

## ЦИКЛИЧЕСКИЙ ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТ – МЕДИАТОР ПРОЦЕССОВ ТРАНСДУКЦИИ СТРЕССОВЫХ СИГНАЛОВ В ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ

© 2015 г. Л.В. Дубовская, Ю.С. Бакакина, И.Д. Волотовский

*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, Беларусь*

*E-mail: dubovsk@mail.ru*

Поступила в редакцию 18.05.15 г.

В настоящее время очевидно, что биофизические механизмы трансдукции стрессовых сигналов являются объектом пристального внимания исследователей в связи с острой необходимостью разработки новых методов повышения устойчивости и продуктивности сельскохозяйственных растений. Разработка высокочувствительных методов определения содержания циклического гуанозинмонофосфата и сравнительный анализ зависимых от него событий в биологических системах способствовали прогрессу в понимании функционирования циклического гуанозинмонофосфата в растительных клетках. В настоящее время показано, что циклический гуанозинмонофосфат как вторичный медиатор участвует в таких жизненно важных процессах роста и развития растений, как прорастание семян, клеточное деление, развитие хлоропластов, цветение и регуляция устьичных движений. В обзоре обобщены имеющиеся в литературе данные о роли циклического гуанозинмонофосфата в ответах растительных организмов на действие стресс-факторов абиотической и биотической природы и его взаимодействии с другими внутриклеточными медиаторами. С привлечением существующих представлений о биофизических механизмах стресса в растениях рассмотрены основные элементы цГМФ-зависимой системы трансдукции сигналов в растительной клетке.

*Ключевые слова: циклический гуанозинмонофосфат, внутриклеточная сигнализация, вторичные медиаторы, трансдукция сигнала, абиотический и биотический стресс, устойчивость.*

Трансмембранная передача сигнальной информации внутрь клетки является важным биофизическим процессом в клетке, обеспечивающим стабильность системы жизнеобеспечения организма. Роль циклических мононуклеотидов в качестве вторичных сигнальных медиаторов была установлена в середине XX века, и это касалось в первую очередь циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) как медиатора действия гормонов в животных клетках. Известно, что циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) играет не менее важную роль в клетках животных и человека, например, в таких физиологических процессах, как зрительная рецепция и регуляция сокращения гладкой мускулатуры.

Несмотря на то, что вопрос о содержании и функционировании цГМФ в клетках высших растений долгое время оставался дискуссионным, в настоящее время имеются неопровержимые доказательства участия цГМФ в сигнальной трансдукции растений.

Впервые в тканях млекопитающих цГМФ был детектирован в 1969 г. [1]. В настоящее время показано, что в тканях животных концентрация нуклеотида составляет 4–237 пмоль цГМФ/г ткани [2,3]. Тканям растений свойственны сопоставимые значения содержания цГМФ. Так, концентрация цикломононуклеотида в тканях растений варьирует от 0,065–0,08 пмоль цГМФ/г ткани в алейроновом слое ячменя [4] до 35–72 пмоль цГМФ/г ткани в проростках кукурузы [5]. Следовательно, количество цГМФ, которое присутствует в клетках высших растений, достаточно для его участия в процессах сигнальной трансдукции.

В поддержании уровня содержания цГМФ в животной клетке принимают участие ферменты синтеза и гидролиза цГМФ – гуанилатциклаза (ГЦ) и цГМФ-гидролизующая фосфодиэ-

Сокращения: цАМФ – циклический аденозинмонофосфат, цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат, ГЦ – гуанилатциклаза, ФДЭ – фосфодиэстераза, NO – монооксид азота, цАДФР – циклическая аденозиндифосфатрибоза,  $[Ca^{2+}]_{цит}$  – концентрация свободных ионов кальция в цитозоле клеток, АФК – активные формы кислорода, НДФК – нуклеозиддифосфаткиназа, LY83583 – 6-анилинохинолин-5,8-хинон, ODQ – [1,2,4]оксадиазол[4,3-а]хиноксалин-1, NOS – NO-синтаза, L-NAME – метиловый эфир L-аргинина.

стераза (ФДЭ). В настоящее время получены однозначные свидетельства присутствия функционально активной системы метаболизма цГМФ и в клетках высших растений. В дополнение к имеющимся данным об активности ГЦ и ФДЭ у различных видов растений, были обнаружены и клонированы белки, обладающие ГЦ-активностью, выделены и очищены ФДЭ.

В последние годы появились убедительные доказательства выполнения цГМФ в клетках растений роли биофизической сигнальной молекулы [6–10], а именно участия цГМФ в процессах роста и развития растений, газообмене, старении и созревании, в ответах растений на действие абиотических и биотических факторов окружающей среды. Также в клетках растений обнаружена цГМФ-связывающая активность, идентифицированы некоторые белковые мишени действия цикломононуклеотида [10,11]. Таким образом, в понимании роли цГМФ в растениях за последнее десятилетие достигнут большой прогресс.

Известно, что в организме человека ферменты метаболизма цГМФ выступают в качестве мишеней, на которые направлено действие ряда фармакологических препаратов (вазодилататоры, бронходилататоры и диуретики). Логично предположить, что направленная регуляция активности компонентов гуанилатциклазной системы может привести к повышению устойчивости растений к стрессовым факторам и увеличению их продуктивности. В связи с вышесказанным, представляется актуальным анализ имеющейся информации об участии цГМФ в стрессовых ответах растений и его взаимодействии с другими сигнальными системами. Можно полагать, что выяснение биофизических механизмов, с помощью которых сигналы об изменении условий окружающей среды воспринимаются организмом и трансформируются в его биологический ответ, будет способствовать разработке биотехнологических стратегий повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды.

### СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПРОЦЕССЫ В РАСТЕНИЯХ

На протяжении всего онтогенеза растения подвергаются постоянному воздействию неблагоприятных факторов внешней среды. Для поддержания функциональной и структурной целостности растительный организм вынужден постоянно подстраиваться к изменяющимся условиям обитания. Разнообразные факторы окружающей среды, интенсивность и/или количество которых отличается от оптимальных для

данного вида растений, называются стрессорами или стрессовыми факторами. В случае когда стрессовый фактор вызывает повреждающее действие и глубина его действия превышает защитные возможности организма, можно говорить о стрессоре как экстремальном факторе.

Изначально теория стресса была сформулирована канадским ученым-эндокринологом Г. Селье в 1936 г. для животных систем. Несмотря на то, что у растений отсутствуют как нервная система, так и гормоны, участвующие в стрессовых реакциях животных, общепринято, что при действии стрессоров растения также способны корректировать свой обмен веществ для поддержания гомеостаза. Поэтому в середине XX века концепция стресса с некоторыми модификациями была перенесена и на растительные организмы.

В настоящее время физиологи растений под стрессом понимают реакцию биологической системы на действие абиотических и биотических факторов окружающей среды, которое, в зависимости от интенсивности и продолжительности, может вызывать в системе значительные структурно-функциональные изменения [12–14]. При этом под реакцией подразумевают как сам процесс, так и биологический ответ организма на действие стрессового фактора. Однако очевидно, что растения обладают устойчивостью, т.е. способностью противостоять обратимым (эластичная устойчивость) и необратимым (пластичная устойчивость) физико-химическим изменениям при воздействии стрессоров.

Таким образом, вследствие повышения устойчивости происходит адаптация организма к действию неблагоприятных внешних факторов. Следует отметить, что адаптация к одному из факторов может приводить к повышению устойчивости не только к данному фактору, но и к другим факторам среды. Существование такой перекрестной устойчивости служит важным аргументом в пользу универсального характера защитных реакций. В настоящее время для обозначения этого явления используют термин кроссадаптация. Кроссадаптация – это процесс повышения устойчивости организма к какому-либо стрессорному фактору в результате адаптации к фактору иной природы [15].

Кроме того, различные виды растений могут по-разному реагировать на одинаковые экстремальные условия. Устойчивость растений к стрессовым факторам также зависит от фазы онтогенеза, интенсивности и продолжительности действия стрессора.

Процесс адаптации растений к действию неблагоприятных факторов включает в себя рецепцию биотического и абиотического сигнала

клеткой и его преобразование. В настоящее время еще полностью не установлены биофизические механизмы, с помощью которых сигналы об изменении условий окружающей среды, воспринимаемые клеткой, трансформируются в биологический ответ организма. Однако для выработки стратегии по регулированию устойчивости растений к разнообразным неблагоприятным воздействиям и использованию этой стратегии в практике сельского хозяйства необходимо понимание биофизических механизмов, лежащих в основе трансдукции сигнала, на что и направлен сейчас интерес исследователей.

