

Молекулярные основы реализации сигнального пути фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазы С в клетках растений

О. Н. Яковенко, С. В. Кретинин, В. С. Кравец

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины
Ул. Мурманская, 1, Киев, Украина, 02094

yon@bpci.kiev.ua

Сигналы из окружающей среды могут восприниматься и усиливаться в клетках с помощью сигнальных каскадов. У растений фосфатидилинозитол-специфическая фосфолипаза С (ФЛС) выполняет важную роль в клеточном ответе на внешние стимулы. Субстрат и продукты ФЛС регулируют множество процессов в клетках растений. В настоящем обзоре мы сосредоточили внимание на молекулярных основах реализации сигнального пути фосфатидилинозитол-специфической ФЛС. Анализ данных поможет расширить представление о механизмах, лежащих в основе способности растений реагировать на разнообразные абиотические и биотические стрессы.

Ключевые слова: фосфатидилинозитол-специфическая фосфолипаза С, трансдукция сигнала.

Введение. Фосфатидилинозитол-специфическая фосфолипаза С (ФИ-ФЛС) – ключевой фермент трансдукции сигнала фосфоинозитидного цикла в клетках бактерий, простейших, растений и животных, гидролизующий фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (ФИ(4,5)Ф₂) с образованием инозитолтрифосфата (ИФ₃) и диацилглицерола (ДАГ) [1]. В организме растений ФИ-ФЛС играет важную роль в большинстве физиологических процессов. Она активируется в ответ на различные воздействия окружающей среды, такие как солевой [2, 3], холодной [4, 5], осмотический стрессы и засуха [6–9]. Кроме того, ФИ-ФЛС растений является компонентом сигнальных путей фитогормонов, например, абсцизовой кислоты (АБК) [10, 11] и цитокинина [12].

Как субстрат, так и продукты ФИ-ФЛС, обладая уникальными функциями, участвуют в регуляции

множества процессов [1, 13]. ИФ₃ и продукт его превращения – гексафосфат (ИФ₆) вызывают высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных запасов [14, 15]. ДАГ может фосфорилироваться диацилглицеролкиназой с образованием липидного мессенджера – фосфатидной кислоты (ФК). Исследования показали, что транспорт везикул в клетке тесно связан с внутриклеточной локализацией, циклизацией, движением и деградацией белков и регулируется молекулами фосфолипидов, в том числе ФИ(4,5)Ф₂ и ФК [16, 17].

Изучение активности ФИ-ФЛС растений как *in vitro*, так и *in vivo* осложнено низким содержанием ФИ(4,5)Ф₂ в организме высших растений, а зарегистрировать присутствие ИФ₃ с помощью тонкослойной хроматографии удается достаточно редко [18]. Часто используют анализ количества ИФ₃ с помощью теста Amersham TRK1000 [19]. Большая часть исследований сигналинга ФИ-ФЛС построена на применение ингибиторов этого фермента,

среди которых U73122 и его неактивный аналог U73343. Однако, по некоторым данным, при воздействии U73122 наблюдается медленное увеличение внутриклеточного Ca^{2+} в свободной от Ca^{2+} среде и блокирование Ca^{2+} -каналов L-типа [21]. ФЛС изучают также с использованием трансгенных растений. Эксперименты по угнетению или стимуляции экспрессии генов ФЛС, призванные пролить свет на функции ФИ-ФЛС в организме растений, имеют значительный успех [22–24]. Исследование характеристик ФИ-ФЛС поможет в дальнейшем представить механизмы сигналинга фосфолипидов в различных аспектах роста и развития растений.

Молекулярное строение ФИ-ФЛС растений.

Среди ФИ-ФЛС млекопитающих различают пять типов: , , , , . Они содержат РН-домен, являющийся основной последовательностью, необходимой для присоединения к плазматической мембране, связывания с субстратом и собственно катализа; EF-hand домен, важный для активации фермента, X- и Y-последовательности, представляющие каталитический центр, и С2-домен, обеспечивающий взаимодействие с Ca^{2+} и липидами [25, 26]. Такое строение характерно для изоформы ФЛС , в составе же других семейств ФЛС есть дополнительные домены. ФИ-ФЛС растений структурно идентична самой маленькой среди ФИ-ФЛС млекопитающих изоформе ФЛС с молекулярной массой (м. м.) приблизительно 60–70 кДа, которая имеет две EF-hand последовательности, X-, Y- и С2-домены и не содержит домена РН, характерного для других изоформ ФИ-ФЛС [27].

Однако следует отметить, что на уровне последовательности ФИ-ФЛС ближе к изоформе ФИ-ФЛС млекопитающих [28, 29]. У ФЛС растений нет РН-домена, который у ФЛС животных необходим для взаимодействия с плазматической мембраной. ФЛС содержит С2- Ca^{2+} /фосфолипид-связывающий домен, фиксирующий каталитический центр в правильном положении. Этот домен принимает участие во взаимодействии с мембраной, однако было показано, что его присутствия недостаточно для образования ферментом каталитически активного положения и для ассоциации с плазматической мембраной необходимы другие домены фермента [26, 30].

Экспрессия и эволюция генов ФИ-ФЛС. В 1988 году из клеток животных впервые получена ДНК, кодирующая ФЛС [31]. Семь лет спустя удалось клонировать ДНК ФЛС *Arabidopsis thaliana* L. [2] и сои (*Glycine max* L.) и показать присутствие белка этого фермента как в плазматической мембране, так и в цитозоле [32]. На сегодняшний день известно большое количество генов, кодирующих активные ФИ-ФЛС, и выделены белки ФИ-ФЛС из некоторых видов растений, например, картофеля (*Solanum tuberosum* L.) [33], фасоли золотистой (*Vigna radiata* L.), кукурузы (*Zea mays* L.), риса (*Oryza sativa* L.) [1], петунии (*Petunia inflata* L.) [30].

В геноме *A. thaliana* находятся девять генов *AtФЛС* [22, 29]. Гены *AtФЛС1*–*AtФЛС5* кодируют ФИ-ФЛС, активность которой показана *in vitro*, тогда как ферментативная активность продуктов *AtФЛС8* и *AtФЛС9* маловероятна [22, 34]. *AtФЛС6* и *AtФЛС7* содержат домен, необходимый для активности ФИ-ФЛС, и кодируют активный фермент. Ранее установлено, что *AtФЛС7* кодирует неполноценный и нефункциональный белок с м. м. 30 кДа [22]. Однако позже обнаружена полноцепочечная ДНК *AtФЛС7*, кодирующая, вероятно, функциональный белок ФИ-ФЛС [35].

Каталитические домены всех ФИ-ФЛС обладают сходным строением и окислительно-восстановительным механизмом катализа. Консервативность топологии и части активного сайта свидетельствуют о происхождении от одного родственного белка. Филогенетическая история ФИ-ФЛС эукариотов, очевидно, включает в себя несколько стадий удлинения цепи и дубликации генов. Эволюция семейства генов *AtФЛС*, возможно, прошла в несколько этапов. Тандем генов *AtФЛС8* и *AtФЛС9* образовался при локальной дубликации на поздних этапах. *AtФЛС1*, *AtФЛС4* и *AtФЛС5* составляют группу генов, организованных из небольших фрагментов ДНК. Вероятно, предшественники *AtФЛС4/AtФЛС5* и *AtФЛС1/AtФЛС3* образовались из одного гена при дубликации на хромосоме 5 с последующей дубликацией и перемещением *AtФЛС3* на 4-ю хромосому, ответственную за дальнейшее распределение генов [35].

