Національна академія наук України

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії

**РОЛЬ БРАСИНОСТЕРОЇДІВ У ФОРМУВАННІ ВТОРИННИХ ПОСЕРЕДНИКІВ В ПРОЦЕСІ РЕГУЛЯЦІЇ АДАПТАЦІЇ МЕТАБОЛІЗМУ РОСЛИН ДО ДІЇ АБІОТИЧНИХ СТРЕСІВ**

1. ДЕРЕВ’ЯНЧУК Михайло Вікторович – кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу молекулярних механізмів регуляції метаболізму клітини інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

**РЕФЕРАТ**

**Київ – 2016**

Фітогормони контролюють аспекти росту та розвитку рослин. Чільне місце у цих процесах належить стероїдним гормонам брасиностероїдам (БС), які відіграють ключову роль як у регуляції широкого спектру ростових процесів, включаючи поділ та дифференцію клітин, так і у формуванні захисних реакцій клітин рослин до дії ряду факторів абіотичної і біотичної природи. У модельній системі рослин різушки Таля (*Arabidopsis thaliana*) БС забезпечують регуляцію близько семи тисяч генів, які залучені до контролю процесів росту і розвитку рослин (Litvinovskaya, Minin et al. 2013, Chaiwanon and Wang 2015, Singh and Savaldi-Goldstein 2015, Vragović, Sela et al. 2015) та стійкості за умов стресів (Li, Chen et al. 2013, Zhang, Zhu et al. 2013). Регуляція такої кількості генів передбачає наявність багатокомпонентних молекулярних механізмів реалізації дії брасиностероїдів за певних умов середовища. Результати досліджень останніх років, проведені на молекулярному рівні, свідчать про особливості впливу БС на функціонування органел (Rothová, Holá et al. 2014), процеси внутрішньоклітинного транспорту та кросгормональні взаємодії (Vandenbussche, Callebert et al. 2013, Zhou, Song et al. 2013, Bajguz and Piotrowska-Niczyporuk 2014,). Однак уявлення щодо молекулярних механізмів дії БС лишаються неповними і потребують подальших ґрунтовних досліджень. Результати досліджень ролі БС у метаболізмі активних форм кисню (АФК) (Bartwal, Mall et al. 2013, Fariduddin, Khalil et al. 2013) вказують на тісний взаємозв’зок між досліджуваними гормонами і ендогенним рівнем АФК. Це може досягатися шляхом регуляції активності НАДФН оксидаз та індукції антиоксидантних систем при дії абіотичного стресу (Cui Jin-Xia et al. 2011, Fariduddin, Khalil et al. 2013). Крім НАДФН оксидаз, одним із ключових джерел АФК у клітині є мітохондріальний ланцюг транспорту електронів (мЛТЕ), що здатен генерувати токсичні рівні АФК при порушеннях у його роботі, які виникають за умов впливу стресів ([Cvetkovska and Vanlerberghe 2013](#_ENREF_4)). Ключову роль у гомеостазі мЛТЕ відіграють альтернативні оксидази (АО), які здатні регулювати рівень електронів у мЛТЕ, окислюючи пул відновленого убіхінону і, таким чином, регулюючи потік енергетичних електронів між комплексами мЛТЕ ([Van Aken, Giraud et al. 2009](#_ENREF_7)). Відомо, що активація АО призводить до зниження рівня АФК в мітохондріях, що захищає дихальний ланцюг від самоінгібування і розвитку оксидативного стресу ([Cvetkovska and Vanlerberghe 2012](#_ENREF_3))..

Проведена робота вирізняється комплексним підходом з використанням широкого спектру сучасних методів дослідження, зокрема для аналізу впливу БС на формування вторинних посередників внутрішньоклітинної фосфоліпідної сигналізації проводили мічення тканин рослин флуоресцентно міченим фосфатидилхоліном з міткою BODIPY або розчином радіоактивного ортофосфату (33P) з наступною екстракцією ліпідів і їх розділення методом тонкошарової хроматографії. Кількісний аналіз зон окремих фосфоліпідів проводили на фосфоімеджсканері Pharos FX (Bio-Rad, США). Визначення активності мЛТЕ проводили на полярографі Oxygraph (Hansatech Instruments, Великобританія) з кисневим електродом Кларка. Для дослідження впливу БС на синтез специфічних поліпептидів використали 35S мічення тканин (суміш цистеїну і метіоніну). Біоінформатичний аналіз експресії генів рослин різушки Таляпроводили за допомогою бази даних Genevestigator (Zimmermann et al., 2004).

Були використані рослин різушки Таля дикого типу (col1) та трансгени: *bak1-1* – з мутацією в BAK1 кіназі рецепторного комплексу, *bri1-6* – з мутацією в BRI1 кіназі рецепторного комплексу, *det2-1* – з порушеннями в генах цитохрому Р450, який відповідає за біосинтез гормону, *aox1a* *overexpressor* (AOX1a-OE) – трансгени з надекспресією гену ізоформи альтернативної оксидази *AOX1a*, *aox1a* *antisense* AOX1a-AS) – трансгени із конститутивною експресією антисенсової мРНК до ізоформи альтернативної оксидази *AOX1a*;

Усе це дозволило поєднати ланки сигнальних каскадів фітогормонів і обґрунтувати моделі, які описують механізми ліпідної сигналізації активованої брасиностероїдами із процесами регуляції дихального ланцюга транспорту електронів, синтезу специфічних білків та активності ферментів, які забезпечують гомеостаз активних форм кисню у клітині.

