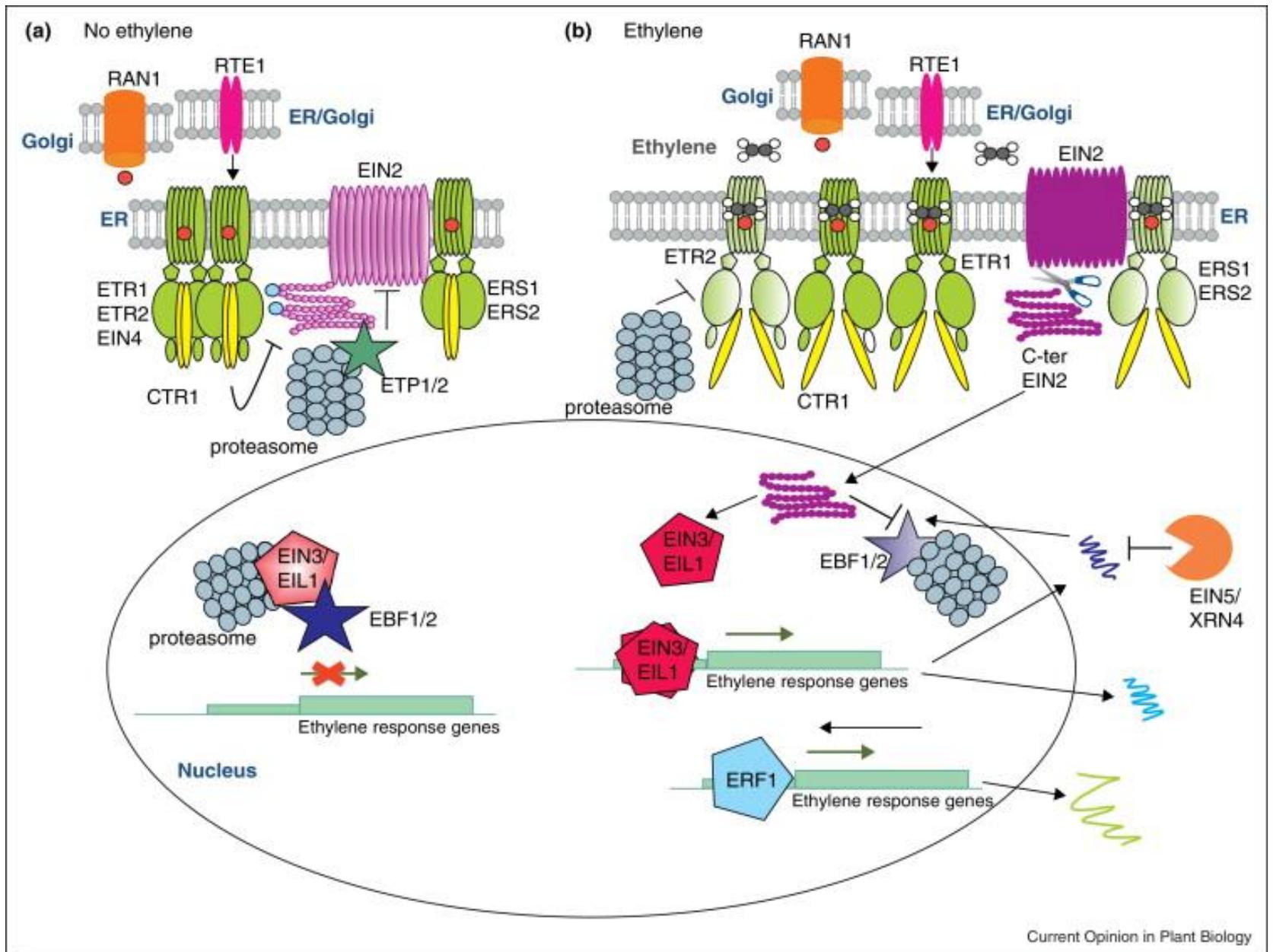
Ser/Thr протеинкиназа CTR1 (MAPKK) – негативный регулятор этиленового сигналинга



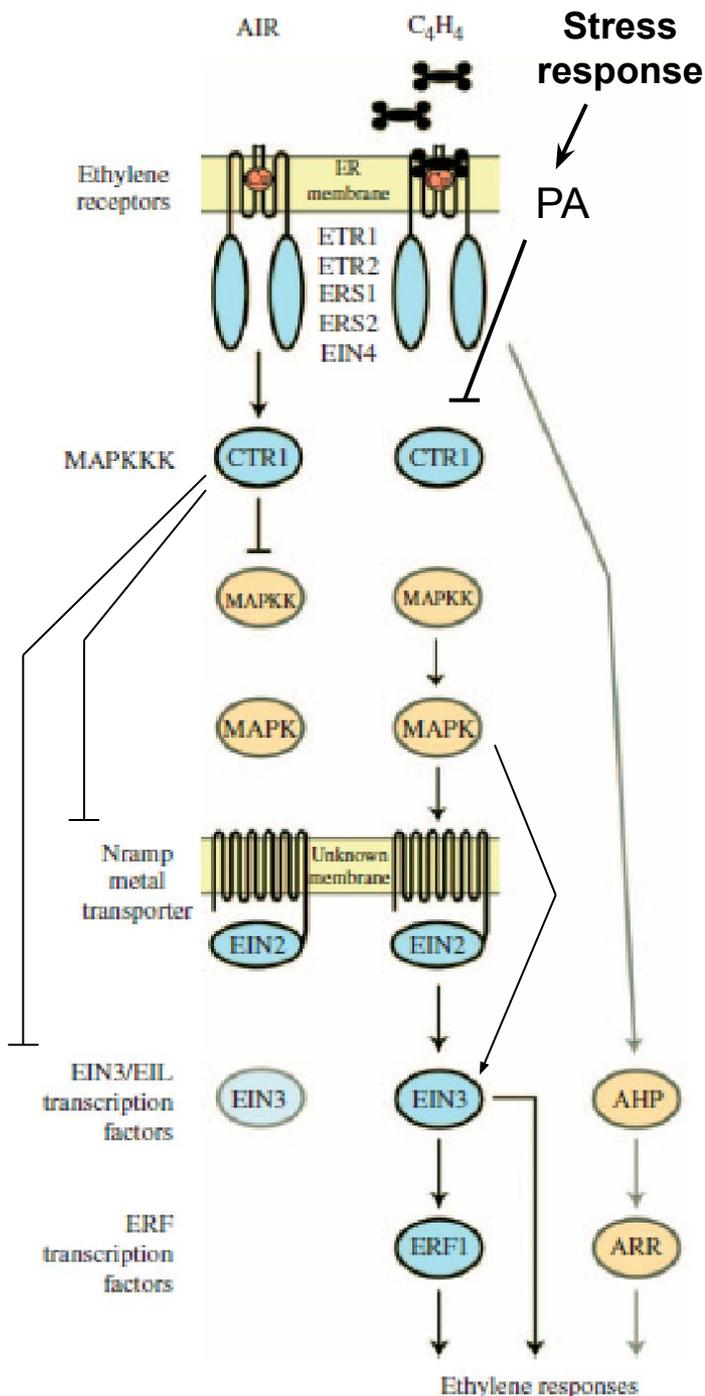
Мишени CTR1:

1. MAP-киназный каскад
2. EIN2 – мембранный белок
3. EIN3 – этилен-зависимый транскрипционный фактор

ETR → **CTR1** —| **Ответ на этилен**



Предполагаемая схема действия MAP-киназного каскада в этиленовом сигналинге



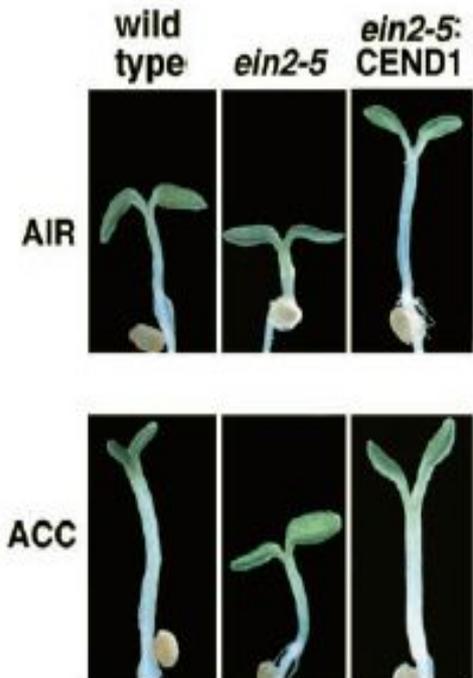
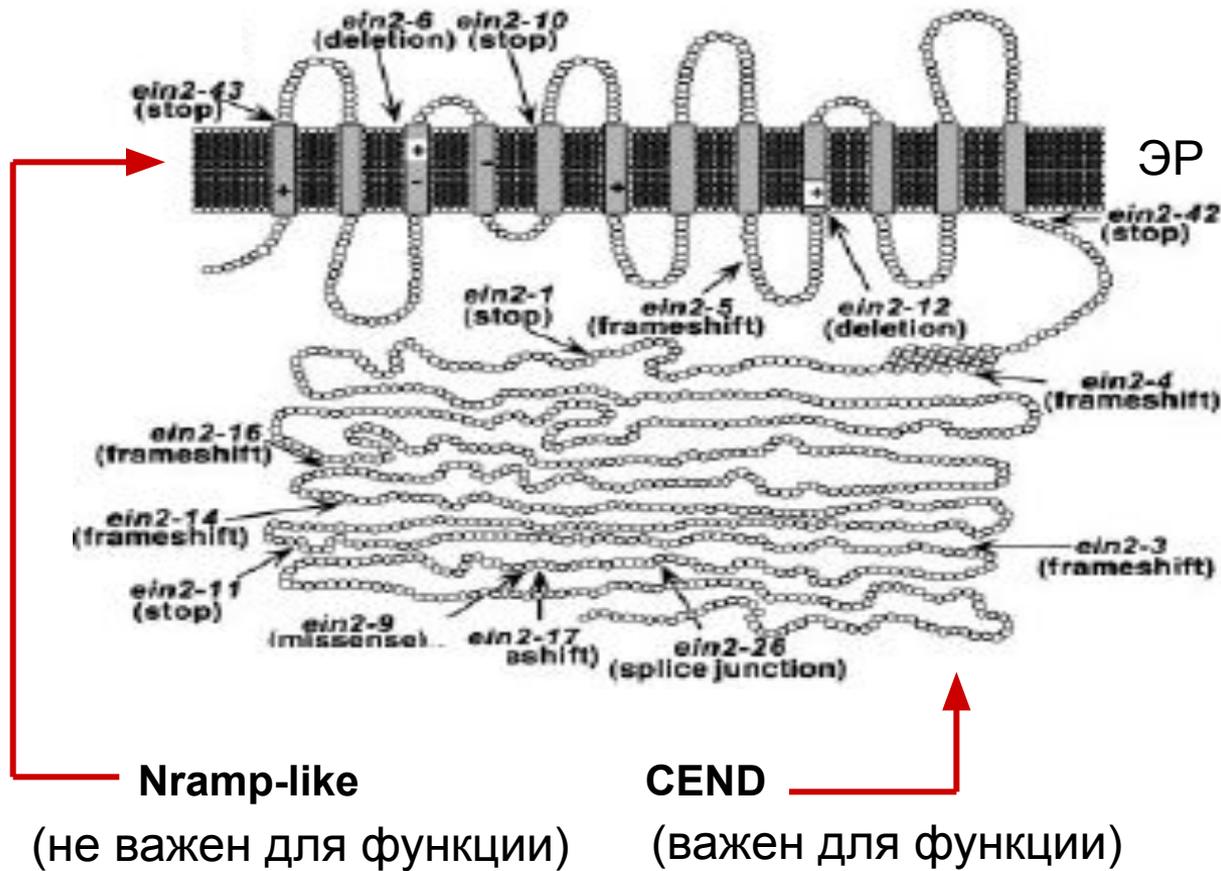
При отсутствии этилена:

1. Рецепторы активируют MAPKKK киназу CTR1
2. CTR1 инактивирует нижележащие компоненты MAP-киназного каскада: MAPKK (МКК9 *Arabidopsis*) и MAPK (МПК3/6 *Arabidopsis*)

В присутствии этилена:

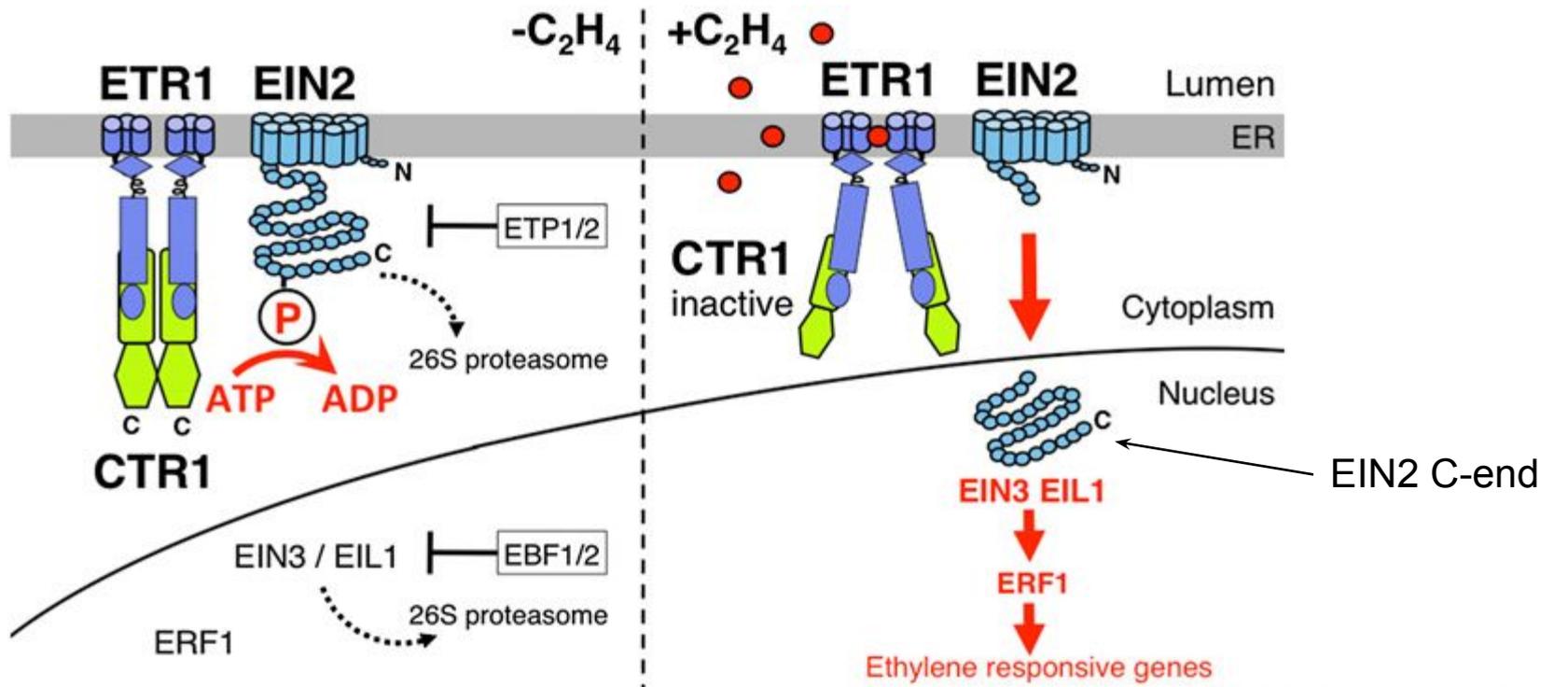
1. Инактивация CTR1
2. Активация МКК9 и МПК3/6
3. МКК9 и МПК3/6 стабилизируют EIN3 □
4. Запуск ответа на этилен

Белок EIN2 - центральный регулятор этиленового сигналинга

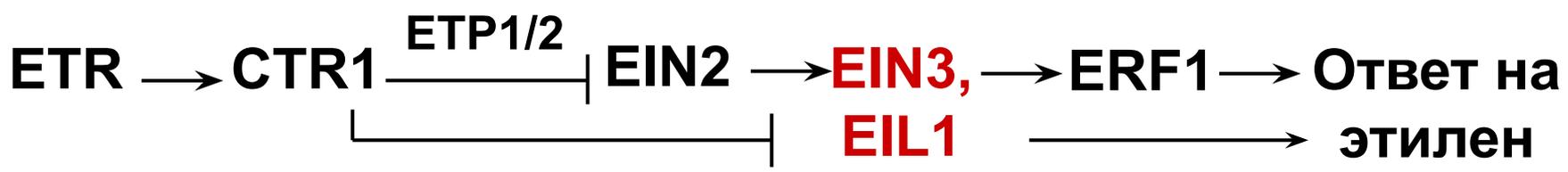


ETR → CTR1 —| **EIN2** → Ответ на этилен

Взаимодействие EIN2 с CTR1 и рецепторами этилена

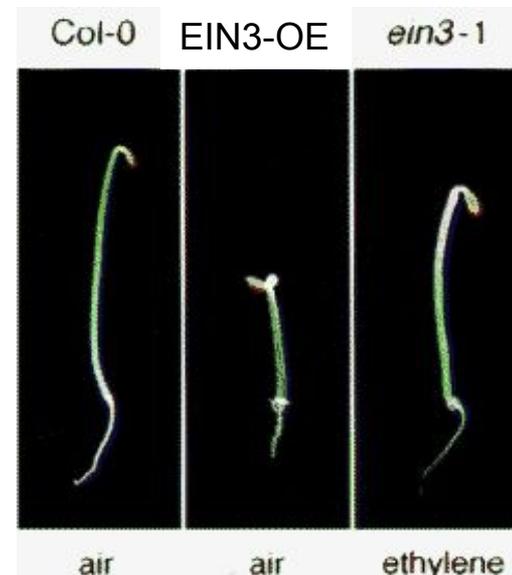
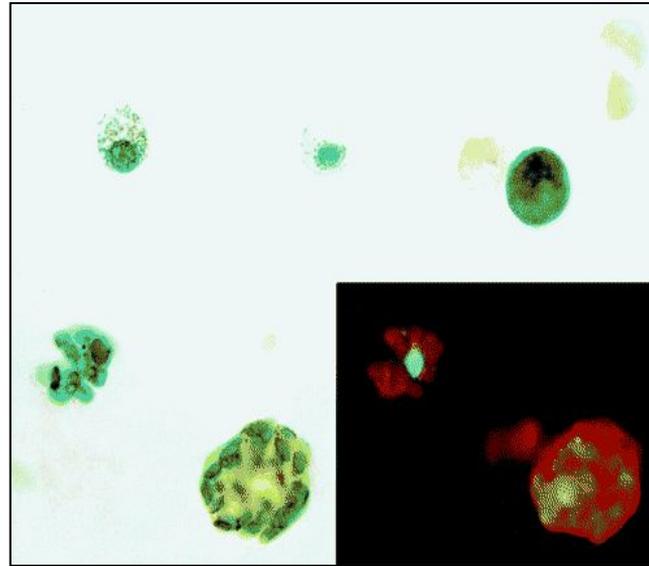


