



В.С. КРАВЕЦ¹, Я.С. КОЛЕСНИКОВ¹,
С.В. КРЕТИНИН¹, О.М. БОНДАРЕНКО¹,
Г.А. РОМАНОВ²

¹ Інститут біоорганічної хімії і нефтехімії НАН України
ул. Мурманская, 1, г. Киев, 02094, Украина

² Інститут фізіології рослин ім. К.А. Тимирязева РАН
kravets@bpci.kiev.ua

РОЛЬ КАЛЬЦІЯ В РЕГУЛЯЦІИ ФОСФОЛИПАЗИ D ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИТОКИНИНОВ

Ключові слова: Amaranthus caudatus, цитокинин, фосфолипаза D, ЭГТА, верапамил, амарантин

Одно из интенсивно развивающихся направлений современной биологии — исследование роли липидной сигнализации в регуляции метаболизма клеток при действии стимулов эндогенной и экзогенной природы [8, 17].

В клетках растений фосфолипиды являются не только компонентами плазматической мембраны, но и предшественниками вторичных посредников внутриклеточной сигнализации [7, 17]. В отличие от их структурных аналогов количество сигнальных липидов подвержено флуктуациям, размах которых определяется величиной и длительностью влияния эндогенных и/или экзогенных факторов, а в случае прекращения их действия исходный уровень таких липидов, свойственный определенному типу клеток, восстанавливается. Следовательно, для молекул сигнальных липидов характерны бóльшие скорости превращений, чем для липидов, которые не принимают участия в передаче сигналов. Такие свойства описаны, прежде всего, для полифосфоинозитидов, фосфатидных кислот (ФК), диацилглицеролпирофосфата, лизофосфолипидов, ряда жир-

© В.С. КРАВЕЦ,
Я.С. КОЛЕСНИКОВ,
С.В. КРЕТИНИН,
О.М. БОНДАРЕНКО,
Г.А. РОМАНОВ, 2010

ных кислот [35]. Многие биотические и абиотические стрессы, как и ряд фитогормонов, вызывают резкое повышение содержания в клетках растений фосфатидной кислоты, что может свидетельствовать об активации как фосфолипазы D (ФЛД) [8, 17], так и фосфолипазы C [19] с одновременной активацией диацилглицеролкиназы [7].

ФЛД (ЕС 3.1.4.4.) — фермент, гидролизующий структурные фосфолипиды с образованием фосфатидной кислоты и свободных гидрофильных соединений типа холина, играет важную роль в реакциях клеток растений на действие стрессов и фитогормонов [17], а продукт реакции — фосфатидная кислота — служит многофункциональным вторичным посредником сигнальных каскадов [8, 33].

Для исследования возможных путей действия фитогормонов широко применяются специфические биотесты. В семядолях этиолированных проростков *Amaranthus caudatus* L. (амаранта) цитокинин, 6-бензиламинопурин (БАП), вызывает быстрое накопление красного пигмента амарантина, на чем и основан специфический, чувствительный и надежный биотест на действие этого фитогормона [26]. Вещества-ингибиторы передачи внутриклеточных сигналов, снижающие уровень биосинтеза амарантина, использовались для выяснения механизмов действия цитокининов в клетках. Обработка растений первичными спиртами (в частности, 1-бутанолом), ингибиторами образования ФК, катализируемого ФЛД, приводит к снижению уровня биосинтеза пигмента ранее, чем блокаторы транскрипции. Более того, первичные спирты блокируют накопление транскриптов гена первичного ответа на цитокинины [26, 27]. В клетках *Catharanthus roseus* L. стимулирующий эффект цитокининов на транскрипцию генов первичного ответа также существенно подавлялся этими спиртами. Однако в случае добавления в смесь определенных фосфатидных кислот индукция транскрипции гена первичного ответа на цитокинины восстанавливалась [5]. Анализ соотношения фосфолипидов в колеоптилях *Zea mays* L. показал, что обработка проростков БАП в течение 30 мин приводит к трехкратному повышению уровня фосфатидной кислоты и снижению количества субстрата данного фермента — фосфатидилэтаноламина [4]. Ранее мы установили, что ФЛД может быть задействована в сигнальном каскаде цитокининов в клетках растений [2].

