



УДК 577.17.05

М. В. Деревянчук, Р. П. Литвиновская, С. С. Черноморченко,
академик НАН Беларуси В. А. Хрипач, В. С. Кравец,
академик НАН Украины В. П. Кухарь

Влияние brassinosteroidов на формирование фосфатидной кислоты *in vivo* у растений пшеницы

Изучено in vivo влияние brassinosteroidов (БС) на формирование клеточного липидного мессенджера — фосфатидной кислоты (ФК) в клетках растений. Обнаружено, что БС значительно увеличивают уровень ФК уже после 20 мин обработки тканей растений раствором 24-эпибрасинолида. Ингибирование 1,2-диацилглицерокиназ снижает интенсивность накопления ФК и увеличивает пул диацилглицерола в ответ на действие БС. БС активируют не только процессы формирования ФК, но и ее дефосфорилирование в диацилглицерол фосфатазами ФК. Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении БС в регуляцию уровня липидных сигнальных посредников клеток растений, в частности ФК.

Браassinosterоиды (БС) — класс стероидных фитогормонов, которые регулируют ключевые этапы роста и развития растений и процессы адаптации к действию стрессовых факторов [1–3]. Фосфатидная кислота (ФК) — один из ключевых сигнальных посредников липидной природы, принимающий участие в формировании сигнальных систем клеток при инициации ответа растений к действию ряда факторов среды [4, 5]. Известно, что БС могут влиять на активность фосфатидилхолингидролизующих фосфолипаз С (ФХ-ФЛС), которые используют в качестве субстрата фосфатидилхолин (ФХ). Так, в культуре клеток табака 24-эпибрасинолид (ЭБЛ) увеличивает уровень липидного вторичного посредника диацилглицерола (ДАГ), который является продуктом метаболизма ФХ ФХ-ФЛС [6]. ФК, как сигнальный мессенджер, образуется в клетках в результате гидролиза фосфолипидов, например ФХ, фосфолипазой D (ФЛD). ФК также может формироваться с ДАГ 1,2-диацилглицеролкиназой (ДАГ-киназа). ДАГ, в свою очередь, образуется в результате гидролиза ФХ ФХ-ФЛС. Таким образом, ФК может быть образована из ФХ в результате гидролиза ФЛD или расщепления ФХ ферментом ФХ-ФЛС с последующим фосфорилированием продукта ДАГ-киназой. ФК может принимать участие в трансдукции сигнала БС, связывая сигнальный компонент — протеинфосфатазу 2A [7, 8].

© М. В. Деревянчук, Р. П. Литвиновская, С. С. Черноморченко, В. А. Хрипач, В. С. Кравец,
В. П. Кухарь, 2015

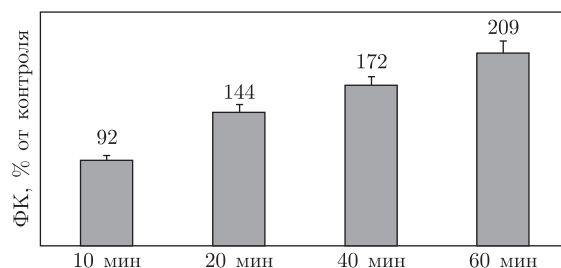


Рис. 1. Влияние ЭБЛ ($2 \cdot 10^{-7}$ М) на процессы формирования ФК в корнях растений пшеницы

Целью настоящего исследования было изучение влияния БС на процессы формирования ФК.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования были корни этиолированных трехсуточных проростков растений пшеницы (*Triticum aestivum*). Использованные реактивы и материалы: ЭБЛ, химически синтезированный в лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси, ингибитор 1,2-диацилглицеролкиназ R59 022 (“Sigma”, США), ингибитор фосфатаз *N*-этилмалеимид (НЭМ) (“Sigma”, США), силикагелевые пластинки 60G F254 (“Merck”, Германия), фосфатидилхолин-BODIPY (“Invitrogen”, США), остальные реактивы были производства России и Украины квалификации “х. ч.”.

Мечение тканей растений с помощью флуоресцентных липидов BODIPY. Мечение тканей растений проводили в соответствии с D. Kocourková с соавт. [9]. Корни растений инкубировали в водном растворе фосфатидилхолина-BODIPY (0,66 мкг/мл) в течение 20 мин при 24 °С. Навеска тканей составляла 100 мг корней на 1 мл раствора фосфатидилхолина-BODIPY.

