

*На правах рукописи*



**Степанченко  
Наталья Сергеевна**

**Исследование взаимодействия сигнальных путей  
этилена и абсцизовой кислоты в контроле пролиферации  
культивируемых клеток арабидопсиса**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ внутриклеточной регуляции Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук

**Новикова Галина Викторовна**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор

**Медведев Сергей Семенович**

доктор биологических наук

**Трофимова Марина Сергеевна**

**Ведущая организация:** Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии Российской академии сельскохозяйственных наук.

Защита состоится «11» октября 2011 г. в 11 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (499) 977-80-18, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат диссертации размещен на сайте [www.ippras.ru](http://www.ippras.ru).

**Автореферат разослан « 7 » сентября 2011 г.**

Ученый секретарь

совета по защите докторских

и кандидатских диссертаций

кандидат биологических наук

М.И. Азаркович

## Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** Накопившаяся за последние годы информация об особенностях функционирования путей передачи гормональных сигналов в клетках растений позволяет заключить, что интегрированный ответ растительного организма на фитогормоны – результат переноса гормонального сигнала между различными информационными каналами (взаимодействие путей передачи гормональных сигналов). На организменном уровне такое взаимодействие проявляется в способности интегрировать вне- и внутриклеточные сигналы при помощи сети, образуемой компонентами путей передачи сигналов фитогормонов.

Известно, что при стрессах этилен и АБК влияют на синтез друг друга (Ruggiero *et al.*, 2004), а пути передачи их сигналов в подвергнутых стрессам растениях могут взаимодействовать (Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2007). Напротив, сведения о взаимодействии сигнальных путей этилена и АБК в не подвергнутых стрессорному действию клетках отсутствуют. Более того, данные, полученные на интактных растениях и/или изолированных органах/тканях растений, не позволяют сделать вывод о том, в регуляции какого ответа, проявляющегося на клеточном уровне, могут взаимодействовать сигнальные пути этилена и АБК. Для ответа на сформулированный вопрос целесообразно использовать биологическую модель, лишенную организменного уровня контроля. Последнему требованию удовлетворяют культивируемые *in vitro* клетки, представляющие собой популяцию клеток с вектором отбора по интенсивности и устойчивости пролиферации.

Имеется множество примеров, демонстрирующих взаимосвязь физиологических ответов растений на фитогормоны, которые выражаются в изменениях их роста и развития, где одним из основополагающих процессов является деление клеток. Если глобальная роль ауксинов и цитокининов в качестве позитивных регуляторов пролиферации клеток не вызывает сомнений (del Pozo *et al.*, 2005), то роль этилена и АБК в делении клеток остается предметом интенсивной дискуссии, а взаимное влияние путей передачи сигналов этих гормонов в связи с делением клеток остается мало исследованным вопросом.

**Цели и задачи работы.** Цель настоящей работы состояла в поиске пунктов возможного взаимодействия путей передачи сигналов этилена и АБК в контроле клеточных делений в культивируемых клетках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Охарактеризовать на цитологическом и физиологическом уровнях биологическую модель – культивируемые *in vitro* клетки *A. thaliana* – для проведения биохимических и молекулярно-биологических экспериментов.
2. Выяснить влияние экзогенной АБК на пролиферацию культивируемых клеток *A. thaliana* дикого типа (Col-0), а также клеток мутантов по генам *ETR1*, *CTR1* и *EIN2*.

3. Изучить влияние АБК на фосфорилирование белков в клетках Col-0, а также этилен-нечувствительных мутантов *etr1-1*, *ctr1-1* и *ein2-1*, и идентифицировать АБК-регулируемые протеинкиназы и/или фосфорилируемые ими белки.
4. В культивируемых клетках Col-0, *etr1-1* и *ein2-1* проанализировать влияние АБК на транскрипцию генов, кодирующих протеинкиназы, которые функционируют в путях передачи сигналов этилена и АБК.

**Научная новизна.** В работе впервые получены, охарактеризованы и использованы в качестве экспериментальной модели суспензионные культуры клеток этилен-нечувствительных мутантов *A. thaliana etr1-1*, *ctr1-1* и *ein2-1*. Показано, что этилен, образующийся при культивировании клеток, необходим для их устойчивой пролиферации. Экспериментально подтверждено, что в культивируемых клетках *A. thaliana* нечувствительность к этилену влияет на передачу сигнала АБК. Мутации, блокирующие работу этиленового сигнального пути (*etr1-1*, *ein2-1*), ведут к увеличению синтеза АБК в течение субкультивирования, а также к проявлению дифференциального эффекта экзогенно добавляемой АБК на синтез ДНК, пролиферацию и рост клеток, а также на образование трахеальных элементов. В культивируемых клетках *A. thaliana* обнаружена митоген-активируемая протеинкиназа (МАПК) ERK1-типа, идентичная МРК11. На основании данных по экспрессии генов, кодирующих МАПК, установлено, что в клетках Col-0, *etr1-1* и *ein2-1* МРК1/2/4 могут функционировать в пути передачи сигнала АБК, МРК3/5 – в активируемом этиленом МАП-киназном каскаде, тогда как МРК6 вовлечена в регуляцию синтеза этилена. Функционирование белков ETR1, EIN2 и энзиматическая активность МАПК МРК6 определяют баланс между пролиферацией и дифференцировкой в культивируемых клетках *A. thaliana*. Предложена схема взаимодействия сигнальных путей этилена и АБК в контроле пролиферации.

**Научно-практическое значение.** Полученные результаты позволяют глубже понять молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляции фитогормонами как пролиферации клеток в суспензионных культурах, так и при переходе культивируемых клеток к цитодифференцировке. Эти данные могут быть использованы для дальнейшего изучения взаимодействия путей передачи сигналов разных фитогормонов, которое выражается в регуляции клеточного цикла растительных клеток. Полученные результаты о взаимодействии сигнальных путей фитогормонов в активно пролиферирующих клетках могут быть использованы при чтении курсов лекций по молекулярной биологии, физиологии и биохимии растений для студентов и аспирантов биологических специальностей.

**Апробация работы.** Основные результаты научной работы были представлены: на XVI и XVII Международных конгрессах Федерации Европейских Обществ Биологов растений (Финляндия, Тампере, 2008; Испания, Валенсия, 2010); конференциях молодых ученых ИФР РАН (Москва, 2009, 2010); на XVI международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2009” (Москва, 2009); на международной конференции “Plant abiotic stress – from signaling to development” (Эстония,

Тарту, 2009); на Годичном собрании Общества физиологов растений России, международной научной конференции “Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера”, (Апатиты, Россия, 2009); на VI Международной научной конференции “Регуляция роста, развития и продуктивности растений” (Беларусь, Минск, 2009); на VII съезде Общества физиологов растений России “Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, Россия, 2011).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из которых 5 – в рецензируемых изданиях.

**Структура диссертации.** Диссертация состоит из разделов: введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы. Работа изложена на 136 страницах машинописного текста, включает 20 рисунков, 11 таблиц. Список литературы включает 233 наименования, из которых – 227 на иностранных языках.

### **Объекты и методы исследования**

**Растительный материал и обработка клеток.** Объектом исследования служили суспензионные культуры клеток *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. четырех генотипов: дикий тип (экотип Columbia, Col-0) и этилен-нечувствительные мутанты *ctr1-1* (constitutive triple response 1), *etr1-1* (ethylene resistant 1) и *ein2-1* (ethylene insensitive 2). Культуры выращивали в среде SH (Shenk and Hildebrandt, 1972) в стеклянных колбах в темноте при температуре 26°C и постоянном перемешивании. Период субкультивирования составлял 10 дней. Обработку клеток АБК (25 мкМ), U0126 (20 мкМ), BrdU (150 мкМ) проводили на 5-й день субкультивирования. Время инкубации клеток с добавленными растворами составляло 3 час. В экспериментах, в которых изучали совместное влияние перечисленных выше веществ, клетки 1 час обрабатывали АБК, а затем добавляли соответствующее соединение и инкубировали еще 2 час. По окончании обработки и удаления среды клетки замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –70°C.

**Рост суспензионных культур** определяли весовым методом, а размер клеток оценивали по диаметру протопластов, выделение которых проводили по методу, описанному Смоленской и Носовым (1988).

**Цитологический анализ суспензионных культур.** Клетки фиксировали смесью уксусной кислоты с 96% этанолом (1:3). Митотический индекс подсчитывали на препаратах, окрашенных по Фельгену. Приготовленные постоянные препараты использовали для определения количества ДНК в ядрах (Greilhuber, 2005).

**Цитофотометрию** проводили двухволновым методом (Мендельсон, 1969) в микроспектрофотометре Univar (Reichert-Jung). В качестве стандарта использовали клетки апикальной меристемы корня *Vigna radiata* cv. Berken с известным количеством ДНК

(4С = 2,1 пг) (Zorinians *et al.*, 2003). Данные по количеству ДНК в ядрах анализировали по методу, описанному Nosov с соавт. (1983).

**Определение выделения этилена** проводили в газовом хроматографе Цвет 106 с пламенно-ионизационным детектором и устройством для концентрирования углеводов (Ракитин, Ракитин, 1986).