У *Arabidopsis thaliana* L. исследованы различные молекулярные формы ФЛД, активность которых зависит как от миллимолярных (ФЛД α) [12; 24], так и микромолярных (ФЛД β , ФЛД δ , ФЛД γ , ФЛД ϵ) [23, 34, 37] концентраций кальция, описаны также независимые от указанного иона молекулярные формы ФЛД (ФЛД ζ) [25].

Установлена способность ФЛД β связывать ионы кальция и показано, что степень связывания значительно повышалась при наличии в среде фосфатидилсерина, что указывает на возможность регуляции фосфолипидами плазматической мембраны степени взаимодействия ФЛД β с данными ионами [24, 37]. Эти эффекты ионов кальция и компонентов биологических мембран обес-

печивают тонкую регуляцию функций ФЛД. Аналогичным образом активность ФЛД в пределах одного класса молекулярных форм фермента ФЛД γ (ФЛД γ 1 и ФЛД γ 2) зависит от различных концентраций кальция [23]. Максимальная активность молекулярной формы ФЛД δ у *A. thaliana* *in vitro* зарегистрирована в присутствии микро- и миллимолярных концентраций кальция [34]. Фермент ФЛД ϵ также активен тогда, когда есть микромолярные концентрации Ca^{2+} , но исключительно при наличии активатора — олеиновой кислоты [11]. Способность к регуляции указанных молекулярных форм ФЛД низкими уровнями ионов кальция свидетельствует о возможности быстрой активации этих ферментов в ответ на минимальные флуктуации концентраций кальция в клетках, обусловленные действием эндогенного или экзогенного стимулов [17, 29].

Целью данной работы было исследование роли кальция в регуляции активности ФЛД при действии цитокининов на ткани растений.

Материалы и методы исследований

Объект исследования — этиолированные трехдневные проростки *A. caudatus*, выращенные при температуре 25 °С в термостате. Семена получены в Национальном ботаническом саду им. Н.Н. Гришко НАН Украины. Изучение действия БАП на биосинтез пигмента амарантина и динамику количества фосфолипидов проводили на семядолях, которые отделяли при слабом освещении.

Введение метки, экстракция и анализ фосфолипидов. Семядоли *A. caudatus* инкубировали 14 час при температуре 25 °С в растворе [^{33}P]-ортофосфата с активностью 3,7 МБк/мл, приготовленном на 25 мМ Mes-KOH (2-(N-морфолино)-этансульфоновой кислоты-KOH) буфере (pH 6,4). С целью анализа активности фосфолипазы D в ткани растений вводили 0,8 %-ный 1-бутанол. Чувствительность ФЛД к ионам кальция *in vivo* исследовали путем инкубирования тканей в течение 30 мин с модификаторами кальциевого баланса в клетках (5 мМ ЭГТА и 0,3 мМ верапамила) в Mes-KOH буфере. Ткани растений обрабатывали цитокинином БАП (5×10^{-6} М) и фиксировали в жидком азоте. В контрольные варианты добавляли по отдельности 1-бутанол, БАП или БАП с 2-бутанолом (неактивным аналогом 1-бутанола).

Липиды экстрагировали смесью 50 : 100 : 1 хлороформ/метанол/12 М соляная кислота. Двухфазную систему создавали, добавляя хлороформ и 0,9%-ный раствор NaCl. Нижнюю органическую фазу промывали смесью 3:48:47 хлороформ/метанол/1М соляная кислота. Экстракты липидов упаривали в токе азота и сохраняли при температуре — 20 °С [38].