Экспрессия генов *AtФЛС* повышается в ответ на действие таких факторов окружающей среды, как

Усиление экспрессии генов фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазы C в клетках растений в ответ на абиотические воздействия и влияние абсцизовой кислоты

Воздействие	Активируемая изоформа	Объект	Литературный источник
Абсцизовая кислота	<i>AtPLC6</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	[34]
	<i>TjPLC2</i>	<i>Torenia fournieri</i> L.	[85]
	<i>AtPLC1–9</i> , кроме <i>AtPLC2</i>	<i>A. thaliana</i> L.	[35]
Снижение температуры	<i>AtPLC1</i>	<i>A. thaliana</i> L.	[2]
	<i>AtPLC1–5</i>	<i>A. thaliana</i> L.	[22]
	<i>BnPLC2</i>	<i>Brassica napus</i> L.	[9]
	<i>ZmPLC</i>	<i>Zea mays</i> L.	[86]
	<i>AtPLC1–9</i> , кроме <i>AtPLC2</i>	<i>A. thaliana</i> L.	[35]
Повышение температуры	<i>AtPLC6</i>	<i>A. thaliana</i> L.	[34]
Солевой стресс	<i>AtPLC1</i>	<i>A. thaliana</i> L.	[2]
	<i>AtPLC1–5</i>	<i>A. thaliana</i> L.	[22]
	<i>AtPLC6</i>	<i>A. thaliana</i> L.	[34]
	<i>VrPLC3</i>	<i>Vigna radiata</i> L.	[7]
	<i>ZmPLC</i>	<i>Z. mays</i> L.	[86]
	<i>ZmPLC1</i>	<i>Z. mays</i> L.	[38]
	<i>AtPLC1</i>	<i>A. thaliana</i> L.	[2]
Засуха	<i>StPLC1</i>	<i>Solanum tuberosum</i> L.	[33]
	<i>AtPLC1–5</i>	<i>A. thaliana</i> L.	[22]
	<i>VrPLC3</i>	<i>V. radiata</i> L.	[7]
	<i>ZmPLC</i>	<i>Z. mays</i> L.	[86]
	<i>TjPLC2</i>	<i>T. fournieri</i> L.	[85]

обезвоживание, засоление и холодовой стресс [2, 36]. Гены ФЛС картофеля экспрессируются в ответ на раневой стресс и водный дефицит [33].

Транскрипция *AtФЛС1* и *AtФЛС6* индуцируется в ответ на абиотические стрессы, среди них обезвоживание, засоление и переохлаждение [2, 34] (таблица). Предполагают, что увеличение уровня транскрипции приводит к возрастанию количества белка АтФЛС и таким образом активирует сигнальные пути up- или down-регуляции генов, участвующих в различных клеточных реакциях. Например, показано, что транскрипция *AtФЛС1*, активация фермента и увеличение количества ИФ₃ необходи-

мы для последующей экспрессии генов в ответ на воздействие АБК [2].

AtPLC1 активируется в ответ на воздействие соли, АБК, холода и обезвоживание. Экспрессия генов *AtPLC2* не индуцируется при действии абиотических стрессов [37]. В отличие от *AtPLC2* остальные восемь генов *AtPLC* индуцируются в ответ на внешние воздействия. Для *AtФЛС8* и *AtФЛС9* уровень транскрипции повышается менее чем в два раза под влиянием всех внешних стимулов [35]. Показано усиление индукции *AtФЛС6* более чем в два раза как последствия некоторых внешних воздействий [2].

С помощью трансгенных растений кукурузы описана физиологическая роль ФИ-ФЛС в реакции растений на абиотический стресс. Фенотип растений дикого типа и растений с угнетенной и повышенной экспрессией генов ФИ-ФЛС, выращенных в оптимальных условиях, не изменялся. Однако в условиях водного стресса растения со сниженным уровнем экспрессии *ФЛС1* отличались низким содержанием воды в тканях, ухудшением осмотической регуляции, падением фотосинтетической активности, высоким процентом потери ионов, большей интенсивностью перекисного окисления липидов и меньшей продуктивностью по сравнению с диким типом. Сделан вывод о повреждении механизмов трансдукции сигнала об обезвоживании и нарушении способности клеток к адаптации в стрессовых условиях, что свидетельствует о жизненно важной роли генов ФЛС в регуляции ответа на стресс, вызванный водным дефицитом [38].

Кинетические свойства ФЛС. Большинство ферментативно активных растительных ФИ-ФЛС получено из цитозоля, но ввиду того, что субстрат этого фермента ассоциирован с мембраной, определенная для этой среды активность может изменяться при переходе от цитозоля к мембране. Поэтому одним из наиболее характерных и интересных параметров при изучении липолитического фермента является его активация на поверхности мембран. Описана активность ФЛС растений *Catharanthus roseus* L. с применением липидных субстратов, распределенных в фосфолипидных везикулах, фосфолипидных мицеллах и монослое в воздушно-водной среде [39]. Использование P^{33} -меченных субстратов для непосредственного измерения активности ФЛС *C. roseus* L. выявило зависимость соотношения и количества PC-PS монослоя от давления. Активность ФЛС возрастает при повышении давления до 20 мН/м и достигает максимума в этих условиях, а при последующем росте давления активность ФЛС падает. Редукция активности ФЛС является, возможно, результатом уменьшения способности фермента к связыванию с субстратом. Это явление специфично и, очевидно, регулируется концентрацией ФИ(4,5)Ф₂ или другим, пока еще неизвестным способом. Такие результаты отлича-

ются от полученных для ФЛС животных и подобны ФЛС, что неожиданно, поскольку по строению ФЛС растений ближе к изоформе ФЛС. Однако для изоформ ФЛС при увеличении поверхностного давления показано линейное снижение активности. Причины отличий между активностями ФЛС растений и ФЛС в монослое неизвестны, но определена зависимость активности разных изоформ от особенностей поверхности, с которыми они взаимодействуют. Таким образом, исследованиями ФЛС растений и других организмов [40, 41] установлено, что гидролиз ФИ(4,5)Ф₂ в монослое зависит от поверхностного давления, обуславливающего особенности взаимодействия ферментов этого семейства с липидной поверхностью [39].

Эти данные и результаты, полученные с использованием монослойного субстрата, где активность ФЛС уменьшалась при повышении субстратного давления, свидетельствуют о том, что фосфолипаза С должна проникать сквозь липидные агрегаты в случае связывания и гидролиза их субстратов. Данные о везикулярном связывании подтверждают взаимодействие ФЛС растений с мембранной поверхностью при помощи субстрата ФИ(4,5)Ф₂. Для обеспечения ФЛС-опосредованного образования вторичных мессенджеров ФЛС может взаимодействовать с мембранной поверхностью специфическим некаталитическим способом с дальнейшим связыванием или перестройкой поверхности, что может способствовать формированию стабильного закрепления ФЛС на поверхности мембраны [42].

