

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профобразования
«Российский университет дружбы народов»
Аграрно-технологический институт
Агробιοтехнологический департамент



КУРСОВАЯ РАБОТА НА ТЕМУ
«Кальциевая сигнальная система»
По дисциплине «Иммунитет растений»

Квалификация: Магистр
Выполнил: Курчаев М.Л
Группа САГмд-01-21
Студенческий билет №1032211800

Москва 2022

Содержание

Введение.....	2
Работа кальциевой сигнальной системы.....	3
Семейство кальцийзависимых протеинкиназ.....	7
Понижения уровня Ca ²⁺	9
Снижение концентрации ионов кальция.....	10
СВЛ белки	13
Механизм функционирования кальциевой сигнальной системы у растений при действии теплового стресса	16
Заключение.....	19
Список источников.....	21

Введение

В современном аграрном секторе важность понимания физиологических процессов растений и их адаптации к различным условиям среды становится

все более актуальной. Ключевым аспектом в регуляции клеточных процессов растений является кальциевая сигнальная система, которая играет существенную роль в адаптации растений к изменениям окружающей среды и регулировании их роста и развития.

Кальциевая сигнальная система клеток растений включает в себя разнообразные компоненты, такие как кальциевые каналы, транспортеры, белки-датчики кальция и молекулы-посредники, участвующие в передаче и регуляции кальциевого сигнала. Эта система обеспечивает быстрый и точный ответ растений на различные внутренние и внешние сигналы, позволяя им приспособиться к неблагоприятным условиям, таким как перепады температур, сухость, избыток влаги или соли в почве и др.

В рамках работы по теме "Кальциевая сигнальная система клеток растений" будет проведен анализ существующей научной литературы и исследований, охватывающих различные аспекты данной темы.

Работа кальциевой сигнальной системы

Повышение концентрации ионов кальция в цитозоле является одной из наиболее ранних ответных реакций на инфицирование патогенами (на действие элиситоров), на механическое повреждение (или раздражение) и другие стрессоры. Эта кальциевая "вспышка" носит преходящий характер. Ее восходящая ветвь вызвана открыванием кальциевых каналов, расположенных

в плазмалемме, вакуолярном тонопласте и в мембранах эндоплазматической сети. Во всех трех случаях имеет место чрезвычайно высокий трансмембранный электрохимический градиент Ca^{2+} - в цитозоле концентрация этих ионов при невозбужденном состоянии клетки приблизительно в 1000 раз меньше, чем в клеточной стенке, вакуоле или в матриксе эндоплазматической сети, и цитозольная сторона мембран заряжена отрицательно по сравнению с другой стороной. При открывании кальциевых каналов ионы кальция устремляются в цитозоль, и их концентрация повышается в 10-20 раз. Эта кальциевая "вспышка" используется клеткой в качестве сигнального интермедиата. В основе сигнальной функции лежит способность ионов кальция взаимодействовать с белками. При связывании ионов кальция некоторыми остатками аминокислот, например аспартата или глутамата, происходит изменение заряда соответствующего участка белка и, вследствие этого, конформации белковой молекулы. Это сказывается на ее активности, что и используется для передачи элиситорного сигнала на последующие звенья сигнальных цепей.

Так же, как и в большинстве других сигнальных систем, в случае кальциевой системы элиситоры связываются с рецепторами плазмалеммы (рис. 1), после чего элиситорный импульс трансмембранно передается на комплекс G-белков, а от них - на фосфолипазу C (ФЛС), катализирующую реакцию гидролиза эфирной связи между остатками фосфорной кислоты и гидроксила глицерина фосфоинозитольного фосфолипида - фосфатидилинозитолбисфосфата (ФИФ). Образующиеся диацилглицерин и инозитол-1,4,5- трисфосфат являются вторичными посредниками. Первый может активировать мембранные Ca^{2+} - зависимые протеинкиназы C (ПКС). Изоформы этого фермента отличаются различной степенью активации ионами кальция и диацилглицерином. Протеинкиназы C способны осуществлять фосфорилирование большого числа белков, регулируя их активность и вызывая клеточный ответ на внешний сигнал. Это относится и к фосфорилированию белковых факторов регуляции транскрипции.