PNAS: November 2012

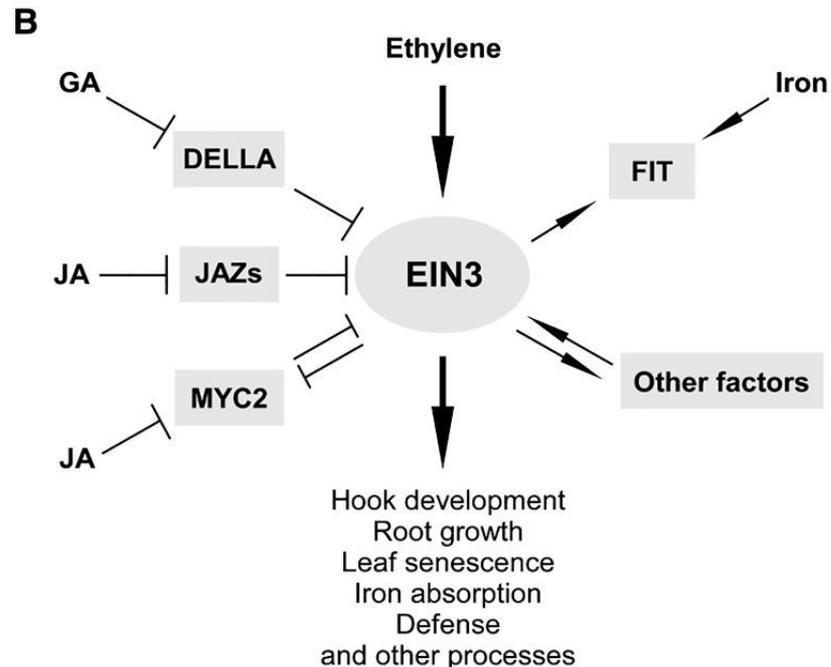
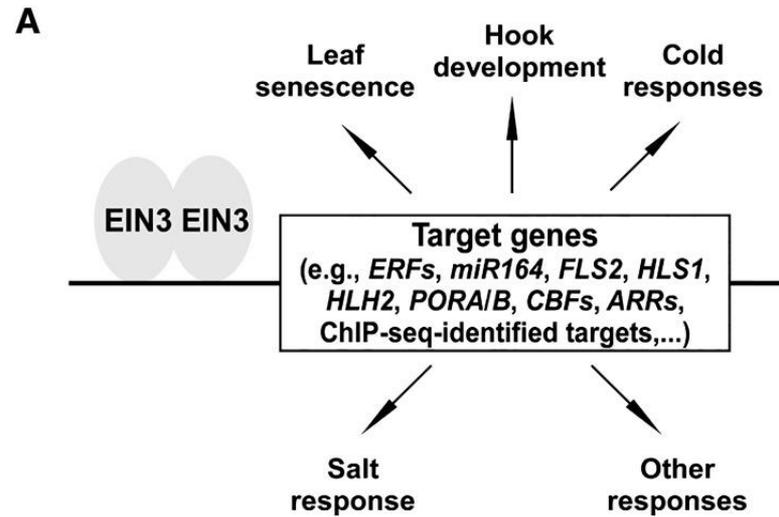


Этилен-зависимые транскрипционные факторы EIN3 и EIL1

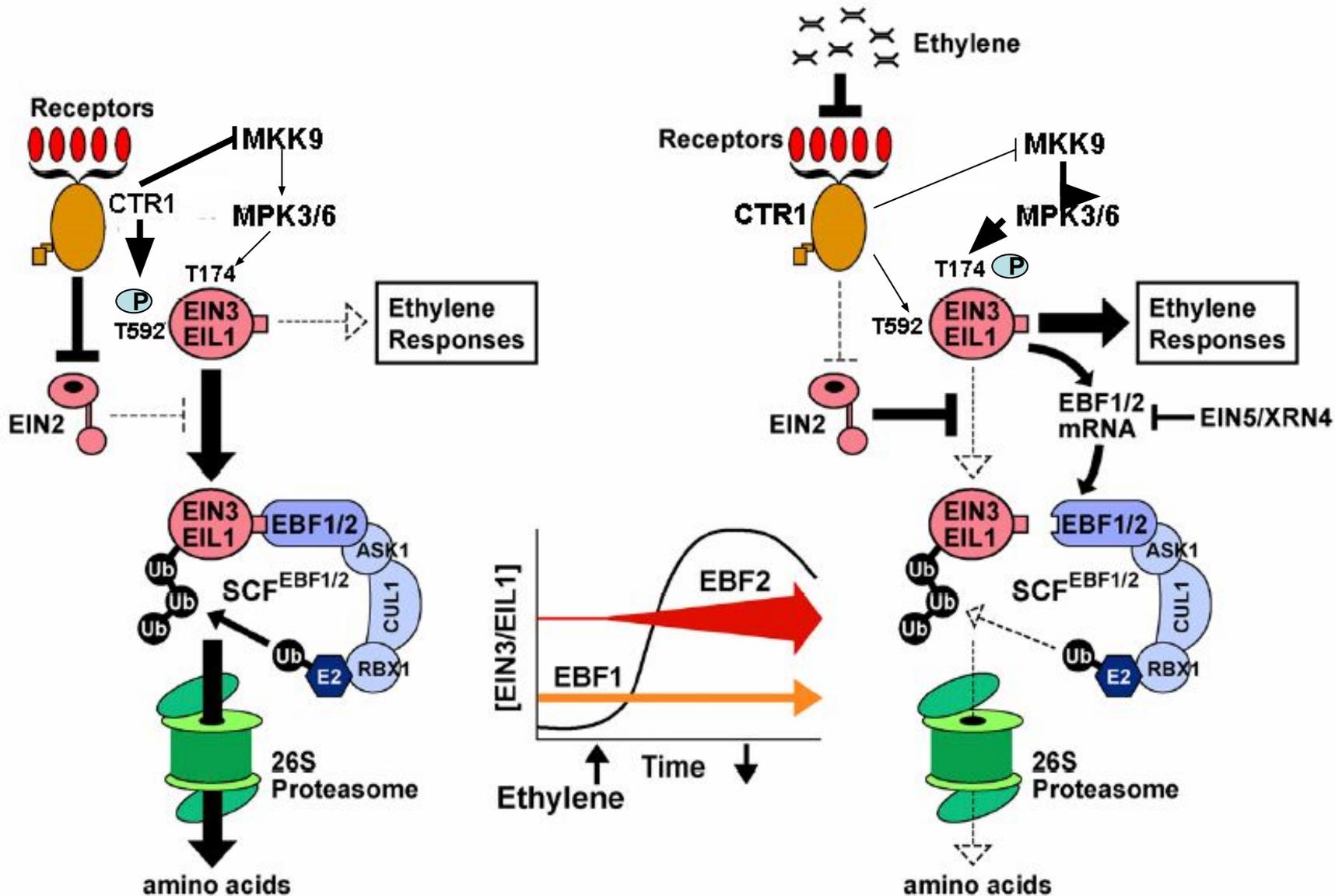
- Позитивные регуляторы этиленового сигналинга
- Регуляторы транскрипции, локализуются в ядре
- Сверхэкспрессия генов семейства *EIN3* приводит к конститутивному этиленовому ответу
- Короткоживущие белки (время полужизни – 30 мин)
- Интенсивность ответа на этилен регулируется на уровне стабильности EIN3 белков (но не на уровне экспрессии *EIN3* генов)
- Индуцируют экспрессию гена *ERF1* (Ethylene Response Factor)



ТФ EIN3 – координаторы ответа на этилен и его взаимодействия с другими гормонами



Регуляция стабильности белков EIN3



Дестабилизаторы EIN3: CTR1 (фосфорилирование T592), EBF (убиквитинирование)

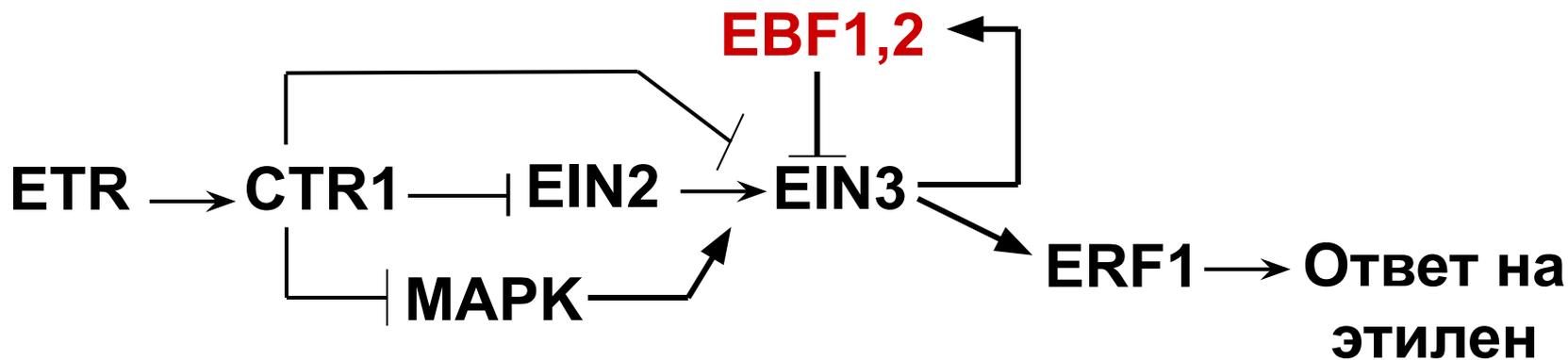
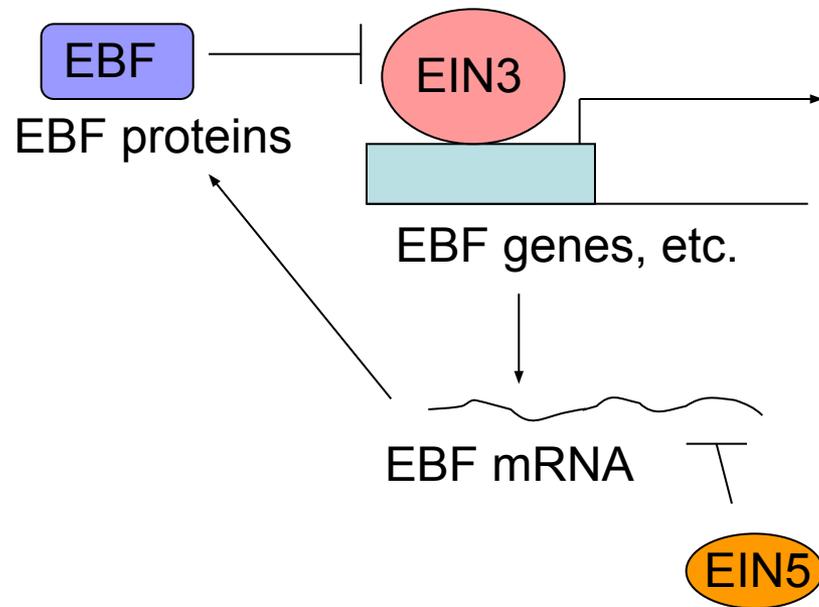
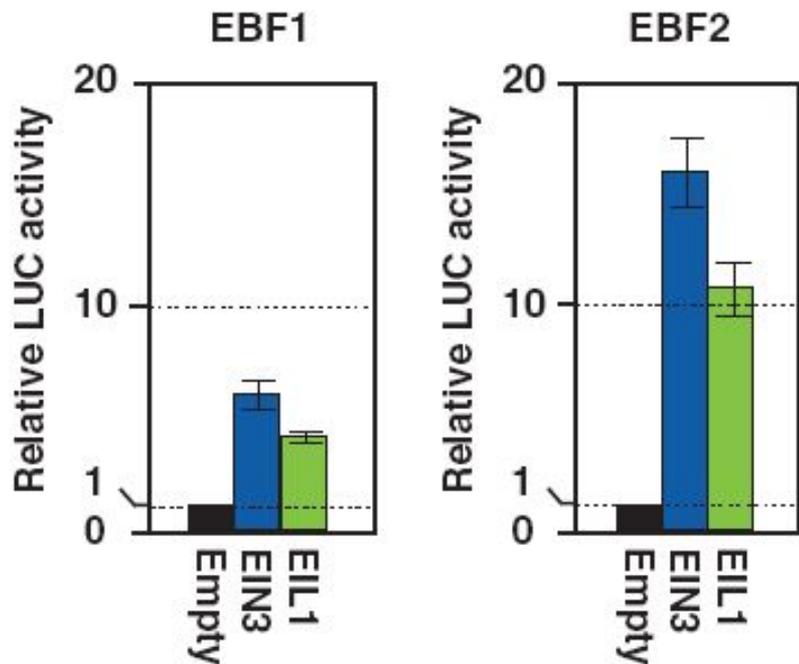
Стабилизаторы EIN3: MAPK (фосфорилирование T174), EIN2 (белок-белковые взаимодействия), EIN5 (деградация транскриптов EBF)

Регуляция стабильности белков EIN3

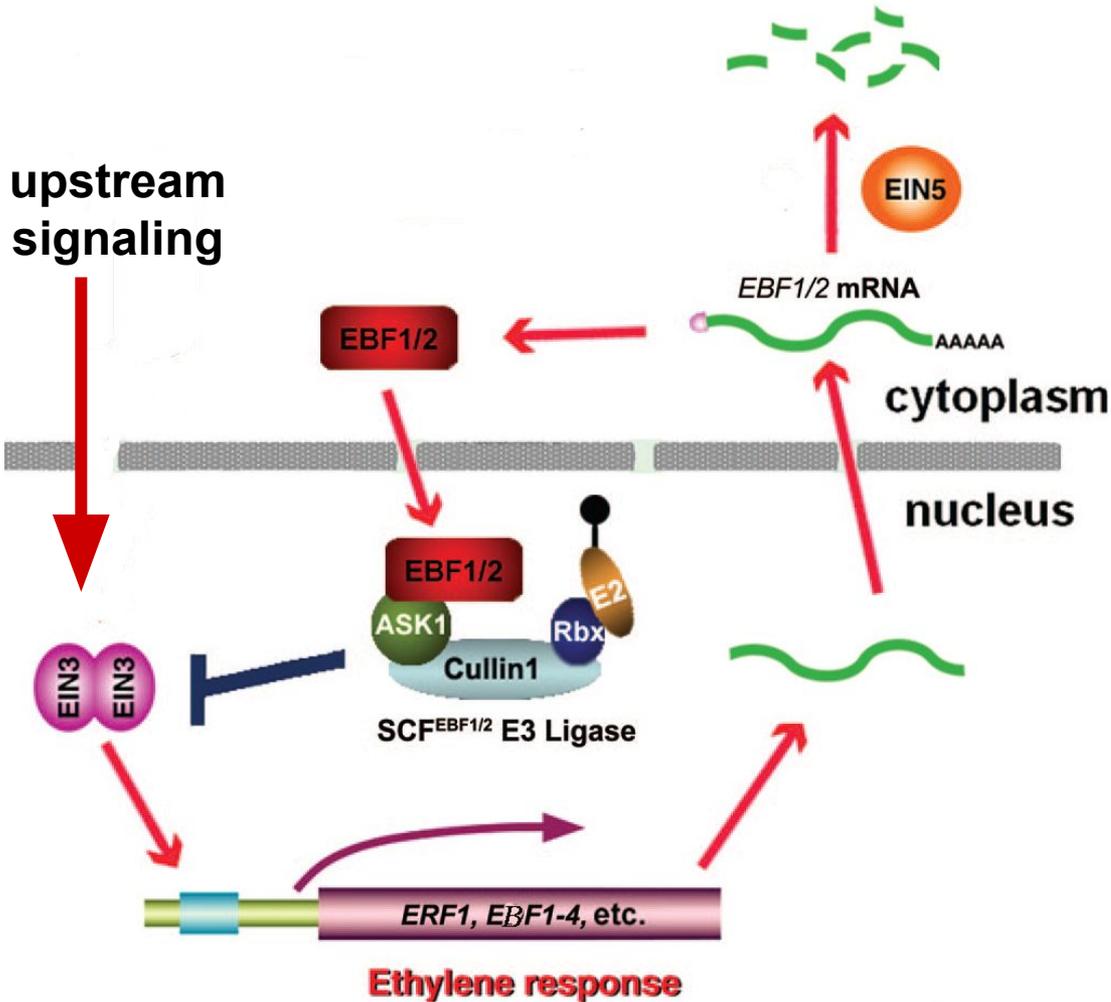
- Белки EIN3 подвергаются **протеасомо-зависимой деградации**
- Связывание белков EIN3 с убиквитин-лигазным комплексом SCF зависит от F-боксов содержащих белков EBF1 и 2 (EIN3-Binding F-box)
- Связывание EIN3 с EBF происходит при фосфорилировании EIN3 белков по консервативному остатку Thr-592, которое осуществляет киназа CTR1
- Экспрессия гена *EBF2* позитивно регулируется этиленом

- Противоположный процесс – **стабилизация** EIN3 белков
- Этилен-зависимая стабилизация белков EIN3 - при фосфорилировании по остатку Thr-174 через MAP-киназный каскад, включающий в себя киназы MKK9 и MPK3/6 (инактивируется CTR1)
- Этилен стимулирует накопление EIN3 белков даже у нулевых мутантов *ctr1* □ возможен CTR1-независимый путь регуляции (например, через белок EIN2)