### РЕЦЕПЦИЯ СТРЕССОВЫХ СИГНАЛОВ В РАСТЕНИЯХ

Индукционное повышение устойчивости растений к действию факторов внешней среды различной природы реализуется в клетках при участии сигнальных систем, которые воспринимают, усиливают и преобразуют поступающие извне стрессовые сигналы в биологические ответы.

В большинстве случаев поступающий стимул (первичный медиатор, агонист, лиганд) улавливается клеткой с помощью специальных рецепторных белковых молекул. Агонист при взаимодействии с рецептором изменяет его состояние, что и приводит к биологическому отклику. Так, например, в рецепции и трансдукции биотических сигналов при заражении растения патогенами участвуют рецептор-подобные киназы [16]. Работы по установлению природы рецепторов абиотических стрессовых сигналов в растениях находятся на начальной стадии. Например, только в 2008 г. было обнаружено, что гистидиновая киназа АТНК1 плазматической мембраны арабидопсиса является осмосенсором [17]. Авторы работ [18,19] предполагают, что в клетках высших растений в качестве температурных сенсоров и сенсоров дефицита влаги могут выступать  $\text{Ca}^{2+}$ -ионные каналы, реагирующие на изменения структурно-функционального состояния цитоплазматической мембраны, включая изменение ее микровязкости.

### ТРАНСДУКЦИЯ СТРЕССОВЫХ СИГНАЛОВ В РАСТЕНИЯХ. ВТОРИЧНЫЕ МЕДИАТОРЫ

В большинстве случаев после рецепции сигнал передается G-белкам, которые связывают рецепторы с внутренними эффекторами – ионными каналами, ферментами и др. В результате

происходит быстрое увеличение концентрации вторичных медиаторов (монооксида азота (NO), цГМФ, цАМФ, циклической аденозиндифосфатрибозы (цАДФР), ионизированных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и др.). Биофизические медиаторы выступают в роли усилителя первичного сигнала, передавая его на внутриклеточные мишени для формирования ответной реакции. Под мишенью понимается центр (site) – молекула, способная взаимодействовать с медиатором и изменять свою функциональную активность, что в конечном счете приводит к формированию ответной реакции системы. Таким образом, первичный медиатор инициирует в клетке сигнальный каскад – последовательность событий, обеспечивающих передачу стимула внутри клетки. G-белки обнаружены в ряде высших растений и морских водорослей [20]. Продемонстрировано, что G-белки участвуют в регуляции метаболизма цГМФ [21], причем обработка растений арабидопсиса мембрано-проникающим аналогом цГМФ приводит к увеличению уровня экспрессии генов, кодирующих G-белки [6].

Элементы сигнальных систем клеток различных организмов в основном унифицированы. Такая консервативность позволяет проводить поиск аналогий между строением сигнальных систем в животных и растительных клетках, а также дает основание использовать при изучении процессов сигнализации растений методические подходы и ингибиторы, аналогичные применяемым при изучении животных.

Изменения концентрации свободных ионов кальция в цитозоле клеток ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ ) возникают в ходе трансдукции ряда абиотических и биотических сигналов [22]. Известно, что цГМФ может быть вовлечен в регуляцию сигнальных каскадов через генерацию так называемых  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнатур. Показано, например, что мембрано-проникающие аналоги цГМФ индуцируют увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  в протопластах табака [23]. цГМФ может регулировать  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз в клетке через модуляцию активности цикломононуклеотид-регулируемых каналов [24], а также опосредовано через рианодин-подобные  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы [25].

В 90-х годах прошлого столетия было обнаружено, что в животных клетках в роли традиционных на тот момент времени биофизических медиаторов выступает NO. NO может регулировать  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ , непосредственно взаимодействуя с  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами и вызывая их активацию или ингибирование путем S-нитрозилирования или нитрования тирозина. Помимо этого, NO может открывать потенциал-зависимые каналы, деполяризуя тем самым плазматическую мембрану [26]. В клетках млекопи-

тающих эффекты NO часто реализуются через цГМФ, хотя описаны и цГМФ-независимые биофизические механизмы [27,28].

В настоящее время показано, что NO может опосредовать ответы растений на многие стимулы, в том числе на стимулы стрессового характера. При этом в качестве медиатора при NO-сигнализации цГМФ может выступать и в клетках растений [10,25,29].

К важным посредникам во внутриклеточных процессах передачи стрессового сигнала относятся активные формы кислорода (АФК) и продукты перекисного окисления липидов. Причинами роста содержания АФК в растительных клетках и их органеллах, например в хлоропластах и митохондриях [30], при высоких температурах могут быть увеличение активности АФК-генерирующих ферментов (НАДФН-оксидазы, отдельных форм пероксидаз), а также снижение активности антиоксидантных ферментов. При этом оказалось, что обработка растений как  $H_2O_2$ , так и озоном приводила к увеличению содержания цГМФ [31].

Значительную роль в клеточной сигнализации играют протеинкиназы и протеинфосфатазы. Активация протеинкиназ, которая может осуществляться, например, с участием ионов  $Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ /кальмодулинового комплекса, на начальных стадиях сигнализации приводит к фосфорилированию белков – следующих компонентов сигнальной цепи, изменяя их конформацию и активность. Оказалось, что экспрессия генов многих ферментов, участвующих в процессах фосфорилирования/дефосфорилирования белков ( $Ca^{2+}$ -зависимых протеинкиназ, фосфатаз типа PP2C и др.), является цГМФ-опосредованной [6].

В животных клетках классической мишенью цГМФ-сигнала являются цГМФ-зависимые протеинкиназы, активация которых приводит к фосфорилированию многочисленных белков. До настоящего времени цГМФ-зависимые протеинкиназы в растениях не идентифицированы, однако в геноме арабидопсиса содержатся мотивы, обладающие высокой степенью гомологии с нуклеотидными последовательностями, кодирующими цГМФ-связывающие и каталитические домены известных протеинкиназ человека и быка [6].

Одним из субстратов протеинкиназ являются транскрипционные факторы, представляющие собой небольшие белковые молекулы, способные активировать или ингибировать экспрессию определенных генов через взаимодействие с их промоторами, определяя, таким образом, функциональный ответ клетки на стрессовое воздействие [32]. С использованием мик-

роэрей-технологии было продемонстрировано, что цГМФ стимулирует экспрессию более 120 транскрипционных факторов [6].

Таким образом, трансдукция сигнала протекает в режиме кросстока (взаимодействия) между многими биофизическими сигнальными системами (путями). Поэтому можно сделать вывод о функционировании в растительной клетке сложной сигнальной сети, которое обеспечивается не только тем обстоятельством, что ключевые биофизические медиаторы являются общими компонентами нескольких сигнальных путей, но и возможным регулированием активности сигнальных систем этими же медиаторами. В качестве одного из кандидатов на роль участника молекулярного кросстока между сигнальными системами выступает цГМФ.

### ЦИКЛОГУАНОЗИНМОНОФOSФATНАЯ СИГНАЛЬНАЯ СИСТЕМА В РАСТЕНИЯХ

К настоящему времени накоплено много данных о том, что в регуляции процессов роста и развития растительных организмов важную роль в качестве внутриклеточного медиатора выполняет цГМФ (рис. 1).

Биофизический вторичный медиатор (посредник, мессенджер) – это физиологически активная внутриклеточная регуляторная молекула, которая образуется или высвобождается в результате ферментативной активности одного из компонентов цепи передачи сигнала и участвует в его дальнейшей передаче и амплификации. Вторичный медиатор должен удовлетворять ряду важных критериев. Во-первых, агонист (или стресс-фактор) должен стимулировать или ингибировать образование или транспорт данного вторичного медиатора. Клетки, которые не реагируют на действие агониста, не должны усиливать производство вторичного посредника. Изменение концентрации вторичного медиатора должно предшествовать или возникать в то же время, что и клеточный ответ на действие агониста. Увеличение концентрации агониста должно приводить к увеличению/уменьшению концентрации вторичного медиатора. Этот процесс обычно характеризуется переходным характером кривой доза-ответ вследствие значительного усиления сигнала. Во-вторых, ингибиторы катаболизма вторичного посредника или его аналоги должны имитировать или усиливать ответ. В-третьих, ингибирование синтеза вторичного медиатора должно снижать или предотвращать действие агониста. Соответствие цГМФ данным критериям в растительной клетке было детально изучено в последнем десятилетии.



Рис. 1. Участие цГМФ в реализации физиологических процессов в растениях.