Экстракция и разделение липидов методом тонкослойной хроматографии. Экстракцию фосфолипидов проводили смесью метанол:хлороформ 2 : 1 (v/v) согласно методу [10]. К полученному экстракту добавляли 0,15 М KCl для создания двухслойной среды. Отбирали нижнюю фазу хлороформа с липидами и упаривали ее под струей азота. Реэкстракцию упаренного остатка проводили в 20 мкл этанола. Липиды разделяли на силикагелевых пластинках размером 100 × 200 мм. В качестве подвижной фазы использовали верхнюю органическую фазу смеси этилацетат/изооктан/муравьиная кислота/вода с объемными соотношениями 12 : 2 : 3 : 10. Количественный анализ зон отдельных фосфолипидов проводили на фосфоимеджсканере PharosFX (“Biorad”, США). Продукты были идентифицированы в соответствии с P. Rejchag с соавт. [11] и стандартами липидов.

Результаты исследований и обсуждение. В результате проведенных экспериментов нами отмечено резкое увеличение уровня ФК в корнях растений пшеницы, обработанных раствором ЭБЛ, после 20–60 мин действия гормона (рис. 1). Для исследования путей формирования ФК был использован ингибиторный метод с использованием специфического ингибитора ДАГ-киназ (ЕС 2.7.1.107) R59 022. Этот подход позволяет оценить изменения уровня клеточной ФК при блокировании пути формирования ФК через ФХ-ФЛС при использовании соответствующего субстрата — ФХ. Для исследования влияния процессов расщепления ФК фосфатазами фосфатидной кислоты (ФФК, ЕС 3.1.3.4) был использован ингибитор ФФК *N*-этилмалеимид.

Обработка растений ингибитором ДАГ-киназ R59 022 снижала уровень ФК на 15% в контрольных растениях. В условиях одновременной обработки растений ингибитором и ЭБЛ