Взаимодействие EIN3-EBF - негативная обратная связь в этиленовом сигналинге



Рибонуклеаза EIN5/XRN4 регулирует уровень транскриптов *EBF1/2*

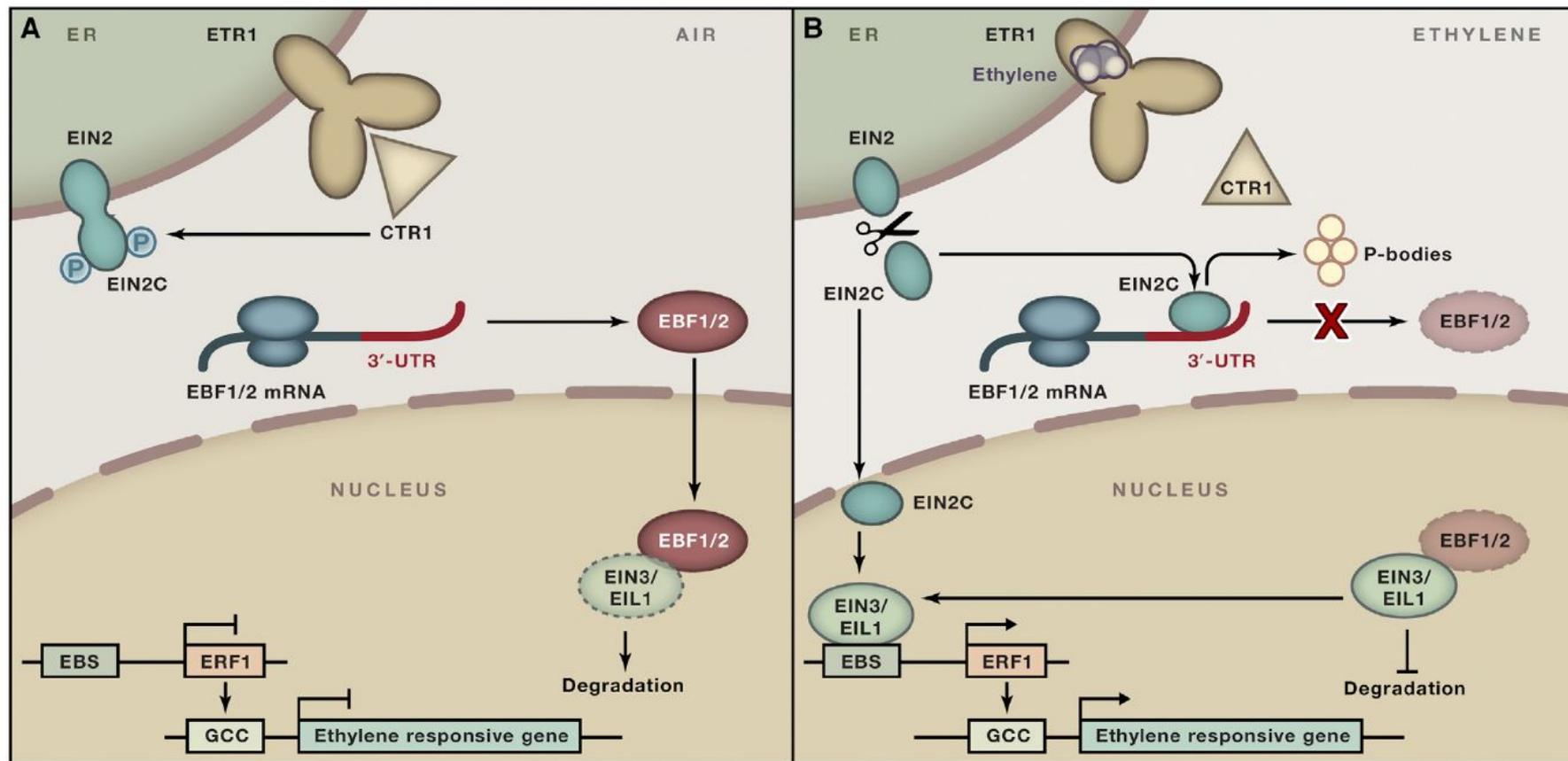


- Продукт гена *EIN5* был идентифицирован как 5'-3'-экзорибонуклеаза XRN4

- Участвует в деградации транскриптов *EBF1/2* □ позитивная регуляция этиленового сигналинга

- У мутанта *ein5* накапливаются белки EBF1/2 □ снижение уровня белка EIN3 □ репрессия ответа на этилен

EIN2 репрессирует трансляцию EBF транскриптов



- **Факты:** Сверхэкспрессия 3'UTR генов *EBF* вызывает нечувствительность к этилену (эффект сильнее, чем от «цельных» генов *EBF*). Но только при наличии: 1. активного EIN2, 2. активного EIN5, 3. мотива polyU внутри 3'UTR генов *EBF*
- **Механизм:** EIN2 взаимодействует с polyU мотивом в 3'UTR транскрипта EBF1, 2, а также с EIN5 и белками PAB. В результате EBF транскрипты не транслируются, образуя РНК-белковые комплексы P-bodies (processing-bodies)

EIN2 репрессирует трансляцию EBF транскриптов

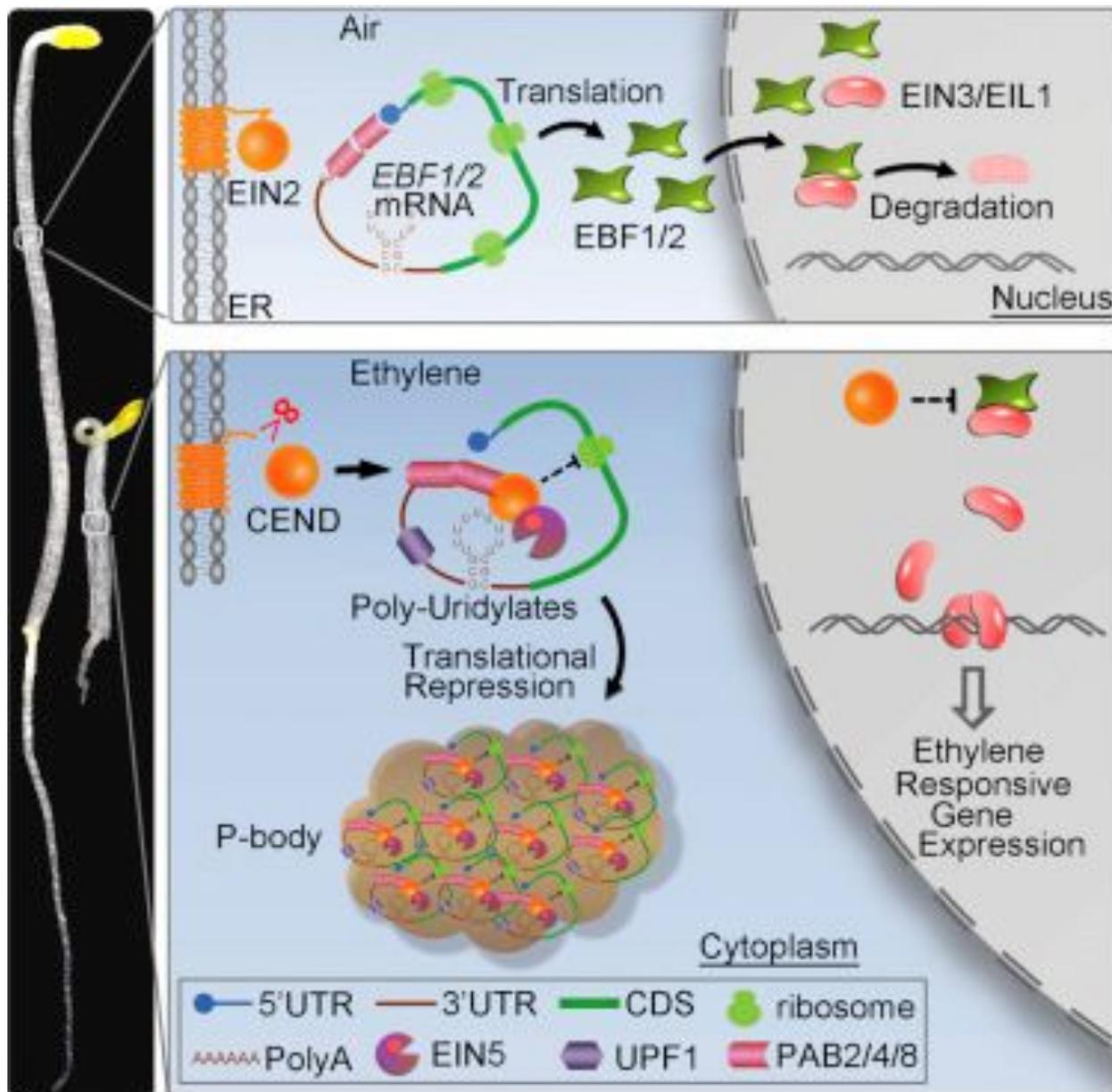
Участники:

полиУ-шпильки в
3'UTR
транскриптов EBF

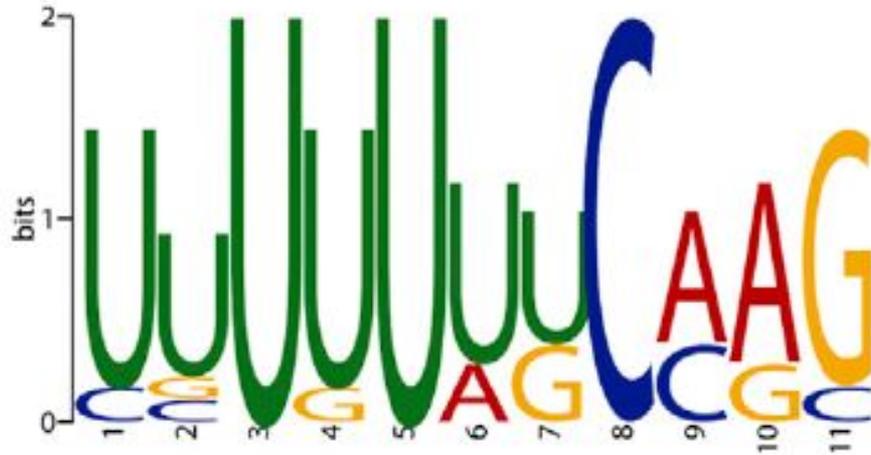
С-концевой домен
EIN2

Экзорибонуклеаза
EIN5

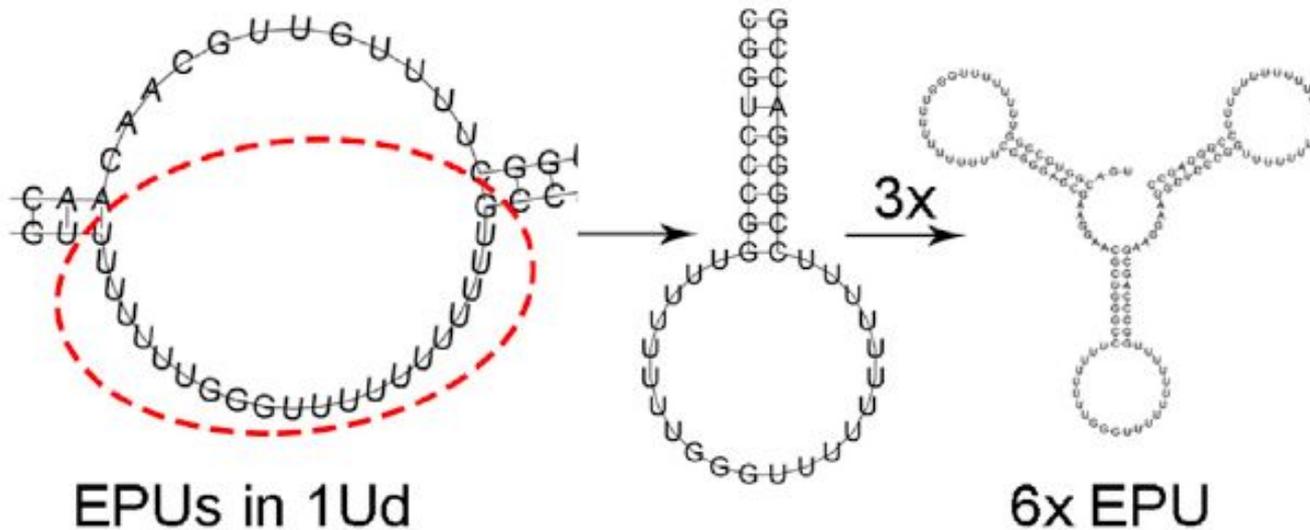
Белки PAB,
участвующие в
формировании
P-bodies всех
эукариот

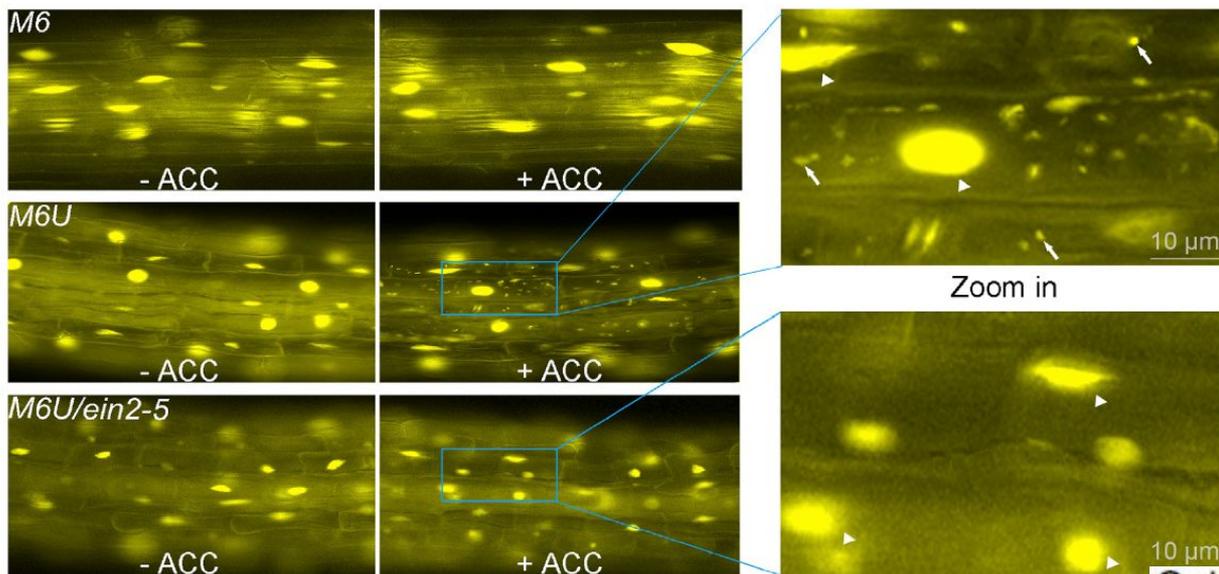
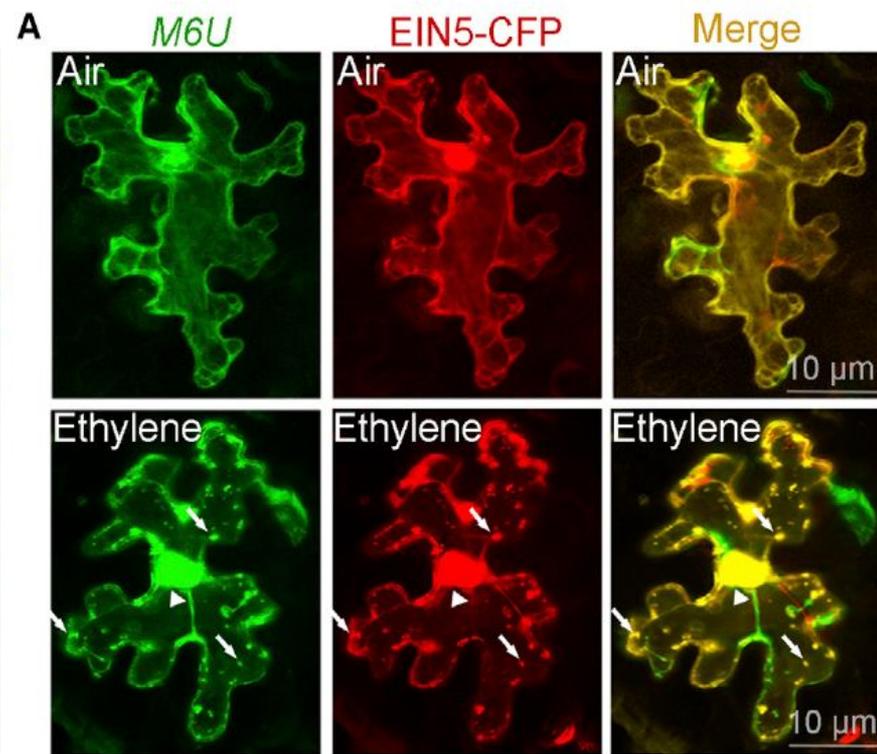
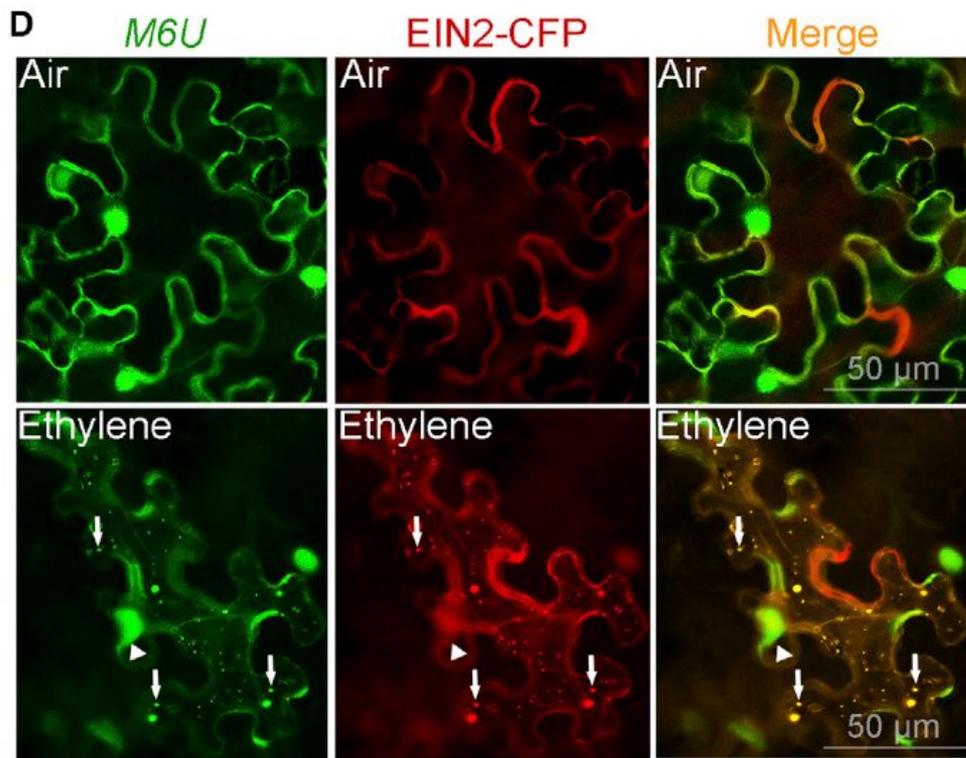