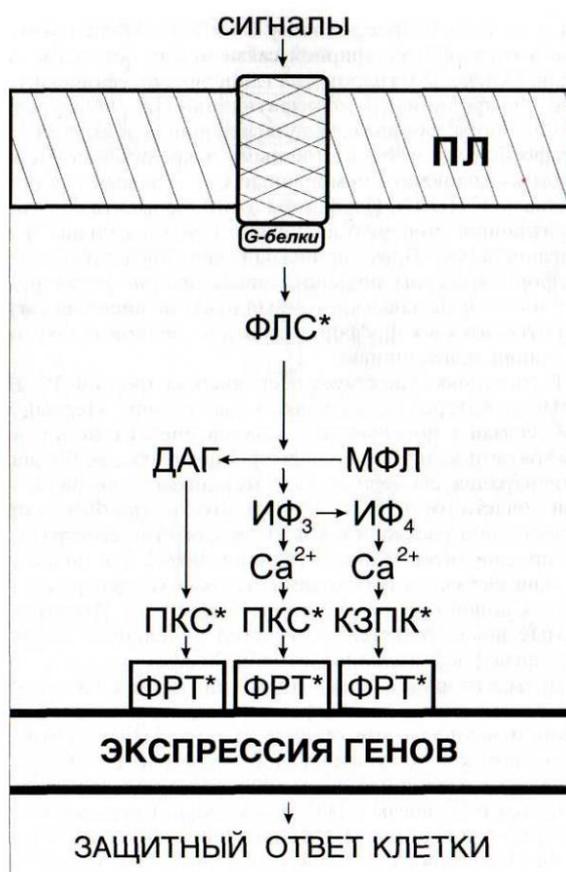


Рис. 1. Схема функционирования кальциевой сигнальной системы

В растениях существует несколько изоформ ФЛС. Наибольший интерес представляют две из них. Первый тип ФЛС связан с поверхностью плазматических мембран, ее субстратами являются полифосфоинозитиды, необходимая концентрация свободных Ca^{2+} находится в физиологической области (от 1 нМ до 1 мкМ); второй тип ФЛС - преимущественно растворимая ФЛС, в качестве субстрата для нее предпочтителен фосфатид или инозитол, для полной активации фермента необходима высокая концентрация свободных ионов Ca^{2+} (мМ).

Имеются непрямые доказательства об участии G-белков в индукции гидролиза фосфатидинозитолбисфосфата.

Другой вторичный посредник - инозитол- 1,4,5-трисфосфат, взаимодействует с белками кальциевых каналов тонопласта и эндоплазматической сети и открывает их, что вызывает поток ионов кальция в цитозоль (рис. 2). В нем Ca^{2+} активирует различные ферменты, например

кальцийзависимые протеинкиназы (ПКС) или кальций-кальмодулинзависимые протеинкиназы (ПКВ), которые, в свою очередь, могут фосфорилировать белки, в том числе факторы регуляции транскрипции, и вызвать экспрессию защитных генов. Инозитол-1,4,5-трисфосфат (или продукт его фосфорилирования - инозитолтетрафосфат) может повышать концентрацию Ca^{2+} в цитозоле, открывая также кальциевые каналы плазмалеммы.