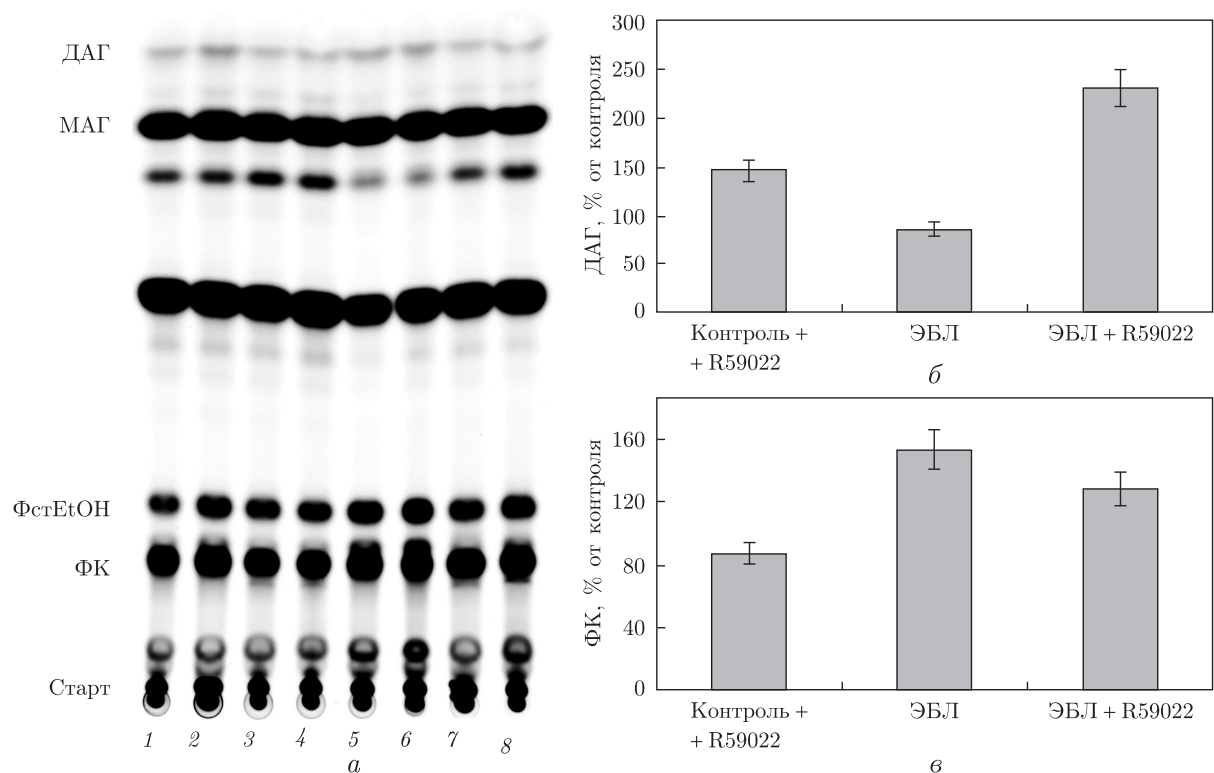


Рис. 2. Формирование ФК у растений пшеницы, обработанных ингибитором 1,2-диацилглицеролкиназ R59022.

a — хроматограмма липидов с корней растений пшеницы: 1, 2 — контрольные растения 20 мин + R59022 (150 мкМ) + 0,6% этанол; 3, 4 — контрольные растения 20 мин + 0,6% этанол; 5, 6 — ЭБЛ ($2 \cdot 10^{-7}$ М) 20 мин + R59022 (150 мкМ) + 0,6% этанол; 7, 8 — ЭБЛ ($2 \cdot 10^{-7}$ М) 20 мин + 0,6% этанол.

б, в — влияние ЭБЛ на процессы формирования ДАГ (*б*) и ФК (*в*) в корнях пшеницы, обработанных R59022.

ДАГ — диацилглицерол, МАГ — моноацилглицерол, ФстEtОН — фосфатидилэтанол, ФК — фосфатидная кислота

уровень ФК снижался почти в 2 раза по сравнению с таковым в растениях без обработки ингибитором (рис. 2). В то же время при обработке растений ЭБЛ и R59022 уровень ДАГ возрастал почти в 3 раза (см. рис. 2). Это свидетельствует об активном участии ДАГ-киназ в формировании ФК в ответ на обработку БС. Ингибирование фермента приводило к накоплению высокого уровня ДАГ, который является субстратом ДАГ-киназ (см. рис. 2). Это указывает на активацию brassinosteroids ФХ-ФЛС образования ФК, поскольку возрастание уровня ДАГ из меченого ФХ в условиях нашего эксперимента может обеспечивать только ФХ-ФЛС.

При обработке растений ЭБЛ и ингибитором ФФК НЭМ уровень ФК увеличивался почти в 2 раза по сравнению с растениями, обработанными лишь ЭБЛ (рис. 3). Одновременно с увеличением уровня ФК мы наблюдали увеличение уровня фосфатидилэтанола (ФстEtОН), который является специфическим продуктом ФЛД в результате реакции трансфосфатидилирования (см. рис. 3). Это свидетельствует о том, что формирование ФК в ответ на обработку ЭБЛ происходит также при участии ФЛД. При этом ингибирование процессов дефосфорилирования ФК фосфатазой фосфатидной кислоты увеличивало пул