Медиаторная роль цГМФ в физиологических процессах подтверждается в первую очередь функционированием в растительной клетке ферментов, осуществляющих метаболизм циклического мононуклеотида: его синтез – ГЦ и распад – ФДЭ.

Присутствие ГЦ в растительных тканях было подтверждено с использованием ингибиторов гуанилатциклаз животных. Кроме того, в настоящее время в литературе имеются работы, в которых измерена активность ГЦ в растениях. Одними из первых удельную активность ГЦ измерили R. Newton с соавт. (1984) в интактных хлоропластах фасоли [44]. Детально активность ГЦ была изучена в субклеточных фракциях, полученных из проростков овса [45]. Было показано, что активность ГЦ в проростках овса контролируется G-белками, ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим белком кальмодулином. Также было установлено, что активность данного фермента контролируется световыми условиями выращивания растений.

При исследовании генома арабидопсиса на наличие полной нуклеотидной последовательности, свойственной генам ГЦ цианобактерий и животных, соответствующие последовательности обнаружены не были. Однако изучение генома арабидопсиса на присутствие мотивов, соответствующих консервативным функциональным аминокислотным последовательностям в каталитическом центре известных ГЦ, выявило семь кандидатов на роль ГЦ [46].

Впервые белок с ГЦ-активностью в клетках высших растений был обнаружен только в 2003 г. [46]. В экстрактах клеток *Escherichia (E.) coli*, в которых экспрессировали AtGC1 (*Arabidopsis thaliana* Guanylyl Cyclase 1), концентрация цГМФ была в 2,5 раза выше, чем в контрольных

экстрактах. Кроме того, очищенный белок AtGC1 обладал  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимой ГЦ-активностью *in vitro* и в три раза более низкой аденилатциклазной активностью при использовании АТФ в качестве субстрата вместо ГТФ [46]. В силу необычной структуры его гена, AtGC1 нельзя отнести к представителям традиционных ГЦ.

В настоящее время показано, что PnGC-1 (*Pharbitis nil* Guanylyl Cyclase 1) (гомолог белка AtGC1) [47], рецептор brassinостероида AtBR1 (*Arabidopsis thaliana* Brassinosteroid Receptor 1) [48], ассоциированный с клеточной стенкой киназо-подобный рецептор AtWAKL10 (*Arabidopsis thaliana* Wall Associated Kinase-Like 10) [49], рецептор сигнального пептида Pep1 AtPepR1 (*Arabidopsis thaliana* Peptide signaling molecule Receptor) [24], флавиномонооксигеназа At1g62580 (*Arabidopsis thaliana* flavin-containing monooxygenase) и рецептор фитосульфокина PSKR1 (Phytosulfokine receptor) [50] также содержат в своем составе функциональные ГЦ-домены. Данные белки, экспрессированные в клетках *E. coli*, обладали как киназной, так и ГЦ-активностью. Необходимо отметить, что сверхэкспрессия рецептора AtPSKR1 в протопластах листьев арабидопсиса приводила к 20-кратному увеличению содержания цГМФ, свидетельствуя о ГЦ-активности рецептора *in vivo* [50].

В поддержании уровня содержания цГМФ в клетке принимает участие ФДЭ. Активация этого фермента вызывает быстрое падение концентрации цГМФ в клетках до базовых значений, что позволяет цГМФ выполнять роль вторичного медиатора в процессах внутриклеточной сигнализации. В литературе имеются данные о ФДЭ-активности, измеренной в проростках гороха, семенах ячменя, листьях моркови

и картофеле; показано присутствие ФДЭ в клетках растений в виде множественных изоформ, различающихся между собой внутриклеточной локализацией, сродством к субстрату и чувствительностью к ионному составу среды [51]. Биохимические параметры активности цГМФ-гидролизующей ФДЭ были детально охарактеризованы в различных субклеточных фракциях, полученных из проростков овса [52]. Предполагается, что в геноме арабидопсиса имеются возможные гены ФДЭ, однако нуклеотидные последовательности генов пока еще не расшифрованы, а сами гены не клонированы [53].

Разнообразные стимулы, модулирующие активность ферментов метаболизма цикломононуклеотида, вызывают увеличение в цитоплазме содержания цГМФ, который, в свою очередь, взаимодействует с белками-мишенями. В клетках животных цГМФ опосредует множество внутриклеточных эффектов через взаимодействие с тремя типами внутриклеточных белков-мишеней: цГМФ-зависимой протеинкиназой, цГМФ-регулируемыми ФДЭ циклических нуклеотидов и рецепторными белками цГМФ-регулируемых ионных каналов. Следовательно, цГМФ выступает в роли вторичного медиатора, участвуя как в фосфорилировании белков, так и в процессах, независимых от фосфорилирования [54].

Идентификация мишеней действия цГМФ в растительной клетке в настоящее время продолжается. Так, в нашей лаборатории с использованием аффинной хроматографии и методов протеомики в качестве белковых мишеней цГМФ были идентифицированы изоформы нуклеозиддифосфаткиназы (НДФК) [10,55]. Известно, что в клетках растений изоформы НДФК являются компонентами сигнальной трансдукции и принимают участие в таких важных регуляторных процессах, как деление и рост клеток [56], фоторецепторная фитохромная сигнализация [57] и формирование УФ-ответа [58], а также в стрессовой сигнализации при тепловом [59], окислительном воздействии [60,61] и механическом повреждении [62]. При этом множественные функции фермента обусловлены скорее способностью НДФК фосфорилировать белки, чем ее ролью в переносе фосфорной группы на нуклеозиддифосфаты.

Между тем в геноме арабидопсиса выявлены 32 кодирующие последовательности, которые соответствуют циклонуклеотидмонофосфатсвязывающим доменам в белках, из них 20 являются компонентами цикломононуклеотид-регулируемых каналов [6]. Кроме того, цГМФ контролирует экспрессию генов и тем самым опосредованно участвует в реализации биологиче-

ских процессов в клетках [6]. F. Maathuis (2006) исследовал цГМФ-регулируемый транскриптом корней арабидопсиса для выявления компонентов цГМФ-зависимой сигнализации [6]. Функциональная характеристика цГМФ-регулируемых транскриптов показала, что порядка 150 из них участвуют в процессах клеточного метаболизма (углеводный, азотный обмен, синтез белков, метаболизм липидов). Также среди них присутствовало большое число факторов транскрипции (123), сигнальных компонентов (26), транспортеров (71), а также транскриптов, связанных с различными патологиями растений (33). Интересно, что 78 транскриптов, как было показано, участвуют в фосфорилировании белков, 19 – в реализации действия гормонов, 15 – в стрессовых ответах.

Таким образом, имеющиеся к настоящему времени данные о содержании цГМФ в растительной клетке, быстрой регуляции его концентрации под влиянием внешних стимулов, присутствии в растениях белков, обладающих ГЦ- и ФДЭ-активностями, наличии белков-мишеней цГМФ и цГМФ-регулируемой экспрессии жизненно важных генов свидетельствует о том, что в клетках растений присутствует цГМФ-зависимая сигнальная система, основными структурно-функциональными компонентами которой являются цГМФ и ферменты его метаболизма – ГЦ и ФДЭ.

#### УЧАСТИЕ цГМФ В ТРАНСДУКЦИИ СТРЕССОВЫХ СИГНАЛОВ

Воздействие экстремальных абиотических и биотических факторов среды на сельскохозяйственные растения может приводить к значительным (до 80%) потерям урожая. В связи с этим, изучение биофизических механизмов формирования клеточного ответа на действие неблагоприятных факторов окружающей среды является чрезвычайно важной и актуальной задачей современной биологии, решение которой позволит целенаправленно управлять устойчивостью растений, обеспечивая их продуктивность и урожайность.

При изучении транскриптома тканей корней арабидопсиса было показано, что цГМФ контролирует экспрессию ряда генов, участвующих в реакции растений на действие абиотических и биотических стрессоров [6]. В таблице приведены литературные данные об участии цГМФ в реализации стрессовых ответов в растениях, описание которых будет представлено ниже.