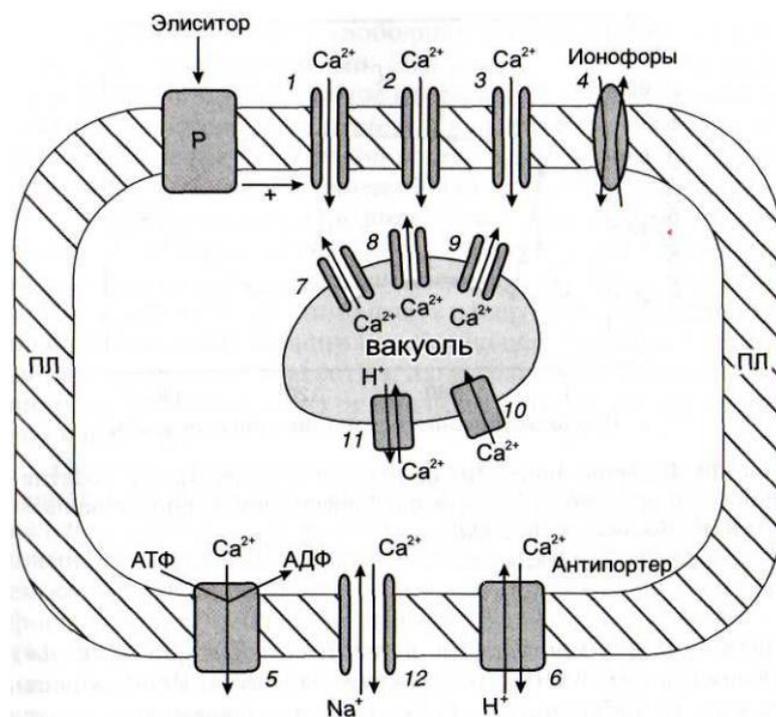


Рис. 2. Влияние элиситоров на кальциевый обмен клеток растений. 1 - рецепторактивируемый Ca^{2+} -канал; 2 - кальциевые каналы, активируемые ИФ3 и ИФ4 ; 3 - потенциалзависимые кальциевые каналы; 4 - транспортировка ионов Ca^{2+} ионофорами; 5 - Ca^{2+} -АТФазы плазмалеммы; 6 - Ca^{2+}/H^{+} -антипортёр плазмалеммы; 7 - кальциевые каналы, активируемые ИФ3 ; 8 - кальциевые каналы, активируемые цАДФР; 9 - кальциевые каналы, активируемые протеинкиназами; 10 - Ca^{2+} -АТФазы тонопласта; 11 - Ca^{2+}/H^{+} -антипортёр тонопласта; 12 - Ca^{2+}/Na^{+} -об- менник; ПЛ - плазмалемма; Р - рецептор

Предполагается, что у животных клеток мономерные трансмембранные белки-рецепторы упомянутых выше инозитолфосфатов, после взаимодействия с ними образуют тетрамерные каналы, осуществляющие вброс ионов кальция в цитозоль.

Семейство кальцийзависимых протеинкиназ

Недавно обнаружено новое семейство кальцийзависимых протеинкиназ (КЗПК), отличных от ПКС. Показано, что под влиянием элиситоров может происходить вызванная фосфорилированием фермента трансформация его неактивной формы 68 кДа в активную 70 кДа (рис. 3). Предложена существенная модификация этой схемы, основывающаяся на относительно медленном передвижении ионов кальция в цитозоле, как было показано в опытах с использованием инъекции меченого кальция в гигантский аксон кальмара. Причиной могло быть интенсивное связывание ионов кальция белками и обратный перенос избытка ионов кальция Ca^{2+} -активируемыми АТФазами.



Рис. 3. Влияние элиситора на изменение содержания неактивной (1) и активной (2) форм кальцийзависимой протеинкиназы (КЗПК) 7-70 кДа; 2-68 кДа

Новая схема распространения кальциевой волны в клетках предполагает, что после открывания кальциевого канала у его отверстия происходит накопление относительно медленно диффундирующих ионов кальция, что вызывает активацию в этой области мембраносвязанной фосфолипазы С. Освобождающийся в результате фосфолипазной реакции инозитолтрифосфат подвижен и, диффундируя от места образования, может достигать соседних кальциевых каналов, связываться с ними и открывать их.

Необходимо иметь в виду, что белки каналов имеют места связывания не только ИФЗ, но и ионов кальция. Предполагается, что при локальном передвижении от соседнего открытого кальциевого канала они достигают свободных кальцийсвязывающих мест и захватываются ими. Это вносит дополнительный вклад в ИФЗ-индуцированное открывание и поддержание в открытом состоянии кальциевых каналов. Так происходит распространение кальциевой волны вдоль мембраны и одновременно, местное (примембранное) повышение содержания ионов кальция. Предполагается, что этот механизм проявляется в том случае, когда концентрация элиситора невелика и лимитирует количество активируемых кальциевых каналов. Необходимо иметь в виду, что значительное повышение концентрации ионов кальция в цитозоле вблизи каналов может привести к их закрыванию и ограничению поступления Ca^{2+} из окружающей среды или органоидов в цитозоль.

Передача элиситорного сигнала в геном клеток, интенсивность и направленность функционирования этой сигнальной системы осложнена различными деталями, касающимися природы элиситоров, большей или меньшей атакуе мости фосфолипазой С различных молекулярных видов фосфолипидов, особенностями строения изоформ белков - участников сигнальной системы, различиями вклада кальциевых каналов плазмалеммы и различных органелл клетки в кальциевую "вспышку", наконец, вероятной "кластеризацией" кальциевых каналов и кальцийзависимых Ca^{2+} - АТФаз и удаленностью друг от друга этих кластеров. Недавно была высказана гипотеза о существовании во внутренней ядерной мембране животных клеток кластеров специальных, например кальциевых каналов, с помощью которых осуществляется локальное (фонтанное) изменение концентрации ионов вблизи определенных генов и таким образом происходит специфическая регуляция их экспрессии. Топографическая специфичность регуляции генов могла бы осуществляться с помощью специальной фонтанной РНК (фРНК) и так называемых фионов - участков ДНК, способных связывать фРНК. Вброс

порции ионов в ядро происходит с помощью комплекса фибрин-фРНК-белок ионного канала внутренней мембраны ядерной оболочки.