**Определение содержания АБК** в клетках суспензионных культур проводили по методике Карягина (Карягин, 1998) в газовом хроматографе Газохром 1109 с высокочувствительным и селективным по отношению к АБК детектором по захвату электронов.

**Выделение растворимых белков.** Замороженные в жидком азоте клетки гомогенизировали и экстрагировали белки в (1:1,5, вес/объем) 50 мМ Трис-НСl (рН 7,6), который содержал 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 1 мМ фенилметилсульфонил фторид (ФМСФ), 1 мМ ЭГТА, 2 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 мМ бензамидин, 10 мМ NaF, 50 мМ β-глицерофосфат и 250 мМ сахарозу. Растворимые белки, полученные центрифугированием (130000 g, 3 час), переводили в 10 мМ Трис-НСl (рН 7,6) гель-фильтрацией в колонках NAP-5 (GE Healthcare Life Science). Содержание белка определяли с бицинхиновым реагентом (BCA-Protein assay) (Sigma).

**Фосфорилирование белков *in vitro* и разделение меченых белков двумерным электрофорезом (2-DE).** Фосфорилирование цитозольных белков *in vitro* проводили в реакционной смеси, содержащей 20 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ MnCl<sub>2</sub>, 1 мМ ЭГТА, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ, 2 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 мМ β-глицерофосфат, 1 мМ бензамидин, 10 мкМ АТФ и 18,5 кБк [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ/мкг белка (уд. активность 110 ТБк/ммоль). Реакцию инициировали добавлением 50-100 мкг белка и проводили в течение 20 мин при 30°C. Белки осаждали при -20°C 80% ацетоном. Осадки, промытые 2-3 раза 80% ацетоном, растворяли в буфере, содержащем 7,5 М мочевины, 2 М тиомочевину, 1% Тритон X-100, 4% CHAPS, 20 мМ ДТТ, 0,2% Bio-Lyte 3/10 (Bio-Rad). В аналитических целях разделение белков при помощи 2-DE осуществляли в Mini-PROTEAN 2-D Electrophoresis Cell (Bio-Rad) по O'Farrell (1975). Для идентификации фосфобелков MALDI-TOF MS и LC-ESI MS/MS продукты реакции фосфорилирования фракционировали в первом направлении на IPG Strips (длина 7 см, диапазон рН 4-7, Bio-Rad) согласно инструкции производителя. Во втором направлении проводили электрофорез в денатурирующих условиях в 12,5% ПААГ по Laemmli (1970). Гели окрашивали Кумасси G-250 (Neuhoff *et al.*, 1985), высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой Biomax MR (Kodak). Вырезанные из 2-DE-гелей полипептиды, соответствующие фосфобелкам, идентифицировали MALDI-TOF MS в центре "Постгеномные и нанотехнологические инновации" на базе Инновационного центра медицинских нанобиотехнологий ГУ НИИ физико-химической медицины ФМБА, LC-ESI MS/MS анализ фосфобелков проводили в Отделе биомолекулярной масс-спектрометрии медицинского факультета Лейденского университета (Нидерланды).

**Изоэлектрическое фокусирование белков в нативных условиях** при помощи MicroRotofor Liquid-Phase IEF Cell (Bio-Rad) проводили согласно протоколу производителя.

**Определение МАП-киназной активности *in vitro*** проводили, инкубируя белковые образцы (10 мкг) в течение 20 мин при 30°C в реакционной смеси, содержащей 0,25 мг/мл основного белка миелина (МВР), 20 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ MnCl<sub>2</sub>, 1 мМ ЭГТА, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ, 2 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 мМ β-глицерофосфат, 1 мМ бензамидин, 10 мкМ АТФ и 37 кБк [γ-<sup>32</sup>P]АТФ (уд. активность 110 ТБк/ммоль). Реакцию останавливали добавлением буфера образцов для ДДС-Na-электрофореза и кипячением. Затем проводили электрофорез в денатурирующих условиях в 15% ПААГ. Для визуализации фосфорилированного МВР высушенные окрашенные гели экспонировали с рентгеновской пленкой Biomax MR (Kodak).

**Определение МАП-киназной активности *in situ*** проводили в 10% ПААГ с 0,5 мг/мл МВР, запolyмеризованным в ПААГ. После электрофореза гели инкубировали в 20% изопропанолe, 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0) и 5 мМ 2-меркаптоэтанолe (2МЕ) с последующей промывкой в 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0) с 5 мМ 2МЕ. Затем белки повторно денатурировали при помощи 6 М гуанидингидрохлорида в 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0) с 5 мМ 2МЕ. Ренатурацию белков проводили в 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 0,04% Твин 40 и 5 мМ 2МЕ. Далее гели предынкубировали в 40 мМ Hepes-NaOH (рН 8,0), содержащем 2 мМ ДТТ, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мМ ЭГТА и 1 мМ MnCl<sub>2</sub>. Реакцию фосфорилирования в геле проводили в 40 мМ Hepes-NaOH (рН 8,0), содержащем 40 мкМ АТФ, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ MnCl<sub>2</sub> и 74 кБк/мл [γ-<sup>32</sup>P]АТФ (уд. активность 110 ТБк/ммоль). Реакцию терминировали 5% ТХУ с 1% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Высушенные гели экспонировали с рентгеновской пленкой Biomax MR (Kodak).

**Вестерн блоттинг.** После электрофоретического разделения (ДДС-Na ПААГ и 2-DE) белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (45 мкм, Hybond-C Extra, GE Healthcare Life Science) в Trans-Blot SD Electrophoretic Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) при 0,8 мА/см<sup>2</sup> в течение 2 час. Высушенные мембраны экспонировали с рентгеновской пленкой Biomax MR (Kodak). После этого мембраны инкубировали с первичными антителами в TBST (10 мМ Трис-НСl рН 7,6, 150 мМ NaCl, 0,05% Твин 20) с 2% желатиной в течение ночи при 4°C. В качестве первичных антител для иммунодетекции использовали анти-ERK1 и анти-фосфоERK1 кроличьи поликлональные и анти-фосфотирозинные (pY20) мышинные моноклональные антитела (Sigma), а для визуализации – антимышинные и антикроличьи антитела, меченые пероксидазой хрена (Promega).

**Окраску гелей азотнокислым серебром** проводили по Ansorge (1985) или Shevchenko с соавт. (1996).

**Выделение ДНК из культивируемых *in vitro* клеток.** Навеску замороженных в жидком азоте клеток (около 100 мг сырого веса) растирали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. ДНК выделяли при помощи набора реактивов GenElute

Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Концентрацию выделенной ДНК определяли спектрофотометрически.

**Аллель-специфическая ПЦР.** Поскольку мутации *ctr1-1*, *etr1-1* и *ein2-1* точечные, то праймеры подбирали к участку гена, где локализована мутация. ПЦР проводили в 10 мкл буфера, содержащего 60 mM Трис-НСl (рН 8,5), 25 mM КСl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Тритон X-100, 10 mM 2МЕ, 0,2 mM дНТФ, 3 ед. активности Таq-полимеразы Hot-Taq (Fermentas), 0,5 мкМ праймеров, 10-100 нг ДНК. Реакцию инициировали добавлением в раствор ДНК-матрицы. Продукты реакции анализировали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле.

**ПЦР с обратной транскрипцией.** Навеску замороженных в жидком азоте клеток растирали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. РНК выделяли при помощи набора Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию выделенной РНК определяли спектрофотометрически. Качество образцов РНК оценивали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. Препараты РНК очищали от примеси ДНК при помощи DNase I (Fermentas), инкубируя 1 мкг РНК с 1 ед. активности фермента в течение 1 час при 37°C в буфере, содержащем 100 mM Трис-НСl (рН 7,5), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Полученные препараты использовали для синтеза кДНК при помощи обратной транскриптазы SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. Синтез второй цепи проводили при помощи ПЦР в 10 мкл смеси, содержащей 60 mM Трис-НСl (рН 8,5), 25 mM КСl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Тритон X-100, 10 mM 2МЕ, 0,2 mM дНТФ, 3 ед. активности Таq-полимеразы, 0,5 мкМ праймеров, 2-4 мкл смеси кДНК. Продукты реакции анализировали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле.

**Количественное определение включения бромдезоксипуридина (BrdU) в ДНК** проводили как описано Ueda с соавт. (2005). Выделенную из культивируемых клеток геномную ДНК (2 мкг) денатурировали 0,4 N NaOH, затем нейтрализовали добавлением 1M Трис-НСl (рН 6,8). Нейтрализованный раствор одноцепочечной ДНК (50 нг) при помощи Bio-Dot SF Microfiltration apparatus (Bio-Rad) наносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra (45 мкм), мембрану высушивали на воздухе, а затем ДНК фиксировали ультрафиолетом. Мембрану инкубировали с моноклональными антителами против BrdU (Sigma). Для визуализации использовали антимишьяные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Promega).

**Обработку данных** проводили при помощи компьютерных программ Progenesis PG220 v2006 (Nonlinear Dynamics Ltd.) и One-Dscan V1.3 (Scanalytics). В таблицах и на рисунках представлены средние арифметические значения из трех независимых экспериментов и их стандартные ошибки.