Неожиданные результаты получены при изучении сайта взаимодействия с поверхностью и дальнейшего связывания липидного субстрата внутри мембраны. Кривая уравнения Михаелиса-Ментен с коэффициентом Хилла около 1, возможно, свидетельствует о существовании единого сайта связывания. У ФЛС животных аминоконцевой участок, содержащий плекстрим-гомологичный домен, необходим для связывания с фосфолипидными везикулами, содержащими ФИ(4,5)Ф₂. Эти результаты подтверждают, что присутствие ФИ(4,5)Ф₂ может быть важным фактором, необходимым для локализации белков, содержащих этот домен на мембранной поверхности. Однако плекстрим-гомологичный домен среди продуктов генов раститель-

ных ФЛС получить не удалось. Возможно, ФЛС растений сначала должна присоединиться к $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ в каталитическом сайте [43].

Синтезированы энантиомерно чистые аналоги всех природных субстратов ФИ-ФЛС, включая как длинно-, так и короткоцепочечные фосфатидилинозитол-4,5-бифосфаты, фосфатидилинозитол-5-фосфаты и нефосфорилированные фосфатидилинозитолы. Субстраты, фосфорилированные по 4-инозитольной связи ($\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ и ФИ-4-Ф), имеют очень сходные кинетические свойства и их фосфорилирование происходит в 20–30 раз активнее, чем 4-нефосфорилированных (ФИ-5-Ф и ФИ). Можно сделать вывод о том, что для катализа ФИ-ФЛС важно взаимодействие именно с 4-фосфатной группой. Кроме того, аффинность связывания всех четырех групп достаточно сходна, что свидетельствует о достаточности энергии ферментативного связывания с 4-фосфатной группой для катализа.

Специфичность ФИ-ФЛС корней пшеницы к полифосфоинозидам контролируется различными факторами: рН (рН 6–7 – гидролиз ФИФ, рН 6–6,5 – гидролиз $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$) и ионами. Ионы кальция, марганца и кобальта в концентрации 4 мМ снижают специфичность ФЛС к $\text{ФИ}\text{Ф}_2$ и усиливают гидролиз ФИФ. При высоких концентрациях кальция специфичность ФЛС изменяется в такой последовательности: $\text{ФИ} > \text{ФИ}4\text{Ф} > \text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ [45].

По свойствам *in vitro* ФЛС можно разделить на две группы: растворимые формы, требующие миллимолярных концентраций кальция для катализа и проявляющие субстратную специфичность по отношению к ФИ, и ФЛС, присоединенные к плазмалемме, с субстратной специфичностью по отношению к полифосфоинозидам, для активации которых достаточно микромолярных концентраций кальция (оптимум 0,1–10 мкМ) [30]. Очищенная мембранная ФЛС высокоспецифична к Фам (100 % активности), неочищенный фермент более специфичен к ПФИам (для ФИФ – 10 %, для $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ – 30 % активности неочищенного фермента). Активность очищенной формы по отношению к $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ восстанавливается при добавлении белкового фактора, утрачиваемого во время выделения белка, однако показано, что данный регуляторный фактор не является G-белком [45].

Регуляция активности ФЛС. G-белки. Гетеротримерный G-белок состоит из α -, β - и γ -субъединиц и действует как молекулярный «переключатель», контролирующий множество важных клеточных реакций, передавая сигнал от рецепторов клеточной поверхности на внутриклеточные элиситоры, такие как ФЛС, фосфолипаза Д, циклазы, ионные каналы, фосфодиэстеразы и др. [46]. В геноме человека содержится около 1000 генов G-белка, тогда как в геноме *A. thaliana* на сегодняшний день обнаружен лишь один ген, кодирующий G-белок, участвующий в регуляции клеточного цикла [47] и передаче сигнала АБК в замыкающих клетках [48]. На растениях *A. thaliana* продемонстрировано, что G-белок участвует в процессах регуляции ионных каналов [49] и клеточной пролиферации [50]. Кроме того, мутационные изменения компонентов G-белка растений *A. thaliana* и риса приводят к нарушениям широкого круга процессов, таких как прорастание семян, рост побегов и корней, движение устьиц [50].

Выделены и охарактеризованы три субъединицы G-белка бобовых, показано участие G-белков в передаче сигнала засоления и теплового стресса и взаимодействие между G-белком и ФЛС. Взаимодействие между γ -субъединицей G-белка является важным этапом трансдукции сигнала о засолении. G-опосредованная трансдукция сигнала лежит в основе термотолерантности. Для выяснения механизма регуляции этих белков в ответ на солевой и температурные стрессы и их роли в адаптации необходимы дальнейшие исследования [51].

Изменения концентрации ИФ_3 наблюдаются в ответ на повышение тирозинкиназной активности и активации ФЛС во время активации G-белка при поражении растений лимона *Citrus limon* L. грибом *Alternaria alternata*. Установлено, что может происходить активация двух сигнальных путей: одного – с участием G-белка и другого – с участием тирозинкиназно-зависимой ФЛС. Возможность связи между активацией ФЛС и тирозинкиназами требует дальнейшего изучения [52].

Регуляция активности ФЛС ионами кальция. Кальций – основной активатор среди ионов, способных влиять на активность ФЛС. Оптимум концентрации кальция для активности ФЛС фракций

микросом и плазматических мембран клеток *Brassica napus* составляет 10^{-5} – 10^{-4} М [53].

Максимальный гидролиз ФИ(4,5)Ф₂ ФЛС сои наблюдается при оптимуме pH 6,5–7,5 [54]. Гидролиз липидов ФИ-ФЛС картофеля усиливался при концентрации кальция 100 мкМ, специфичность к ФИ(4,5)Ф₂ начинает снижаться после 100 мкМ кальция для ФЛС1, тогда как ФЛС2 и 3 утрачивают специфичность при повышении концентрации кальция от 100 до 10000 мкМ [33].

Ингибирование ФЛС1 *A. thaliana* не угнетает индуцированную АБК экспрессию стрессорных генов *Cor* и *RD29a* [20]. Возможно, что синтез циклической АДФ-рибозы опосредует первичное повышение концентрации цитозольного кальция, приводящее к активации ФИ-ФЛС. Однако это не исключает возможности того, что другие изоформы ФИ-ФЛС даже при низких концентрациях кальция могут инициировать такой первичный ответ параллельно с поступлением кальция в клетку. Как минимум одна изоформа ФИ-ФЛС *A. thaliana*, AtФЛС4, активна в отсутствие кальция [22].

AtФЛС1 преимущественно гидролизует ФИ(4,5)Ф₂. При оптимальных концентрациях кальция гидролиз ФИ(4,5)Ф₂ идет в 100 раз эффективнее, чем ФИ. Максимальный уровень гидролиза наблюдается при 1–50 мкМ кальция, а при его концентрации более 1 мМ преобладает гидролиз ФИ (как и у ФЛС картофеля и сои). Константа Михаелиса-Ментен для ФЛС корней *S. roseus* составляет 0,0518, а субстратная константа – 45,5 мкМ; максимальная скорость реакции – 137,2 пМ/мин [39].