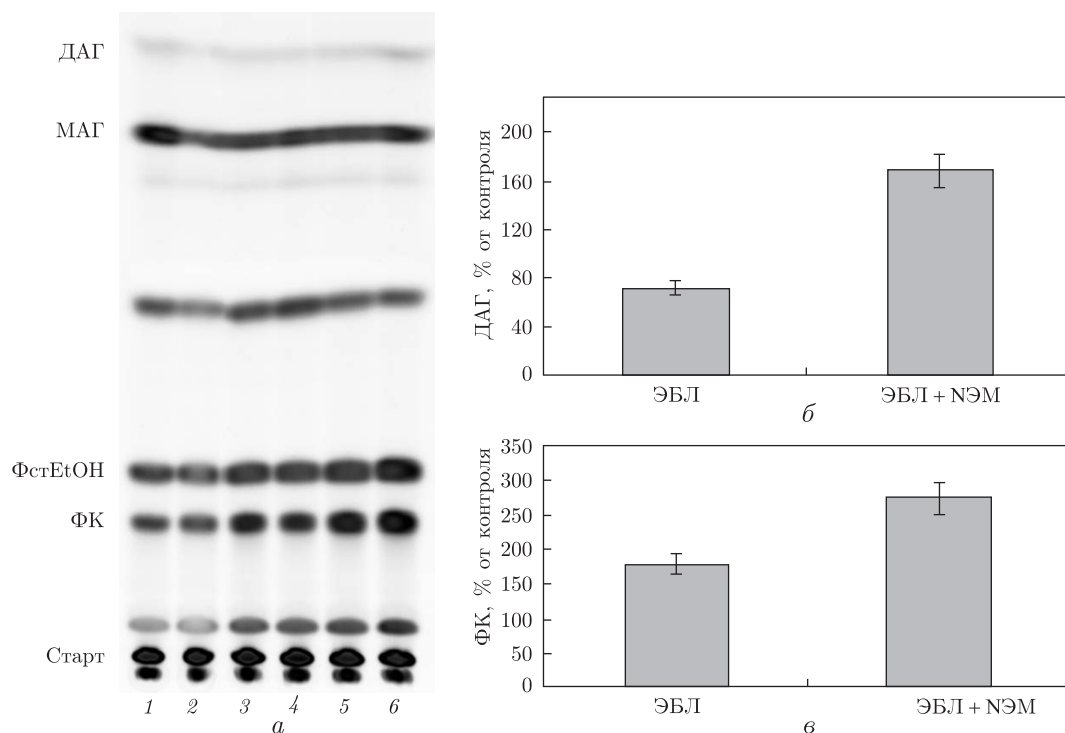


Рис. 3. Формирование ФК у растений пшеницы, обработанных ингибитором ФФК НЭМ.
a — хроматограмма липидов с корней пшеницы: 1, 2 — контрольные растения 20 мин + 0,6% этанол; 3, 4 — ЭБЛ ($2 \cdot 10^{-7}$ М) 20 мин + 0,6% этанол; 5, 6 — ЭБЛ ($2 \cdot 10^{-7}$ М) 20 мин + НЭМ (1 мМ) + 0,6% этанол.
б, в — влияние ЭБЛ на процессы формирования ДАГ (*б*) и ФК (*в*) в корнях пшеницы, обработанных НЭМ. ДАГ — диацилглицерол, МАГ — моноацилглицерол, ФстEtОН — фосфатидилэтанол, ФК — фосфатидная кислота

ДАГ на 70% в растениях, обработанных БС и НЭМ (см. рис. 3). Следует отметить, что ДАГ, образованный ФФК по ФЛД пути, может структурно отличаться от ДАГ, сформированного ФХ-ФЛС, что, в свою очередь, может определять их разные функции [12]. Процессы дефосфорилирования ФК фосфатазами фосфатидной кислоты, чувствительными к НЭМ, и фосфорилирования диацилглицерола ДАГ-киназами имеют разную внутриклеточную локализацию, что, вероятно, указывает на различные сигнальные пути [13]. Этим, вероятно, объясняются процессы быстрого взаимопревращения ФК и ДАГ в ответ на обработку ЭБЛ.

Как уже было замечено ранее, ФК вовлечена в регуляцию трансдукции сигнала БС через процессы фосфорилирования/дефосфорилирования БС-зависимых BZR1 факторов транскрипции генов [7, 8]. В свою очередь, BZR1 регулируют экспрессию генов ФЛД и ДАГ-киназ, непосредственно влияя на дальнейшие процессы образования ФК в растениях [14]. Так как ФК образуется уже после 20 мин действия БС (см. рис. 1), а индукция генов фосфолипаз и ДАГ-киназ происходит через значительно больший промежуток времени [14], мы предполагаем, что первичное влияние БС на процессы формирования ФК возникает в результате быстрой активации ферментов фосфолипидной сигнализации при рецепции сигнала гормона на плазматической мембране клетки.

Наши результаты указывают на вовлечение фосфолипидной сигнализации, в частности ФХ-ФЛС, ФЛД и ДАГ-киназ, в процесс формирования ФК при трансдукции сигнала БС

в клетке растений, что может указывать на регуляцию ряда других клеточных процессов БС посредством фосфолипидной сигнализации.

Работа выполнена при поддержке Государственного фонда фундаментальных исследований Украины (проекты № 54.4/026-2013), НАН Украины (проект № 2.1.10.32-10) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект №X13 K-094).