## Результаты и обсуждение

**Характеристика суспензионных культур.** Поскольку первичными эксплантами для получения клеточных суспензий были листья растений *A. thaliana* с точечными мутациями *etr1-1*, *ctr1-1* и *ein2-1*, то при помощи аллель-специфической ПЦР мы подтвердили, что культивирование *in vitro* не привело к реверсии мутаций. В течение периода субкультивирования клетки в небольших кластерах имеют форму удлинённых “клеточных файлов”, указывая на непрерывность их роста и деления. За период субкультивирования суспензия Col-0 прирастала в 14,7 раз; штаммы *etr1-1* и *ein2-1* прирастали в 7,5 и 6,4 раз соответственно, тогда как штамм *ctr1-1* рос менее интенсивно (индекс роста 3,0). Удельная скорость роста ( $\mu_{\max}$ , сут<sup>-1</sup>) клеток составила для Col-0 0,43, *etr1-1* 0,33, *ctr1-1* 0,17 и *ein2-1* 0,34. Несмотря на различия в скорости роста, жизнеспособность всех штаммов была высокой (не менее 90%). Так как время удвоения числа клеток Col-0 (38 час) меньше, чем у этилен-нечувствительных мутантов, то можно заключить, что для деления клеток в культуре необходима чувствительность к этилену и сбалансированная работа этиленового сигнального пути. Клетки мутантов по морфологии отличались от Col-0: клетки *etr1-1* значительно мельче, клетки *ein2-1* гетерогенны по размерам, а клетки *ctr1-1* в 1,5-2 раза крупнее. Кроме того, у *etr1-1* и *ein2-1* постоянно образовывались трахеальные элементы (ТЕ), которые не встречались у Col-0 и *ctr1-1*.

При культивировании *in vitro* клетки продуцируют этилен, который может влиять на скорость пролиферации и эндоредупликацию ядерной ДНК (Dan *et al.*, 2003). В связи с этим мы исследовали степень гетерогенности культивируемых клеток по количеству ядерной ДНК. Количество ДНК в ядрах Col-0 варьировало от 2С до 32С с преобладанием 8С (47%). Распределение ядер по количеству ДНК в культуре *etr1-1* сходно с диким типом, но спектр пloidности более узкий. В культуре *ein2-1* число клеток с количеством ДНК 8С и 16С было примерно одинаковым и составляло 32% и 36% соответственно. Однако стоит отметить, что в культуре *ein2-1* ядра с 32С встречались чаще, чем в Col-0. В популяции клеток *ctr1-1* доля ядер с 16С существенно выше (~25%), чем в Col-0 и *etr1-1*. Эти данные согласуются с результатами, полученными на этиолированных проростках *Arabidopsis* (Gendreau *et al.*, 1999). Показано, что обработка проростков Col-0 предшественником этилена АЦК вела к увеличению доли полиплоидных ядер, которая сравнима с таковой у *ctr1-1*, но в отсутствие этилена.

**Влияние АБК на синтез ДНК и митотическую активность.** Измерение содержания эндогенной АБК в клетках в течение периода субкультивирования показало, что количество гормона у *etr1-1* и *ein2-1* имело тенденцию к повышению, тогда как у Col-0 количество АБК практически не менялось. Опираясь на эти данные, клетки обрабатывали экзогенной АБК (25 мкМ) на 4-5 день после инокуляции в свежую питательную среду, когда содержание эндогенной АБК сходно у всех генотипов.

Влияние АБК на пролиферацию клеток было оценено по синтезу ДНК и митотической активности. Поскольку АБК как возможный регулятор деления клеток блокирует

клетки на границе G1/S, мы проанализировали эффект АБК на синтез ДНК, определяя *in vivo* включение аналога тимидина 5-бром-2-дезоксисуридина (BrdU) в ДНК. В клетках Col-0 обработка АБК вызывала устойчивое снижение включения BrdU в ДНК (Рис. 1). Этот результат может быть следствием негативного эффекта АБК на синтез ДНК,

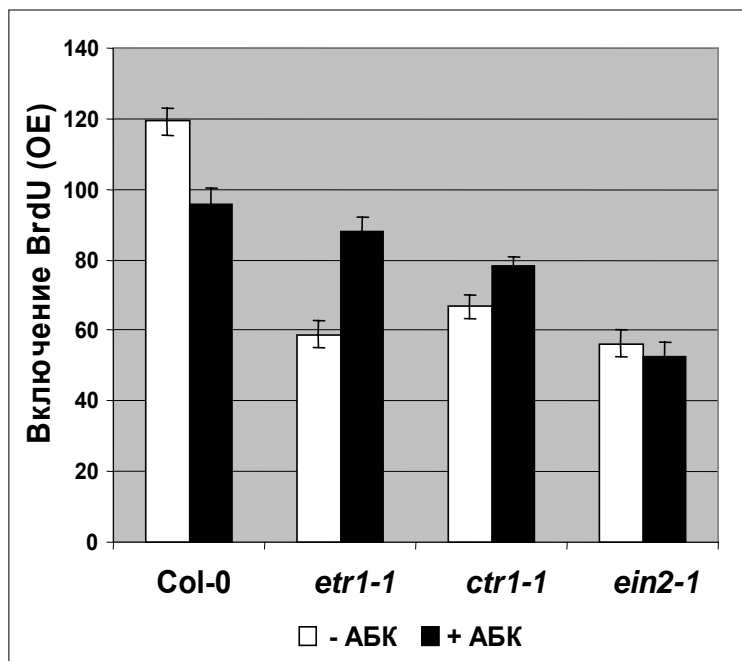


Рис. 1. Влияние АБК на включение 5-бром-2-дезоксисуридина (BrdU) в ДНК клеток Col-0, *etr1-1*, *ctr1-1* и *ein2-1*.

происходящие в популяциях клеток. При нормально функционирующем пути передачи этиленового сигнала, как в клетках Col-0, АБК ингибировала синтез ДНК (G1/S переход) и не влияла на величину митотического индекса (МИ) (5,4%). В суспензиях *etr1-1* и *ein2-1* массово встречаются ТЕ, то есть определенная доля клеток выходила из цикла и переходила к терминальной дифференцировке (образование ТЕ), поэтому популяции клеток *etr1-1* и *ein2-1* имели МИ 2,8% и 2,7% соответственно. Экзогенная АБК в отсутствие восприятия этиленового сигнала стимулировала синтез ДНК у *etr1-1*, но не у *ein2-1*, где этилен воспринимается, но его сигнал не проводится. Значительная часть клеток *ctr1-1* отвлекается на процессы эндоредупликации ДНК и, вероятно, задерживается в фазе G2. Экзогенная АБК не влияла на синтез ДНК в клетках *ctr1-1*, но препятствовала переходу клеток к эндоциклам, что видно по возрастанию МИ с 3,5% до 4,3%.

**Влияние АБК на рост и морфологию клеток.** Чтобы выяснить влияние АБК на рост и морфологию, клетки переносили в среду, уже содержащую АБК, и каждые двое суток измеряли сырой вес, число погибших клеток, а также количество ТЕ (Рис. 2 и Таблица 1). В конце периода субкультивирования у Col-0 снижалась биомасса, тогда как у *ein2-1* в ответ на АБК не наблюдалось изменений роста. Особенно сильно эффект

что согласуется с данными литературы (Swiatek *et al.*, 2002). Включение BrdU в ДНК клеток *etr1-1* повышалось под влиянием АБК, тогда как у мутантов *ctr1-1* и *ein2-1* эффект АБК достоверно не проявлялся. Следовательно, в системе, где отбор клеток осуществляется по признаку активной пролиферации, нечувствительность к этилену может влиять на передачу сигнала АБК, которая в норме ведет к ингибированию синтеза ДНК. В экспоненциальной фазе роста синтез ДНК в контрольных условиях согласуется с митотической активностью ( $r = 0,98$ ), которая в свою очередь отражает процессы,

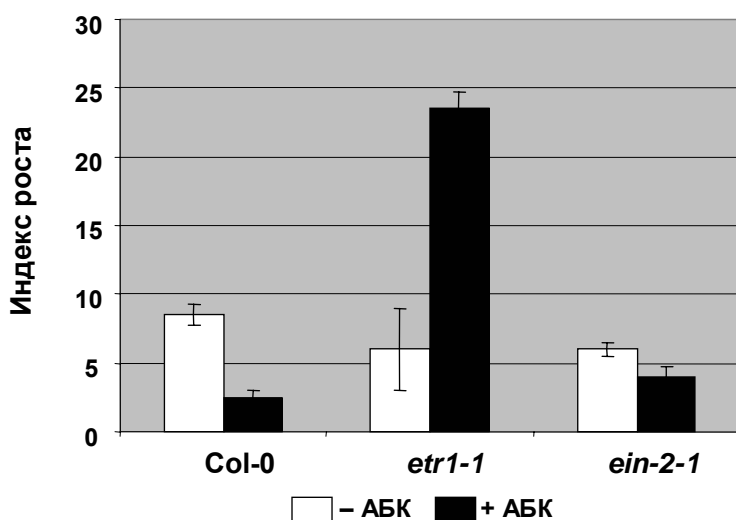


Рис. 2. Влияние АБК на индекс роста клеток суспензионных культур *A. thaliana* Col-0, *etr1-1* и *ein2-1*.