ERR-PolyU (EPU)



Полиуридиновые
МОТИВЫ в 3'UTR EBF
ГЕНОВ

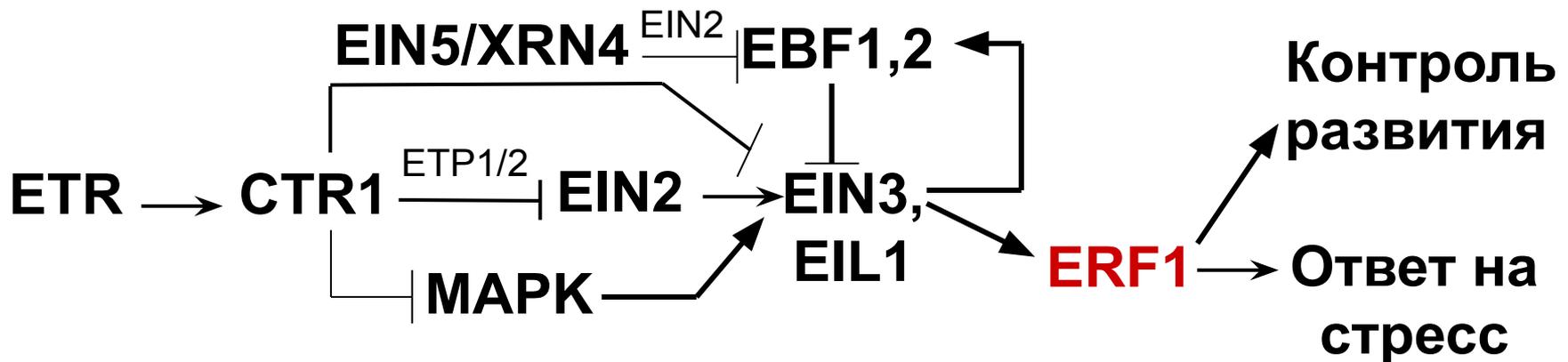
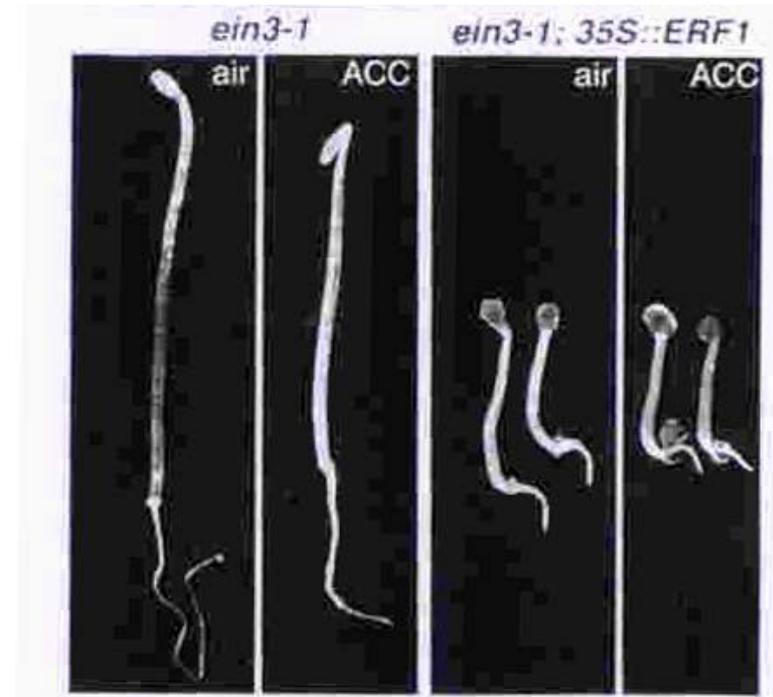




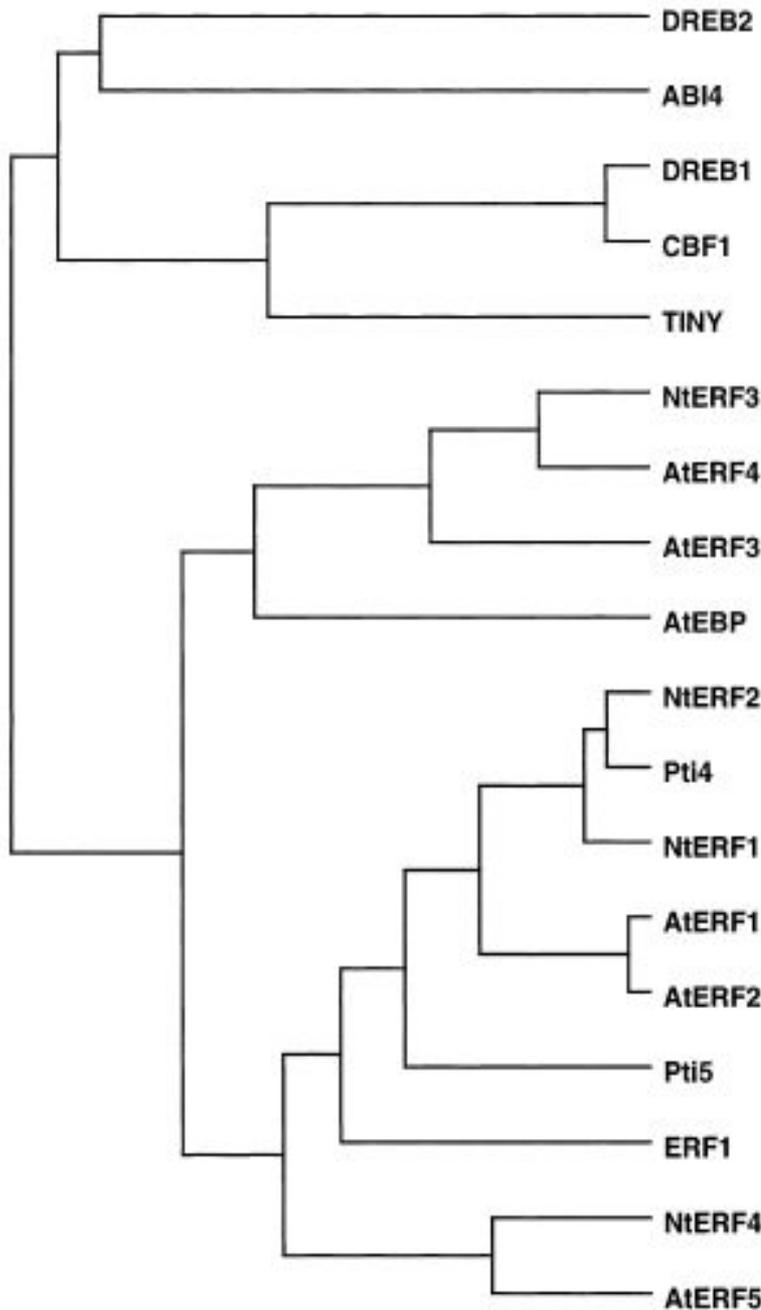
Опыты по ко-
локализации
3'UTR EBF с
белками EIN2
и EIN5

Транскрипционные факторы ERF

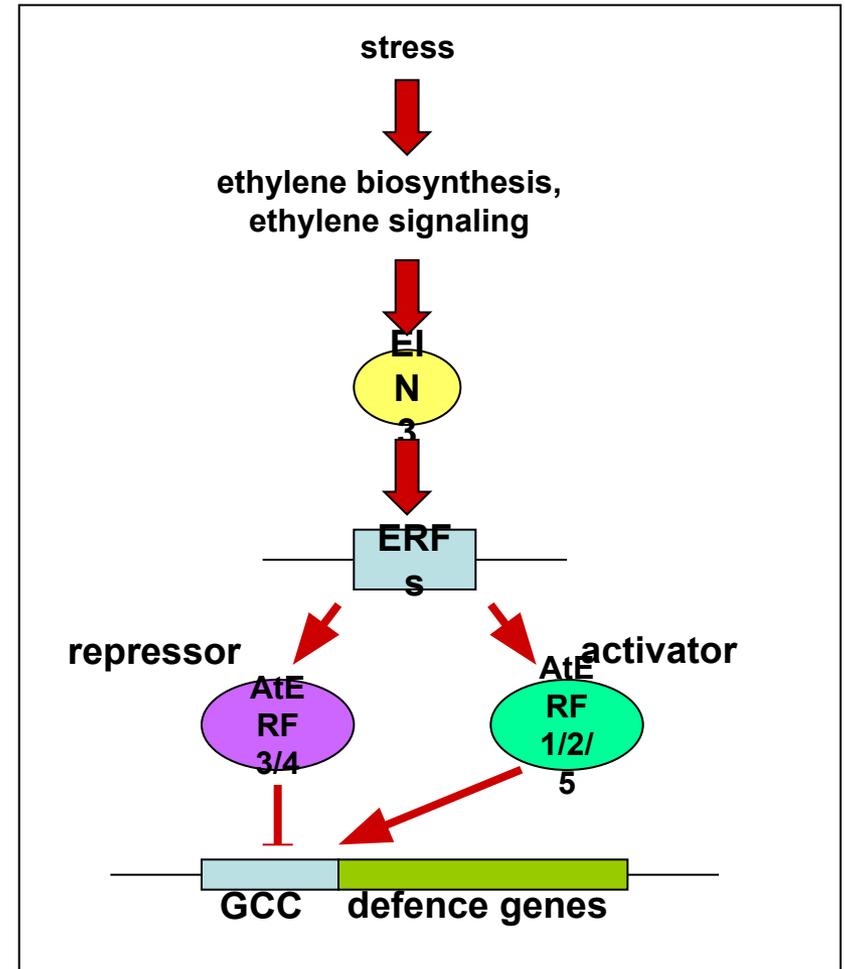
- Транскрипционные факторы EIN3 и EIL связываются с последовательностью EBS (EIN3-Binding Site) в промоторе гена *ERF1*
- ERF – семейство AP2-подобных транскрипционных факторов
- ERF белки связываются со специфической последовательностью (ERE -Ethylene Response Element; the GCC box) в промоторах этилен-регулируемых генов



Филогенетическое древо ERF белков разных видов растений

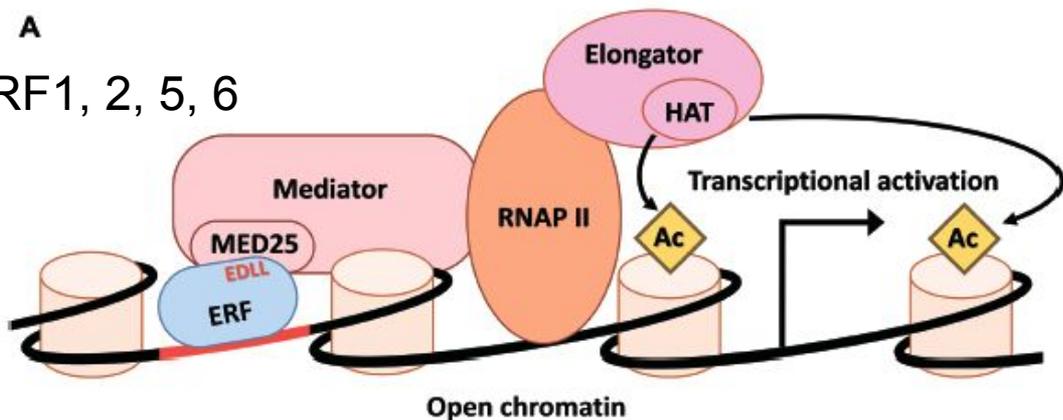


Функции AtERF белков:



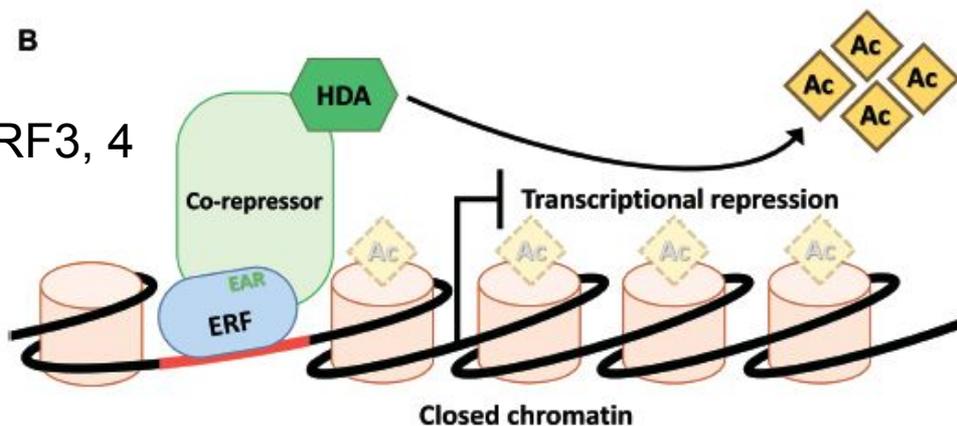
ERF-активаторы и ERF-репрессоры

A
AtERF1, 2, 5, 6

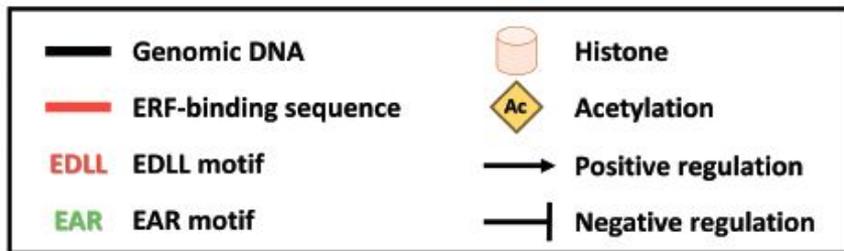


- Содержат мотивы EDLL (Глн (E), Асп (D), Лей (L) (L))
- Рекрутируют в промотор гена мишени РНК-полимеразу II и гистон-ацетилтрансферазы (HAT)

B
AtERF3, 4



- Содержат мотивы EAR (ERF-associated Amphiphilic Repression)
- Рекрутируют в промотор гена мишени белки-коррепрессоры и гистон-деацетилазы (HDA)

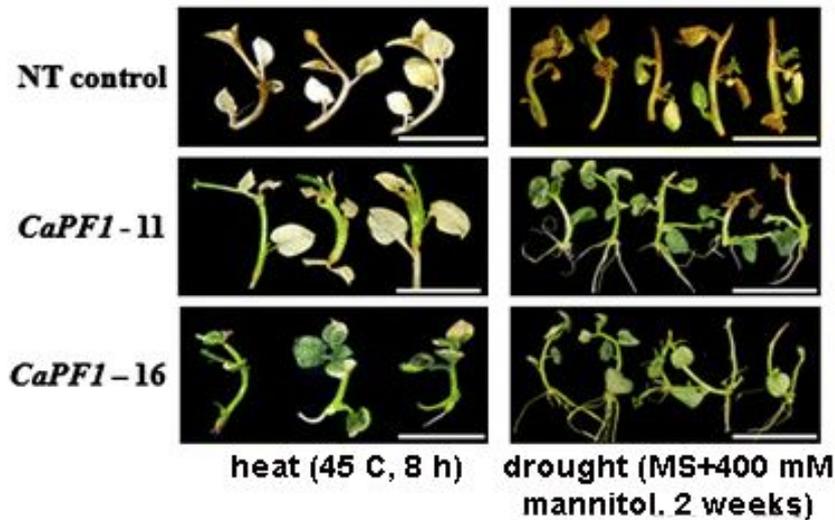


Абиотический стресс

(поранение, высокая температура, высыхание)

LEA □ дегидрины

GST □ глутатион-S-трансферазы

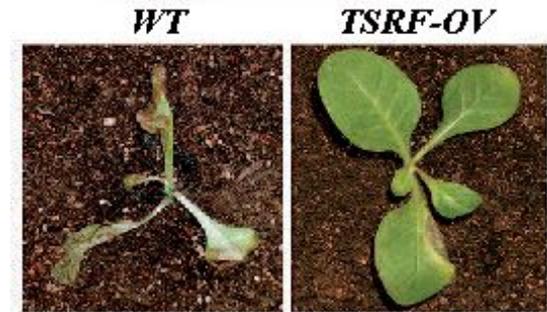


Биотический стресс

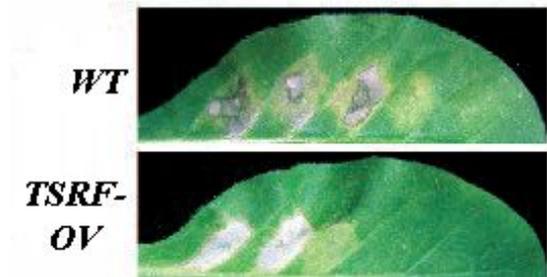
(поражение патогенами)

Гены PR белков

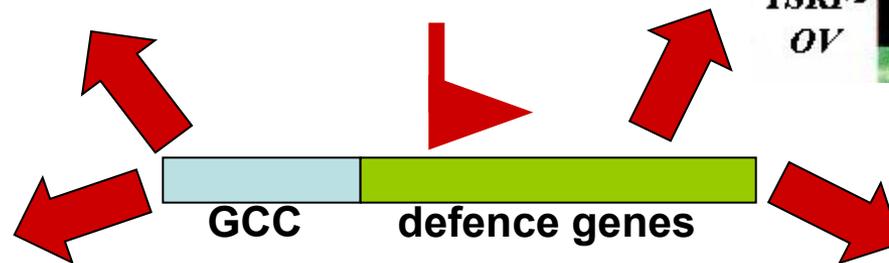
(pathogene-related): хитиназы, бета-1,3-глюканазы ИТ.Д.