Фосфолипиды разделяли на активированных нагреванием пластинках для тонкослойной хроматографии (10 × 20 см) «MERCCK» (Германия) в органической фазе системы этилацетат/изооктан/муравьиная кислота/вода (12:2:3:10 об./об.) [38]. В целях идентификации липидов использовали вещества-стандарты (фирмы «Fluka» и «Sigma»). Меченые фосфолипиды визуализировали методом автордиографии на рентгеновской пленке «Retina XBM» (Украина—Германия). Количественную активность образцов фосфолипидов определяли методом

сцинтилляционного счета на жидкостно-сцинтилляционном счетчике Rack Beta 1219 («Wallac», Финляндия)

Результаты исследований и их обсуждение

В связи с тем, что цитокинины играют ключевую роль в регуляции роста и развития растений, они интенсивно исследуются с целью установления мишеней их действия, путей влияния на активность и направленность метаболизма клеток растений [1, 3]. Для определения роли кальция в регуляции фосфолипазы D при действии цитокининов анализировали способность этого фермента катализировать реакцию трансэтерификации при наличии первичных спиртов. Ранее мы установили, что ФЛД чувствительна к действию цитокининов у модельного объекта *A. caudatus* [2]. Для ФЛД характерна способность образовывать при наличии первичных спиртов фосфатидилспирты вместо фосфатидной кислоты в так называемой реакции трансэтерификации, на которой основаны большинство исследований активности ФЛД *in vivo* [8, 21, 38]. В связи с этим в ткани растений вводили непосредственный предшественник фосфатидилспиртов — первичный спирт 1-бутанол [21, 38]. На радиоавтографе хроматограммы фосфолипидов (рис. 1; 3) показано пятно фосфатидилбутанола, образующееся при действии БАП и введении в ткани первичного бутанола. Вторичный бутанол, не используемый ФЛД в качестве субстрата в реакции трансэтерификации, не способствовал новообразованию фосфатидилбутанола (рис. 1; 4). На радиоавтографах были выявлены области фосфатидилбутанола исключительно в треках фосфолипидов, выделенных из растений, обработанных БАП (рис. 1). Уже на 10-й минуте действия цитокининов наблюдалось резкое увеличение новообразования фосфатидилбутанола, о чем свидетельствовали результаты сцинтилляционного счета (рис. 2). Более длительное воздействие цитокининов повышало интенсивность накопления фосфатидилбутанола (данные не приведены), что свидетельствует о существенной активации ФЛД при действии цитокининов. С другой стороны, вторичные спирты, которые не вовлекаются в реакцию трансэтерификации, не вызывали в клетках синтеза фосфатидилбутанола (рисунки 1, 2).

В процессе функционирования ФЛД в клетках образуется ФК, которая является не только метаболитом фосфолипидов, но и модулятором активности ряда ферментных систем, вовлекаясь в реакцию клеток на действие фитогормонов и стресса [3, 8]. Среди ключевых ферментов метаболизма клеток, активируемых ФК, установлены фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа [6] и протеинкиназа, которая активируется как ФК, так и ионами кальция [32]. ФК также стимулирует полимеризацию актина [13]. С другой стороны, среди ферментов, ингибируемых ФК, выявлена протеинфосфатаза 2С [36].

В клетках растений существуют различные по биохимическим свойствам молекулярные формы ФЛД, которые отличаются по чувствительности к кофакторам — ионам кальция [17], играющим роль вторичных посредников ряда