Потребность в Ca²⁺ для активации многих ФИ-ФЛС растений может свидетельствовать о том, что образование ИФ₃ не является первичным ответом на действие стресса, так как необходимо начальное повышение уровня Ca²⁺ для активации ФИ-ФЛС и образования ИФ₃. Рост уровня кальция может происходить за счет его поступления из внеклеточной среды или при действии вторичных мессенджеров, способных высвобождать Ca²⁺, например, циклическая АДФ-рибоза [56, 57], адениндинуклеотид-фосфат никотиновой кислоты [58], сфингозин-1-фосфат [59], пероксид водорода [60] и ИФ₆ [61].

Исследовали регуляцию кальцием пяти изоформ AtФЛС. Показано, что ФЛС2 *A. thaliana* наи-

более чувствительна к действию ионов кальция: при 10 нмоль – 80 % максимальной активности. Чувствительность к микромолярным концентрациям кальция снижается в порядке ФЛС4-ФЛС5- ФЛС1. ФЛС3 наименее реагирует на действие кальция: при 10 нМ – 15 % максимальной активности. ФЛС4 наиболее устойчива при низких концентрациях кальция, ее активность составляет 20 % от максимума в присутствии 2 мМ ЭГТА. Все ФЛС *A. thaliana*, за исключением ФЛС3, максимально активны при 3 мкМ кальция и остаются на том же уровне активности при его концентрации 10 мкМ. В случае микромолярных концентраций кальция активность изоформ ФЛС отличается. ФЛС 2 и 4 достигают максимального уровня активности при 1 мкМ кальция, как и ФЛС5, тогда как ФЛС 1 и 3 нуждаются в больших концентрациях кальция для максимальной активности. Перекрытие экспрессии генов различных ФЛС *A. thaliana* свидетельствует об их функциональной избыточности. Однако возможно также, что регуляция генов и активности каждой ФИ-ФЛС осуществляется по-разному. Высвобождение кальция при действии одной из изоформ ФИ-ФЛС может вызывать активацию других изоформ ФИ-ФЛС. Постоянная экспрессия ФЛС 2 и 3 *A. thaliana* свидетельствует о том, что они могут участвовать в первичном ответе на стресс, вызывая повышение концентрации ионов кальция для индукции экспрессии генов ФЛС 1, 4 и 5 вместе с другими генами, экспрессия которых активируется кальцием [22].

Молекулярные механизмы реализации сигнального пути фосфолипазы С в клетках растений. *Инозитолтрифосфат, инозитолгексафосфат.* Введение ИФ₃ в клетки ведет к повышению концентрации цитоплазматического кальция, закрытию устьиц, набуханию протопластов, ингибированию роста пыльцевых трубок и закрытию плазмодесм [62]. ИФ₃ является вторичным посредником, который высвобождает кальций из внутриклеточных хранилищ клеток растений [14]. Высокоаффинные сайты связывания ИФ₃ у животных локализованы на эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Предполагаемый рецептор ИФ₃ выделен и охарактеризован у растений *Vigna radiata* L. По сравнению с рецепторами клеток животных он

меньше по размеру (110 вместо 250 кДа у животных), а его активность усиливается метаболитами инозитолфосфатов [63]. Доказано существование чувствительных к ИФ_3 кальциевых каналов на невакуолярных мембранах. Однако на сегодняшний день выделить белки каналов, регулируемых ИФ_3 , не удалось. Гены, гомологичные рецепторам ИФ_3 у животных в геноме *A. thaliana*, также не найдены [64]. У растений *Chenopodium rubrum* L. сайты связывания ИФ_3 расположены на ЭР [54]. Показано, что $\text{И}(2,4,5)\text{Ф}_3$ эффективно, хотя и слабее, чем $\text{И}(1,4,5)\text{Ф}_3$, стимулирует высвобождение кальция из внутриклеточных депо [65]. Комплекс ИФ_3 с фитазой, возможно, взаимодействует с рецептором ИФ_3 , что ведет к высвобождению кальция из фракций микросом, тогда как $\text{И}(1,3,4)\text{Ф}_3$ не обладает такой способностью, поскольку не связывается с рецептором [65]. На растениях *Ch. rubrum* L. *in vitro* показано взаимодействие комплекса ИФ_3 -фитазы с рецептором к ИФ_3 , для чего необходимы наномолярные концентрации последнего. Связывание ИФ_3 с высокоаффинным некаталитическим сайтом фитазы ведет к существенным изменениям ее конформации. В результате происходит образование комплекса ИФ_3 -фитаза-рецептор, что вызывает намного более активное высвобождение кальция, чем свободный ИФ_3 [63]. Эти исследования указывают на возможность существования нового сигнального каскада, регулирующего гомеостаз кальция, который опосредован ИФ_6 -фитазной системой в клетках растений [65].

Роль ИФ_6 исследована недостаточно. Обработка клеток устьиц *S. tuberosum* L. и *V. faba* L. абсцизовой кислотой повышает уровень ИФ_6 . Введение ИФ_6 экранирует ингибирующее действие АБК и кальция на калиевые каналы, проводящие калий в клетки [15]. У дрожжей происходит образование мессенджеров ИФ_6 и ФК из ИФ_3 и ДАГ, регулирующих транскрипцию генов и транспорт мРНК [66]. Это объясняет отсутствие генов, кодирующих кальциевые каналы, которые регулируются ИФ_3 , и отсутствие генов протеинкиназы С (ПКС) в геномах этих организмов.

Уровень ИФ_3 жестко регулируется. Инозитолфосфатазы растений существенно отличаются от таковых у животных. У растений *in vivo* [18] и *in*

vitro установлено [67], что $\text{И}(1,4,5)\text{Ф}_3$ гидролизует ферментами инозитол-полифосфат-1'-фосфатазой и инозитол-полифосфат-5'-фосфатазой, в результате чего образуются продукты $\text{И}(4,5)\text{Ф}_2$ и $\text{И}(1,4)\text{Ф}_2$.

Диацилглицерол, диацилглицеролтирофосфат, фосфатидная кислота. Возрастание уровня ДАГ повышает H^+ -АТФазную активность, стимулирует открытие устьиц, изменение клеточного деления, препятствует движению белков сквозь плазмодесмы и усиливает фосфорилирование [67]. Обработка клеток ДАГ *in vivo* ведет к изменению эластичности цитоскелета в результате уменьшения напряжения межвакуолярных филаментов. ДАГ вовлекается также в процесс митоза в клетках тычиночных нитей. Кроме того, ДАГ индуцирует поглощение ионов в изолированных протопластах замыкающих клеток и открытие устьиц [62]. Чем обусловлены такие эффекты: непосредственно действием ДАГ или его метаболитами (такими, например, как жирные кислоты или фосфатидная кислота), не установлено. Большинство наблюдений свидетельствует о фосфорилировании ДАГ сразу же после его образования [62, 69, 70].

Повышение уровня ФК обнаружено в различных типах клеток растений под воздействием осмотического стресса, ранения, патогенов, АБК, оксидативного стресса, влияния Nod-факторов и засухи [70]. При замораживании и воздействии патогенов наблюдается образование 18:3/16:3-ФК из галактолипидов через ДАГ, фосфорилированный киназой ДАГ. Кроме этого, важным генератором ФК является фосфолипаза Д [1, 24].