Resistance to *Ralstonia solanacearum*



ERFs



Созревание плодов

Ripening genes:

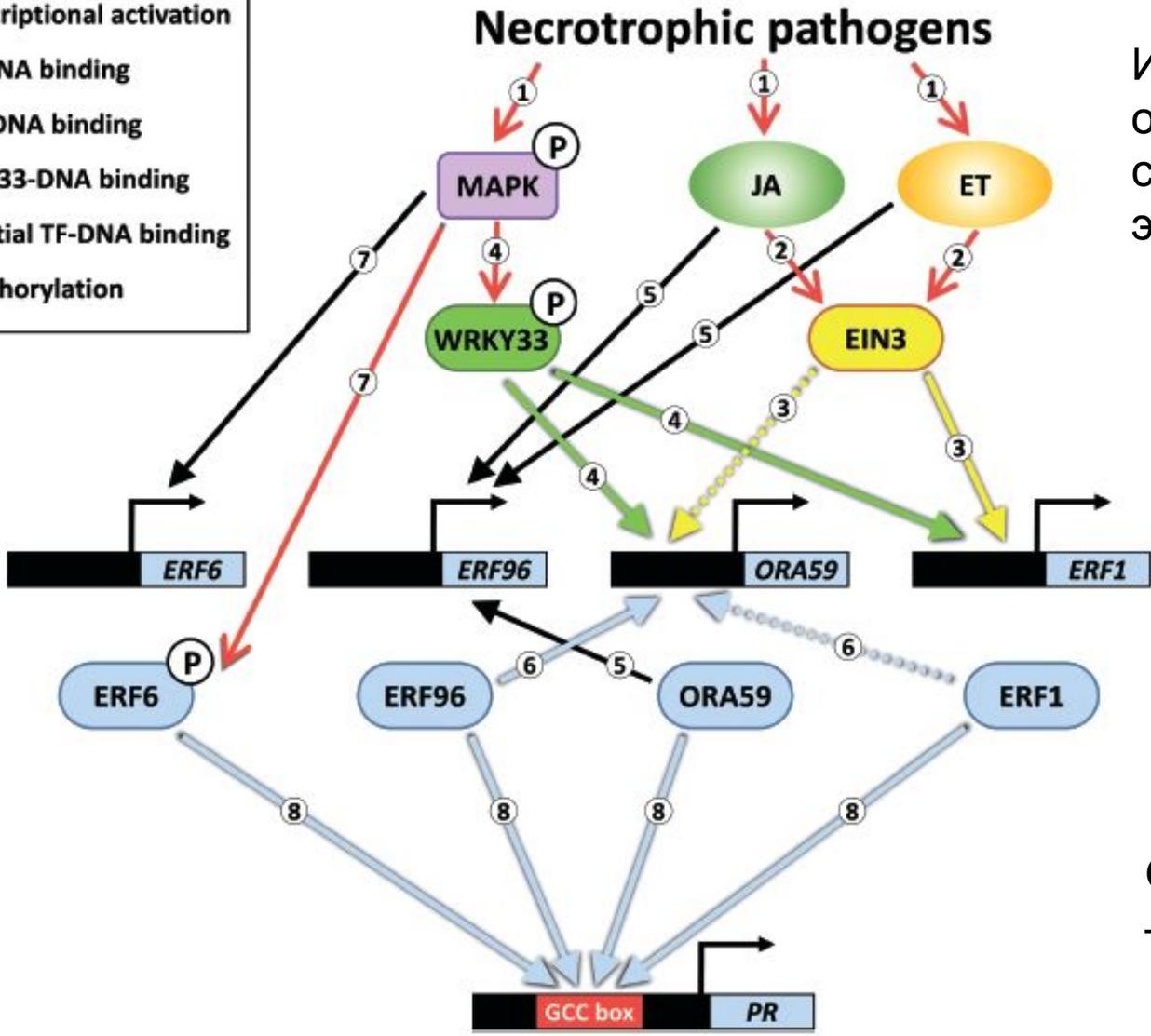
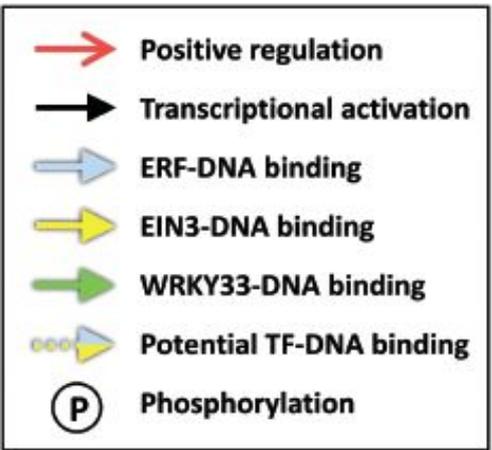
E3 (томат) □ пектиназа;
Целлюлазы, экспансины

Старение

Senescence-associated genes (SAG):

Гены протеаз, РНКаз;
Гены ТФ *WRKY*

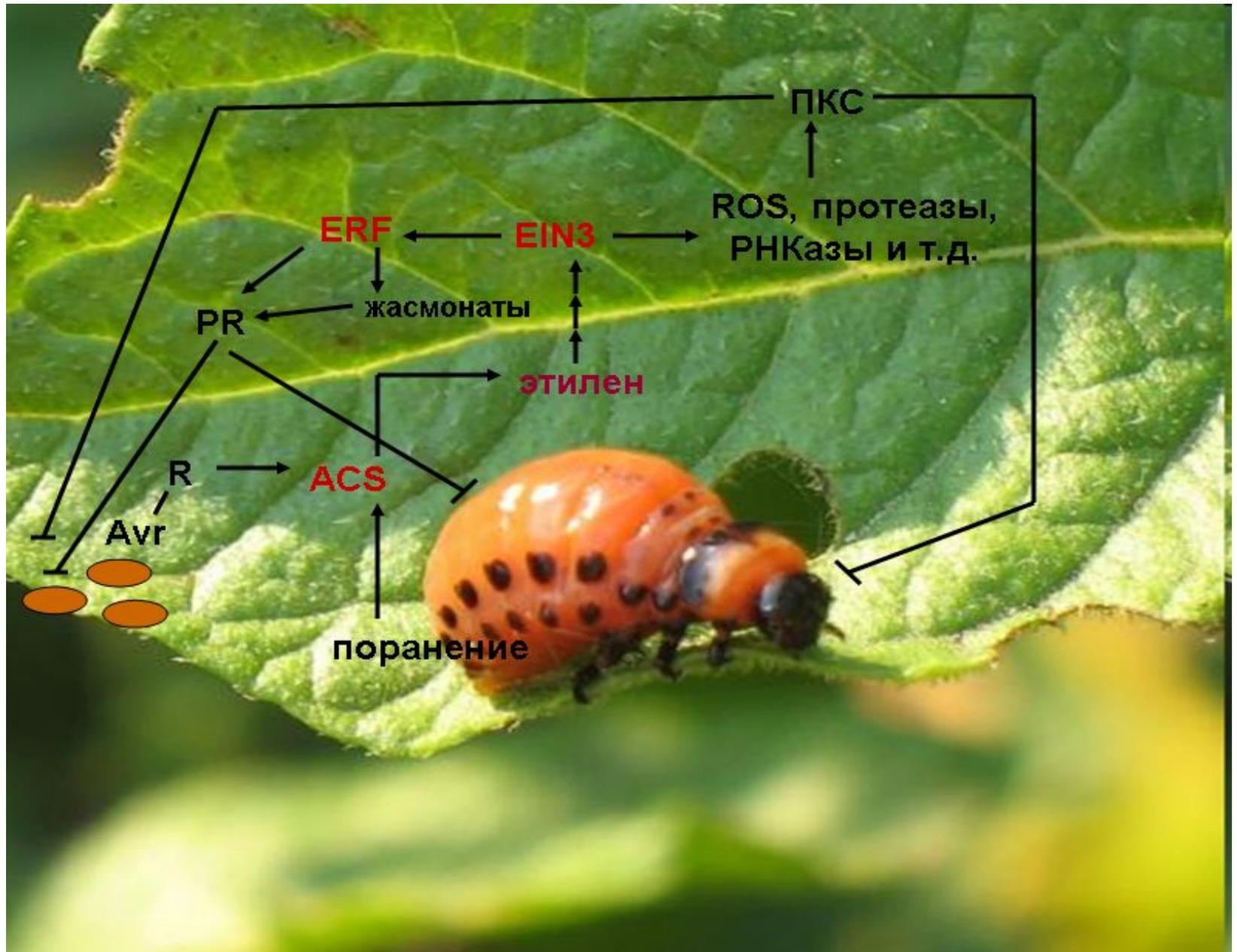
Некоторые ERF - центральные регуляторы защиты от некротрофных патогенов



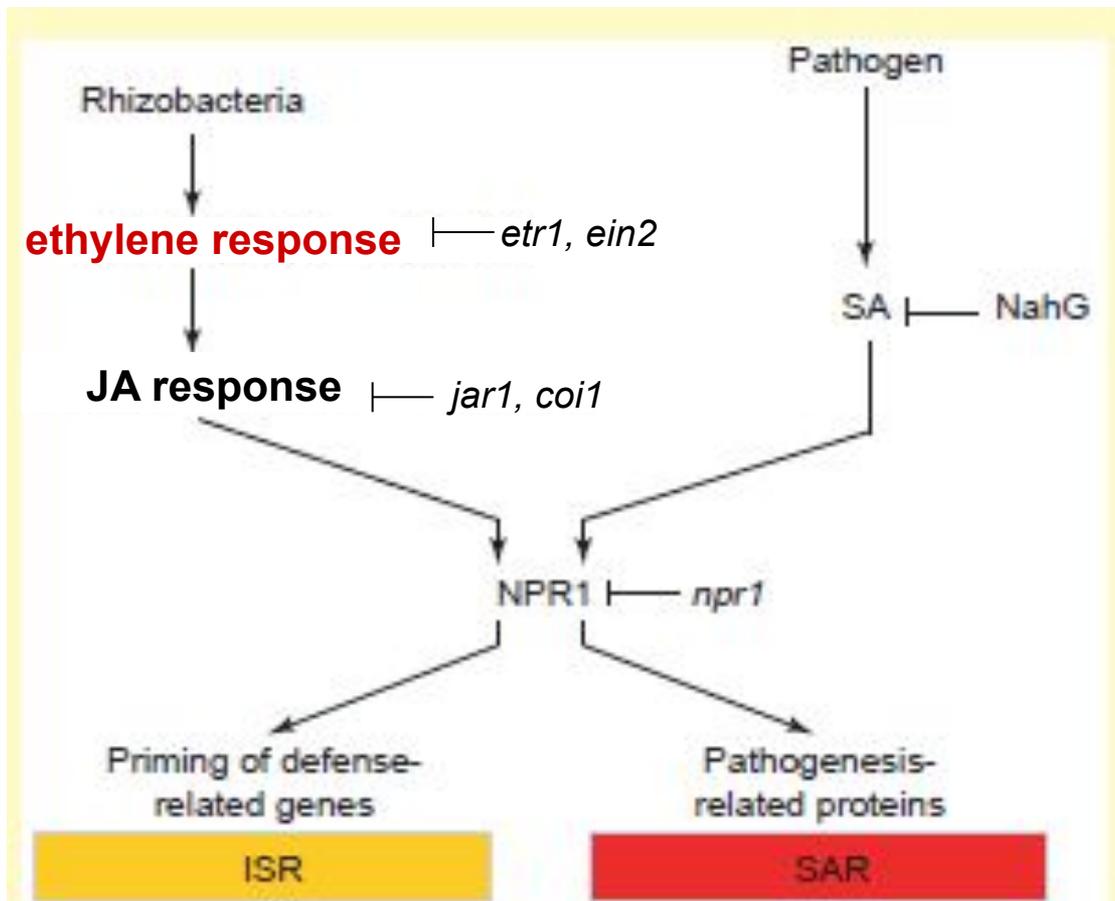
Индусируются в ответ на разные стимулы (не только этилен и EIN3)

Основная мишень – гены PR-белков

Роль этилена в реакции сверхчувствительности (HR)



Фитогормоны и системная устойчивость растений



1. ISR (Induced Systemic Resistance)

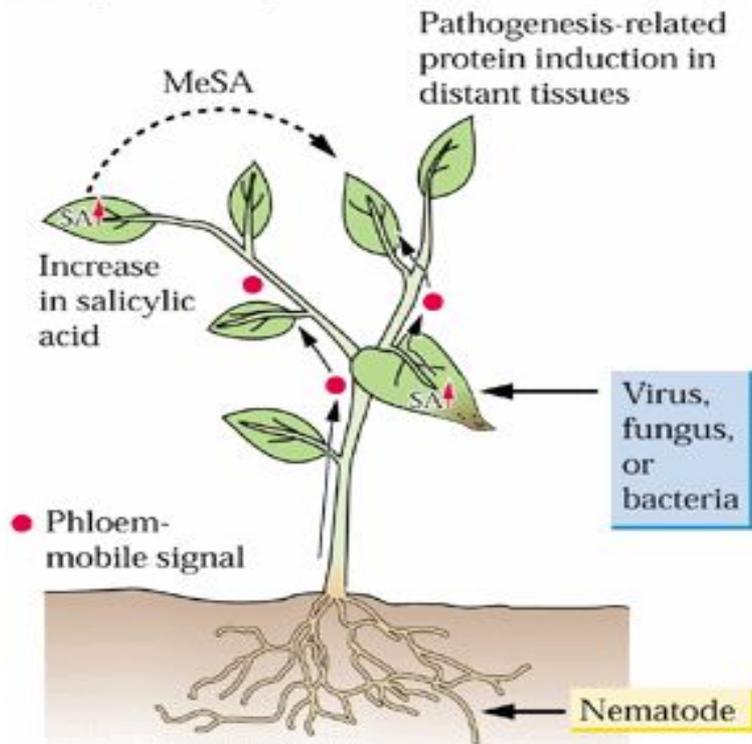
- При взаимодействии с непатогенными микроорганизмами
- Основные медиаторы – этилен и жасмонаты

2. SAR (Systemic Acquired Resistance)

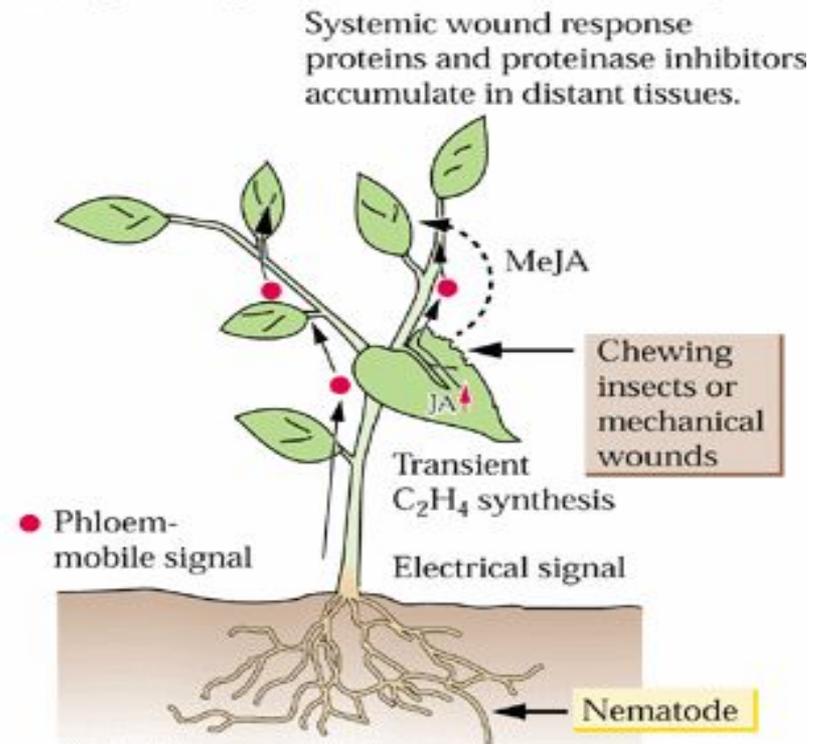
- При взаимодействии с патогенными микроорганизмами
- Основной медиатор – салициловая кислота

Газообразные гормоны – этилен и метил-жасмонат могут выступать в роли вторичных медиаторов при передаче стрессовых сигналов (в том числе – между растениями)