Имеется ряд обзорных работ, посвященных сигнальной функции ионов кальция, в которых анализируются особенности функционирования структур, обеспечивающих как повышение концентрации ионов кальция в цитозоле (кальциевые каналы), так и снижение - до исходного уровня с помощью связывания избытка ионов кальция белками, разрушения (дефосфорилирования) ИФЗ и вследствие этого закрывания кальциевых каналов, а также с помощью ионных помп, перебрасывающих ионы кальция обратно против градиента концентрации за счет использования энергии гидролиза макроэргических фосфатных связей АТФ (см. рис. 2).

У высших растений охарактеризованы различные Ca^{2+} -каналы, по которым Ca^{2+} транспортируется через плазматические мембраны, тонопласт, мембраны эндоплазматической сети, хлоропластов и ядер. Эти каналы подразделяются на несколько групп, в зависимости от их электрических характеристик. Они в разной степени чувствительны к верапамилу и La^{3+} . В функционирование сигнальных путей вовлечены главным образом, кальциевые каналы, активируемые деполяризацией мембран от -140 мВ до менее отрицательных значений, что, по-видимому, приводит к изменению конформации белков кальциевых каналов и их открыванию. Элиситор-активируемые каналы выделены в отдельную группу.

ИТФЗ- и цАДФрибоза-управляемые каналы найдены в мембранах ЭПР и вакуолей растений, тогда как в клетках животных ИТФЗ и цАДФрибоза индуцируют выход Ca^{2+} только из ЭПР. Обнаружено, что разные типы стрессоров индуцируют выход Ca^{2+} в цитозоль из разных внутриклеточных компартментов.

Понижения уровня Ca^{2+}

Последующее за "кальциевой вспышкой" снижение концентрации Ca^{2+} в цитозоле является обязательным условием функционирования кальциевой

сигнальной системы. Более того, длительное сигналиндуцированное повышение концентрации ионов кальция может привести к гибели клеток.

Существует несколько механизмов понижения уровня Ca^{2+} в цитозоле. Оно может осуществляться за счет связывания Ca^{2+} кальмодулином и другими белками. Ca^{2+} -связывающие белки, обнаруженные в растениях, подразделяются на четыре группы: 1) кальмодулин (КМ); 2) КМ-подобные белки с кальцийсвязывающими доменами; 3) Ca^{2+} -регулируемые протеинкиназы; 4) белки без специфического Ca^{2+} -связывающего домена.

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

Привлекают все большее внимание аннексины - Ca^{2+} -связывающие белки, взаимодействующие с кислыми фосфолипидами в присутствии Ca^{2+} . Некоторые аннексины способны образовывать ионные каналы в искусственных мембранах. Показано, что аннексины *Arabidopsis thaliana* участвуют в защите от окислительного стресса.

Снижение концентрации ионов кальция

Пожалуй, основной вклад в снижение концентрации ионов кальция в цитоплазме играют закрывание кальциевых каналов в результате гидролиза ИФЗ специфическими фосфатазами и активация кальциевых насосов (Ca^{2+} -АТФаз), которые за счет энергии гидролиза АТФ переносят ионы кальция в обратном направлении против градиента концентрации, восстанавливая исходные значения градиента Ca^{2+} и в связи с этим способность клеток воспринимать новый элиситорный сигнал. Ca^{2+} -АТФазы характеризуются высоким сродством к Ca^{2+} .

В растениях найдены различные Ca^{2+} -АТФазы, принадлежащие в том числе к автоингибирующемуся (АСА) типу (которые регулируются комплексом Ca^{2+} -кальмодулин). АСА-тип Ca^{2+} -АТФаз растений

локализуются в ЭПР и плазматических мембранах, тогда как в животных клетках этот тип АТФаз локализован исключительно на плазматических мембранах. Активность АСА-типа Ca^{2+} -АТФаз ЭПР в *Arabidopsis* ингибируется Ca^{2+} -зависимой протеинкиназой [Hwang et al., 2000]. Обнаружены зависимые и независимые от кальмодулина Ca^{2+} -АТФазы. Установлен элиситориндуцированный синтез кальмодулин-стимулируемой кальциевой АТФазы плазмалеммы.

Еще один механизм снижения содержания ионов кальция в цитозоле - их удаление в процессе работы $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ антипортеров, использующих для этого энергию гидролиза АТФ. Роль кальциевых каналов и кальциевых помп в мембранах клеток растений была экспериментально обоснована опытами с использованием специфических ингибиторов.