Выявлено множество белков, способных к связыванию с ФК, таких как MAPK [3], протонные АТФазы [6], протеинкиназа, влияющая на полимеризацию актина [71], НАДФН-оксидаза [72], кальций-зависимая протеинкиназа [73], SNF-связанная протеинкиназа SnRK2.10, регуляторная субъединица протеинфосфатазы 2A RCN1, DRG1, специфические изоформы 14-3-3 белка GRF6 () и GRF8 (), изоформы белка теплового шока, несколько изоформ тубулина и изоформы фосфоенолпируваткарбоксилазы (Ppc1 и Ppc3) [17, 71].

Сигнализация ФК является всегда стремительной и переходной, что обеспечивается механизма-

ми ослабления сигнала [70]. Для большинства сигнальных молекул очень важно восстановление их исходной концентрации. В клетках растений сигнализация ФК ослабляется за счет ее фосфорилирования киназой фосфатидной кислоты (КФК) с образованием диацилглицеролпирофосфата (ДГПФ) [62, 70]. В условиях покоя концентрация ДГПФ в клетках остается очень низкой, и уровень экспрессии ответственного за его появление фермента КФК у всех растений остается постоянным. Это предусматривает тесную связь между образованием ДГПФ и наличием его предшественника ФК. Поскольку образование ДГПФ совпадает со снижением уровня ФК, то КФК может участвовать в ослаблении сигналов ФК. *In vivo* активация КФК обнаружена у дрожжей и во многих растительных системах в ответ на разнообразные физиологические стимулы, включая гиперосмотический стресс, засуху и атаку патогенов. Поэтому не следует исключать возможного участия ДГПФ в качестве вторичного посредника трансдукции сигнала ФЛС в клетках растений [70].

Функции $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ в клетках растений. В клетках животных $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ не только является субстратом ФИ -ФЛС, но и сам может выступать в качестве сигнальной молекулы, влияя на разнообразные биологические процессы в клетках [13]. У высших растений $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ выступает в роли регулятора сигнальных путей. Изменения уровня внутриклеточного $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ наблюдаются в ответ на действие света, холода, гравитимуляцию, оксидативного стресса, активацию G-белков и влияние патогенных элиситоров [74]. Возможные процессы, проходящие с участием $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$, перечислены ниже:

1. Регуляция ионных каналов; $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ считают ключевым регулятором активности ионных каналов, особенно K^+ [75]. Индуцированное солевым стрессом накопление $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ в плазматической мембране растений может отражать эту функцию [13].

2. Образование и текучесть мембран; у млекопитающих во время деления клеток $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ преимущественно локализуется в мембране и необходим для полного завершения цитокинеза для образования активного участка и эффективного слияния

мембран, а также деления клеток [76, 77]. Плотная локализация $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ во время деления растительных клеток может играть подобную роль.

3. Реорганизация цитоскелета; $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ причастен к образованию борозды деления. $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ связывается с актин-регулирующими белками и может влиять на их активность [78, 79, 80]. Кроме того, локальное увеличение уровня $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ может способствовать взаимодействию белков с плазматической мембраной с помощью специфических $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ -связывающих сайтов [79, 81]. Полагают, что растения содержат несколько таких доменов, включая белки, участвующие в организации цитоскелета [1, 13]. Низкий уровень $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ в растениях можно объяснить большей аффинностью белковых доменов к липидам, чем у млекопитающих, или тем, что дополнительные домены белков имеют аффинность к другим компонентам, необходимым для эффективного связывания с плазматической мембраной. Подтверждением таких функций может быть ответ, наблюдаемый во время деления клеток и при солевом стрессе, а также U71322-индуцированные изменения на цитоплазматической сети и влияние на морфологию вакуолей [13]. Во время роста пыльцевых трубок также показано участие $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ в регуляции актинового цитоскелета [30].

4. Мембранный транспорт; в клетках млекопитающих многие полифосфоинозитиды вовлекаются в экзо- и/или эндоцитоз [79, 82]. Хотя накопления $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ в малых везикулярных структурах не наблюдается [84]. Полярный градиент $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ во время роста корневых волосков может отражать события мембранного транспорта [30, 84].

Несмотря на разнообразие сигнальных механизмов ФЛС, минорное количество присутствующее в мембранах высших растений $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ регистрируется во вновь сформированных мембранах делящихся клеток и накапливается в мембранах в ответ на солевой стресс [13]. Уменьшение уровня $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ в замыкающих клетках устьиц в ответ на действие АБК свидетельствует о его участии в сигнальных каскадах АБК, активирующих закрытие устьиц [55]. Показано, что белок, связывающий $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$, ингибирует индуцированное светом открытие устьиц, приводя к падению уровня свобод-

ного $\text{FI}(4,5)\text{P}_2$, уменьшению образования FI_3 и ФК под воздействием фосфолипаз С и Д и останавливает вызванное АБК закрытие устьиц [74]. Зависимое от света возрастание уровня $\text{FI}(4,5)\text{P}_2$ в плазматической мембране может происходить не только за счет усиления интенсивности синтеза, но и в условиях ослабления гидролиза $\text{FI}(4,5)\text{P}_2$ фосфолипазой С. Снижение экспрессии ФЛС уменьшает ингибиторный эффект АБК на прорастание семян и влияние этого фитогормона на экспрессию генов, чувствительных к засухе и холоду [37].

ФИ-ФЛС играет важную роль в трансдукции сигнала АБК в замыкающих клетках устьиц. U-73122 – ингибитор ФЛС – угнетает ответ замыкающих клеток на действие АБК и колебания уровня цитозольного Ca^{2+} [11]. Кроме того, уменьшение уровня ФИ-ФЛС в замыкающих клетках устьиц частично предотвращает ингибирование открытия устьиц АБК [22, 23]. Для изучения участия ФИ-ФЛС в индуцированном светом открывании устьиц использовали U-73122. Замыкающие клетки устьиц после обработки этим ингибитором ускоряют открывание, обусловленное циркадным ритмом. Вопрос о том, происходит ли регуляция ответа ФЛС на действие света тем же путем, что и сигналинг АБК, остается открытым [74].

Таким образом, несмотря на значительные достижения последних лет в изучении кинетики ФИ-ФЛС, экспрессии генов и участия этого фермента в сигнальных каскадах клеток, механизмы реализации сигнального пути, опосредованного фосфолипазой С, требуют дальнейших интенсивных и разносторонних исследований.

Работа выполнена при поддержке Фонда фундаментальных исследований Украины, грант Ф14.4/253-2007.

O. M. Iakovenko, S. V. Kretynin, V. S. Kravets

Molecular basis of phosphoinositide-specific phospholipase C signaling pathways in plant cells

Summary

In plants external stimulus can be perceived and amplified in the cells by functional signaling cascades. Phosphoinositide-specific phospholipase C is an enzyme shown to initiate and provide key events in the cellular responses to extracellular signals. Both substrate and products of phospholipase C are involved in the regulation of numerous processes in plant cells. In this review, we

focused on molecular basis of the phosphoinositide-specific phospholipase C signaling pathways. The data analyzed will help to elucidate the mechanisms responsible for plant's ability to respond to a variety of biotic and abiotic stress signals.