АБК (25 мкМ) добавляли в среду в момент пересадки клеток, индекс роста, число погибших клеток и количество трахеальных элементов культур измеряли в конце периода субкультивирования.

АБК проявлялся у *etr1-1*: прирост биомассы был значительным, количество ТЕ снижалось, и повышалась доля живых клеток. Напротив, в культуре *ein2-1* более чем в 2-3 раза увеличивалось число ТЕ, а процент живых клеток снижался. Поскольку в ходе культивирования клеток экзогенная АБК замедляла снижение продукции этилена только в культуре Col-0, а доля живых клеток при этом увеличивалась, то можно допустить, что роль экзогенной АБК состояла в поддержании синтеза этилена на уровне, который позволял клеткам продолжать пролиферацию.

Таблица 1. Влияние АБК на число трахеальных элементов (ТЕ) и жизнеспособность клеток культур Col-0, *etr1-1* и *ein2-1*.

Сутки	АБК	Col-0		<i>etr1-1</i>		<i>ein2-1</i>	
		ТЕ, $\times 10^{-3}$	Живые клетки, %	ТЕ, $\times 10^{-3}$	Живые клетки, %	ТЕ, $\times 10^{-3}$	Живые клетки, %
6	-	0	91,5 ± 0,5	80 ± 11	90,7 ± 0,88	52 ± 4	91,1 ± 0,75
	+	0	92,8 ± 0,8	67 ± 12	95,1 ± 0,59	118 ± 6	88,4 ± 1,07
11	-	0	69,5 ± 0,5	49 ± 2	94,2 ± 1,2	33 ± 3	93,4 ± 0,63
	+	0	71,1 ± 2,9	29 ± 5	97 ± 0,57	132 ± 13	83,4 ± 1,48

Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Таким образом, в культивируемых клетках *A. thaliana* нечувствительность к этилену влияла на проявление ответа на АБК. Мутации, блокирующие работу этиленового сигнального пути (*etr1-1*, *ein2-1*), ведут к увеличению синтеза АБК в течение субкультивирования, а также к проявлению дифференциального эффекта экзогенной АБК на синтез ДНК, пролиферацию, рост клеток и образование ТЕ. В норме (Col-0) экзогенная АБК снижает синтез ДНК (Рис. 1) и последующую пролиферацию клеток, но у штам-

мов мутантов “спасает” от негативных последствий, связанных с отсутствием этиленового сигналинга (Рис. 2 и Таблица 1).

### Влияние АБК на фосфорилирование растворимых белков клеток *A. thaliana*.

Несмотря на своеобразие судьбы клеток *etr1-2*, *ctr1-1* и *ein2-1*, популяции стабильно поддерживаются в условиях *in vitro*, что указывает на нормальное функционирование системы циклин-зависимых протеинкиназ, которые обеспечивают прохождение клеточного цикла. Мы сосредоточили внимание на поиске макромолекул, функционирование которых не дублирует элементы универсальной циклин-зависимой машины клеточного цикла. Такими макромолекулами могут быть протеинкиназы и/или протеинфосфатазы – ключевые компоненты пути передачи сигналов АБК и этилена (Schweighofer *et al.*, 2007, Yoo *et al.*, 2008, Fujita *et al.*, 2009).

Клетки всех генотипов в фазе экспоненциального роста в течение трех часов обрабатывали АБК (25 мкМ). Концентрация АБК и время экспонирования были выбраны на основании наших данных об отсутствии эффекта кратковременной обработки АБК на синтез этилена. Мы не выявили различий в спектрах фосфорилированных *in vitro* цитозольных белков, выделенных из обработанных АБК клеток Col-0, *etr1-1*, *ctr1-1* и *ein2-1*, однако имелись различия по степени фосфорилирования индивидуальных полипептидов. На рис. 3 приведен радиоавтограф 2-DE геля, где номерами 1, 10, 11, 12, 14, 17, 21, 22, 23, 30, 33 и 34 отмечены полипептиды, уровень фосфорилирования кото-

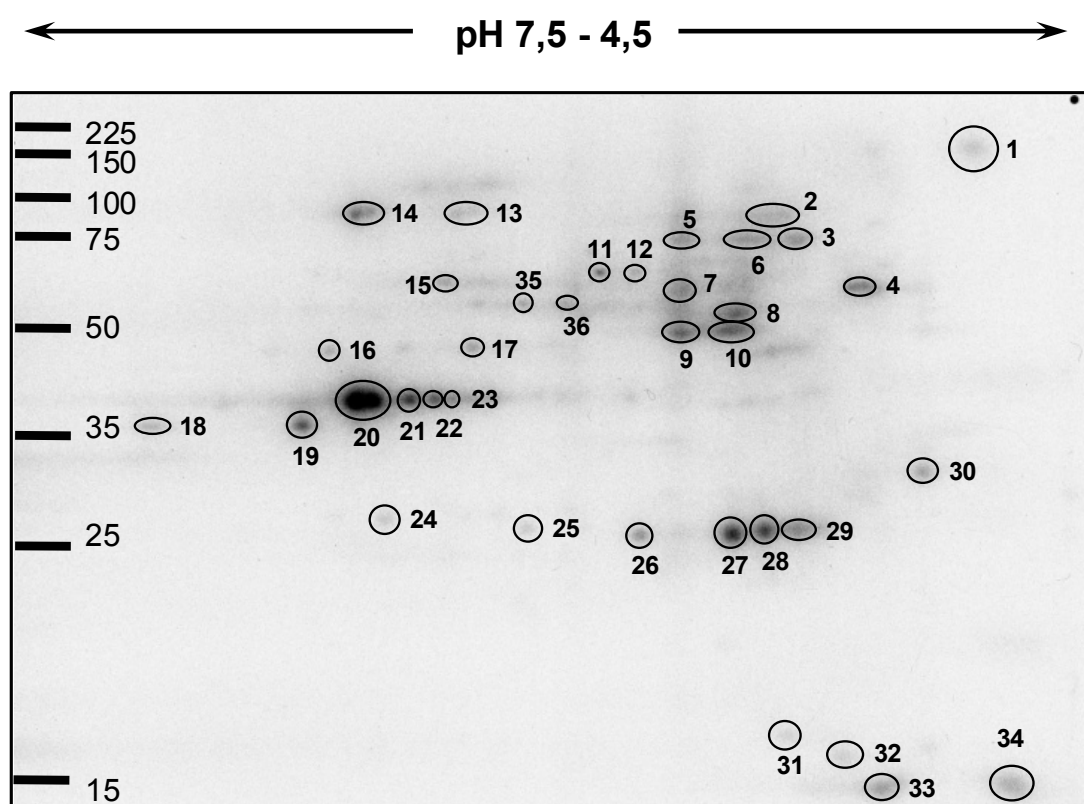


Рис. 3. Авторадиограмма фосфорилированных *in vitro* белков клеток Col-0. Отмечены все проанализированные фосфопротеины.

рых дифференциально регулировался экзогенной АБК как у *Col-0*, так и у всех мутантов. Эти данные указывают на присутствие в культивируемых клетках АБК-зависимых протеинкиназ, отличающихся от этилен-регулируемых.

Известно, что в клетках животных и дрожжей МАП-киназы важны как для клеточной пролиферации, так и для регуляции клеточного цикла (Pearce and Humphrey, 2001). Представлялось вполне логичным допустить, что эффект АБК мог быть связан с изменениями энзиматической активности этих протеинкиназ. МАП-киназы работают в каскадах, включающих три функционально связанных фермента: МАПККК–МАПКК–МАПК. Чтобы убедиться, что среди АБК-регулируемых фосфобелков могут иметься МАПКК, клетки сначала обработали специфическим ингибитором МАПКК U0126, а затем – АБК. В ответ на обработку клеток U0126 наблюдалось значительное снижение уровня фосфорилирования некоторых белков (Рис. 4), что указывало на вероятное присутствие МАПК, за активацию которых отвечают МАПКК.