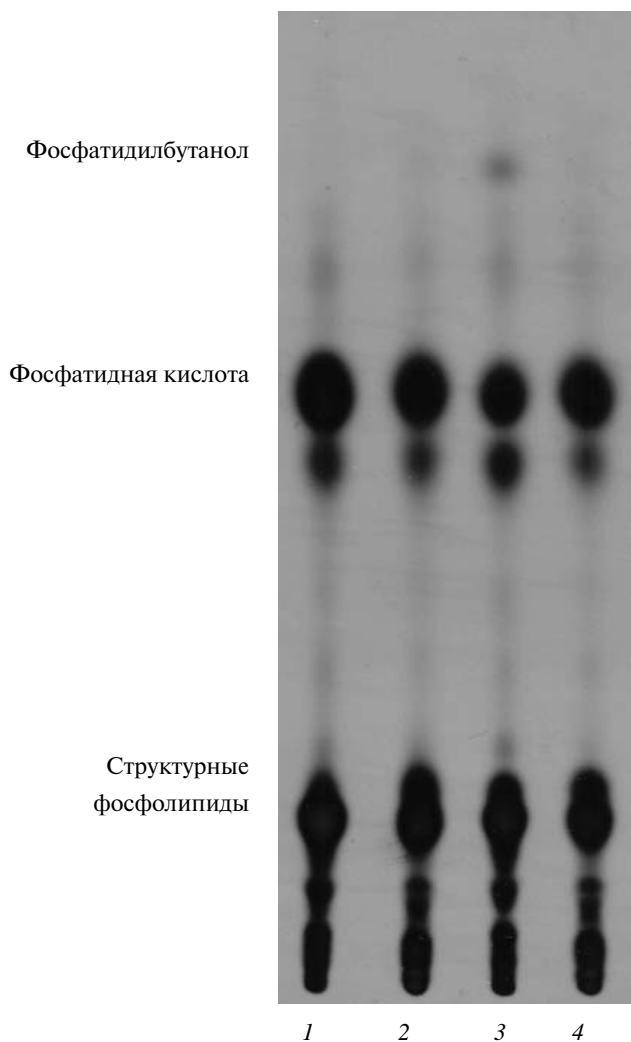


Рис. 1. Радиоавтограф уровня активности фосфолипазы D (по уровню новообразования фосфатидилбутанола) в тканях *Amaranthus caudatus* L. *in vivo* под влиянием БАП (10 мин): 1 — контроль; 2 — 1-бутанол; 3 — БАП + 1-бутанол; 4 — БАП + 2-бутанол

Fig. 1. Radioautograph of levels phospholipase D activity (according to phosphatidylbutanol accumulation) by BAP (10 min) in *Amaranthus caudatus* L. tissues *in vivo*: 1 — control; 2 — 1-butanol; 3 — BAP + 1-butanol; 4 — BAP + 2-butanol

сигнальных систем клеток животного и растительного происхождения и участвующих в формировании реакции метаболизма клеток на действие различных факторов внешней среды [14, 15, 30].

Для анализа участия ионов кальция в регуляции метаболизма клеток широко используют этиленгликольтетраацетат (ЭГТА), хелат которого с ионом кальция не проникает через плазмалемму, в результате чего снижается концентрация внеклеточного кальция, и верапамил (производное фенилалкилами-

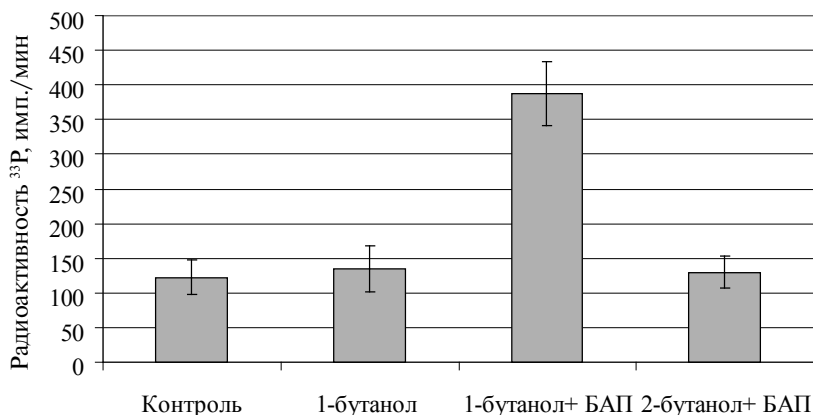


Рис. 2. Влияние БАП (10 мин) на уровень новообразования фосфатидилбутанола (активность фосфолипазы D) в тканях *A. caudatus in vivo*

Fig. 2. Effect of VAP on phosphatidylbutanol accumulation (phospholipase D activity) in *A. caudatus* tissues *in vivo*