**Осмотический и солевой стресс.** Почвы с избыточным содержанием солей (0,15–0,25% и более) называются засоленными. К ним относят

Участие цГМФ в реализации действия стрессовых факторов на растения

Воздействие	Растение	Ссылка
Солевой и осмотический стресс	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Maathuis, et al., 2001 [6] Donaldson, et al., 2004 [66]
Окислительный стресс	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	Колеснева и др., 2006 [82] Дубовская и др., 2008 [69] Pasqualini, et al., 2009 [31] Dubovskaya, et al., 2011 [10]
Низкотемпературный стресс	<i>Arabidopsis thaliana</i> (проростки) <i>Camellia sinensis</i> (пыльца)	Бакакина и др., 2009 [71] Bakakina, et al., 2014 [72] Wang, et al., 2012 [29]
Высокотемпературный стресс	<i>Arabidopsis thaliana</i> (проростки) <i>Arabidopsis thaliana</i> (пыльца)	Бакакина и др., 2009 [73] Bakakina, et al., 2014 [72] Tunc-Ozdemir, et al., 2013 [74]
Патогены	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	Durner, et al., 1998 [25] Meier, et al., 2009 [7] Qi, et al., 2010 [24]

солончаки, солончаковые почвы и солонцы. Избыточное содержание солей характерно для 25% пахотных земель планеты, к 2050 г. засоленные почвы могут составить до 50% занятых в сельском хозяйстве площадей [63].

Интересно, что предварительная обработка растений арабидопсиса мембрано-проникающими аналогами цикломононуклеотидов повышает их устойчивость к засолению, регулируя поток ионов  $\text{Na}^+$  через плазматическую мембрану клетки [64,65]. В литературе имеются данные, свидетельствующие о регуляции циклическими нуклеотидами в клетках корней арабидопсиса транспорта ионов  $\text{Na}^+$  через потенциал-независимые каналы (Voltage-Independent ion Channels – VICs) [64]. Введение цГМФ или цАМФ в микромолярных концентрациях в цитоплазму клетки приводило к быстрому снижению проницаемости канала и подавлению процесса входа в нее ионов натрия [64].

Позднее, L. Donaldson с соавт. (2004) продемонстрировали [66], что в ответ на солевой или осмотический стресс в клетках растений арабидопсиса происходит быстрое увеличение содержания цГМФ, которое снижалось после предварительной инкубации растений с 6-анилинохинолин-5,8-хиноном (LY83583) – ингибитором растворимой изоформы ГЦ. При этом ответ регистрировался уже через 5 с, после чего содержание цГМФ оставалось повышенным по крайней мере в течение 15 мин. Интересные результаты были получены при изучении взаимодействия между цГМФ и  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ . Ингибитор растворимой формы ГЦ LY83583 уменьшал амплитуду  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа клеток растений при солевом стрессе, индуцированном 50 мМ NaCl, однако не оказывал эффекта на рост  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$

при осмотическом стрессе и обработке растений более высокими концентрациями NaCl.

В 2011 г. J. Li и соавт. показали, что мембранопроникающий аналог цикломононуклеотида 8-бромо-цГМФ способен ослаблять эффект солевого стресса – ингибирование роста корней и прорастания семян [67]. При этом цГМФ не только регулировал ионный баланс клетки в условиях солевого стресса, но также индуцировал при участии  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальной системы экспрессию гена  $\text{H}^+$ -АТФазы плазматической мембраны.

Таким образом, цГМФ является вторичным медиатором сигнальных процессов в клетках растений, индуцированных солевым и осмотическим стрессами. При этом трансдукция осмотического сигнала является  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой, тогда как в случае солевого стресса увеличение цГМФ сопряжено с ростом  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  [66].

Эти результаты согласуются с данными о том, что в геноме арабидопсиса представлены гены, имеющие в своем составе цикломононуклеотидсвязывающий мотив. К ним относятся гены селективных  $\text{K}^+$ - и циклонуклеотид-регулируемых каналов, а также  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -переносчика. Кроме того, недавно было обнаружено, что цГМФ регулирует экспрессию генов ряда мембранных переносчиков. Среди 71 цГМФ-зависимого транскрипта были обнаружены мРНК 20 транспортеров одновалентных катионов и 8 переносчиков ABC-типа [6]. Совокупность представленных данных доказывает важную роль цГМФ в поддержании ионного баланса клетки, что особенно важно в условиях осмотического и солевого стрессов.

**Окислительный стресс.** Общей чертой ответов растительных клеток на действие многочисленных стрессовых воздействий, которым подвергаются растения в течение всего своего роста и развития, является избыточное образование АФК и, как следствие, развитие окислительного стресса. Вследствие высокой реакционной способности АФК приводят к окислительным повреждениям практически всех компонентов клетки.  $H_2O_2$  является одной из форм АФК, генерируемой в клетке. При этом добавление экзогенного  $H_2O_2$  имитирует ответы, наблюдаемые при окислительном стрессе [67], что позволяет использовать его в качестве индуктора данного стресса.

$H_2O_2$ -индуцированный окислительный стресс вызывал увеличение содержания цГМФ в проростках арабидопсиса. Эффект наблюдался уже через 30 с после обработки листьев в растворе  $H_2O_2$ , достигая его трехкратного увеличения по сравнению с контролем через 1 мин инкубации [10,69]. Через 5 мин инкубации содержание цГМФ снижалось до уровня контроля и не изменялось по крайней мере в течение 10 мин. На основе результатов ингибиторного анализа с использованием LY83583 и прямого измерения активности ферментов метаболизма цГМФ было установлено, что  $H_2O_2$  активирует фермент анаболизма цГМФ – гуанилатциклазу, не оказывая влияния на активность фермента катаболизма – ФДЭ.

С помощью ингибиторного анализа было установлено, что  $H_2O_2$  индуцирует синтез цГМФ через активацию нитратредуктазы – фермента синтеза NO. Так, обработка растений донором NO – нитропруссидом натрия – приводит к такому же увеличению активности ГЦ, как и под влиянием  $H_2O_2$  [10]. Следовательно,  $H_2O_2$  стимулирует нитратредуктазу и синтез NO, который, в свою очередь, активирует ГЦ и образование цГМФ.

Было обнаружено, что LY83583 ингибирует  $H_2O_2$ -индуцированное увеличение  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в проростках арабидопсиса [10]. При этом увеличение цГМФ в ответ на  $H_2O_2$  детектировалось через 30 с инкубации, тогда как рост  $[Ca^{2+}]_{цит}$  следовал только после лаг-фазы продолжительностью 40 с. Этот факт позволяет полагать, что рост содержания цГМФ предшествует в данной сигнальной цепи  $Ca^{2+}$ -ответу. Таким образом, в сигнальных реакциях растений на окислительный стресс принимает участие цГМФ, синтез которого происходит вследствие NO-зависимой активации ГЦ. При этом цГМФ может опосредовать свои ответы через увеличение  $[Ca^{2+}]_{цит}$ , которое, вероятно, явля-

ется результатом активации цикломононуклеотид-зависимых каналов.

S. Pasqualini с соавт. (2009) наблюдали увеличение содержания цГМФ в растениях табака при  $O_3$ -индуцированном окислительном стрессе. Интересно, что цГМФ-ответ детектировался только через 3 ч после обработки растений озоном, при этом повышенная концентрация цГМФ сохранялась по крайней мере в течение двух последующих часов [31]. В присутствии ингибитора ГЦ 1Н-[1,2,4]оксадиазол[4,3-а]хиноксалина-1 (ODQ)  $O_3$ -индуцированный рост концентрации цГМФ не проявлялся. Авторы этой работы предположили, что в случае озонных эффектов цГМФ опосредует адаптивные ответы.

Таким образом, цГМФ в растительной клетке участвует в трансдукции как быстрых сигнальных процессов и регуляции активности ионных каналов [10,66], так и более медленных адаптивных реакций организма, в основе которых лежат изменения состава транскриптома [6] и протеома.

**Температурный стресс.** В ходе всего периода жизнедеятельности растение вынуждено приспосабливаться к изменениям температуры во внешней среде. Растительные организмы подвергаются как сезонным, так и суточным колебаниям температуры, которые могут приводить к нарушению таких жизненно важных процессов, как дыхание, фотосинтез, водный обмен и др. [70]. Несмотря на большое количество работ по изучению механизмов действия экстремальных температурных факторов на растительный организм, роль цГМФ в этих процессах только начинает проясняться.

В нашей лаборатории был оценен характер влияния низкотемпературного фактора на содержание цГМФ в проростках арабидопсиса [71,72]. Было обнаружено, что уже через 30 с после начала воздействия низких температур в проростках арабидопсиса регистрируется двукратное переходное увеличение концентрации цГМФ по сравнению с контролем. Через 10 мин инкубации содержание цГМФ снижается до уровня контроля. В ходе экспериментов с использованием ингибитора ГЦ LY83583 и прямого измерения удельной активности ферментов метаболизма цГМФ ГЦ и ФДЭ было установлено, что низкотемпературное стрессовое воздействие ( $0^\circ C$ ) приводит к увеличению содержания цГМФ через стимуляцию активности ГЦ [71,72]. Данный ответ на действие низких температур обращался в присутствии ингибитора нитратредуктазы вольфрамата натрия, но не ингибитора NO-синтазы (NOS) млекопитающих метилового эфира L-аргинина (L-NAME).