Keywords: phosphoinositide-specific phospholipase C, signal transduction.

O. M. Yakovenko, S. V. Kretynin, V. S. Kravets

Молекулярні основи реалізації сигнального шляху фосфатиділінозитол-специфічної фосфолипази С у клітинах рослин

Резюме

Сигнали довілля можуть сприйматися та посилюватися в клітинах завдяки сигнальним каскадам. У рослин фосфатиділінозитол-специфічна фосфолипаза С (ФЛС) виконує важливу роль у клітинній відповіді на зовнішні стимули. Субстрат та продукти цього ферменту регулюють численні процеси в клітинах рослин. В огляді зосереджено увагу на молекулярних основах реалізації сигнального шляху фосфатиділінозитол-специфічної ФЛС. Аналіз даних може доповнити уявлення про механізми, що лежать в основі здатності рослин реагувати на різноманітні абіотичні та біотичні стреси.

Ключові слова: фосфатиділінозитол-специфічна фосфолипаза С, трансдукція сигналу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meijer H. J. G., Munnik T. Phospholipid-based signaling in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.*—2003.—**54**.—P. 265–306.
2. Hirayama T., Ohto C., Mizoguchi T., Shinozaki K. A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1995.—**92**, N 9.—P. 3903–3907.
3. DeWald D. B., Torabinejad J., Jones C. A., Shope J. C., Cangelosi A. R., Thompson J. E., Prestwich G. D., Hama H. Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis* // *Plant Physiol.*—2001.—**126**, N 2.—P. 759–769.
4. Smolenska-Sym G., Kacperska A. Inositol 1,4,5-trisphosphate formation in leaves of winter oilseed rape plants in response to freezing, tissue water potential and abscisic acid // *Physiol. Plant.*—1996.—**96**, N 4.—P. 692–698.
5. Vergnolle C., Vaultier M.-N., Taconnat L., Renou J.-P., Kader J.-C., Zachowski A., Ruelland E. The cold-induced early activation of phospholipases C and D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in *Arabidopsis* suspension cell // *Plant Physiol.*—2005.—**139**, N 3.—P. 1217–1233.
6. Takahashi S., Katagiri T., Hirayama T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture // *Plant Cell Physiol.*—2001.—**42**, N 2.—P. 214–222.
7. Kim Y. J., Kim J. E., Lee J.-H., Lee M. H., Jung H. W., Bahk Y. Y., Hwang B. K., Hwang I., Kim W. T. The Vr-PLC3 gene encodes a putative plasma membrane-localized phosphoinositide-specific phospholipase C whose expression is induced by abiotic stress in mung bean (*Vigna radiata* L.) // *FEBS Lett.*—2004.—**556**, N 1–3.—P. 127–136.

8. *Zonia L., Munnik T.* Osmotically induced cell swelling versus cell shrinking elicits specific changes in phospholipid signals in tobacco pollen tubes // *Plant Physiol.*–2004.–**134**, N 2.–P. 813–823.
9. *Das S., Hussain A., Bock C., Keller W. A., Georges F.* Cloning of *Brassica napus* phospholipase C2 (BnPLC2), phosphatidylinositol 3-kinase (BnVPS34) and phosphatidylinositol synthase1 (BnPtdIns S1) – comparative analysis of the effect of abiotic stresses on the expression of phosphatidylinositol signal transduction-related genes in *B. napus* // *Planta.*–2005.–**220**, N 5.–P. 777–784.
10. *Assmann S. M., Shimazaki K.* The multisensory guard cell. Stomatal response to blue light and abscisic acid // *Plant Physiol.*–1999.–**119**, N 3.–P. 809–815.
11. *Staxen I., Pical C., Montgomery L. T., Gray J. E., Hetherington A. M., McAinsh M. R.* Abscisic acid induces phosphoinositide-specific phospholipase C-dependent oscillations in guard cell cytosolic free calcium // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*–1999.–**96**, N 4.–P. 1779–1784.
12. *Repp A., Mikami K., Mittmann F., Hartmann E.* Phosphoinositide specific phospholipase C is involved in cytokinin and gravity responses in the moss *Physcomitrella patens* // *Plant J.*–2004.–**40**, N 2.–P. 250–259.
13. *Leeuwen W., Vermeer J. E. M., Theodorus W. J., Gadella Jr., Munnik T.* Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole *Arabidopsis* seedlings // *Plant J.*–2007.–**52**, N 6.–P. 1014–1026.
14. *Alexander J., Lassalles J. P., Kado R. T.* Opening of Ca²⁺ channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-trisphosphate // *Nature.*–1990.–**343**.–P. 567–570.
15. *Lemtiri-Chlieh F., MacRobbie E. A. C., Webb A. A. R., Manison N. F., Brownlee C., Skepper J. N., Chen J., Prestwich G., Brearley C. A.* Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*–2003.–**100**, N 17.–P. 10091–10095.
16. *Munnik T., Meijer H. J. G.* Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants // *FEBS Lett.*–2001.–**498**, N 2–3.–P. 172–178.
17. *Testerink C., Munnik T.* Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants // *Trends Plant Sci.*–2005.–**10**, N 8.–P. 368–375.
18. *Brearley C. A., Hanke D. E.* Inositol phosphates in barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone tissue are stereochemically similar to the products of breakdown of InsP6 *in vitro* by wheatbran phytase // *Biochem. J.*–1996.–**318**, N 1.–P. 279–286.
19. *Perera I. Y., Hung C. Y., Brady S., Muday G. K., Boss W. F.* A universal role for inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling in plant gravitropism // *Plant Physiol.*–2006.–**140**, N 2.–P. 746–760.
20. *Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.* Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants // *Mol. Genet. and Genom.*–1993.–**236**, N 2–3.–P. 331–340.
21. *Horowitz L. F., Hirdes W., Suh B. C., Hilgemann D. W., Mackie K., Hille B.* Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca requirement and regulation of M current // *J. Gen. Physiol.*–2005.–**126**, N 3.–P. 243–262.
22. *Hunt L., Otterhag L., Lee J. C., Lasheen T., Hunt J., Seki M., Shinozaki K., Sommarin M., Gilmour D. J., Pical C., Gray J. E.* Gene-specific expression and calcium activation of *Arabidopsis thaliana* phospholipase C isoforms // *New Phytologist.*–2004.–**162**, N 3.–P. 643–654.
23. *Mills L. N., Hunt L., Leckie C. P., Aitken F. L., Wentworth M., McAinsh M. R., Gray J. E., Hetherington A. M.* The effects of manipulating phospholipase C on guard cell ABA-signalling // *J. Exp. Biol.*–2004.–**55**, N 395.–P. 199–204.
24. *Hunt L., Mills L. N., Pical C., Leckie C. P., Aitken F. L., Kopka J., Mueller-Roeber B., McAinsh M. R., Hetherington A. M., Gray J. E.* Phospholipase C is required for the control of stomatal aperture by ABA // *Plant J.*–2003.–**34**, N 1.–P. 47–55.
25. *Rebecchi M. J., Pentyala S. N.* Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C // *Phys. Rev.*–2000.–**80**, N 4.–P. 1291–1335.
26. *Cao Z., Zhang J., Li Y., Xu X., Liu G., Madan K. B., Yang H., Ren D.* Preparation of polyclonal antibody specific for AtPLC4, an *Arabidopsis* phosphatidylinositol-specific phospholipase C in rabbits // *Protein Exp. and Purification.*–2007.–**52**, N 2.–P. 306–312.
27. *Swann L., Larman M. G., Saunders C. M., Lai F. A.* The cytosolic sperm factor that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLC // *Reproduction* – 2004.–**127**, N 4.–P. 431–439.
28. *Otterhag L., Sommarin M., Pical C.* N-terminal EF-hand-like domain is required for phosphoinositide-specific phospholipase C activity in *Arabidopsis thaliana* // *FEBS Lett.*–2001.–**497**, N 2–3.–P. 165–170.
29. *Mueller-Roeber B., Pical C.* Inositol phospholipid metabolism in *Arabidopsis*. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C // *Plant Physiol.*–2002.–**130**, N 1.–P. 22–46.
30. *Dowd P. E., Coursol S., Skirpan A. L., Kao T. H., Gilroy S.* Petunia phospholipase C1 is involved in pollen tube growth // *The Plant Cell.*–2006.–**18**, N 12.–P. 1438–1453.
31. *Suh P. G., Ryu S. H., Moon K. H., Suh H. W., Rhee S. G.* Cloning and sequence of multiple forms of phospholipase C // *Cell.*–1988.–**54**, N 9.–P. 161–169.
32. *Shi J., Gonzales R. A., Bhattacharyya M. K.* Characterization of a plasma membrane-associated phosphoinositide-specific phospholipase C from soybean // *Plant J.*–1995.–**8**, N 3.–P. 381–390.
33. *Kopka J., Pical C., Gray J. E., Muller-Roeber B.* Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato // *Plant Physiol.*–1998.–**116**, N 1.–P. 239–250.
34. *Xu X., Cao Z., Liu G., Bhattacharyya M. K., Ren D.* Cloning and expression of AtPLC6, a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C in *Arabidopsis thaliana* // *Chin. Sci. Bull.*–2004.–**49**.–P. 567–573.
35. *Tasma M., Volker B., Steven A. W., Madan K. B.* Expression and evolution of the phosphoinositide-specific phospholipase C gene family in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol. and Biochem.*–2008.–**46**, N 7.–P. 627–637.
36. *Hirayama T., Mitsukawa N., Shibata D., Shinozaki K.* AtPLC2, a gene encoding phosphoinositide-specific phospholipase C, is constitutively expressed in vegetative and floral tissues in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol.*–1997.–**34**, N 1.–P. 175–180.
37. *Sanchez J. P., Chua N. H.* *Arabidopsis* PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals // *Plant Cell.*–2001.–**13**.–P. 1143–1154.
38. *Wang C. R., Yang A. F., Yue G. D., Gao Q., Yin H. Y., Zhang J.-R.* Enhanced expression of phospholipase C 1 (ZmPLC1)