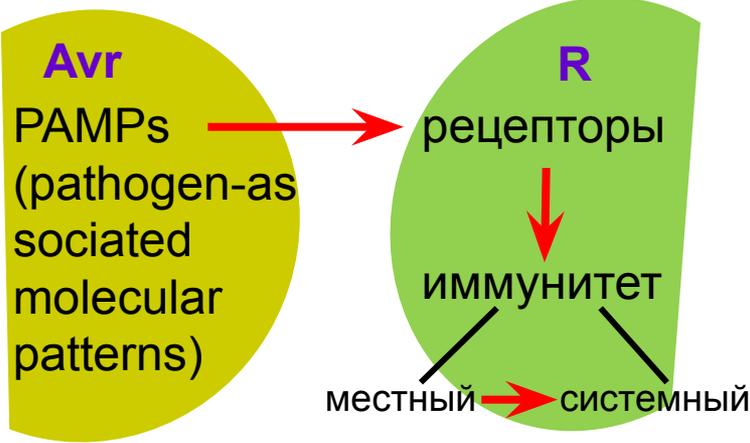
(A) Systemic acquired resistance



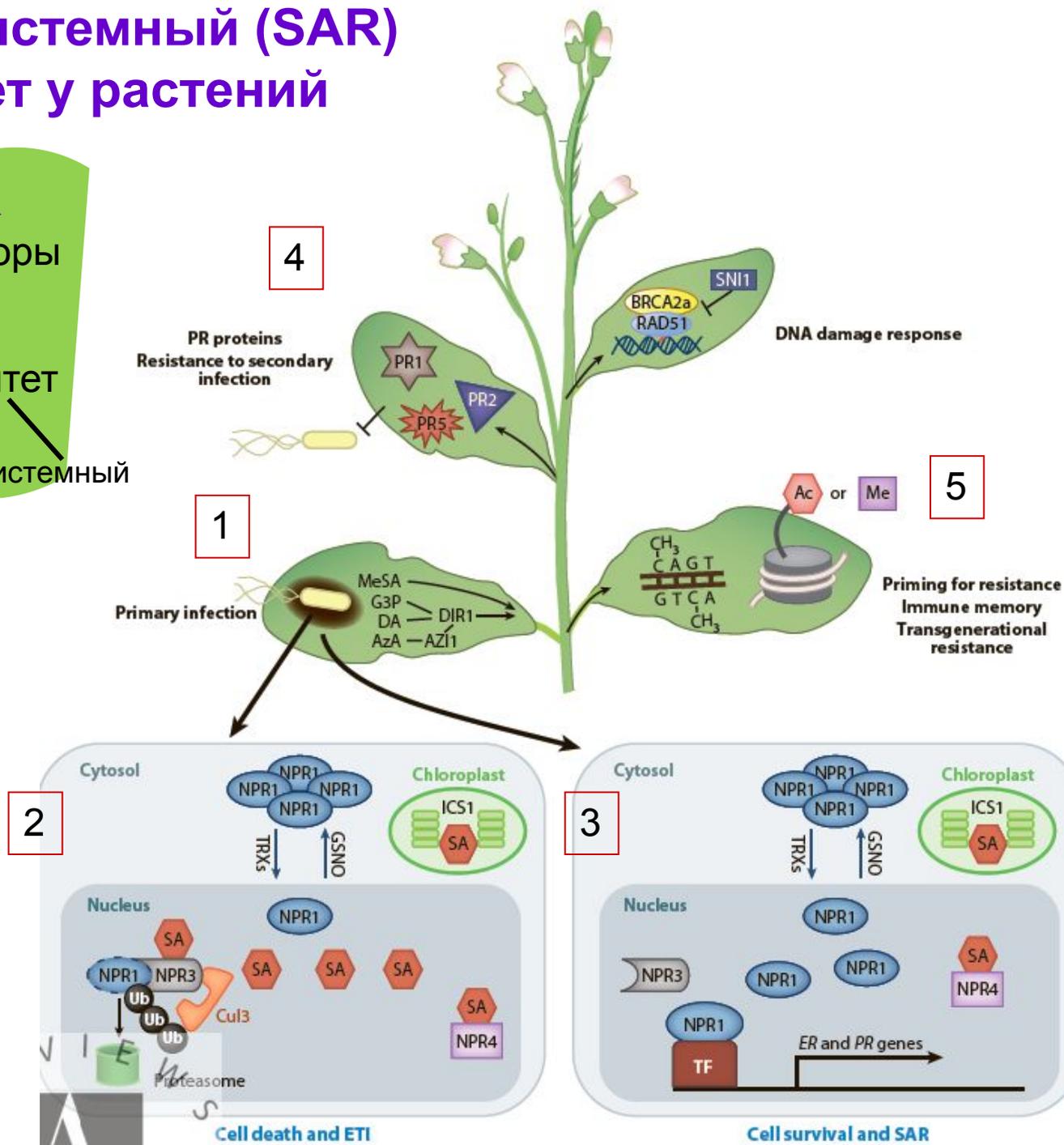
(B) Systemic proteinase inhibitor/wound response



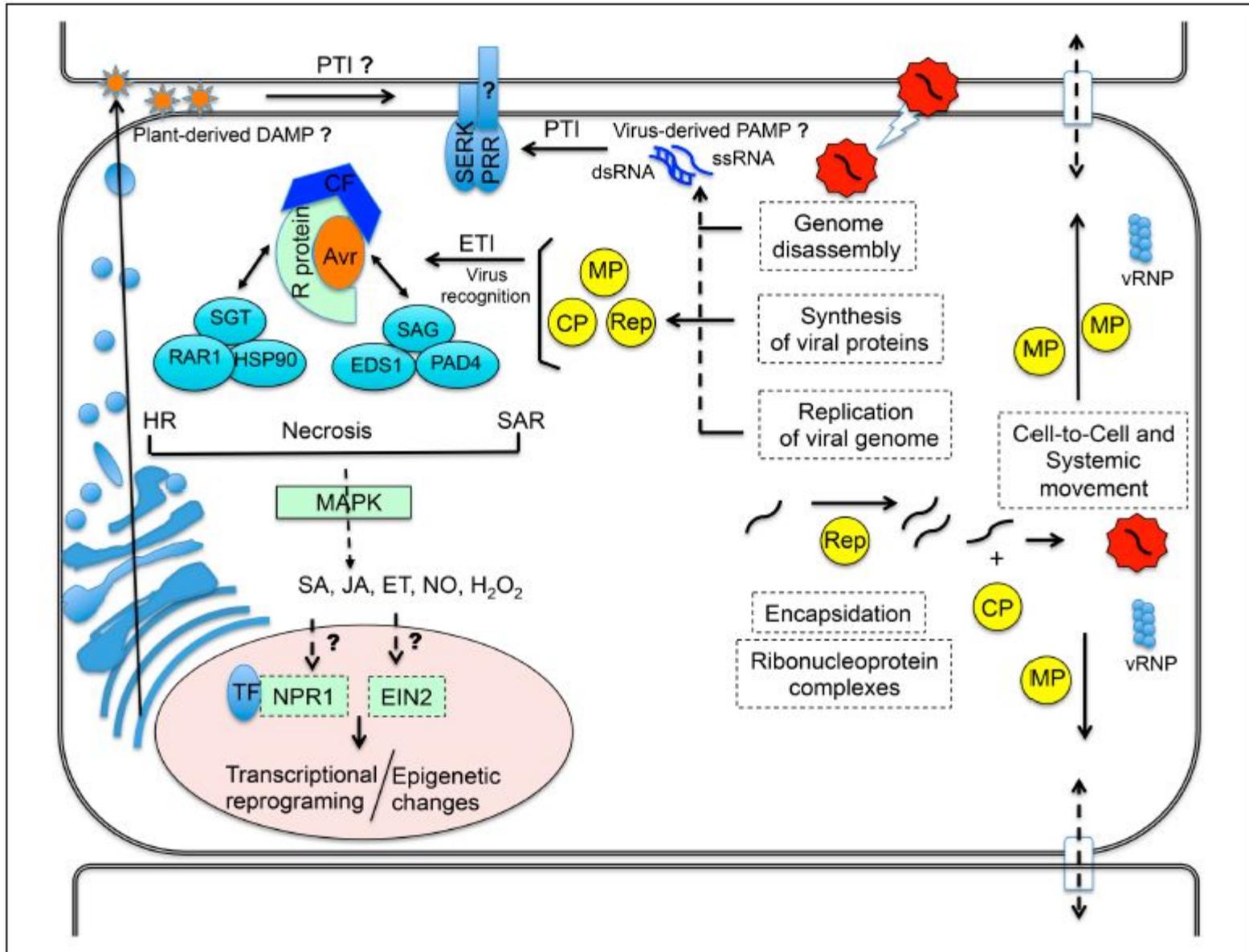
Местный (HR) и системный (SAR) иммунный ответ у растений



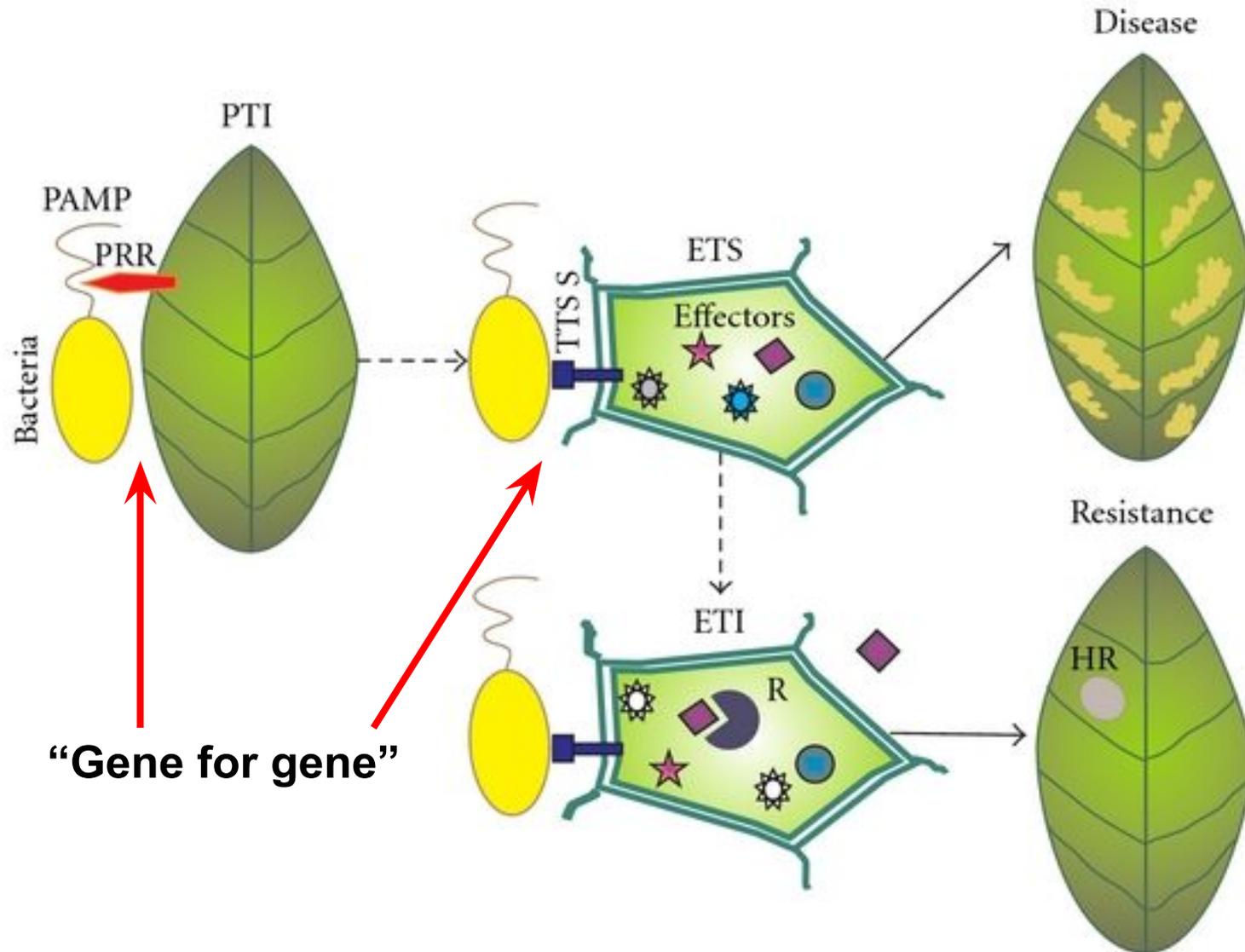
- 1 – первичная инфекция и синтез сигнальных молекул иммунитета
- 2 – резкое повышение концентрации салициловой кислоты в месте инфекции – один из механизмов ПКС при HR
- 3 – развитие системного иммунитета в соседних тканях: более низкая концентрация салициловой кислоты, чем в тканях, подвергающихся HR, ТФ NPR1 активирует транскрипцию генов, кодирующих PR белки
- 4 – PR белки убивают патогенов, устойчивость к повторному инфицированию
- 5 – «память иммунитета» за счет модификации гистонов в «генах устойчивости»



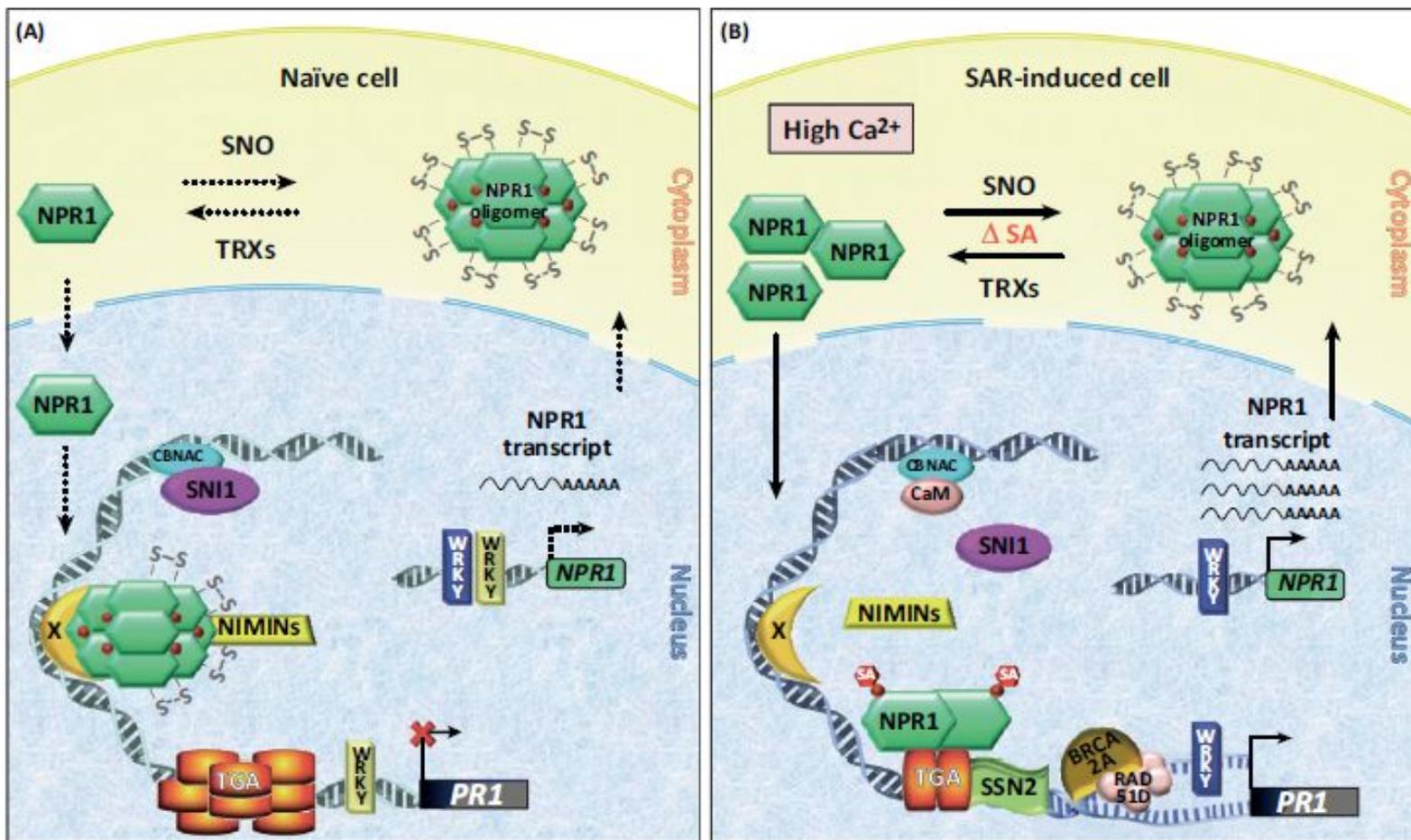
PAMP-triggered (PTI) and Effector-triggered (ETI) plant immunity: 2 барьера защиты



PAMP-triggered (PTI) and Effector-triggered (ETI) plant immunity: 2 барьера защиты



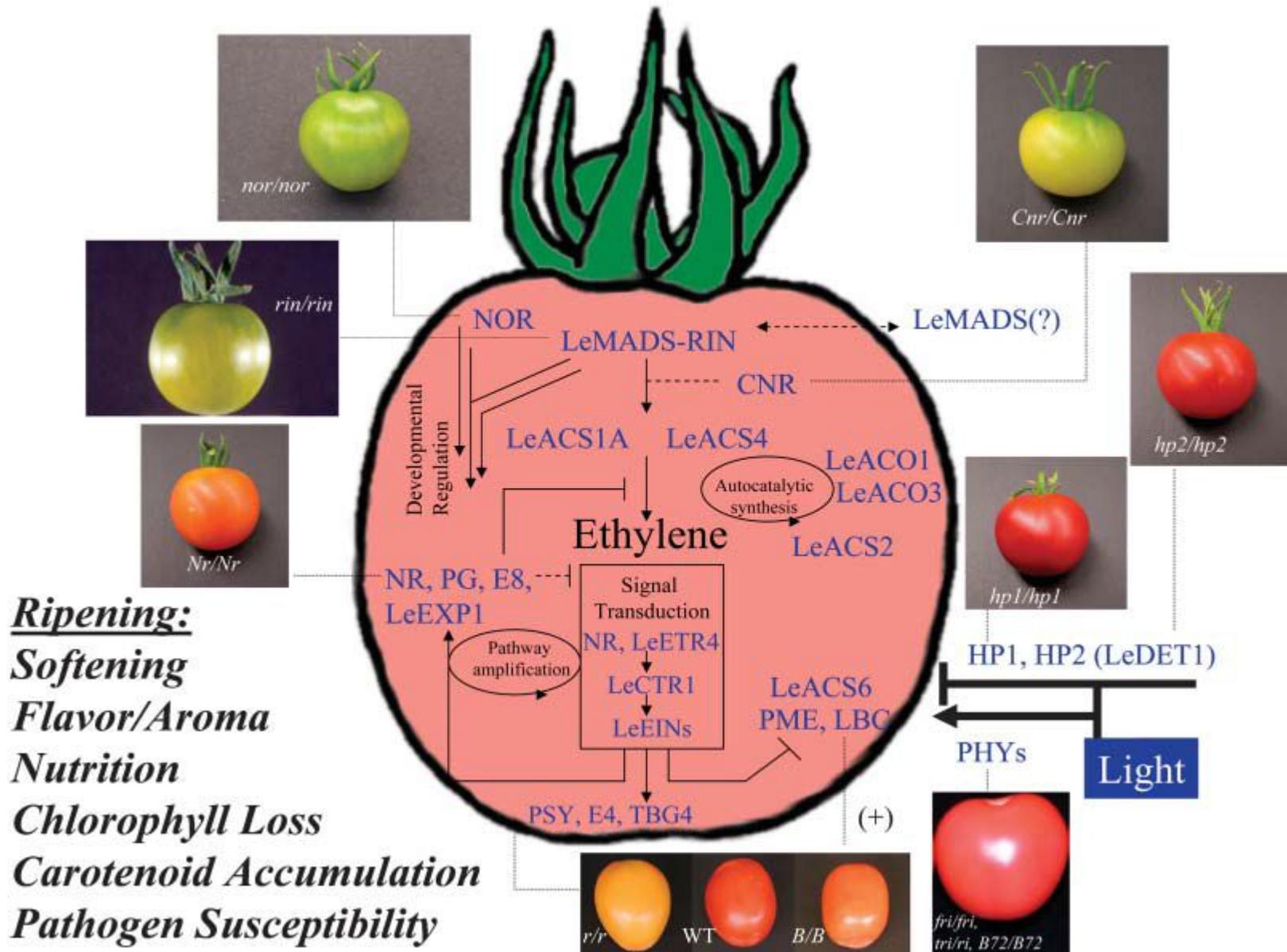
ТФ NPR1 (nonexpresser of *PR* genes 1) – Центральный регулятор иммунитета растений (SAR)