Следовательно, синтез цГМФ при низкотемпературном стрессе индуцируется NO, образование которого катализируется нитратредуктазой. Также было показано, что LY83583 и модуляторы метаболизма NO L-NAME и вольфрамат натрия частично подавляют рост  $[Ca^{2+}]_{цит}$  при действии низких температур (0°C). Таким образом, в реализации действия низкотемпературного фактора в растениях участвует цГМФ, синтез которого происходит за счет NO-зависимой активации ГЦ, что и приводит к изменению  $[Ca^{2+}]_{цит}$  [71,72].

При действии высоких температур (40 и 50°C) в проростках арабидопсиса также наблюдалось быстрое переходное увеличение концентрации цГМФ, но с другими кинетическими параметрами [72,73]. При этом эффект продолжительностью 10 мин наблюдался уже через 15 с после температурного воздействия (50°C) и достигал максимума (четырёхкратное увеличение содержания цГМФ по сравнению с контролем) к 30 с инкубации. В ответ на действие высоких температур удельная активность ГЦ увеличивалась в 1,8 раза по сравнению с контролем, в то время как активность ФДЭ не изменялась [72,73]. Этот вывод следовал также из результатов опытов с использованием ингибитора ГЦ LY83583. Было обнаружено также, что ингибиторы синтеза NO – вольфрамат натрия и L-NAME-предотвращают увеличение содержания цГМФ в ответ на действие высоких температур. Следовательно, образование цГМФ при высокотемпературном стрессе индуцируется NO, синтез которого катализируется как нитратредуктазой, так и pos-подобным ферментом, в свою очередь NO активирует ГЦ.

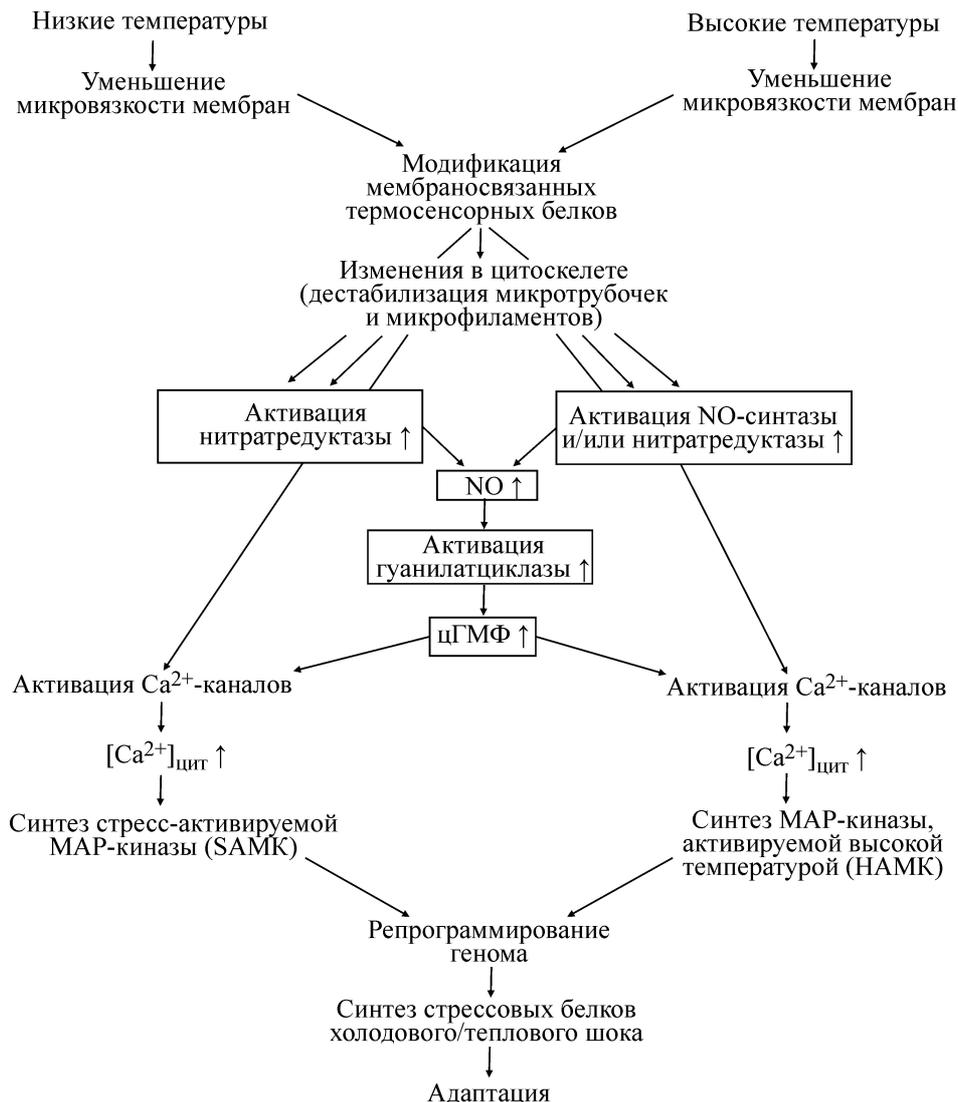
Оказалось, что при действии высоких температур LY83583 подавлял рост  $[Ca^{2+}]_{цит}$  на 25% в проростках арабидопсиса. Кроме того, с помощью ингибиторов было установлено, что реализация действия высокотемпературного фактора на  $[Ca^{2+}]_{цит}$  также осуществляется с участием NO [72]. Следовательно, цГМФ, синтез которого происходит по NO-зависимому механизму, участвует в реализации биологического действия высокотемпературного фактора, опосредуя свой эффект через рост  $[Ca^{2+}]_{цит}$ . Однако, в отличие от холодного стресса, при действии высоких температур в клетке активируются и нитратредуктаза, и NOS-подобный фермент.

В литературе имеются данные об участии цГМФ в репродуктивных процессах растений при действии экстремальных температур. В 2012 г. Y. Wang с соавт. показали, что цГМФ контролирует при холодном стрессе (4°C) ответы пыльцы *Camellia sinensis* по критерию про-

растания [29]. Инкубация пыльцевых трубок с ингибитором ФДЭ силденафилом замедляла процессы их элонгации и прорастания при действии низких температур, тогда как ингибитор ГЦ ODQ обращал эффекты холодного стресса. Полученные результаты были подтверждены экспериментами по прямому измерению содержания цГМФ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Было показано, что двухчасовой холодной стресс приводит к росту концентрации цГМФ в пыльце, при этом ингибитор NO-синтазы N $\omega$ -нитро-L-аргинин и ингибитор ГЦ ODQ подавляли рост концентрации цГМФ, индуцированный низкими температурами. В данной работе было продемонстрировано также участие цГМФ в NO-опосредованном накоплении в пыльце низкомолекулярного антиоксиданта пролина при действии низких температур. Таким образом, при холодном стрессе в клетках пыльцы растений активируется NOS-подобный фермент и синтез NO, в результате взаимодействия которого с ГЦ в клетках накапливается цГМФ.

M. Tunc-Ozdemir с соавт. (2013) изучали участие цГМФ в трансдукции высокотемпературного стресса в пыльце арабидопсиса [74]. Обнаружено, что при действии высоких температур (42°C) через 30 мин в листьях и в пыльце растений возрастает содержание цГМФ. При этом в листьях оно увеличилось в 1,76 раза по сравнению с контролем и составляло 24 пкмоль/г сухого веса, тогда как в пыльце составляло 0,022 пкмоль/г сухого веса, что оказалось в 1,16 раз выше, чем в контроле. Для сравнения, в пыльце *Camellia sinensis* содержание цГМФ составляет 0,405 пкмоль/г сухого веса. Несмотря на то, что содержание цГМФ в пыльце намного ниже, чем в листьях, этой концентрации цГМФ вполне достаточно для активации белков-мишеней, в частности, цикломононуклеотид-зависимых каналов (CNGC) [75]. Эксперименты с использованием мутантов, дефицитных по гену *CNGC16*, кодирующему одну из субъединиц цикломононуклеотидсвязывающего ионного канала, позволили установить связь между содержанием цГМФ, активностью  $Ca^{2+}$ -проницаемого канала и факторами транскрипции теплового шока в пыльце при реализации действия высокотемпературного фактора.