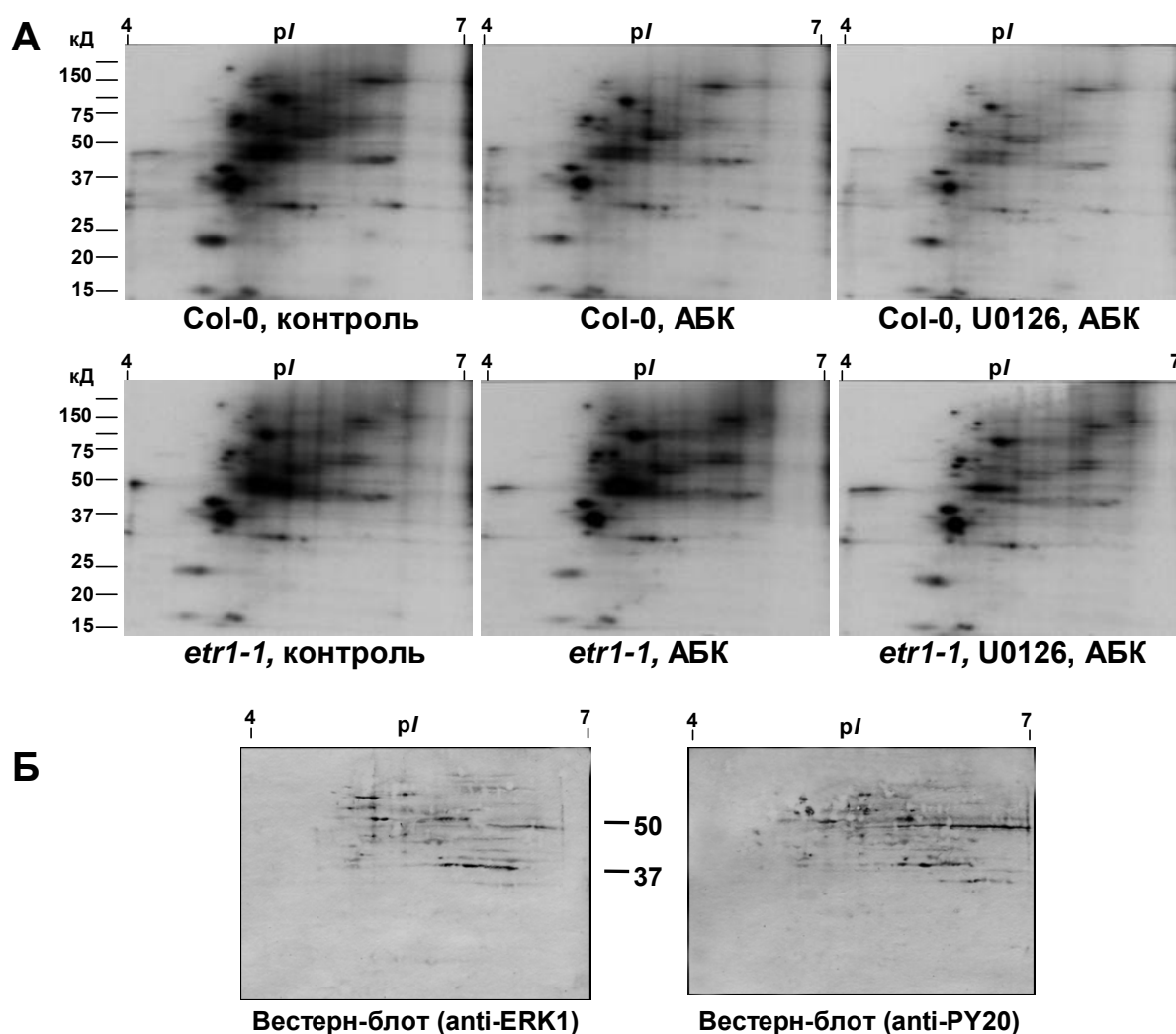


Рис. 4. А. Влияние ингибитора МАПКК (U0126) на АБК-зависимое фосфорилирование белков клеток *Col-0* и *etr1-1*.

Б. Вестерн-блот анализ белков, разделенных при помощи 2-DE, с антителами против МАПК ERK1 типа (anti-ERK1) и против фосфотирозина (anti-PY20).

У *Arabidopsis* 12 из 23 МАПК относятся к МАПК ERK1-типа (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). При помощи анти-ERK1 антител мы показали, что среди белков, степень фосфорилирования которых изменялась после обработки клеток АБК в присутствии U0126, имеются МАПК ERK1-типа (Рис. 4). При помощи антител против фосфоТир (анти-pY20) было подтверждено наличие терминальных МАПК, так как только терминальные МАПК фосфорилируются по аминокислотным остаткам Тре и Тир в мотиве фосфорилирования Тре-Глу-Тир. Фосфобелки с мол. массами от 37 до 55 кД и *pI* 5,5-7,0 реагировали не только с анти-ERK1, но и с анти-pY20 антителами (Рис. 4). Таким образом, в цитозоле культивируемых клеток *A. thaliana* присутствуют регулируемые АБК протеинкиназы, среди которых имеются МАПК иммунологически близкие МАПК ERK1-типа.

**Влияние АБК на МАП-киназную активность в клетках Col-0 и этилен-нечувствительных мутантов.** Для обогащения фракции цитозольных белков МАПК мы применили изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) в MicroRotofor Liquid-Phase IEF Cell. При этом способе ИЭФ белки разделяются по величинам *pI*, которые соответствуют *pI* нативных белков. В результате были получены 10 фракций (диапазон pH 3,0-10,0), ферментативную активность которых проверяли в реакции фосфорилирования *in vitro* с экзогенным субстратом МАПК МВР. Наибольший эффект АБК на МВР-киназную активность проявился во фракциях с pH от 5,1 до 6,8 (Рис. 5А). В этих фракциях содержались белки, которые наиболее активно и АБК-зависимо фосфорилировали МВР. Мол. массы этих белков были определены при помощи фосфорилирования МВР *in situ* (в геле) (Рис. 5Б). МВР-фосфорилирующая активность ассоциирована с полипептидами 41 и 45 кД (Рис. 5Б), что соответствует мол. массам терминальных МАПК. У Col-0 во фракции с pH 5,1-5,4 АБК активировала МАПК с мол. массой 41 кД, а у *ein2-1* – 45 кД. Это свидетельствует о том, что в зависимости от функциональной активности этиленового сигнального пути в ответ на АБК активируются разные

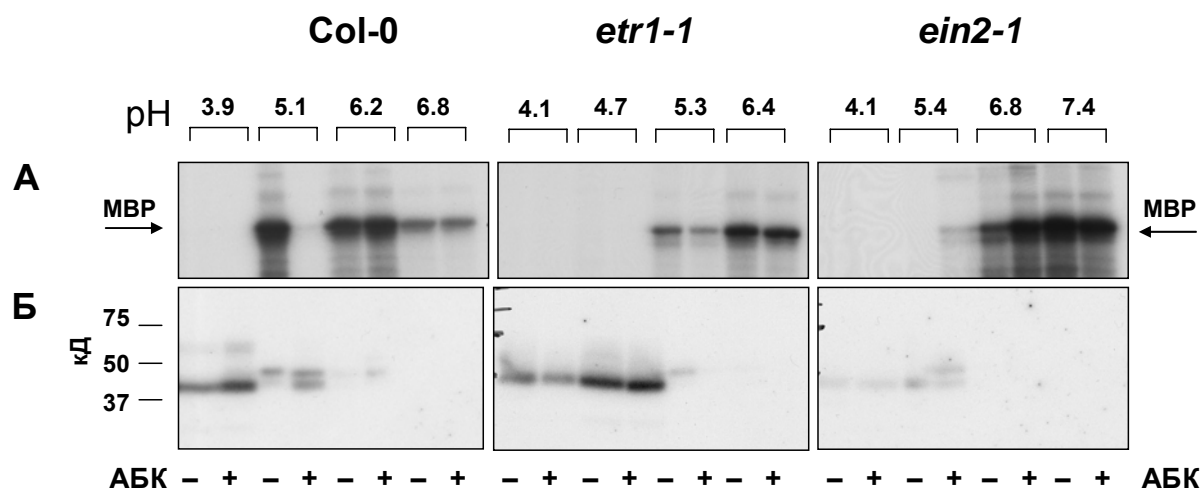


Рис. 5. Влияние АБК на фосфорилирование МВР *in vitro* (А) и *in situ* (Б) фракциями белков после ИЭФ в нативных условиях.

МВР-киназы. Далее мы проверили кросс-реактивность белков с анти-pY20, а также с антителами против фосфорилированной формы ERK1. Так как 41-кД и 45-кД полипептиды реагировали с обоими типами антител, то дифференциально регулируемые МВР-киназы можно отнести к МАПК ERK1-типа. Чтобы установить мол. массу и *pI* индивидуальных МАПК, с белками фракции с *pH* 5,1-5,4 провели фосфорилирование МВР *in situ* после 2-DE. Было обнаружено, что у Col-0 и *ein2-1* в ответ на АБК работали разные МАПК. У *ein2-1* конститутивная активность некоторых из них сравнима с АБК-индуцируемой у Col-0. То есть, в клетках, где этиленовый сигнал не проводится, могут работать МАПК, которые в норме обеспечивают проведение сигнала АБК. Несмотря на высокую разрешающую способность 2-DE, попытка идентифицировать АБК-регулируемые МАПК при помощи MALDI-TOF MS оказалась неудачной из-за высокого фона МВР, заполимеризованного в гелях второго направления, и мы были вынуждены искать способы предварительной подготовки белковых фракций для идентификации фосфорилированных белков.