Возникает вопрос, существует ли в растениях еще один механизм удаления Ca^{2+} из цитозоля, характерный для клеток животных после их возбуждения, с помощью $\text{Na}^{+} / \text{Ca}^{2+}$ -обменника, обладающего низким сродством к Ca^{2+} , но высокой скоростью переноса - около 20 нМ на 1 мг мембранного белка в секунду при 300 °С? Функционирование этого белка-переносчика осуществляется за счет энергии трансмембранного градиента Na^{+} и мембранного потенциала. На клетках водорослей получены данные о противоположно направленных трансмембранных потоках Ca^{2+} и Na^{+} , характеристики которых свидетельствуют о сходстве их с функциональными характеристиками $\text{Na}^{+} / \text{Ca}^{2+}$ -обМСНника животных клеток .

В клетках растений существуют еще два органоида, в которых концентрация ионов кальция может достаточно сильно изменяться, - хлоропласты и митохондрии; однако это в значительной степени автономные образования со своими системами поддержания ионного гомеостаза. До сих пор неясно, в какой степени они участвуют в элиситориндуцированном изменении концентрации ионов кальция в цитозоле. Есть надежда, что этот вопрос будет разрешен с использованием специально сконструированных для этой цели трансгенных растений. Необходимо отметить, что вопрос о вкладе митохондрий в функционирование кальциевой сигнальной системы у

животных клеток решается положительно. Более того, считается, что они принимают активное участие в сигнальных внутриклеточных процессах, что они могут освобождать Ca в цитозоль с помощью Na⁺ / Ca²⁺-обменника внутренней мембраны и поглощать, используя Ca²⁺-унипортер.

Для измерения концентрации ионов кальция в цитозоле и других компартментах используют селективные электроды, красители, а также трансгенные растения с привнесённым геном экворина - Ca²⁺-зависимого флуоресцентного белка. Использование таких трансгенных растений позволило установить, что сигналиндуцированное преходящее повышение содержания ионов кальция в цитозоле приводит к быстрому и преходящему возрастанию их концентрации в митохондриях, что может быть предотвращено предобработкой разобщителями электронного транспорта и фосфорилирования. Установление этого факта позволяет подойти к объяснению до сих пор еще не очень ясного механизма передачи элиситорного сигнала, рецептируемого плазмалеммой, в хлоропласты и митохондрии. Получение трансгенных растений с химерным геном экворина и ядерного белка нуклеоплазмина позволило установить, что сигналиндуцированное повышение содержания Ca²⁺ происходит не только в цитозоле, но и в ядре.

Как уже отмечалось, в целом ряде опытов было показано, что сигналиндуцированное возрастание концентрации ионов кальция в цитозоле объясняется активацией кальциевых каналов не только плазмалеммы, но и внутренних вместилищ ионов кальция.

В опытах с активатором G-белков мастопараном было обнаружено, что устранение внешнего пула Ca²⁺ могло не ингибировать кальциевого "всплеска" в цитозоле, из чего был сделан вывод об активации кальциевых каналов мембран органелл. Подавление эффекта с помощью ингибитора неомицина позволило сделать вывод об участии в этом процессе фосфоинозитидов.

В настоящее время интенсивно обсуждаются возможности автокаталитических и автосупрессорных процессов в кальциевой сигнальной системе. Большой интерес вызвали сообщения о том, что если незначительное

повышение концентрации ионов кальция в цитозоле стимулирует, то сильное - ингибирует индуцируемое инозитол-1,4,5-трисфосфатом открывание кальциевых каналов. Обнаружен Ca^{2+} -индуцируемый синтез белка кальмодулина, который образует с ионами кальция комплекс, принимающий участие в активации различных белков, в том числе протеинкиназ, и через них - факторов регуляции транскрипции. В растениях существуют и кальмодулин-независимые, но Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы, имеющие у С-конца домен, по своей структуре близкий к структуре кальмодулина и способный связывать ионы кальция, что приводит к активации протеинкиназы без участия молекулы кальмодулина.

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

СВЛ белки

Как было сказано выше, важнейшей функцией кальция является его участие во множестве сигнальных путей клетки. На изменения реагируют каналы, помпы, экспрессия генов, синтез алкалоидов, защитных молекул, NO и др., а трансдукторами при этом является ряд белков. Рассмотрим основные из них.

