

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 дупликации генов. Эволюция семейства генов *AtФЛС*, возможно, прошла в несколько этапов. Тандем генов *AtФЛС8* и *AtФЛС9* образовался при локальной дупликации 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 дупликации на хромосоме 5 с последующей дупликацией 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 α -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 довели 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