**Идентификация предполагаемых субстратов МАПК при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии.** Для определения уникального профиля АБК-регулируемых фосфопротеинов для каждого генотипа было выбрано по 12 полипептидов, уровень фосфорилирования которых дифференциально менялся в ответ на АБК. Эти полипептиды вырезали из 2-DE гелей, и для их идентификации применяли MALDI-TOF MS и LC-ESI MS/MS. В результате были идентифицированы МАПК МРК11, две енолазы, белок KRP4 (Kip-related protein), бета-субъединица АТФ синтазы, фактор инициации трансляции 4A (eF4A), фактор транскрипции SCL9 (Scarecrow-like 9), НАДФ-зависимая оксидоредуктаза, аннексин 2 (ANNAT2), альдо/кето редуказа, PYL8, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (Рис. 6). Все перечисленные белки обнаружены во фракциях, обладавших МАП-киназной активностью. Проанализировав последовательности этих белков в базах данных NetPhos и NetPhosK, мы нашли, что в аминокислотных последовательностях нескольких белков имеются РХ(S/T)Р мотивы, которые фосфорилируют МАПК. То есть, эти белки могут быть потенциальными субстратами МАПК или других протеинкиназ, способных их фосфорилировать АБК-зависимо. Особого внимания заслуживает идентифицированная нами МАПК МРК11, являющаяся ближайшим гомологом МРК4, поскольку недавно показано, что у *Arabidopsis* обе МАПК участвуют в цитокинезе (Kosetsu *et al.*, 2010). Следует подчеркнуть, что идентификация МАПК МРК11 была подтверждена при помощи LC-ESI MS/MS.

Основываясь на имеющихся в литературе данных, в отношении некоторых из идентифицированных белков можно высказать соображения об их потенциальной роли в качестве субстратов МАПК.

Известно, что факторы транскрипции – наиболее “привычные” внутриклеточные субстраты МАПК. В этом смысле интересен белок SCL9. В покоящемся центре корня *Arabidopsis* дикого типа и *ctr1-1* обработка этиленом приводила к увеличению числа клеток (Ortega-Martinez *et al.*, 2007), что, по-видимому, связано с ростом экспрессии

*SCR* в ответ на этилен. Поскольку в нашей работе обработка АБК усиливала синтез ДНК в *etr1-1*, то можно думать, что АБК-регулируемое фосфорилирование SCL9 – результат функционирования как пути передачи сигнала этилена, так и АБК.

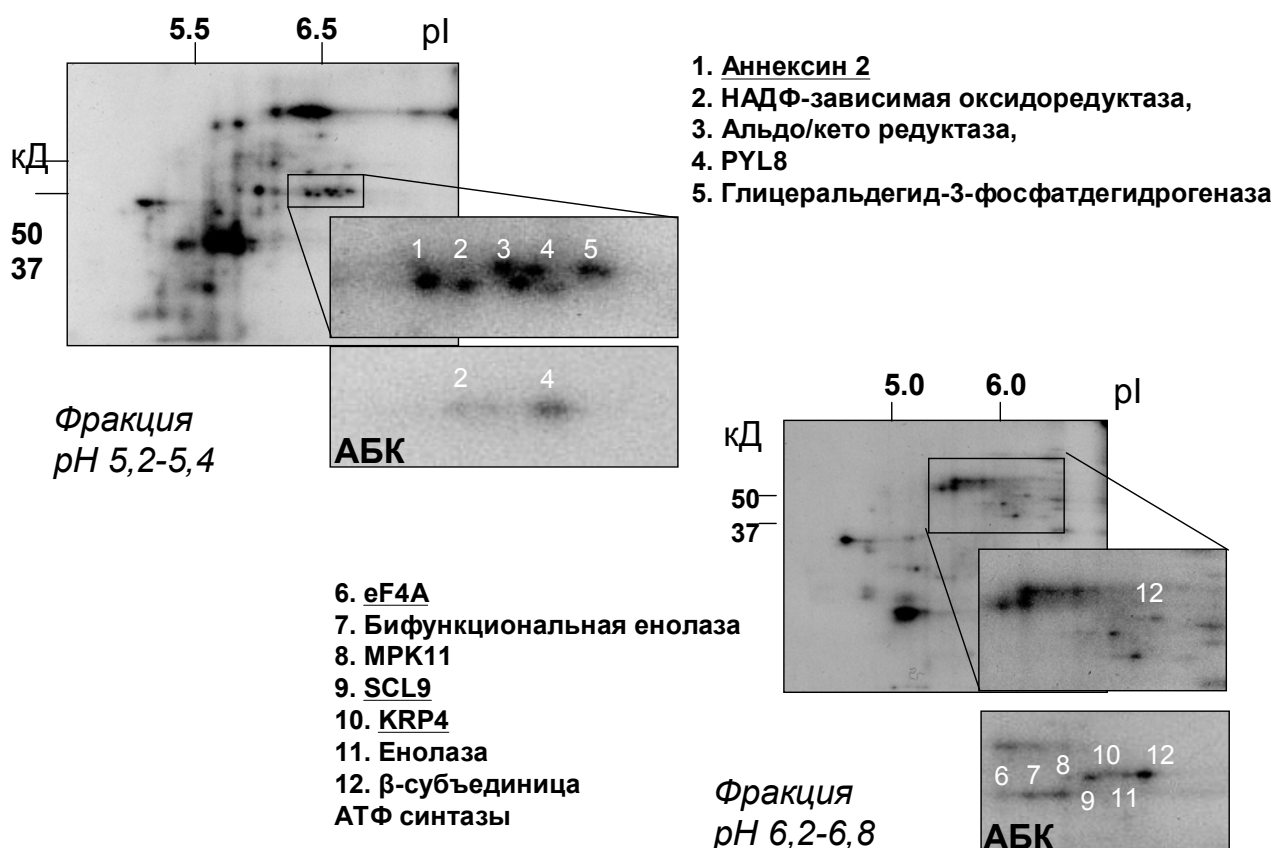


Рис. 6. АБК-регулируемое фосфорилирование белков фракций с pH 5,2-5,4 и 6,2-6,8, полученных после ИЭФ в нативных условиях.

Цифрами отмечены фосфобелки, идентифицированные при помощи MALDI-TOF MS. Представлены автордиограммы. Приведены списки идентифицированных белков. Подчеркнуты белки, у которых найдены потенциальные сайты фосфорилирования МАПК.

Белок KRP4 присутствует в клетках в нефосфорилированном состоянии, подтверждая, что использованные в наших экспериментах клетки митотически активны. Имеются данные, что пик экспрессии *KRP4* приходится на G2 (Menges *et al.*, 2005), а белок KRP4 необходим для прохождения S-фазы (Ormenese *et al.*, 2004). Обнаружено также, что у *Arabidopsis* при обработке АБК индуцировалась транскрипция *KRP1/2* (Wang *et al.*, 1998), что позволяет думать о KRP1 как о важном регуляторе АБК-зависимого ингибирования роста.

В клетках высших эукариот фактор инициации трансляции eIF4A является субстратом МАПКАРК (МАПК activated protein kinase), которую фосфорилируют МАПК. В клетках млекопитающих МАПКАРК2 регулирует прохождение S-фазы, а также G2/M переход в ответ на облучение УФ-С средней интенсивности (Manke *et al.*, 2005), причем МАПКАРК2 – внутриклеточный субстрат МАПК SAPK (Stress-activated protein



kinase). Следовательно, нельзя исключить, что eIF4A может быть потенциальным субстратом и для МАПК ERK1-типа.

Специального внимания заслуживает белок PYL8 (Pyrabactin resistance-like), принадлежащий семейству рецепторов АБК. Кроме PYL8 в состав этого семейства входят ещё 13 белков, причем все они способны специфически связывать физиологически активную АБК (Park *et al.*, 2009). Мы показали, что PYL8 присутствует в клетках *Arabidopsis* в фосфорилированном виде. Это согласуется с существующими представлениями о механизме функционирования рецепторов АБК (Miyazono *et al.*, 2009), а с другой стороны, указывает, что в исследуемой клетках путь передачи сигнала АБК функционально активен.

Суммируя данные масс-спектрометрии, подчеркнем, что обнаруженные нами белки ассоциированы с G1- и S-

фазами, что согласуется с результатами анализа транскриптома *Arabidopsis*, которые показали, что транскрипция генов, кодирующих идентифицированные белки, также связана с фазами G1 и S (Menges *et al.*, 2002).