Резюмируя, можно сделать вывод о том, что цГМФ участвует в ответах клеток растений на действие низко- и высокотемпературных стрессоров (рис. 2). Реализация действия температурного стрессового сигнала в биологический ответ осуществляется с участием фермента синтеза цГМФ – ГЦ, активность которого регулируется NO. В основе механизма реализации



**Рис. 2.** Гипотетическая схема участия цГМФ в трансдукции низко- и высокотемпературного стрессового сигнала в клетках высших растений. SAMK (Stress-Activated MAP Kinase) – стресс-активируемая MAP-киназа, HAMK (Heat shock-Activated MAP Kinase) – MAP-киназа, активируемая высокими температурами.

цГМФ-опосредованных сигнальных ответов может лежать активация цикломононуклеотид-зависимых Ca<sup>2+</sup>-каналов. Анализ временных характеристик цГМФ-ответов указывает на участие цикломононуклеотида при температурном стрессе как в быстрых сигнальных [71–73], так и в адаптивных [29,74] реакциях.

**Биотический стресс.** Очевидно, что кроме абиотических на растения оказывают влияние и биотические стрессовые факторы (патогенные микроорганизмы, грибы, вирусы, нематоды и др.). Общепринято, что начальной стадией взаимодействия патогена и растения является конформационное узнавание сайтов взаимодействия клеток растения и патогена. Затем патоген выделяет разнообразные ферменты, разрушаю-

щие структурные компоненты покровных тканей растения, и, как результат, патоген проникает в растительную ткань. Следующий этап – образование в месте проникновения физиологически активных радикалов деградации белков и липидов клеточной стенки – элиситоров, выполняющих роль сигнальных веществ, модуляторов активности генетического аппарата. И, хотя химическая природа элиситоров очень разнообразна, по сути дела, от них начинается цепь трансдукции, завершающаяся биологическим эффектом – стимуляцией экспрессии определенных генов.

Известно, что в месте внедрения патогена в растение наблюдается программируемая гибель клеток и связанный с ней недостаток пи-

тательных веществ, ограничение роста и распространения патогена. При этом в месте внедрения отмечается быстрая переходная генерация АФК.

Интересным обстоятельством является следующий факт. При широком разнообразии первичного сигнала биотического стресса у растений в цепи трансдукции имеются общие для всех стрессорных реакций элементы, к которым относятся NO и цГМФ.

В литературе имеются данные о совместном участии цГМФ и NO в реализации действия биотических стрессоров [25,76]. Так, заражение суспензионной клеточной культуры авирулентным штаммом бактерий *Pseudomonas syringae* имитировало развитие гиперчувствительного ответа, результатом которого была NO-индуцированная гибель клеток арабидопсиса. Присутствие ингибитора ГЦ ODQ подавляло действие NO на гибель клеток, указывая на то, что NO опосредует свое действие через активацию ГЦ при NO-индуцированной гибели клеток и развитии гиперчувствительного ответа.

В соответствии с этими результатами находятся данные, полученные в нашей лаборатории. Так, было показано, что в растениях табака при высоких микромолярных концентрациях NO функционирует как внутриклеточный сигнальный индуктор программируемой цепи событий, что приводит к активации каспазоподобных протеаз, фрагментации ДНК, деградации белков и уменьшению содержания АТФ [77]. Для установления участия цГМФ в данном сигнальном каскаде были проведены исследования в присутствии ингибитора LY83583, подавляющего каталитическую активность ГЦ. Оказалось, что добавление LY83583 ингибировало ДНК-фрагментирующий эффект NO и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, что свидетельствует о том, что в NO-опосредованной фрагментации ДНК при окислительном стрессе принимает участие цГМФ. LY83583 также блокировал эффект донора NO (нитропруссид натрия) на активность каспаз и концентрацию АТФ. Полученные результаты указывают на то, что в NO-зависимом запуске программируемой клеточной гибели и индукции каспазного каскада, сопровождающегося снижением содержания АТФ, принимает участие цГМФ.

Другой группой авторов было установлено, что в табаке цГМФ в виде мембрано-проникающего аналога, NO (донор) и O<sub>3</sub> (индуктор окислительного стресса) увеличивали накопление транскриптов гена *PR-1*, кодирующего патогенез-зависимый белок, и гена *PAL*, кодирующего фенилаланинаммиаклиазу [25,31]. Известно, что увеличение экспрессии *PR-1* и *PAL*

наблюдается при действии различных стрессовых факторов, в том числе и при заражении растений патогенами [78]. Ингибиторы ГЦ LY83583 и ODQ оказывали подавляющий эффект на NO-зависимую индукцию экспрессии генов *PAL* и *PR-1*, который обращался в присутствии 8-бромо-цГМФ [25,31], указывая на участие цГМФ в защитных ответах растений при биотическом стрессе. Показано также, что в активации транскрипции защитных генов *PAL* и *PR-1* участвует цАДФР, действие которой усиливалось при добавлении 8-бромо-цГМФ [25]. Оба эффекта блокировались в присутствии рутениевого красного – блокатора Ca<sup>2+</sup>-каналов, что указывает на синергетическое действие цГМФ и цАДФР при индукции экспрессии генов *PAL* и *PR-1*.

В литературе описаны и NO-независимые эффекты цГМФ при биотических стрессах. Так, заражение авирулентным штаммом бактерий *Pseudomonas syringae* уже через 30 мин приводило к значительному росту содержания NO в суспензии клеток арабидопсиса, но даже спустя 6 ч после инокуляции с вирулентным штаммом NO-ответ отсутствовал [79]. В то же время вирулентный и авирулентный штаммы *Pseudomonas syringae* приводили к росту концентрации цГМФ в листьях арабидопсиса [7]. Увеличение содержания цГМФ наблюдалось практически сразу после инокуляции листьев авирулентным штаммом и только через 1 ч после инкубации с вирулентным, что еще раз указывает на участие цГМФ как в быстрых сигнальных, так и в адаптивных ответах.

Интересно отметить, что O<sub>3</sub>- и NO-индуцированная стимуляция экспрессии генов альтернативной оксидазы *AOX1a* и глутатионпероксидазы *GPX*, участвующих в детоксикации, являлись цГМФ-независимыми процессами [31]. Таким образом, можно заключить, что цГМФ опосредует индукцию экспрессии генов белков-участников процессов вторичного защитного метаболизма, тогда как экспрессия генов белков, выполняющих функцию детоксикации, является цГМФ-независимой.

В целом у растений в зависимости от биологического механизма формирования выделяют две формы индуцированной устойчивости: приобретенная системная устойчивость и индуцированная системная устойчивость. В развитии приобретенной системной устойчивости принимает участие салициловая кислота, тогда как индуцированная системная устойчивость от нее не зависит, но, в свою очередь, регулируется этиленом и жасмоновой кислотой [80].

Показано, что в качестве одного из кандидатов на роль ГЦ в растениях выступает

AtWAKL10, белок с ГЦ- и киназной активностями [49]. Патоген-индуцированная экспрессия AtWAKL10, которая была сопряжена с экспрессией ряда защитных генов, а также генов ферментов биосинтеза салициловой кислоты и белков  $Ca^{2+}$ -сигнализации, свидетельствует о связи между цГМФ, ионами  $Ca^{2+}$  и салициловой кислотой [49]. На возможное участие цГМФ в развитии приобретенной системной устойчивости указывает цГМФ-опосредованное увеличение экспрессии гена *PAL* и активности фенилаланинаммиакилазы, участвующей в биосинтезе салициловой кислоты [25].

Обнаружено, что ODQ ингибировал синтез этилена, стимулированный NO [31]. Однако NO-индуцированная экспрессия гена *ACS2*, белковым продуктом которого является синтаза аминокислоты циклопропанкарбоксильной кислоты, участвующая в синтезе этилена, являлась цГМФ-независимой [31]. Полученные результаты указывают на участие цГМФ в продукции клетками этилена при стрессе, при этом цГМФ, по-видимому, оказывает влияние на этапе трансляции и/или посттрансляционной модификации *ACS2*.

Из вышеприведенных данных следует, что цГМФ играет важную роль в реализации защитных механизмов растений при биотических стрессах, принимая участие в развитии приобретенной устойчивости.

#### ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Совокупность представленных данных позволяет говорить о том, что в клетках высших растений цГМФ удовлетворяет всем критериям, предъявляемым к вторичным медиаторам. цГМФ является биофизической сигнальной молекулой, концентрация которой быстро регулируется в физиологических условиях и в ответ на стрессовые воздействия ферментами его метаболизма – ГЦ и ФДЭ, что подтверждено прямым измерением активности данных ферментов, а также с использованием ингибиторного анализа. В качестве вторичного медиатора цГМФ регулирует сигнальные процессы путем непосредственного взаимодействия с эффекторными белками-мишенями и тем самым способствует передаче и амплификации первичного сигнала. Кроме того, показано, что цГМФ может опосредованно контролировать экспрессию жизненно важных генов и участвовать в реализации биологических процессов в клетках.