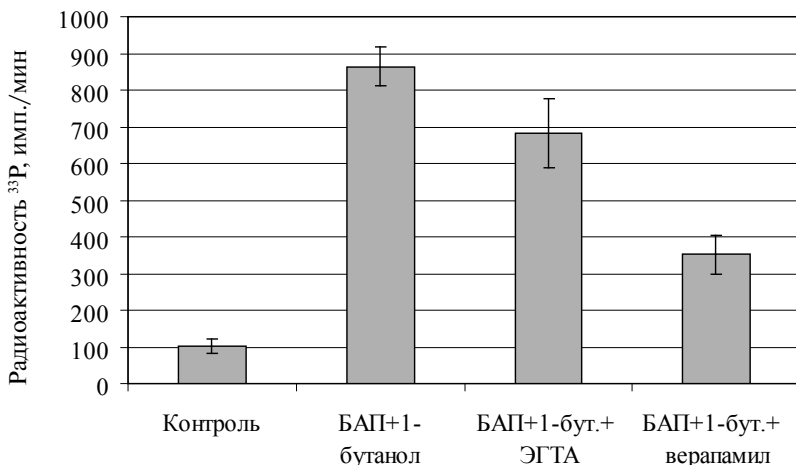


Рис. 3. Влияние ЭГТА и верапамила на активность фосфолипазы D *in vivo* в тканях *A. caudatus* при действии БАП в течение 30 мин

Fig. 3. Effect of EGTA and verapamil on phospholipase D activity *in vivo* in *A. caudatus* tissues under VAP application during 30min

на), ингибирующий Ca^{2+} -каналы L-типа плазматических мембран [9, 18]. Эти модификаторы уровней кальция используются для изучения регуляции ФЛД в клетках растений и животных. В частности, аккумуляция ФК, обусловленная активацией ФЛД под влиянием холодового шока, нивелируется ЭГТА (2,2 мМ) или ионами лантана (10 мМ) (ингибитора каналов кальция) в суспензиях клеток *Arabidopsis* [28]. ЭГТА также угнетает активность ФЛД проростков риса [16]. Выраженное угнетение ФЛД, активированной 1,25-гидроксивитамином D₃, зарегистрировано при обработке миобластов ЭГТА, а также блокаторами

каналов кальция нифедипином и верапамилом [20]. В плазматической мембране тромбоцитов кроликов верапамил (10^{-4} М) угнетал формирование фосфатидной кислоты [10].

Наличие в клетках растений молекулярных форм ФЛД, зависящих от уровня ионов кальция [17], обусловило наш интерес к определению роли этих ионов в регуляции ФЛД клеток *A. caudatus in vivo* при действии цитокининов. Для выявления возможного участия ионов кальция в механизме действия цитокининов ткани семядолей амаранта, насыщенные радиоактивным фосфором, инкубировали с ЭГТА и верапамилом. Далее в среду инкубации растений вводили БАП. Результаты анализа влияния цитокининов на уровень формирования *in vivo* фосфатидилбутанола под воздействием хелатора ионов кальция (ЭГТА) и блокатора кальциевых каналов (верапамила) приведены на диаграмме (рис. 3). В присутствии исследуемых веществ радиоактивность продукта ФЛД, синтезированного после введения цитокининов, резко снижалась по сравнению с вариантами, где добавлялся только БАП. ЭГТА, способный связывать кальций в апопласте, в меньшей мере угнетал синтез фосфатидилбутанола, в то время как верапамил, блокирующий кальциевые каналы плазматической мембраны, значительно снижал активность ФЛД, стимулированную цитокининами (рис. 3). Полученные нами результаты свидетельствуют о снижении уровня новообразования фосфатидилбутанола при хелатировании ионов кальция в апопласте в случае введения в ткани исследуемых растений ЭГТА. Еще более сильное угнетение активности ФЛД отмечено в опытах с использованием верапамила (рис. 3), поскольку он предотвращает проникновение в клетки ионов кальция, играющих важную роль в регуляции активности ФЛД.