Большинство белков СВЛ присутствуют в мембранах. Их эффекторные киназы главным образом локализируются в цитозоле и ядре. Для исследований данных взаимодействий используют флуоресцентные метки и модифицированные ими эф-фекторные белки. С их помощью установлено место передачи кальциевого сигнала для разных протеинкиназ. Например, киназы СРК23 и СРК24 взаимодействуют с СВЛ1 и СВЛ9 возле плазматической мембраны (Ху, 2006; Waadt et al., 2008). Эти результаты

позволяют установить, что белки CBL определяют местонахождение и действие комплексных соединений CBL-CIPK. Особый случай взаимодействия наблюдался для цитозольного датчика кальция CBL8 с киназой CIPK14. Взаимодействие между этими двумя белками наблюдалось исключительно в плазматической мембране. Предположение, что CBL8 не имеет модифицированного липидом N-конца и, таким образом, отличается от липидмодифицированных CBL1, 4, 5 и 9, позволяет предположить альтернативный способ формирования комплексов CBL8-CIPK. Другие CIPK14-киназы взаимодействуют с локализованными в тонопласте CBL2 и CBL3, показывая, что одна и та же киназа может быть задействована в разных путях, с включением многообразных CBLs различных структур клетки.

Дальнейшие исследования с помощью метода бимолекулярной флуоресцентной комплементации (Bimolecular fluorescence complementation, BiFC) обнаружили альтернативные пути взаимодействия и формирования комплексов CBL-CIPK24 в плазматической мембране – CBL1-CIPK24 и CBL5-CIPK24, тонопласте – CBL2-CIPK24 и CBL10-CIPK24. Но данный метод не позволяет исследовать перемещение белков в клетке, так как дополнительно стабилизирует образованные ими комплексы, поэтому был использован иной подход к проблеме – коэкспрессия флуорофор-меченых CBLs и CIPKs. Эти исследования показали, что CIPK5, связанный с зеленым флуоресцентным белком (Green fluorescent protein, GFP), не находится в цитозоле долгое время и обнаруживается в тонопласте. Таким образом можно сделать вывод, что белки CBL, взаимодействуя в цитозоле с CIPKs, могут перемещаться к мембранам, где и выполняют основную функцию. Это должно в будущем связать зависимость альтернативных взаимодействий CBL-CIPK и концентрации Ca^{2+} в цитозоле.

Вероятно, различные комплексы CBL-CIPK требуют формирования разных концентраций цитозольного кальция, и эта зависимость касается расшифровки определенного Ca^{2+} -сигнала. Кроме того, Ca^{2+} -связывающие способности белков CBL могут изменяться при взаимодействии с другим CIPK, как это показали исследования кристаллизации комплексных

соединений CBL2-CIPK14, так же как CBL4-CIPK24. Это создает дополнительные трудности в изучении зависимости концентрации Ca^{2+} и комплексообразования CBL-CIPK. Вместе взятые эти переменные параметры образования CBL-CIPK способствуют расшифровке отличающегося Ca^{2+} -сигнала в определённых местах клетки, запускающей генерацию отдельных специфических реакций.

Одна из важнейших функций данных взаимодействий – ответы на абиотический стресс с участием АБК у *Arabidopsis*. Недавними исследованиями проанализированы функции CBL и CIPK у пшеницы, сорго, яблони, хлопка, тополя и др. В последнее время пять новых CIPKs и два CBLs идентифицированы в фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.), 43 подобных CIPK гена (похожие у риса) обнаружены у кукурузы (*Zea mays* L.). Функции CIPK риса заключаются в модуляции ответов на абиотический стресс на протяжении прорастания семян и роста проростков (OsCIPK31) и ген OsCIPK23, который, как оказалось, мультистрессиндуцирован, регулирует сигнальные пути во время опыления и реакцию на водный дефицит.

Другой пример – многофункциональность CIPK-OsCIPK15, который был включен в механизм толерантности к дефициту кислорода, а также в различных МAMP-иммунных (Microbe-associated molecular pattern, МAMP) реакциях вместе с OsCIPK14. Повышение и синтез реактивных форм кислорода (РФК) являются фундаментальными компонентами быстрых иммунных реакций на патогенные воздействия у растений и животных и эти исследования были опубликованы многими учёными. Также они важны и для передачи сигнала от АБК в клетках устьиц, при прорастании семян, росте пыльцевой трубки и удлинении корня, как регулятор Na^+/K^+ -гомеостаза растений при солевом стрессе. Несколько исследований показали, что поддерживается взаимосвязь между Ca^{2+} и повышением реактивных форм кислорода (РФК), поэтому была описана активация кальциевых каналов клеток устьиц и корней РФК и наоборот, кальций усиливает накопление реактивных форм кислорода.