TRENDS in Plant Science

Может существовать в виде олигомеров (неактивен) или мономеров (активен), взаимодействовать с репрессорами (NIMIN, WRKY-репрессоры) и активаторами (WRKY-активаторы) транскрипции

Этилен и созревание плодов



Климактерические и неклимактерические плоды

Климактерические – пик интенсивности дыхания при созревании (их можно собирать зелеными и «дозреть» этиленом)



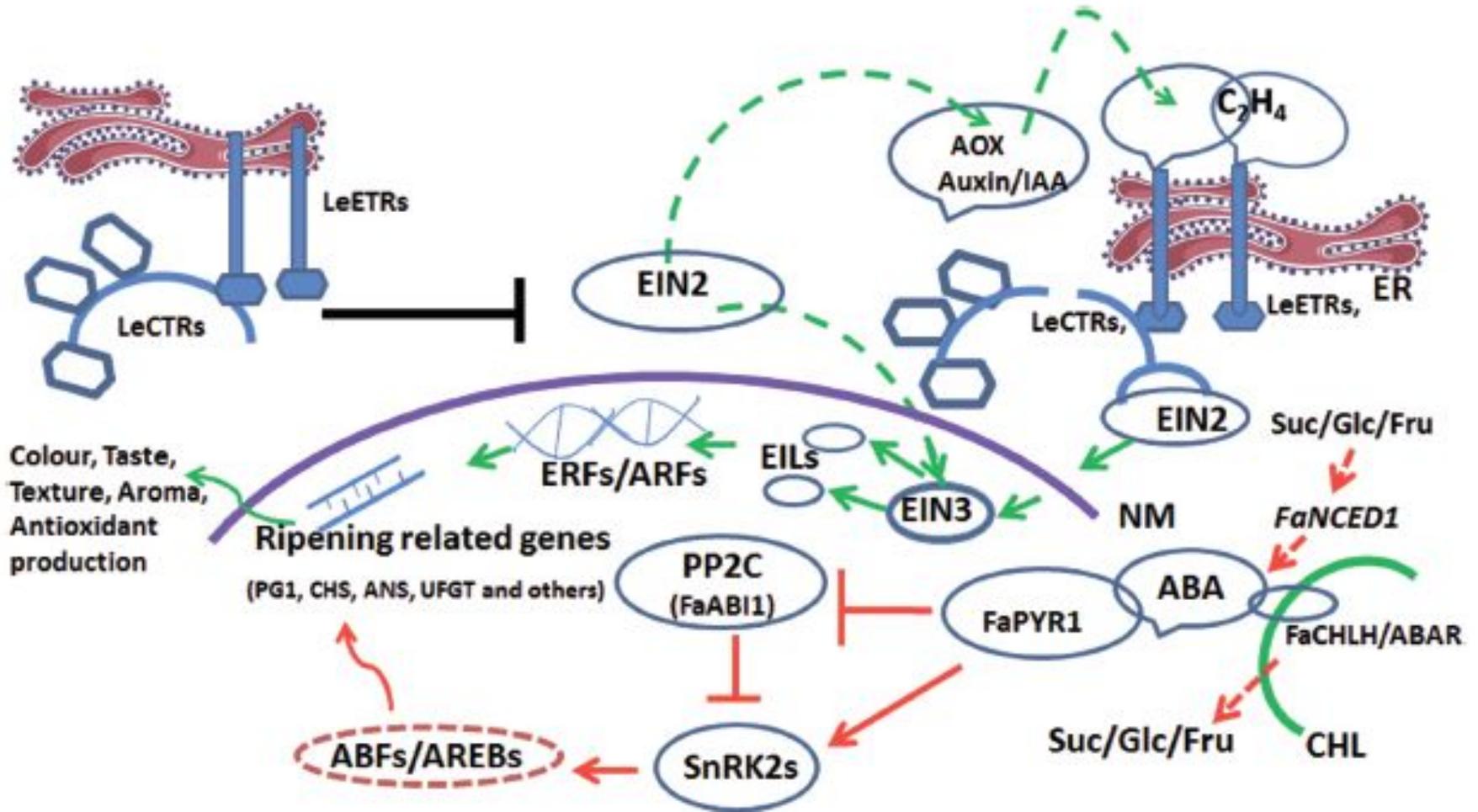
НЕклимактерические – пик интенсивности дыхания при старении



Роль этилена и АБК в созревании плодов

Регулируют одни и те же гены, действуют независимо

- Созревание климактерических плодов (томат) – центральная роль этилена
- Созревание НЕклимактерических плодов (клубника) – центральная роль АБК



В процессе созревания климактерических плодов повышается биосинтез этилена

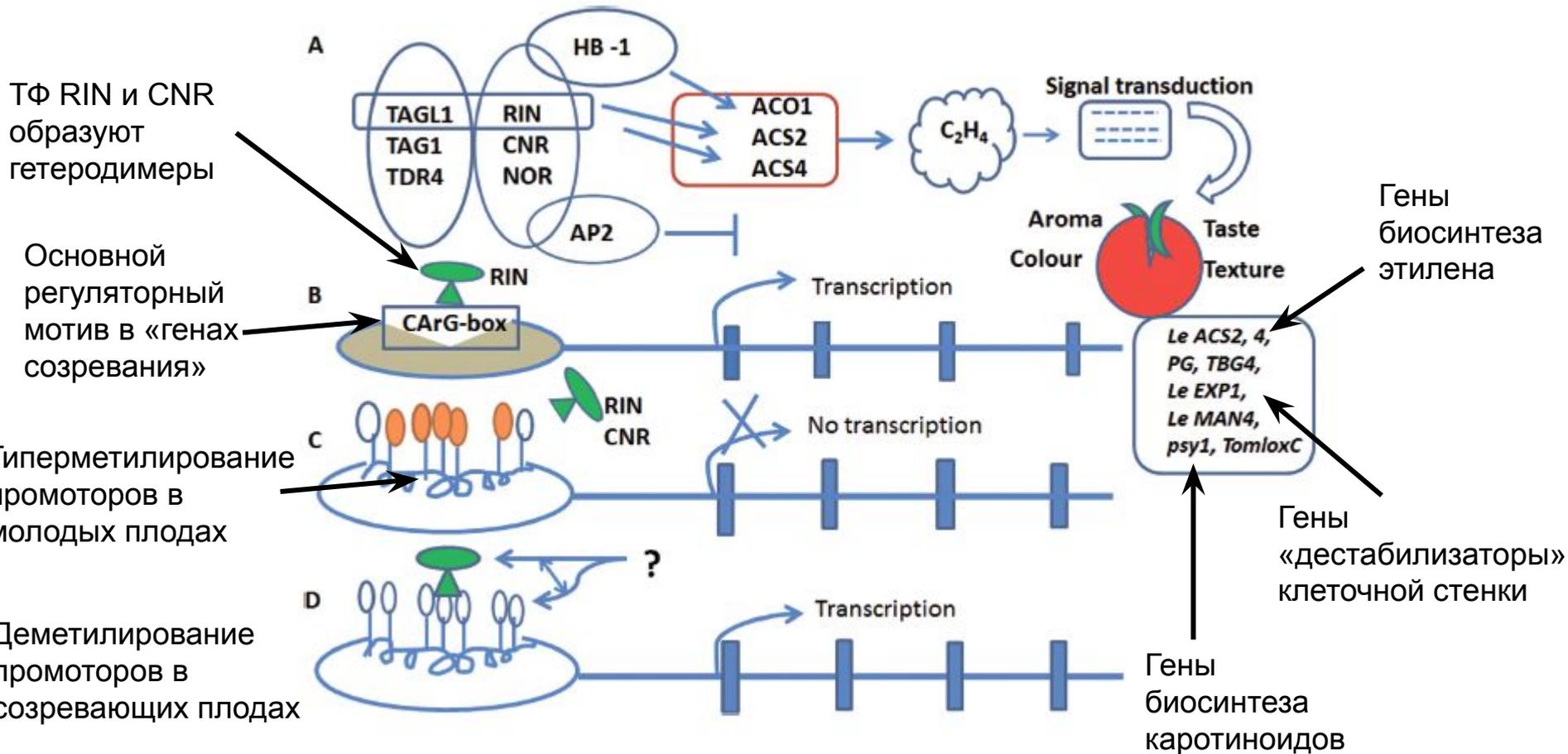
ТФ RIN (Ripening Inhibitor) и CNR (Colorless Non-Ripening)