- improves drought tolerance in transgenic maize // *Planta*.—2008.—**227**, N 5.—P. 1127–1140.
39. *Hernandez-Sotomayor S. M. T., Santos-Briones C. De Los, Munoz-Sanchez J. A., Loyola-Vargas V. M.* Kinetic analysis of phospholipase C from *Catharanthus roseus* transformed roots using different assays // *Plant Physiol.*—1999.—**120**, N 4.—P. 1075–1081.
 40. *Rebecchi M., Boguslavsky V., Boguslavsky L., McLaughlin S.* Phosphoinositide-specific phospholipase C-delta1: effect of monolayer surface pressure and electrostatic surface potentials on activity // *Biochemistry*.—1992.—**31**, N 51.—P. 12748–12753.
 41. *James S. R., Paterson A., Harden T. K., Demel R. A., Downes C. P.* Dependence of the activity of phospholipase C on surface pressure and surface composition in phospholipid monolayers and its implications for their regulation // *Biochemistry*.—1997.—**36**, N 4.—P. 848–855.
 42. *James S. R., Paterson A., Harden T. K., Downes C. P.* Kinetic analysis of phospholipase C isoforms using phospholipid-detergent mixed micelles // *J. Biol. Chem.*—1995.—**270**, N 20.—P. 11872–11881.
 43. *Hartog M., Verhoef N., Munnik T.* Nod factor and elicitors activate different phospholipid signaling pathways in suspension-cultured alfalfa cells // *Plant Physiol.*—2003.—**132**, N 1.—P. 311–317.
 44. *Melin P. M., Pical C., Jergil B., Sommarin M.* Polyphosphoinositide phospholipase C in wheat root plasma membranes. Partial purification and characterization // *Biochim. et Biophys. Acta.*—1992.—**1123**, N 2.—P. 163–169.
 45. *Huang C.-H., Tate B. F., Crain R. C., Cote G. G.* Multiple phosphoinositide-specific phospholipases C in oat roots: characterization and partial purification // *Plant J.*—1995.—**8**, N 2.—P. 257–267.
 46. *Munnik T., Arisz S. A., de Vrije T., Musgrave A.* G protein activation stimulates phospholipase D signaling in plants // *Plant Cell.*—1995.—**7**, N 12.—P. 2197–2210.
 47. *Colucci G., Apone F., Alyshmerni N., Chalmers D., Chrispeels M. J.* GCR1, the putative Arabidopsis G protein-coupled receptor gene is cell cycle-regulated, and its overexpression abolishes seed dormancy and shortens time to flowering // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2002.—**96**, N 3.—P. 7575–7580.
 48. *Pandey S., Chen J. G., Jones A. M., Assmann S. M.* G-protein complex mutants are hypersensitive to abscisic acid regulation of germination and postgermination development // *Plant Physiol.*—2006.—**141**, N 2.—P. 243–256.
 49. *Wang X. Q., Ullah H., Jones A. M., Assmann S. M.* G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells // *Science.*—2001.—**292**, N 5524.—P. 2070–2072.
 50. *Ullah H., Chen J. G., Young J. C., Im K. H., Sussman M. R., Jones A. M.* Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in Arabidopsis // *Science.*—2001.—**292**, N 5524.—P. 2066–2069.
 51. *Misra S., Wu Y., Venkataraman G., Sopory S. K., Tuteja N.* Heterotrimeric G-protein complex and G-protein-coupled receptor from a legume (*Pisum sativum*): role in salinity and heat stress and cross-talk with phospholipase C // *Plant J.*—2007.—**51**, N 4.—P. 656–669.
 52. *Ortega X., Perez L. M.* Participation of the phosphoinositide metabolism in the hypersensitive response of *Citrus limon* against *Alternaria alternata* // *Biol. Res.*—2001.—**34**, N 1.—P. 43–50.
 53. *Novotna Z., Valentova O., Martinec J., Feltl T., Nokhrina K.* Study of phospholipase D and C in maturing and germinating seeds of *Brassica napus* // *Biochem. Soc. Trans.*—2000.—**28**, N 6.—P. 817–818.
 54. *Lee Y. C., Suh S. L., Assmann S., Kelleher J., Crain C.* Abscisic acid-induced phosphoinositide turnover in guard cells protoplasm of *Vicia faba* // *Plant Physiol.*—1996.—**110**, N 3.—P. 987–996.
 55. *Martinec J., Feltl T., Scanlon C. H., Lumsden P. J., Machackova I.* Subcellular localization of a high affinity binding site for D-myo-inositol-1,4,5-trisphosphate from *Chenopodium rubrum* // *Plant Physiol.*—2000.—**124**, N 1.—P. 475–483.
 56. *Wu Y., Kuzma J., Marechal E., Graeff R., Lee H. C., Foster R., Chua N. H.* Abscisic acid signalling through cyclic ADP-ribose in plants // *Science.*—1997.—**278**.—P. 2126–2129.
 57. *Leckie C. P., McAinsh M. R., Allen G. J., Sanders D., Hetherington A. M.* Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1998.—**95**, N 26.—P. 15837–15842.
 58. *Navazio L., Bewell M. A., Siddiqua A., Dickinson G. D., Gallione A., Sanders D.* Calcium release from the endoplasmic reticulum of higher plants elicited by the NADP metabolite nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—**97**, N 15. P. 8693–8698.
 59. *Ng C. K., Carr K., McAinsh M. R., Powell B., Hetherington A. M.* Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate // *Nature.*—2001.—**410**, N 6828.—P. 596–599.
 60. *McAinsh M. R., Clayton H., Mansfield T. A., Hetherington A. M.* Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress // *Plant Physiol.*—1996.—**111**, N 4.—P. 1031–1042.
 61. *Lemtiri-Chlieh F., MacRobbie E. A. C., Brearley C. A.* Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K⁺-inward rectifying conductance in guard cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—**97**, N 15.—P. 8687–8692.
 62. *Munnik T., Irvine R. F., Musgrave A.* Phospholipid signalling in plants // *Biochim. et Biophys. Acta.*—1998.—**1389**, N 3.—P. 222–272.
 63. *Dasgupta S., Dasgupta D., Chatterjee A., Biswas S., Biswas B. B.* Conformational changes in plant Ins(1,4,5)P₃ receptor on interaction with different myo-inositol trisphosphates and its effect on Ca²⁺ release from microsomal fraction and liposomes // *Biochem. J.*—1997.—**321**, N 2.—P. 355–360.
 64. *Stevenson J. M., Perera I. Y., Heilmann I., Persson S., Boss W. F.* Inositol signaling and plant growth // *Trends Plant Sci.*—2000.—**5**, N 8.—P. 252–258.
 65. *Samanta S., Dalal B., Biswas S., Biswas B. B.* Myo-inositol tris-phosphate-phytase complex as an elicitor in calcium mobilization in plants // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1993.—**191**, N 2.—P. 427–434.
 66. *York J. D., Guo S., Odom A. R., Spiegelberg B. D., Stolz L. E.* An expanded view of inositol signaling // *Adv. Enzyme Regul.*—2001.—**41**.—P. 57–71.
 67. *Drrebak B. K., Watkins P. A. C., Chattaway J. A., Roberts K, Dawson A. P.* Metabolism of inositol(1,4,5)trisphosphate by a soluble enzyme fraction from pea (*Pisum sativum*) roots // *Plant Physiol.*—1991.—**95**, N 2. —P. 412–419.
 68. *Drrebak B. K., Watkins P. A. C.* Inositol(1,4,5)trisphosphate production in plant cells-stimulation by the venom peptides, mellitin and mastoparan // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1994.—**205**, N 1.—P. 739–745.