Сигнальные пути кальция способны затрагивать и NO-сигнализацию, NO-реактивный свободный газообразный радикал. На сегодняшний момент доказано его участие в разных физиологических процессах, таких как рост корней, закрытие устьиц, гомеостаз железа и гормонов, адаптивные реакции к биотическим и абиотическим стрессам. Наибольший прогресс в изучении функций оксида азота приходится на последние 10 лет после открытия его энзиматического происхождения в растении. Определено несколько вторичных посредников, через которые осуществляется влияние на клетку: цГМФ, протеинкиназы, белки, зависимые от посттрансляционных модификаций посредством NO и ряд генов. Более десяти лет назад Грант с соавторами продемонстрировали, что поврежденные болезнями листья растений имеют повышенный уровень цитозольного кальция, что является одним из этапов иммунного ответа растения. Ферменты активации кальций проницаемых каналов также могут контролироваться NO.

После открытия ряда генов кальцийзависимых белков стали изучать пути регуляции их экспрессии. Одним из таких компонентов является оксид азота. Определение проводили путем введения в растение самого газа или молекул предшественников для копирования эффекта эндогенного NO. Среди генов присутствуют представители ряда кальцийзависимых сигнальных каскадов, в том числе кальциевые сенсоры, Ca²⁺-проницаемые каналы, помпы и другие Ca²⁺-зависимые протеины. Кроме известных кальциевых депо, предложено участие аппарата Гольджи в генерации кальциевого сигнала. Оказалось, что эта структура не участвует в каких-либо ответах и изменяет активность своих транспортеров кальция в ответ на гормональные стимулы, поддерживая при этом стабильную концентрацию кальция.

Механизм функционирования кальциевой сигнальной системы у растений при действии теплового стресса

Чтобы защитить себя от повреждающего воздействия высоких температур, растения синтезируют белки теплового шока (БТШ или HSP, от heat shock protein). БТШ, действуя в качестве шаперонов, восстанавливают

поврежденные при нагревании белки или, если это невозможно, способствуют их деградации. Тем не менее, на сегодняшний день нет четкого ответа, как инициируется экспрессия БТШ? Описаны транскрипционные факторы теплового шока (ФТШ или Hsf, от heat shock factor), активирующие экспрессию БТШ, установлены промоторные последовательности, с которыми взаимодействуют ФТШ, но о первопричинах активации экспрессии можно только догадываться. Согласно классической модели, ФТШ в обычных условиях находится в инертном, мономерном состоянии в результате взаимодействия с HSP90 и HSP70. При повышении температуры появляются денатурированные белки, которые связываются с HSP90/HSP70. В результате ФТШ освобождается из комплекса, олигомеризуется, транспортируется в ядро, где и активирует экспрессию БТШ. Но эта модель не объясняет, почему агенты, не вызывающие денатурацию белков, тем не менее, активируют экспрессию БТШ. Более того, при повышении температуры экспрессия БТШ может происходить независимо от появления денатурированных белков. Следовательно, появление денатурированных белков является достаточным, но не обязательным условием для экспрессии БТШ. Вместе с тем, получены данные, свидетельствующие, что усиление генерации АФК и кратковременное повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле может играть важную роль в активации экспрессии БТШ при действии теплового стресса

Ионы Ca^{2+} играют важную роль на всех этапах онтогенеза растений, а также в адаптации к не благоприятным условиям существования. Стрессовые воздействия приводят к кратковременному повышению уровня Ca^{2+} в цитозоле ($[Ca^{2+}]_{цит}$). Бияшева и соавт., используя протопласты гороха, пожалуй, впервые показали повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$ при тепловом воздействии. Впоследствии эти результаты были подтверждены с использованием других растительных объектов. Повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$ играет важную роль в активации экспрессии БТШ, а ингибирование этого процесса подавляет защитный ответ растительной клетки. Положительная связь между $[Ca^{2+}]_{цит}$ и экспрессией БТШ подтверждается в экспериментах с агентами, повышающими $[Ca^{2+}]_{цит}$. Обработка $CaCl_2$ активировала синтез БТШ [19, 23,