Синтез этилена

«Размягчение» клеточной стенки

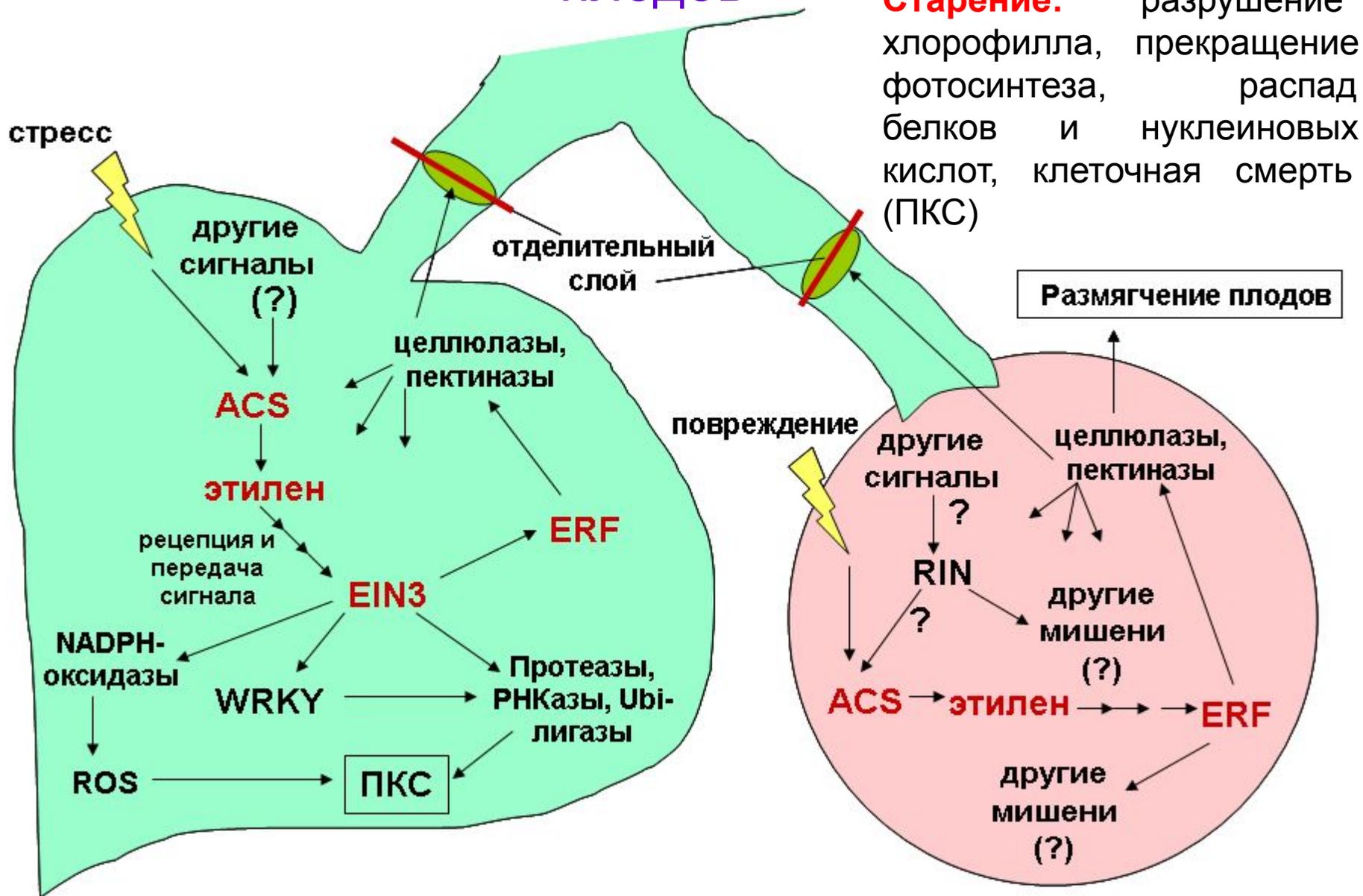
Синтез моносахаридов

Синтез каротиноидов

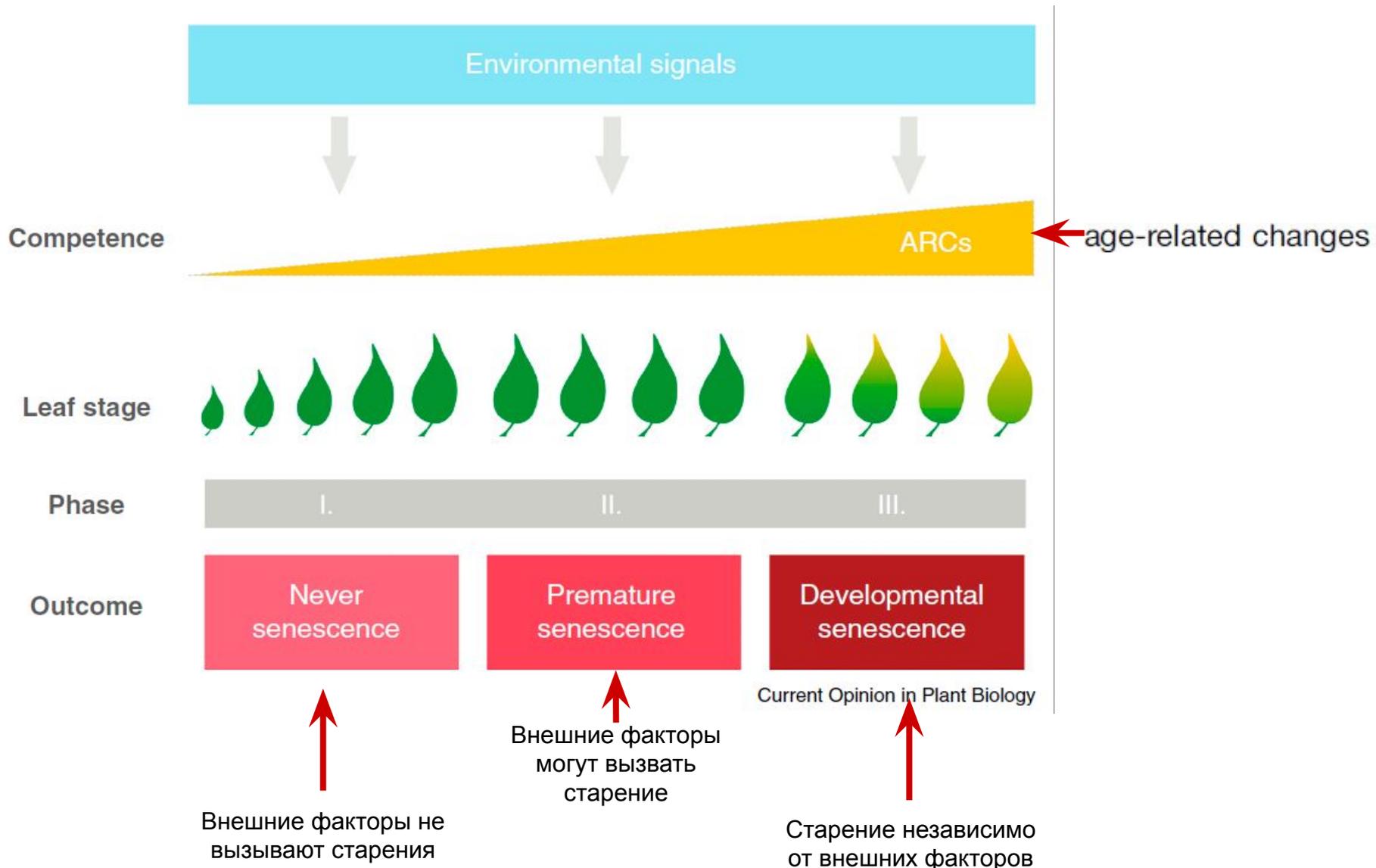


Роль этилена в старении листьев и созревании плодов

ПЛОДОВ

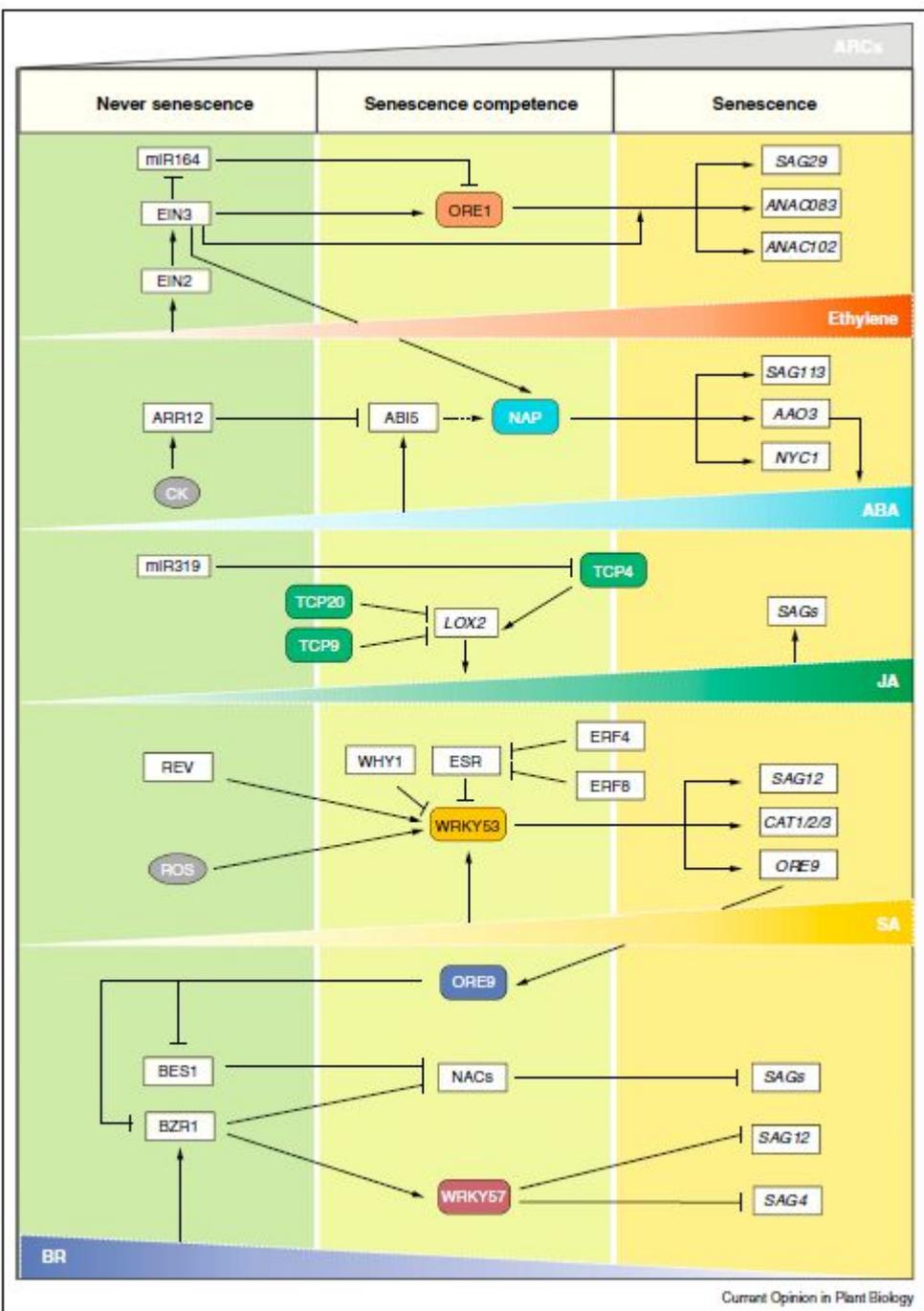
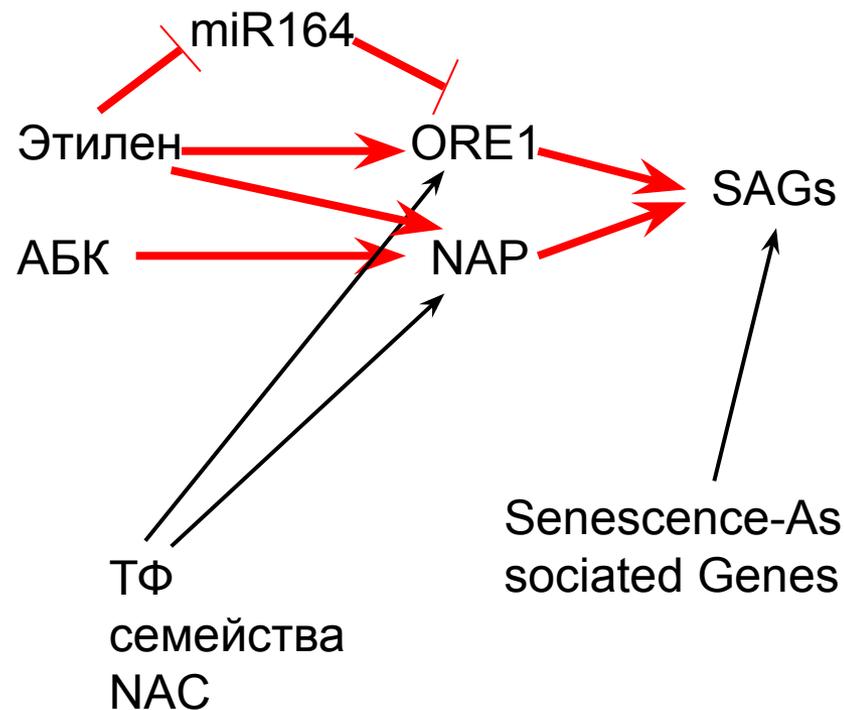


Контроль старения листьев в зависимости от «внешних» и «внутренних» причин

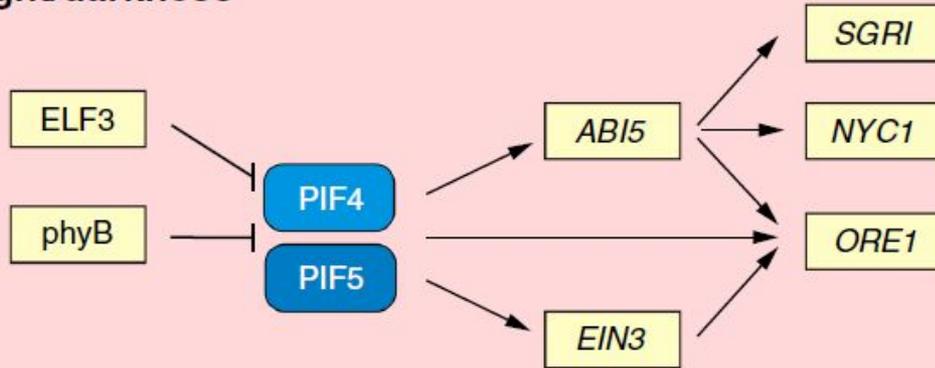


Взаимодействие гормонов и ТФ в регуляции возрастозависимого старения листьев

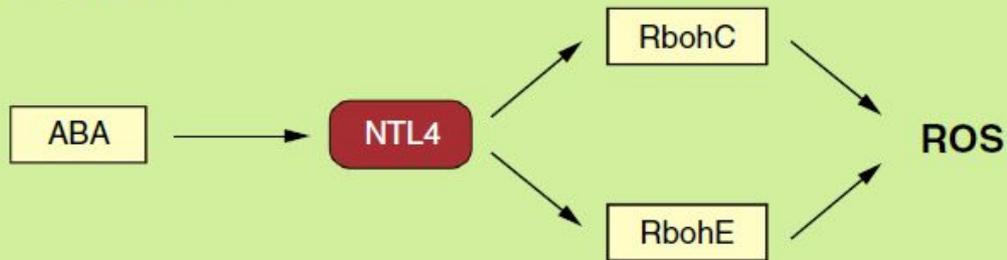
Гормоны «за старение»: Et, ABA, JA, SA
 Гормоны «против старения»: CK, BR, GA



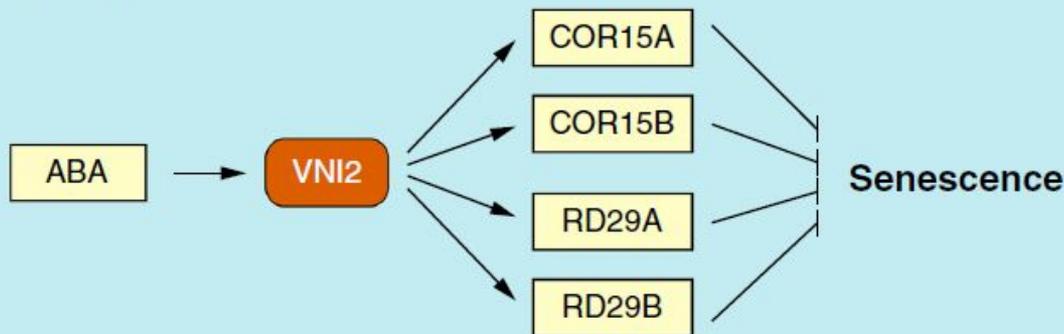
Light/darkness



Drought stress



Salt stress



Взаимодействие гормонов и ТФ в регуляции старения листьев под воздействием внешних факторов

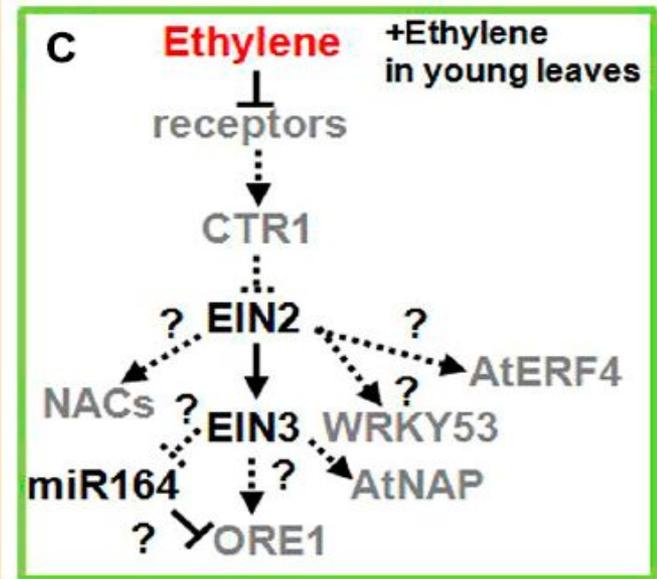
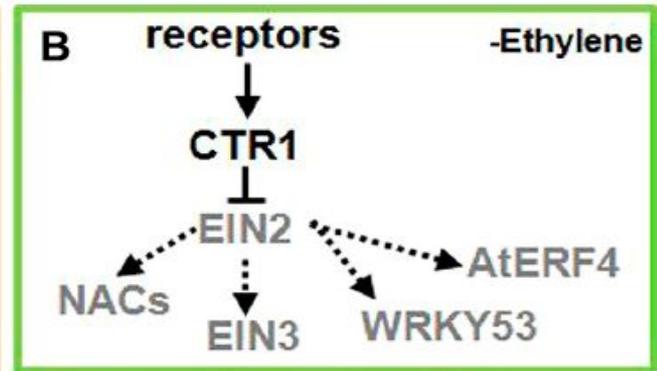
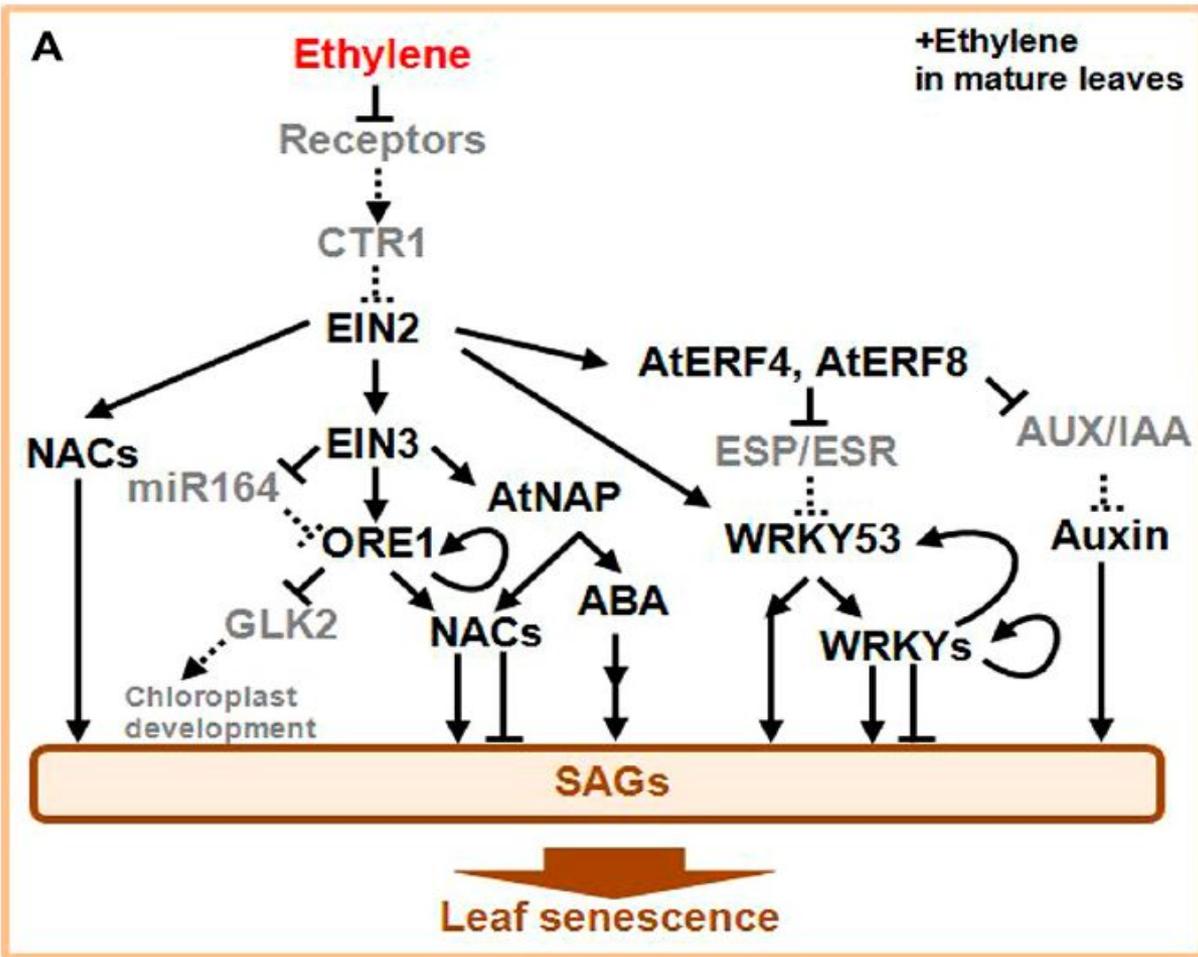
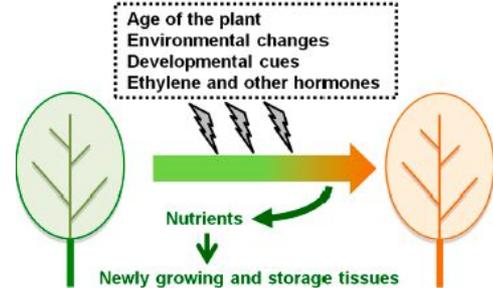
Этилен → старение в темноте

→ старение при механических повреждениях

АБК → старение под влиянием дегидратации и засоления

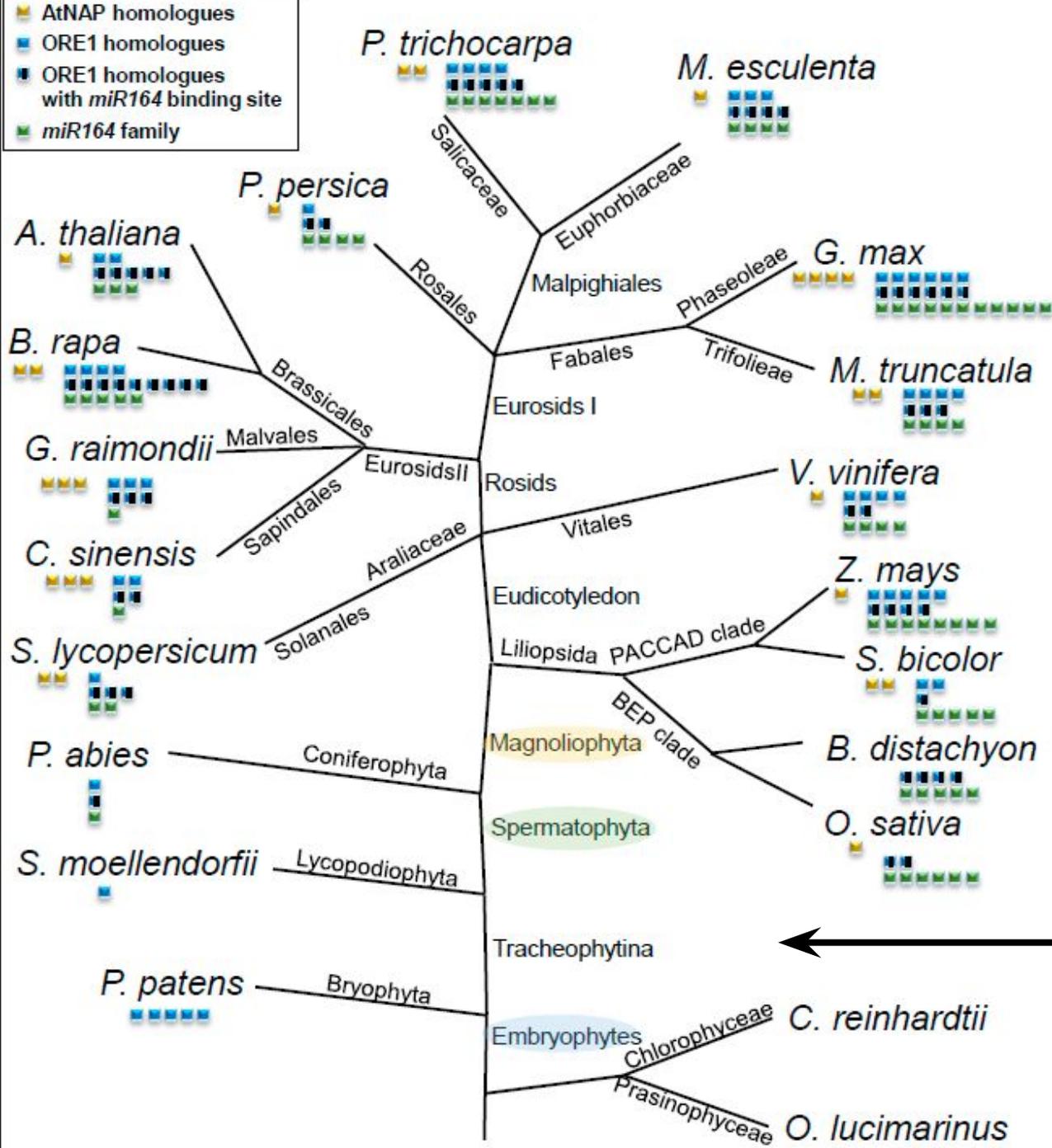


Этилен и старение листьев



SAG (senescence-associated genes): ТФ семейств NAC, WRKY, AP2
 Мишени EIN3 – гены *OREASA1* и *NAP1* – центральные регуляторы старения

- AtNAP homologues
- ORE1 homologues
- ORE1 homologues with *miR164* binding site
- miR164* family



Гомологи *ORE1*
 есть у всех
 наземных
 растений,
 гомологи *miR164* –
 у семенных
 растений,
 гомологи *NAP* –
 только у
 покрытосеменных

← Синтезировать
 этилен впервые
 начали сосудистые
 растения