В настоящее время очевидно, что цГМФ и ГЦ являются важными участниками стрессовой сигнализации, индуцированной абиотическими

и биотическими факторами, в клетках высших растений. Установлено, что цГМФ опосредует ответы растений на действие солевого, осмотического [66], окислительного [10,31], низко- и высокотемпературного стрессовых факторов [29,71–73], а также при заражении патогенами [24,79].

Концентрация цГМФ в клетке увеличивается в результате стимуляции активности фермента его синтеза ГЦ, которая может быть результатом взаимодействия ГЦ с NO. NO-зависимый синтез цГМФ наблюдался при окислительном и температурном стрессах, заражении растений патогенами [10,25,71–73,76]. В клетках млекопитающих NO активирует продукцию цГМФ через взаимодействие с растворимой (и, возможно, также со связанной) изоформой ГЦ. При этом активация ГЦ посредством NO кратковременна, так как цГМФ быстро разрушается ФДЭ. Об участии ГЦ в NO-индуцированных цГМФ-ответах в клетках растений свидетельствуют результаты ингибиторного анализа с использованием модуляторов активности ГЦ млекопитающих [10,25,31].

Несмотря на то, что в геноме арабидопсиса не была выявлена последовательность, полностью гомологичная последовательности гена ГЦ млекопитающих, в настоящее время клонирован и идентифицирован ряд растительных белков, обладающих ГЦ-активностью. В растениях, очевидно, присутствует другой класс ГЦ, отличный от млекопитающих. Так, в ответах растений на широкий спектр патогенов и их элиситоров принимает участие белок AtWAKL10, имеющий в своем составе домены с гуанилатциклазной и киназной активностями [49].

Исходя из имеющихся данных, цГМФ может опосредовать быстрые сигнальные реакции [10,66] или поздние продолжительные адаптивные ответы [6]. Быстрые ответы могут быть обусловлены участием цГМФ в поддержании ионного гомеостаза клетки за счет его способности регулировать проницаемость потенциал-независимых ионных каналов [6].

В стрессовых сигнальных каскадах увеличение цГМФ, как правило, предшествует изменению  $[Ca^{2+}]_{цит}$  [10,49,66,72]. Известно, что узловым элементом взаимодействия между цГМФ и  $Ca^{2+}$ -сигнализацией, в том числе и при реализации стрессовых ответов, выступают цикломононуклеотидсвязывающие ионные каналы, в состав которых входят сайты связывания для циклонуклеотидмонофосфата и кальмодулина [24,74]. Следовательно, цикломононуклеотидсвязывающие ионные каналы являются одной из мишеней действия цГМФ при стрессах. По

этой схеме цГМФ вызывает рост  $[Ca^{2+}]_{цит}$ . Другая возможность – регуляция рианодин-подобных  $Ca^{2+}$ -каналов, активация которых осуществляется цАДФР [25].

цГМФ-опосредованная активация ионных каналов может быть ограничена микродоменами внутри клетки, обеспечивая пространственное разделение сигнала. В то же время характер кинетики синтеза цГМФ специфичен для каждого стрессового воздействия. Это указывает на гетерогенность распределения цГМФ внутри клетки и, по мнению ряда авторов, предполагает существование цГМФ-сигнатуры [7,24]. Под цГМФ-сигнатурой подразумевается совокупность стимул-специфических пространственных, временных и концентрационных параметров изменения цГМФ, определяющая биологический ответ.

В основе поздних цГМФ-опосредованных ответов лежат изменения на уровне транскриптома [6]. С помощью микрочипов было оценено влияние мембранопроникающего аналога цГМФ 8-бромо-цГМФ на экспрессию генов в тканях корней арабидопсиса [6,81]. Среди обнаруженных цГМФ-регулируемых транскриптов были транскрипты, связанные с действием патогенов, а также транскрипты генов белков, участвующих в трансдукции абиотических и биотических сигналов [6,81].

Недавно в качестве белков-мишеней цГМФ были идентифицированы НДФК [10], которые за счет фосфорилирования белков способны напрямую активировать транскрипцию ряда генов. Известно, что НДФК участвуют в стрессовой сигнализации при тепловом, окислительном, солевом стрессе, механическом повреждении [61]. Это свидетельствует о способности цГМФ опосредовать накопление транскриптов генов защитных белков, транспортеров, белков, участвующих в сигнализации, факторов транскрипции и других, через регуляцию активности НДФК.

Таким образом, цГМФ является важным биофизическим медиатором в трансдукции абиотических и биотических стрессовых сигналов в растительной клетке, являясь основным элементом молекулярного кросстока между сигнальными каскадами. Поэтому следующим шагом на пути понимания роли циклического мононуклеотида в функционировании высших растений должна стать молекулярно-биологическая идентификация и характеристика ферментов метаболизма цГМФ, а также дальнейшая биофизическая идентификация цГМФ-связывающих белков и поиск их молекулярных мишеней в растениях. Необходимо изучить структуру генов, кодирующих ГЦ и цГМФ-специ-

фичную ФДЭ, и установить биофизические механизмы регуляции их экспрессии в ответ на действие биотических и абиотических факторов окружающей среды. Особый интерес представляет выявление реакции различных изоформ ГЦ из клеток растений на влияние стрессоров различной природы. Кроме того, для целостного понимания роли цГМФ в реализации физиологических и стрессовых ответов необходимо провести сравнительный анализ экофизиологических, физиологических, биохимических и метаболических данных, полученных с использованием растений с генетическими мутациями по генам компонентов цГМФ-сигнализации, ген-нокаутных линий, а также растений дикого типа. Получение трансгенных растений с измененным уровнем экспрессии генов белков циклогуанодинмонофосфатной системы и использование регуляторов метаболизма цГМФ открывает новые перспективы разработки стратегий повышения стрессоустойчивости растений.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. D. Goldberg, S. B. Dietz, and A. G. O'Toole, J. Biol. Chem. **244**, 4458 (1969).
2. R. E. Klabunde, J. Tse, and H. R. Weiss, Cardiovasc. Res. **37**, 676 (1998).
3. S. Buvinic, M. I. Poblete, M. V. Donoso, et al., J. Physiol. **573**, 427 (2006).
4. S. P. Penson, R. C. Schuurink, A. Fath, et al., Plant Cell **8**, 2325 (1996).
5. B. Janistyn, Planta **159**, 382 (1983).
6. F. J. Maathuis, Plant J. **45**, 700 (2006).
7. S. Meier, L. Madeo, L. Ederli, et al., Plant Sign. Behav. **4**, 307 (2009).
8. A. Szmjdt-Jaworska, K. Jaworski, A. Pawelek, et al., J. Plant Growth Regul. **28**, 367 (2009).
9. A. Cousson, Plant Physiol. Biochem. **48**, 977 (2010).
10. L. V. Dubovskaya, Y. S. Bakakina, E. V. Kolesneva, et al., New Phytol. **191**, 57 (2011).
11. Л. В. Дубовская, О. В. Молчан и И. Д. Волоотовский, Физиология растений **49**, 216 (2002).
12. D. L. Godbold, Chemosphere **36**, 859 (1998).
13. E. T. Nilsen and D. M. Orcutt, *The physiology of plants under stress: abiotic factors* (John Wiley and Sons, New York, 1996).
14. И. А. Тарчевский, *Метаболизм растений при стрессе* (Фэн, Казань, 2001).
15. В. В. Кузнецов, Вестн. Нижегородского ун-та. Сер. биол. **1**, 65 (2001).
16. C. Zipfel and S. Robatzek, Plant Physiol. **154**, 551 (2010).
17. D. J. Wohlbach, B. F. Quirino, and M. R. Sussman, Plant Cell **20**, 1101 (2008).