26–29] и индуцировала термотолерантность. Аналогичным образом амиодарон, препарат, обладающий фунгицидной активностью, а также протонофор СССР (от carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) повышали $[Ca^{2+}]_{цит}$ и одновременно активировали экспрессию гена HSP101. Несмотря на то, что повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$ играет важную роль в развитии защитных реакций, превышение его уровня может иметь неблагоприятные последствия. Хотя принято считать, что основной причиной гибели при действии жесткого теплового шока является денатурация (агрегация) клеточных белков и усиление продукции АФК, очевидно, что чрезмерное повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$ является еще одной причиной гибели. Повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$ наблюдается не только при мягком тепловом стрессе, но и при более жестком, повреждающем тепловом шоке. Подавление поступления Ca^{2+} в клетку защищало протопласты *A. thaliana* от гибели при жестком тепловом воздействии. Токсичность кальция, вероятно, обусловлена тем, что ионы Ca^{2+} образуют комплексы с отрицательно заряженными молекулами, например фосфатами. Кроме того, кальций может регулировать развитие программируемой клеточной гибели (ПКГ). Повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$ при действии теплового шока активирует в растениях *A. thaliana* MAP киназу 6 (MPK6), которая необходима для активации экспрессии гена γ VPE. Ген γ VPE кодирует вакуолярный процессирующий фермент, который обладает каспазной активностью и участвует в запуске ПКГ [32]. Таким образом, становится очевидным, что Ca^{2+} играет двойную роль в реакции растений на повышение температуры. С одной стороны, он активирует экспрессию БТШ и может защищать растение от гибели, с другой стороны, он может эту гибель стимулировать.

Заключение

Возможность регуляции функционирования цитоскелета с помощью кальциевой сигнальной системы - одна из актуальных задач физиологии растений. Имеются данные, позволяющие считать, что действие на микротрубочки и микрофиламенты изменения концентрации ионов кальция опосредовано кальмодулином и кальцийзависимыми протеинкиназами. Динамическое состояние микротрубочек в значительной степени зависит от фосфорилирования-дефосфорилирования связанных с ними белков. Ингибирование протеинкиназ индуцировало стабилизацию микротрубочек в суспензионной культуре клеток табака при гипотермии. Изменения в цитоскелете могут иметь существенные последствия для клетки, так как от него зависит движение цитоплазмы, ориентация отложения микрофибрилл целлюлозы в клеточную стенку, транспортные процессы и т.д.

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

Рецепторы Nod-факторов могут быть непосредственно связаны с Ca^{2+} и $C1$ -каналами. Альтернативное мнение заключается в том, что вход кальция – это следующее звено за гетеротримерным G-белком (о чем свидетельствуют опыты с активаторами этих белков мастопараном и пертуссиновым токсином) и фосфолипазой C (опыты с ингибитором фермента - неомицином). В первом случае наблюдалась индукция, а во втором - ингибирование эффекта Nod-факторов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kurusu T. et al. Roles of calcineurin B-like protein-interacting protein kinases in innate immunity in rice // *Plant Signaling & Behavior*. – 2010. – Т. 5. – №. 8. – С. 1045-1047.
2. Medvedev C. C. Calcium signal system [Kalcievaya sygnalnaya systema] // *Fisiologia Rasteniy*. – 2005. – Т. 52. – №. 2. – С. 282-305.
3. Mittler R., Finka A., Goloubinoff P. How do plants feel the heat? // *Trends Biochem. Sci.* 2012. V. 37. P. 118– 125.
4. Romeis T., Piedras P., Jones J. D. G. Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response // *The Plant Cell*. – 2000. – Т. 12. – №. 5. – С. 803-815.
5. Saidi Y., Finka A., Goloubinoff P. Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance // *New Phytol.* 2011. V. 190. P. 556–565.
6. Sánchez-Barrena M. J., Martínez-Ripoll M., Albert A. Structural biology of a major signaling network that regulates plant abiotic stress: The CBL-CIPK mediated pathway // *International journal of molecular sciences*. – 2013. – Т. 14. – №. 3. – С. 5734-5749.
7. Scharf K.D., Berberich T., Ebersberger I., Nover L. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. V. 1819. P. 104–119.
8. Spalding E.P., Harper J.F. The ins and outs of cellular Ca²⁺ transport // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011. V. 14. P. 715–720.
9. Waadt R. et al. Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta // *The Plant Journal*. – 2008. – Т. 56. – №. 3. – С. 505-516.
10. Рихванов Е. Г. и др. Механизм функционирования кальциевой сигнальной системы у растений при действии теплового стресса. Роль

митохондрий в этом процессе //Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – №. 2. – С. 155-155.

11.Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений. – 2002.

12.Швартау В. В. и др. Кальций в растительных клетках //Biosystems Diversity. – 2014. – Т. 22. – №. 1. – С. 19-32.