Впервые выявленное в наших исследованиях снижение реакции ФЛД на цитокинины при введении в ткани ЭГТА и верапамила обусловлено способностью большинства молекулярных форм ФЛД клеток растений использовать ионы кальция в качестве кофакторов для регуляции ферментативной активности [24, 34]. Это объясняется наличием в первичной структуре ФЛД специфических доменов, связывающих кальций. Одним из них является домен С2, локализованный на N-конце первичной структуры фермента. Как предполагают, ионы кальция активируют ФЛД путем высокоаффинного связывания с доменом С2 фермента [22, 37], который ассоциируется с фосфолипидами. Низкоаффинным сайтом присоединения ионов кальция является активный центр ФЛД [22, 31]. Связывание кальция с доменом С2 обеспечивает присоединение последнего к субстрату ФЛД, но блокирует его ассоциацию с кофактором фосфатидилинозитолдифосфатом [37], тогда как влияние ионов кальция на активный центр повышает его аффинность к фосфатидилинозитолдифосфату, который так же, как и кальций, задействован в тонкой регуляции функций ФЛД.

Выводы

ФЛД принимает участие в трансдукции цитокининовых сигналов и реализации действия исследованных фитогормонов в клетках растений.

Показано, что модификаторы уровней ионов кальция (ЭГТА и верапамил) при введении их в ткани вызывали снижение цитокинин-зависимой активности ФЛД. Эти результаты, полученные нами впервые, указывают на участие ионов кальция в регуляции реакции ряда молекулярных форм ФЛД на действие цитокининов.

Работа поддержана НАН Украины (гранты 5/3-08; 5/1-09 и 2.1.10.32-05), Российским фондом фундаментальных исследований (Россия) (гранты 07—04—00331 и 08—04—90429_Укр.), НШ—3444.2008.4 и программой Президиума Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология».

1. *Веденічева Н.П., Мусатенко Л.І.* Локалізація і динаміка цитокінінів в період формування репродуктивних органів *Zea mays* L. // Укр. ботан. журн. — 2008. — **65**, № 6. — С. 896—902.
2. *Кравец В.С., Кретицин С.В., Колесников Я.С. и др.* Цитокинины вызывают быструю активацию фосфолипазы D в чувствительных тканях растений // Докл. Академии наук (РАН). — 2009. — **428**, № 5. — С. 1—4.
3. *Романов Г.А.* Как цитокинины действуют на клетку // Физиол. раст. — 2009. — **56**, № 2. — С. 268—290.
4. *Тарасова О.В., Медведев С.С.* Влияние бензиламинопурина на жирнокислотный состав и соотношение фосфолипидов в колеоптилях и корнях проростков кукурузы // Вест. Санкт-Петерб. ун-та. — 2008. — **3**, № 2. — С. 85—88.
5. *Amini A., Glévarac G., Andreu F., et al.* Effects of phosphatidic acid on cytokinin signal transduction in periwinkle cells // J. Plant Growth Regul. — 2008. — **27**, № 4. — P. 394—399.
6. *Anthony R.G., Henriques R., Helfer A. et al.* A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis* // EMBO J. — 2004. — **23**, № 3. — P. 572—581.
7. *Arisz S.A., Testerink C., Munnik T.* Plant PA signaling via diacylglycerol kinase // Biochim. Biophys. Acta — Mol. Cell Biol. Lipids. — 2009. — **1791**, № 9. — P. 869—875.
8. *Bargmann B.O., Munnik T.* The role of phospholipase D in plant stress responses // Curr. Opin. Plant Biol. — 2006. — **9**, № 5. — P. 515—522.
9. *Garrido I., Espinosa F., Álvarez-Tinaut M.C.* Oxidative defence reactions in sunflower roots induced by methyl-jasmonate and methyl-salicylate and their relation with calcium signaling // Protoplasma. — 2009. — **237**, № 4. — P. 27—39.
10. *Homa S.T., Khan S.N., Conroy D.M. et al.* Verapamil inhibits phosphatidic acid formation and modifies phosphoinositide metabolism in stimulated platelets // European Journal of Pharmacol. — 1990. — **182**, № 3. — P. 457—464.
11. *Hong Y., Devaiah S.P., Bahn S.C. et al.* Phospholipase D ϵ and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth // Plant J. — 2009. — **58**, № 3. — P. 376—387.
12. *Hong Y., Pan X., Welti R., Wang X.* Phospholipase D α 3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis* // The Plant Cell. — 2008. — **20**, №3. — P. 803—816.
13. *Huang S., Gao I., Blanchoin I., Staiger C.J.* Heterodimeric capping protein from *Arabidopsis* is regulated by phosphatidic acid // Mol. Biol. Cell. — 2006. — **17**, № 4. — P. 1946—1958.
14. *Kordyum E.L.* A role for the cytoskeleton in plant cell gravisensitivity and Ca²⁺-signaling in microgravity // Cell Biol. International. — 2003. — **27**, № 3. — P. 219—221.
15. *Kordyum E.L.* Calcium signaling in plant cells in altered gravity // Adv. Space Res. — 2003. — **32**, № 8. — P. 1621—1630.
16. *Lee M.H.* Phospholipase D of rice bran. II. The effects of the enzyme inhibitors and activators on the germination and growth of root and seedling of rice // Plant Sci. — 1989. — **59**, № 1. — P. 35—43.
17. *Li M., Hong Y., Wang X.* Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants // Biochim. Biophys. Acta. — 2009. — **1791**, № 9. — P. 927—935.