**Влияние АБК на транскрипцию генов индивидуальных МАПК.** Для того чтобы все-таки подойти к анализу индивидуальных МАПК, мы изучили влияние АБК на транскрипцию генов индивидуальных МАПК. Для анализа были выбраны гены тех МАПК, о которых известно как об участниках путей передачи гормональных сигналов (MPK1/2/3/6), так и о регуляторах клеточного цикла (MPK4/5) (Menges *et al.*, 2008). При помощи ОТ-ПЦР мы выяснили (Рис. 7А), что в экспоненциальной фазе роста культивируемых клеток Col-0, *etr1-1* и *ein2-1* конститутивный уровень транскрипции *MPK4* по сравнению с генами других *MAPK* самый высокий и зависит от обработки АБК

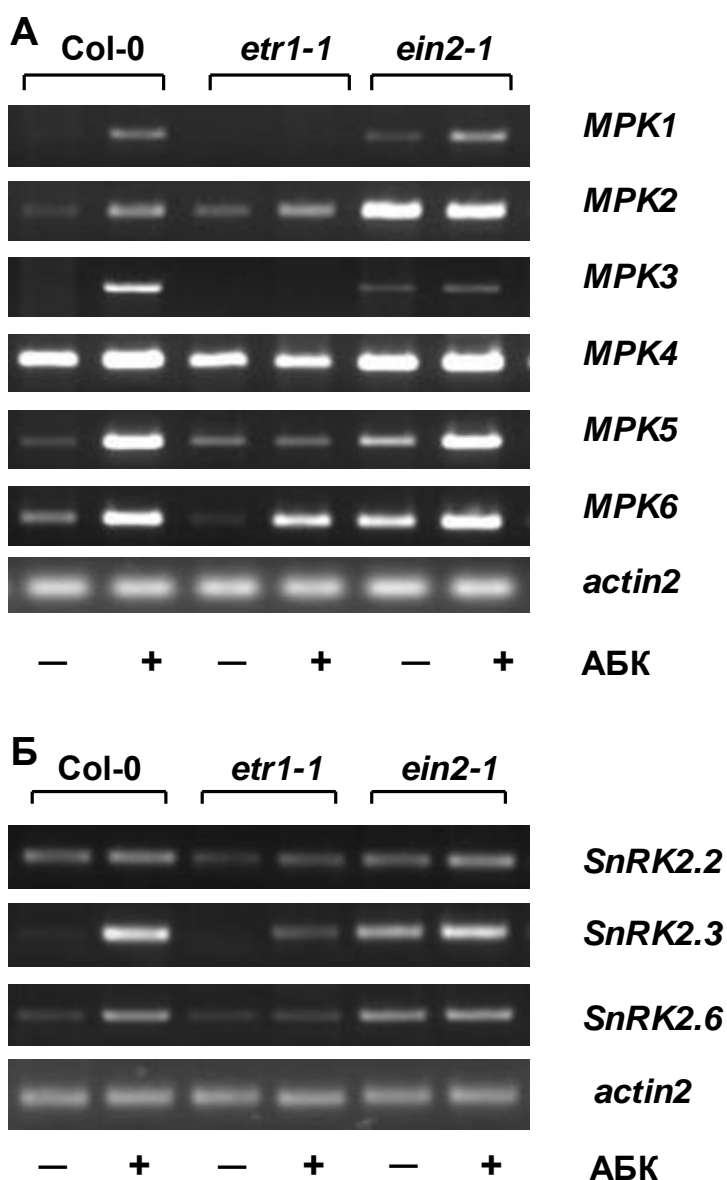


Рис. 7. Влияние АБК на транскрипцию генов индивидуальных МАПК (А) и *SnRK2* (Б) в культивируемых клетках Col-0, *etr1-1* и *ein2-1*.

только у Col-0. Напротив, гены *MPK1* и *MPK2* транскрибировались на крайне низком уровне, что совпадает с данными литературы (Ortiz-Masia *et al.*, 2007). После обработки АБК транскрипция *MPK1* увеличивалась в Col-0 и *ein2-1*, тогда как транскрипция *MPK2* существенно росла как у Col-0, так и у *etr1-1*. Можно предположить, что роль *MPK1/2* в пролиферирующих клетках связана с передачей сигнала АБК. В популяции клеток Col-0 и *ein2-1* транскрипция *MPK5* более чем в два раза повышалась в обработанных АБК клетках, а в клетках *etr1-1* мы не обнаружили влияния АБК на транскрипцию *MPK5*. Экспрессия *MPK3* индуцировалась в клетках Col-0 в ответ на обработку АБК, а у *etr1-1* и *ein2-1* была низкой и не зависела от АБК. Как в популяции Col-0, так и в клетках *etr1-1* *MPK6* транскрибировалась на достаточно высоком уровне и была АБК-зависимой. Поскольку *etr1-1* не воспринимает этилен вследствие мутации в рецепторе этилена ETR1, то ответственной за обнаруженное изменение уровня экспрессии *MPK6* следует считать АБК. Согласно существующим представлениям, МАП-киназный модуль с *MPK3/6* функционирует как при биосинтезе этилена, так и в пути передачи этиленового сигнала (Yoo *et al.*, 2008). Однако тот факт, что при обработке АБК транскрипция *MPK6* усиливается и в клетках Col-0, и в клетках обоих этилен-нечувствительных мутантов приводит нас к заключению, что в культивируемых клетках в путях передачи сигналов и АБК, и этилена может работать МАПК *MPK6*.

**Влияние АБК на транскрипцию генов протеинкиназ семейства SnRK2.** В настоящее время принимается, что протеинкиназы семейства SnRK2 – важные компоненты путей передачи таких стрессовых сигналов, при которых растет содержание эндогенной АБК (Ваена-Gonzalez *et al.*, 2007). Мы изучили влияние экзогенной АБК на транскрипцию генов протеинкиназ SnRK2.2/2.3/2.6, для которых показано участие в передаче сигнала АБК (Hrabak *et al.*, 2003; Boudsocq *et al.*, 2004, Yoshida *et al.*, 2006, Fujii and Zhu 2009). Уровень транскрипции *SnRK2.2* у всех генотипов был достаточно высоким в контроле и практически не менялся при обработке АБК (Рис. 7Б). По сравнению с мутантами в Col-0 экзогенная АБК вызывала усиление транскрипции *SnRK2.6*. Наиболее сильным оказался эффект АБК в отношении *SnRK2.3*, транскрипция которой у Col-0 увеличивалась в 16 раз, а у *etr1-1* АБК индуцировала экспрессию *SnRK2.3*. У *ein2-1* высокий уровень транскрипции всех *SnRK2* в контроле может свидетельствовать, что у этого мутанта путь передачи сигнала АБК работает конститутивно. Учитывая, что в середине экспоненциальной фазы роста содержание эндогенной АБК одинаково, обнаруженные изменения транскрипции *SnRK2.2/2.6* – результат обработки экзогенной АБК.

### Заключение

Внутриклеточными регуляторами пролиферации и дифференцировки у растений являются фитогормоны, ответы на которые в растительной клетке обеспечиваются взаимодействием путей передачи их сигналов. Хотя число сообщений о наличии взаимодействия путей передачи гормональных сигналов постоянно увеличивается, сведе-

ния о молекулярных механизмах взаимодействия крайне ограничены. Предполагается, что взаимодействие может выражаться, во-первых, во влиянии на синтез друг друга, во-вторых, в наличии общего сигнального компонента в путях передачи сигналов, в-третьих, в существовании общих генов-мишеней, что приводит к кооперативной регуляции определенного ответа. Так, показано взаимодействие путей передачи сигналов этилена и АБК в таких процессах как прорастание семян (Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000; Chiwocha *et al.*, 2005), движение замыкающих клеток устьиц (Tanaka *et al.*, 2005, 2006), изменение роста корней, включая формирование латеральных корней при тепловом стрессе (Sharp and LeNoble, 2002; Spollen *et al.*, 2000). Однако на основании этих данных трудно высказать предположения о возможном влиянии этилена и АБК на деление клеток. Вместе с тем, нельзя исключить, что в регуляции пролиферации этилен и АБК способны быть как позитивными, так и негативными регуляторами. Действительно, недавно показано, что этилен, а не ауксин – признанный позитивный регулятор клеточной пролиферации – способен усиливать клеточные деления в покоящемся центре корня (Ortega-Martinez *et al.*, 2007). Хотя АБК часто рассматривают в качестве гормона-ингибитора роста, имеются данные, указывающие, что АБК в низких концентрациях способна активировать рост (Sharp *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002).

Используя культивируемые *in vitro* клетки *A. thaliana* Col-0, а также этилен-нечувствительных мутантов *etr1-1*, *ctr1-1* и *ein2-1*, мы показали, что в этой биологической модели пути передачи сигналов этилена и АБК взаимодействуют, но взаимодействие путей передачи сигналов этилена и АБК не выражается только во взаимном влиянии на синтез друг друга. Мы не обнаружили существенного роста продукции этилена в ответ на кратковременную обработку клеток экзогенной АБК, хотя известно, что в ответ на абиотические стрессы происходит значительный рост продукции этилена и АБК. С другой стороны, измерение влияния АБК на биосинтез этилена в процессе культивирования клеток показало, что только в клетках Col-0 синтез этилена поддерживался на уровне, который позволял клеткам продолжать делиться.

Представляется весьма вероятным, что взаимодействие этилена и АБК связано с их регуляцией экспрессии генов-мишеней. Однако изучение этого вопроса не было задачей нашей работы. Более того, следует специально подчеркнуть, что гены-мишени являются эффекторами, а не компонентами сигнальных путей. Поэтому попытаемся суммировать полученные нами данные, касающиеся собственно компонентов сигнальных путей этилена и АБК.

Связывание добавленной в среду культивирования АБК с рецептором ведет к взаимодействию протеинфосфатазы PP2C с гормон-рецепторным комплексом и ее инактивации. В результате инициируется путь передачи сигнала АБК, в котором функционируют протеинкиназы семейства SnRK2, АБК-зависимо фосфорилирующие свои мишени. Среди них могут быть и МАПК, которые, по-видимому, участвуют в опосредованном АБК снижении уровня пролиферации посредством активации иден-

тифицированного в нашей работе белка KRP4, функции которого как ингибитора циклин-зависимых протеинкиназ показаны (Ormenese *et al.*, 2004).