1. Khripach V. et al. Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century // Ann. Bot. – 2000. – **86**. – P. 441–447.
2. Kagale S. et al. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses // Planta. – 2007. – **225**. – P. 353–364.
3. Kaur R. et al. Effect of 28-homobrassinolide on susceptible and resistant cultivars of tomato after nematode inoculation // Plant Growth Regul. – 2013. – **71**. – P. 199–205.
4. Villasuso A. L. et al. Differences in phosphatidic acid signalling and metabolism between ABA and GA treatments of barley aleurone cells // Plant Physiol. and Biochem. – 2013. – **65**. – P. 1–8.
5. McLoughlin F., Testerink C. Phosphatidic acid, a versatile water-stress signal in roots // Front. Plant Sci. – 2013. – **4**. – P. 525.
6. Wimalasekera R. et al. Plant Phosphatidylcholine-Hydrolyzing Phospholipases C NPC3 and NPC4 with Roles in Root Development and Brassinolide Signaling in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Plant. – 2010. – **3**. – P. 610–625.
7. Tang W. et al. PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1 // Nat. Cell Biol. – 2011. – **13**. – P. 124–131.
8. Di Rubbo S. et al. PP2A phosphatases: the “on-off” regulatory switches of brassinosteroid signaling // Sci. Signal. – 2011. – **4**. – P. pe25.
9. Kocourková D. et al. The phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C NPC4 plays a role in response of *Arabidopsis* roots to salt stress // J. Exp. Bot. – 2011. – **62**. – P. 3753–3763.
10. Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. – 1959. – **37**. – P. 911–917.
11. Pejchar P. et al. Aluminium ions inhibit the formation of diacylglycerol generated by phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C in tobacco cells // New Phytologist. – 2010. – **188**. – P. 150–160.
12. Pettitt T. R. et al. Diacylglycerol and Phosphatidate Generated by Phospholipases C and D, Respectively, Have Distinct Fatty Acid Compositions and Functions: phospholipase D-derived diacylglycerol does not activate protein kinase C in porcine aortic endothelial cells // J. Biol. Chem. – 1997. – **272**. – P. 17354–17359.
13. Eastmond P. J. et al. Phosphatidic acid phosphohydrolase 1 and 2 Regulate Phospholipid Synthesis at the Endoplasmic Reticulum in *Arabidopsis* // The Plant Cell Online. – 2010. – **22**. – P. 2796–2811.
14. Wu P. et al. Phosphatidic Acid Regulates BZR1 Activity and Brassinosteroid Signal of *Arabidopsis* // Mol. Plant. – 2014. – **7**. – P. 445–447.

Институт биоорганической химии
и нефтехимии НАН Украины, Киев
Институт биоорганической химии
НАН Беларуси, Минск

Поступило в редакцию 16.12.2014

М. В. Дерев'янчук, Р. П. Литвіновська, С. С. Чорноморченко,
академік НАН Білорусі В. А. Хрипач, В. С. Кравець,
академік НАН України В. П. Кухар

Вплив брасиностероїдів на формування фосфатидної кислоти *in vivo* у рослин пшениці

Вивчено *in vivo* вплив брасиностероїдів (БС) на формування клітинного сигнального мессенджера — фосфатидної кислоти (ФК) в клітинах рослин. Встановлено, що БС значно індукують зростання рівня ФК вже після 20 хв обробки рослин розчином 24-епібрасиноліду. Інгібування 1,2-діацилгліцеролкінази знижує інтенсивність накопичення ФК і збільшує пул

діацилгліцеролу у відповідь на дію БС. БС активують не тільки процеси формування ФК, але і її дефосфорильовання в діацилгліцерол фосфатазами ФК. Отримані результати свідчать про залучення БС в регуляцію рівня ліпідних сигнальних посередників клітин рослин, зокрема ФК.

M. V. Derevyanchuk, R. P. Litvinovskaya, S. S. Chornomorchenko,
Academician of the NAS of Belarus **V. A. Khripach, V. S. Kravets,**
Academician of the NAS of Ukraine **V. P. Kukhar**

Influence of brassinosteroids on the formation of phosphatidic acid *in vivo* in wheat

The effect of brassinosteroids (BRs) on the formation of a lipid messenger, phosphatidic acid (PA), is investigated in vivo. It is observed that BRs significantly increase the PA level in 20 min after the treatment of plant tissues with 24-epibrassinolide. Inhibition of 1,2-diacylglycerol kinases decreases the PA accumulation and increases the diacylglycerol pool in response to BRs. BRs induce not only the processes of PA formation, but also its further dephosphorylation into DAG by lipid phosphatases. Our results indicate the BRs involvement in the regulation of a phospholipid signaling and the levels of lipid signaling mediators in plant cells, particularly PA.