18. Maffei M., Bossi S., Spiteller D. et al. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. I. Membrane potentials, intracellular calcium variations, oral secretions, and regurgitate components // *Plant Physiol.* — 2004. — **134**, № 4. — P. 1752—1762.
19. Mishkind M., Vermeer J. E.M., Darwish E., Munnik T. Heat stress activates phospholipase D and triggers PIP2 accumulation at the plasma membrane and nucleus // *Plant J.* — 2009. — **60**, № 1. — P. 10—21.
20. Morelli S., Boland R., de Boland A.R. 1,25(OH)₂-vitamin D₃ stimulation of phospholipases C and D in muscle cells involves extracellular calcium and a pertussis-sensitive G protein // *Mol. Cell Endocrinol.* — 1996. — **122**, № 2. — P. 207—211.
21. Munnik T., Meijer H.J.G., ter Riet B. Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate // *Plant J.* — 2000. — **22**, № 2. — P. 147—154.
22. Pappan K., Zheng L., Krishnamoorthi R., Wang X. Evidence for and characterization of Ca²⁺ binding to the catalytic region of *Arabidopsis thaliana* phospholipase Dβ // *J. Biol. Chem.* — 2004. — **279**, № 46. — P. 47833—47839.
23. Qin C., Li M., Qin W. et al. Expression and characterization of *Arabidopsis* phospholipase Dγ₂ // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2006. — **1761**, № 12. — P. 1450—1458.
24. Qin W., Pappan K., Wang X. Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD): cloning of PLDα and regulation of PLDα, β, and γ by polyphosphoinositides and calcium // *J. Biol. Chem.* — 1997. — **272**, № 45. — P. 28267—28273.
25. Qin C., Wang X. The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterisation of calcium-independent and phosphatidylcholine-selective phospholipase Dζ₁ with distinct regulatory domains // *Plant Physiol.* — 2002. — **128**, № 3. — P. 1057—1068.
26. Romanov G. A., Getman I. A., Schmillig T. Investigation of early cytokinin effects in a rapid *Amaranthus* seedling test // *Plant Growth Regul.* — 2000. — **34**, № 3. — P. 337—344.
27. Romanov G. A., Kieber J. J., Schmillig T. A rapid cytokinin response assay in *Arabidopsis* indicates a role for phospholipase D in cytokinin signaling // *FEBS Letters.* — 2002. — **515**, № 1. — P. 39—43.
28. Ruelland E., Cantrel C., Gawer M. et al. Activation of phospholipase C and D is an early response to a cold exposure in *Arabidopsis* suspension cells // *Plant Physiol.* — 2002. — **130**, № 2. — P. 999—1007.
29. Ryu S.B., Wang X. Increases in free linolenic and linoleic acids associated with phospholipase D-mediated hydrolysis of phospholipids in wounded castor bean leaves // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1998. — **1393**, № 1. — P. 193—202.
30. Saidi Y., Finka A., Muriset M. et al. The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane // *The Plant Cell.* — 2009. — **21**, № 9. — P. 2829—2843.
31. Stumpe S., König S., Ulbrich-Hofmann R. Insights into the structure of plant α-type phospholipase D // *FEBS J.* — 2007. — **274**, № 10. — P. 2630—2640.
32. Szczegieliak J., Klimecka M., Liwosz A. et al. A wound-responsive and phospholipid-regulated maize calcium-dependent protein kinase // *Plant Physiol.* — 2005. — **139**, № 4. — P. 1970—1983.
33. Wang X., Devaiah S.P., Zhang W., Welti R. Signaling functions of phosphatidic acid // *Progress in Lipid Research.* — 2006. — **45**, № 3. — P. 250—278.
34. Wang X., Wang C. A novel phospholipase D of *Arabidopsis* that is activated by oleic acid and associated with the plasma membrane // *Plant Physiol.* — 2001. — **127**, № 3. — P. 1102—1112.
35. Hong-Wei X., Chen X., Yu M. Function and regulation of phospholipid signalling in plants // *Biochem. J.* — 2009. — **421**, № 2. — P. 145—156.
36. Zhang W., Qin C., Zhao J., Wang X. Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — **101**, № 25. — P. 9508—9513.