Мы установили, что по мере культивирования клеток образуется этилен, что определяется активной работой АЦК-синтазы 6 – субстрата МАПК МРК6 (Feilner *et al.*, 2005). Сигнал о связывании этилена с его рецепторами (ETR1/2, ERS1/2, EIN4) проводится через МАП-киназный модуль, в котором функционируют МАПК МРК3/6 (Yoo *et al.*, 2008). В ответ на этилен усиливается транскрипция генов, кодирующих РР2С (Schweighofer *et al.*, 2007). Протеинфосфатазы РР2С подгруппы В и некоторые представители подгруппы А имеют домены, обеспечивающие их связывание с МАПК, в том числе с МРК6 (Schweighofer *et al.*, 2007). Связывание РР2С с МРК6 ведет к снижению активности МРК6, и, как следствие, может происходить авторегуляция биосинтеза этилена на уровне, который позволяет клеткам активно пролиферировать.

Теперь рассмотрим последствия описанных выше событий применительно к процессам, происходящим на клеточном уровне. Когда путь передачи сигнала этилена функционально активен, то клетки активно пролиферируют, а экзогенная АБК выполняет свою функцию ингибитора синтеза ДНК и деления. Если путь передачи этиленового сигнала конститутивно активен, то клетки начинают выходить из цикла и переходить к эндоредупликации. В этом случае экзогенная АБК способствует реактивации клеточных делений. При инактивации пути передачи этиленового сигнала идет активная дифференцировка на фоне незначительной пролиферации. Если этилен не воспринимается, то, вероятно, кроме дифференцировки может происходить и массовая гибель клеток, а экзогенная АБК “спасает” клетки, усиливая пролиферацию на фоне снижающейся дифференцировки. Если сигнал этилена воспринимается, но не проводится, то идет активная дифференцировка, которую усиливает экзогенная АБК, при этом пролиферация клеток снижается.

Таким образом, восприятие и передача этиленового сигнала определяет соотношение пролиферации и гибели клеток, которое может корректироваться АБК. Механизм гибели клеток в отсутствие восприятия этилена, по всей видимости, должен отличаться от запрограммированной клеточной смерти, например, сопровождающей старение. Проведение сигнала этилена определяет баланс между пролиферацией и цитодифференцировкой, которая также может быть настроена в ту или иную сторону при помощи АБК. Оба эти обстоятельства требуют дальнейшего изучения, которое проводится нами в настоящее время.

### Выводы:

1. Суспензионные культуры клеток *A. thaliana* экотипа Columbia и этилен-нечувствительных мутантов сохраняют исходные генотипы, что делает их адекватной моделью для изучения взаимодействия путей передачи сигнала этилена и других фитогормонов в контроле пролиферации клеток.
2. Снижение числа делящихся клеток у мутантов по негативным (ETR1 и CTR1) и позитивному (EIN2) регуляторам пути передачи этиленового сигнала указывает, что для пролиферации культивируемых клеток необходима сбалансированная работа этиленового сигнального пути.
3. В культивируемых клетках *A. thaliana* нечувствительность к этилену влияет на передачу сигнала АБК. В норме экзогенная АБК снижает синтез ДНК и последующую пролиферацию клеток, а у штаммов мутантов “спасает” от негативных последствий, связанных с отсутствием этиленового сигналинга.
4. Мутации, блокирующие работу этиленового сигнального пути (*etr1*, *ein2*), ведут к увеличению синтеза АБК в течение субкультивирования, а также к проявлению дифференциального эффекта экзогенно добавляемой АБК на синтез ДНК, пролиферацию и рост клеток, а также на образование трахеальных элементов.
5. Экзогенная АБК регулирует протеинкиназу, которая на основании биохимических и иммунологических характеристик отнесена к МАПК ERK1-типа и идентифицирована как МРК11.
6. В клетках Col-0, *etr1* и *ein2* экспрессия генов, кодирующих МАПК, дифференциально регулируется в ответ на обработку экзогенной АБК. Полученные данные указывают, что МАПК МРК1/2/4 могут функционировать в пути передачи сигнала АБК, МРК3/5 – в активированном этиленом МАП-киназном каскаде, тогда как МРК6 вовлечена в регуляцию синтеза этилена.
7. Взаимодействие сигнальных путей этилена и АБК происходит на уровне МАПК МРК6. Функционирование белков ETR1, EIN2 и ферментативная активность МРК6 определяют баланс между пролиферацией и дифференцировкой в культивируемых клетках *A. thaliana*.

### Список публикаций по теме диссертации:

1. Новикова Г.В., Никашин Б.А., **Степанченко Н.С.**, Мошков И.Е. (2007) Фосфопротеомика в исследованиях регуляторных систем растений: дивиденды секвенированных геномов. *Доклады VI съезда физиологов растений России*, **1**, с. 205-207.
2. **Stepanchenko N.S.**, Nikashin B.A., Nosov A.V., Novikova G.V., Moshkov I.E. (2008) Ethylene and ABA may share signaling component upon *A.thaliana* plants response to UV-B. *Physiol. Plant.*, **133**, P01-069.
3. **Степанченко Н.С.** (2009) Фосфорилирование белков в листьях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. при действии ультрафиолета В. *XVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2009”*, Москва, с. 240.
4. **Stepanchenko N.S.**, Novikova G.V., Nosov A.V., Moshkov I.E. (2009) Cross-talk between ethylene and abscisic acid signaling pathways mediates proliferation of *Arabidopsis thaliana* cultivated cells. *Abstr. Plant Abiotic Stress – from Signaling to Development*, Tartu, Estonia, p. 17.
5. Мошков И.Е., Новикова Г.В., **Степанченко Н.С.** (2009) Этилен: маленькая молекула – большие вопросы. *Годичное собрание Общества физиологов растений (тезисы докладов)*, Апатиты, Россия, с. 9.
6. **Степанченко Н.С.**, Новикова Г.В., Носов А.В., Мошков И.Е. (2009) Влияние этилена и абсцизовой кислоты на фосфорилирование белков культивируемых *in vitro* клеток *Arabidopsis thaliana*, находящихся в разных фазах клеточного цикла. *Годичное собрание Общества физиологов растений России (тезисы докладов)*, Апатиты, Россия, с. 319.
7. **Степанченко Н.С.**, Новикова Г.В., Носов А.В., Мошков И.Е. (2009) Культивируемые *in vitro* клетки *A. thaliana* – модель для изучения влияния этилена и АБК на пролиферацию клеток. *VI-я Международная научная конференция “Регуляция роста, развития и продуктивности растений”*, Минск, с. 144.
8. Новикова Г.В., **Степанченко Н.С.**, Носов А.В., Мошков И.Е. (2009) В начале пути: восприятие АБК и передача ее сигнала у растений. *Физиология растений*, **56**, с. 806-823.
9. **Stepanchenko N.S.**, Novikova G.V., Nosov A.V., Moshkov I.E. (2010) Ethylene and ABA affect the proliferation of *in vitro* cultivated *A. thaliana* cells. *Book of Abstr., XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB)*, Valencia, Spain, P11-003.
10. Мошков И.Е., **Степанченко Н.С.**, Новикова Г.В. (2010) Передача этиленового сигнала: CTR1 – вопросы и ответы. *Тезисы докладов Всероссийского симпозиума “Растение и стресс”*, Москва, с. 246-247.

11. **Степанченко Н.С.**, Новикова Г.В., Носов А.В., Мошков И.Е. (2011) Взаимодействие сигнальных путей этилена и абсцизовой кислоты в контроле пролиферации культивируемых клеток *A. thaliana*. VII съезд Общества физиологов растений России “Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий”, Нижний Новгород, с. 665.
12. Мошков И.Е., **Степанченко Н.С.**, Новикова Г.В. (2011) Передача этиленового сигнала: CTR1 – вопросы и ответы. VII съезд Общества физиологов растений России “Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий”, Нижний Новгород, с. 487.
13. **Степанченко Н.С.**, Новикова Г.В. Мошков И.Е. (2011) Количественное определение содержания белка. *Физиология растений*, **58**, 737-742.
14. Зорина А.А., Миронов К.С., **Степанченко Н.С.**, Синетова М.А., Коробан Н.В., Зинченко В.В., Куприянова Е.В., Аллахвердиев С.И., Лось Д.А. (2011) Системы регуляции стрессовых ответов у цианобактерий. *Физиология растений*, **58**, 643-663.
15. Zorina A., **Stepanchenko N.**, Sinetova M., Panichkin V.B., Novikova G.V., Moshkov I.E., Zinchenko V.V., Shestakov S.V., Suzuki I., Murata N., Los D.A. (2011) Eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases SpkC/F/K are involved in phosphorylation of GroES in the cyanobacterium *Synechocystis*. *DNA Research*, **18**, 137-151.
16. **Степанченко Н.С.**, Фоменков А.А., Мошков И.Е., Ракитин В.Ю., Новикова Г.В., Носов А.В. (2011) Культивируемые *in vitro* клетки этиленнечувствительных мутантов *Arabidopsis thaliana* – модель для изучения взаимодействия путей передачи сигналов фитогормонов в контроле пролиферации клеток. Представлена в Доклады РАН.