69. Van der Luit A. H., Piatti T., van Doorn A., Musgrave A., Felix G., Boller T., Munnik T. Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate // *Plant Physiol.*–2000.–**123**, N 4.–P. 1507–1516.
70. Munnik T. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger // *Trends Plant Sci.*–2001.–**6**, N 5.–P. 227–233.
71. Lee S., Park J., Lee Y. Phosphatidic acid induces actin polymerization by activating protein kinases in soybean cells // *Mol. Cell.*–2003.–**15**, N 3.–P. 313–319.
72. Sang Y., Cui D., Wang X. Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.*–2001.–**126**, N 4.–P. 1449–1458.
73. Farmer P. K., Choi J. H. Calcium and phospholipid activation of a recombinant calcium-dependent protein kinase (DcCPK1) from carrot (*Daucus carota* L.) // *Biochim. et Biophys. Acta.*–1999.–**1434**, N 1.–P. 6–17.
74. Lee Y., Lee Y. Roles of phosphoinositides in regulation of stomatal movements // *Plant Signaling and Behavior.*–2008.–**3**, N 4.–P. 211–213.
75. Suh P. G., Ryu S. H., Moon K. H., Suh H. W., Rhee S. G. Cloning and sequence of multiple forms of phospholipase C // *Cell.*–1988.–**54**, N 2.–P. 161–169.
76. Brill J. A., Hime G. R., Scharer-Schuksz M., Fuller M. T. A phospholipid kinase regulates actin organization and intercellular bridge formation during germline cytokinesis // *Development.*–2000.–**127**, N 17.–P. 3855–3864.
77. Emoto K., Inadome H., Kanaho Y., Narumiya S., Umeda M. Local change in phospholipid composition at the cleavage furrow is essential for completion of cytokinesis // *J. Biol. Chem.*–2005.–**280**, N 45.–P. 37901–37907.
78. Carlton J. G., Cullen P. J. Coincidence detection in phosphoinositide signaling // *Trends Cell Biol.*–2005.–**15**, N 10.–P. 540–547.
79. Hilpela P., Vartiainen M. K., Lappalainen P. Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3 // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*–2004.–**282**.–P. 117–163.
80. Balla T. Imaging and manipulating phosphoinositides in living cells // *J. Physiol.*–2007.–**582**, N 3.–P. 927–937.
81. De Matteis M. A., Di Campli A., Godi A. The role of the phosphoinositides at the Golgi complex // *Biochim. et Biophys. Acta.*–2005.–**1744**, N 74.–P. 396–405.
82. Haucke V. Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis // *Biochem. Soc. Trans.*–2005.–**33**, N 6.–P. 1285–1289.
83. Vermeer J. E., van Leeuwen W., Tobena-Santamaria R., Laxalt A. M., Jones D. R., Divecha N., Gadella T. W., Jr., Munnik T. Visualization of PtdIns3P dynamics in living plant cells // *Plant J.*–2006.–**47**, N 5.–P. 687–700.
84. Vincent P., Chua M., Nogue F., Fairbrother A., Mekeel H., Xu Y., Allen N., Bibikova T. N., Gilroy S., Bankaitis V. A. A Sec14p-nodulin domain phosphatidylinositol transfer protein polarizes membrane growth of *Arabidopsis thaliana* root hairs // *J. Cell Biol.*–2005.–**168**, N 5.–P. 801–812.
85. Song M. F., Han Y. Z. Molecular cloning and characterization of a phosphoinositide-specific phospholipase C from *Torenia fournieri* // *Russ. J. Plant Physiol.*–2008.–**55**, N 3.–P. 385–389.
86. Zhai S., Sui Z., Yang A., Zhang J. Characterization of a novel phosphoinositide-specific phospholipase C from *Zea mays* and its expression in *Escherichia coli* // *Biotechnol. Lett.*–2005.–**27**, N 11.–P. 799–804.

УДК 581.19

Надійшла до редакції 20.09.08