37. Zheng L., Krioshnamoorthi R., Zolkiewski M., Wang X. Distinct Ca²⁺ binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D α and β // J. Biol. Chem. — 2000. — **275**, № 26. — P. 19700—19706.
38. 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**, № 2. — P. 813—823.

Рекомендує в печать
Е.К. Золотарева

Поступила 29.01.2010

В.С. Кравець¹, Я.С. Колесников¹, С.В. Кретинін¹, О.М. Бондаренко¹, Г.О. Романов²

¹ Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ

² Інститут фізіології рослин ім. К.А. Тимірязєва РАН, Москва

РОЛЬ КАЛЬЦІУ В РЕГУЛЯЦІЇ ФОСФОЛІПАЗИ D ЗА ДІЇ ЦИТОКІНІНІВ

Для дослідження механізмів регуляції фосфоліпази D цитокінінами в сім'ядолях проростків *Amaranthus caudatus* L. використовувалися модифікатори рівнів іонів кальцію у клітинах — ЕГТА, хелатор іонів кальцію та верапаміл, інгібітор каналів кальцію плазматичних мембран. Цитокінін БАП зумовлює накопичення червоного пігменту амарантину та активацію фосфоліпази D *in vivo*. Екзогенне введення ЕГТА та верапамілу інгібує вищезазначені реакції клітин на дію цитокінінів. Отримані результати свідчать на користь того, що ізоферменти фосфоліпази D залучені до реалізації біологічної дії цитокінінів у клітинах рослин, іони кальцію забезпечують тонку регуляцію функцій ферменту.

Ключові слова: *Amaranthus caudatus*, цитокінін, фосфоліпаза D, ЕГТА, верапаміл, амарантин.

V.S. Kravets¹, Ya.S. Kolesnikov¹, S.V. Kretynin¹, O.M. Bondarenko¹, G.A. Romanov²

¹ Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyi

² Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow

THE ROLE OF CALCIUM IN PHOSPHOLIPASE D REGULATION BY CYTOKININS

In order to study regulation of phospholipase D by cytokinins in cotyledons of *Amaranthus* seedlings, we applied different modifiers of calcium levels in cells — EGTA, a chelator of calcium, or verapamil, a calcium channel inhibitor, in the plasma membrane. Cytokinin BAP induces accumulation of the red pigment amaranthin and phospholipase D activation *in vivo*. Exogeneous application of EGTA and verapamil inhibits the abovementioned cytokinin responses. It is suggested that phospholipase D isoenzymes are involved in biological action of cytokinins in plant cells, and calcium ensures fine-tune regulation of phospholipase D activity.

Key words: *Amaranthus caudatus*, cytokinin, phospholipase D, EGTA, verapamil, amaranthin.