18. R. Catala and J. Salinas, *J. Appl. Biomed.* **8**, 189 (2010).
19. Z. Liu, Z. Ma, X. Guo, et al., *Plant Physiol. Biochem.* **48**, 860 (2010).
20. N. Tuteja, *Plant Signal. Behav.* **4**, 942 (2009).
21. Л. В. Дубовская и И. Д. Волоотовский, *Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук* **3**, 70 (2005).
22. D. Sanders, C. Brownlee, and J. F. Harper, *Plant Cell* **11**, 691 (1999).
23. I. D. Volotovskii, S. G. Sokolovsky, O. V. Molchan, et al., *Plant Physiol.* **117**, 1023 (1998).
24. Z. Qi, R. Verma, C. Gehring, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 21193 (2010).
25. J. Durner, D. Wendehenne, and D. F. Klessig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10328 (1998).
26. N. J. Willmott, K. Wong, and A. J. Strong, *FEBS Lett.* **487**, 239 (2000).
27. C. Bogdan, *Trends Cell Biol.* **11**, 66 (2001).
28. B. Mayer and B. Hemmens, *Trends Biochem. Sci.* **22**, 477 (1997).
29. Y. H. Wang, X. C. Li, Q. Zhu-Ge, et al., *PLoS One* **12**, 1 (2012).
30. S. S. Gill and N. Tuteja, *Plant Physiol. Biochem.* **48**, 909 (2010).
31. S. Pasqualini, S. Meier, C. Gehring, et al., *New Phytol.* **181**, 860 (2009).
32. Т. В. Чиркова, *Физиологические основы устойчивости растений*. (Изд-во СПбГУ, СПб., 2002).
33. X. Hu, S. J. Neill, Z. Tang, et al., *Plant Physiol.* **137**, 663 (2005).
34. S. J. Neill, R. Desikan, A. Clarke, et al., *Plant Physiol.* **128**, 13 (2002).
35. Л. В. Дубовская, О. В. Молчан и И. Д. Волоотовский, *Физиология растений* **48**, 1 (2001).
36. C. Bowler, G. Neuhaus, H. Yamagata, et al., *Cell* **77**, 73 (1994).
37. Y. Teng, W. Xu, and M. Ma, *J. Plant Physiol.* **167**, 885 (2010).
38. C. V. Lundeen, H. N. Wood, and A. C. Braun, *Differentiation* **1**, 255 (1973).
39. T. Katsumata, N. Takahashi, and S. Ejiri, *Agric. Biol. Chem.* **42**, 2161 (1978).
40. I. H. Ames, R. A. Richman, and J. P. Weiss, *Plant Cell Physiol.* **21**, 367. (1980).
41. M. L. Salmi, K. E. Morris, S. J. Roux, et al., *Plant Physiol.* **144**, 94 (2007).
42. A. Szmjdt-Jaworska, K. Jaworski, A. Tretyn, et al., *J. Plant Physiol.* **161**, 277 (2004).
43. A. M. Prado, D. M. Porterfield, and J. A. Feijy, *Development* **131**, 2707 (2004).
44. R. P. Newton, E. E. Kingston, D. E. Evans, et al., *Phytochem.* **23**, 1367 (1984).
45. I. D. Volotovskii, L. V. Dubovskaya, and O. V. Molchan, *Bulg. J. Plant Physiol.* **29**, 3 (2003).
46. N. Ludidi and C. Gehring, *J. Biol. Chem.* **278**, 6490 (2003).
47. A. Szmjdt-Jaworska, K. Jaworski, A. Paweiek, et al., *J. Plant Growth Regul.* **28**, 367 (2009).
48. L. Kwezi, S. Meier, L. Mungur, et al., *PLoS ONE.* **2**, 1 (2007).
49. S. Meier, O. Ruzvidzo, M. Morse, et al., *PLoS ONE.* **5**, 1 (2010).
50. L. Kwezi, O. Ruzvidzo, J. I. Wheeler, et al., *J. Biol. Chem.* **286**, 22580 (2011).
51. R. P. Newton, A. G. Brenton, D. Ghosh, et al., *Anal. Chim. Acta* **247**, 161 (1991).
52. Л. В. Дубовская, О. В. Молчан и И. Д. Волоотовский, *Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук.* **4**, 85 (2003).
53. S. J. Neill, R. Desikan, and J. T. Hancock, *New Phytol.* **159**, 11 (2003).
54. K. A. Lucas, G. M. Pitari, S. Kazerounian, et al., *Parmacol. Rev.* **52**, 375 (2000).
55. L. V. Dubovskaya and I. D. Volotovskii, *Bulg. J. Plant Physiol.* **30**, 14 (2004).
56. S. Dorion, F. Dumas, and J. Rivoal, *J. Exp. Botany* **57**, 4079 (2006).
57. Y. Shen, J.-I. Kim, and P.-S. Song, *J. Biolog. Chem.* **280**, 5740 (2005).
58. S. Zimmermann, A. Baumann, K. Jaekel, et al., *J. Biolog. Chem.* **274**, 17017 (1999).
59. M. L. Escobar Galvis, S. Marttila, G. Hakansson, et al., *Plant Physiol.* **126**, 69 (2001).
60. Y. Fukamatsu, N. Yabe, and K. Hasunuma, *Plant Cell Physiol.* **44**, 982 (2003).
61. H. Moon, B. Lee, G. Choi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 358 (2003).
62. N. Harris, J. E. Taylor, and J. A. Roberts, *Plant Mol. Biol.* **25**, 739 (1994).
63. B. Joseph and D. Jini, *Asian J. Plant Sci.* **9**, 307 (2010).
64. F. J. M. Maathuis and D. Sanders, *Plant Physiol.* **127**, 1617 (2001).
65. F. Rubio, P. Flores, J. M. Navarro, et al., *Plant Sci.* **165**, 1043 (2003).
66. L. Donaldson, N. Ludidi, M. R. Knight, et al., *FEBS Lett.* **569**, 317 (2004).
67. J. Li, X. Wang, Y. Zhang, et al., *Planta* **234**, 709 (2011).
68. S. J. Neill, R. Desikan, A. Clarke, et al., *J. Exp. Bot.* **53**, 1237 (2002).
69. Л. В. Дубовская, Ю. С. Бакакина и Е. В. Колеснева, *Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук* **1**, 89 (2008).
70. S. Penfield, *New Phytol.* **179**, 615 (2008).
71. Ю. С. Бакакина, Е. В. Колеснева, Л. В. Дубовская и др., *Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук* **3**, 43 (2009).
72. Y. S. Bakakina, E. V. Kolesneva, D. L. Sodel, et al., *J. Plant Physiol. Pathol.* **2**, 1 (2014).
73. Ю. С. Бакакина, Л. В. Дубовская и И. Д. Волоотовский, *Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук* **4**, 34 (2009).
74. M. Tunc-Ozdemir, C. Tang, M. R. Ishka, et al., *Plant Physiol.* **161**, 1010 (2013).
75. C. Gehring, *Cell Commun. Signal.* **8**, 15 (2010).

76. M. Delledonne, Y. Xia, R. A. Dixon, et al., *Nature* **394**, 585 (1998).
77. Y. S. Bakakina, E. V. Kolesneva, L. V. Dubovskaya, et al., in *Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology*, Ed. by M. N. Khan, M. Mobin, F. Mohammad, and F. J. Corpas (Springer, Cham, Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 2014), pp. 199–210.
78. L. Mejía-Teniente, F. D. Durán-Flores, A. M. Chapa-Oliver, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 10178 (2013).
79. A. Clarke, R. Desikan, R. D. Hurst, et al., *Plant J.* **24**, 667 (2000).
80. J. A. Ryals, U. H. Neuenschwander, M. G. Willits, et al., *Plant Cell* **8**, 1809 (1996).
81. R. Bastian, A. Dawe, S. Meier, et al., *Plant Signal. Behav.* **5**, 224 (2010).
82. Е. В. Колеснева, Л. В. Дубовская и И. Д. Волотовский, *Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук* **3**, 61 (2006).

## Cyclic Guanosine Monophosphate as a Mediator in Processes of Stress Signaling Transduction in Higher Plants

L.V. Dubovskaya, Y.S. Bakakina, and I.D. Volotovski

*Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,  
Academicheskaya 27, Minsk, 220072 Belarus*

Currently, biophysical mechanisms of stress signaling transduction became an object of consideration of researchers in connection with the urgent necessity to develop new techniques to enhance the sustainability and productivity of agricultural crops. The development of sensitive methods for the determination of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and comparative analysis of cGMP-dependent events in biological systems has contributed to progress in the understanding of the functioning of cGMP in plant cells. Currently, it is shown that cGMP as a secondary mediator is involved in such vital processes of growth and development of plants as seed germination, cell division, development of chloroplasts, flowering and regulation of stomatal movements. This review summarizes the available data in the literature about the role of cGMP in the responses of plant organisms to the action of stress factors of abiotic and biotic nature and its interaction with other intracellular mediators. With the use of existing ideas about the biophysical mechanisms of stress in plants, the basic elements of cGMP-dependent signal transduction system in a plant cell are considered.

*Key words: cyclic guanosine monophosphate, intracellular signaling, secondary mediators, signal transduction, abiotic and biotic stress, resistance*