Метою роботи було встановлення ролі брасиностероїдів у регуляції процесів формування вторинних посередників та енергетичного гомеостазу клітин рослин за умов засолення.

Наукова новизна отриманих результатів.

У результаті проведених нами досліджень вдалося з’ясувати основні ланки впливу брасиностероїдів на метаболізм рослин з метою адаптації до несприятливих умов середовища (Схема):

## Схема

## Механізм БС-індукованого розвитку адаптації метаболізму рослин за дії абіотичного фактора середовища

## 

Встановлено вплив БС на формування вторинних посередників ліпідних сигнальних посередників – диацилгліцеролу (ДАГ) та фосфатидної кислоти (ФК). Отримані результати свідчать про швидку активацію Фх-ФЛС за дії гормону. Методами інгібіторного аналізу вперше з’ясовано, що у процесі формування ФК беруть участь ДАГ-кінази, які фосфорилюють ДАГ.

Використання трансгенних рослин *bak1* з порушеннями в рецепторному комплексі брасиностероїдів спричиняло пригнічення процесів формування фосфатидної кислоти, що вказує на рецептор-опосередкований шлях активації внутрішньоклітинної ліпідної сигналізації(Схема (1)).

Встановлено, що брасиностероїди задіяні в регуляції дихання рослин, зокрема, альтернативного шляху дихання, що сприяє зниження активності процесів формування АФК у мітохондріях. Вплив брасиностероїдів на дихання рослин є також опосередкований рецептором, що підтверджено на прикладі трансгенної лінії рослин *bri1*. Зниження ендогенного рівня брасиностероїдів специфічними інгібіторами біосинтезу гормону пригнічує процеси дихання та ріст рослин за умов жорстокого сольового стресу (Схема (2)).

Визначено, що разом із активацією альтернативної оксидази брасиностероїди індукують гени ряду білків теплового шоку, зокрема, мітохондріальних шаперонів. Ідентифікація досліджених поліпептидів вказує на можливість індукції брасиностероїдами шаперонів CPN60-2 та малого шаперону БТШ22, які залучаються у стабілізацію білкових компонентів транспортного ланцюга електронів у мітохондріях рослин (Схема (3)).

Виявлена індукція генів мітохондріальних шаперонів і альтернативної оксидази разом із активацією процесів альтернативного дихання проведена вперше і є принципово новим підходом до аналізу ролі брасиностероїдів у регуляції метаболізму рослин за дії абіотичних стресів, зокрема, засолення. Відтак, механізмом впливу брасиностероїдів на рослини є адаптація енергогенеруючих органел клітини з метою підтримання їх гомеостазу і зниження активності процесів формування токсичних рівней АФК.

Практичне значення отриманих результатів.

Встановлення механізмів, які забезпечують трансдукцію сигналів за участю брасиностероїдів в клітинах рослин та здатні індукувати низку послідовних змін інтенсивності та напрямку метаболічних потоків, що призводять до транскрипції відповідних генів та активації захисних реакцій на дію різних стресорів, сприяє формуванню більш глибоких уявлень щодо первинних реакцій адаптації рослин до дії абіотичних стресів. Отримані результати щодо впливу БС на підвищення солестійкості рослин закладають основи для розробки технологій управління стійкістю рослин через регуляцію процесів енергообміну мітохондрій та можуть бути використані у біотехнології та сучасних технологіях агропромислового виробництва для вирощування сільськогосподарських культур в зонах ризикованого землеробства.

і фосфатидилхолін-гідролізуючої фосфоліпази С, 1,2-диацилгліцеролкіназ та процесів формування фосфатидної кислоти; вперше показано, що у цьому процесі задіяна ВАК1 кіназа рецепторного комплексу досліджуваних гормонів.

2. Вперше виявлено, що як екзогенні брасиностероїди активують альтернативний шлях транспорту електронів в мЛТЕ рослин, так і модуляція ендогенного рівня брасиностероїдів інгібітором біосинтезу гормону пригнічує цитохромний та альтернативний шляхи дихання і знижує інтенсивність росту за умов засолення.

3. Вперше в дослідах з мутантами в генах BRI1 кінази рецепторного комплексу брасиностероїдів виявлено її ключову роль на активацію процесів дихання.

4. Виявлено, що брасиностероїди беруть участь в індукції синтезу ряду стресових білків за умов засолення, зокрема, 23,8 кДа та 60,1 кДа, тоді як інгібітор біосинтезу гормону знижував інтенсивність їх накопичення.

5. З використанням біоінформатичних методів з’ясована участь брасиностероїдів у регуляції експресії генів, що кодують компоненти електронтранспортних ланцюгів рослинних органел та проведена біоінформатична ідентифікація вірогідних молекулярних шаперонів, які можуть бути залучені у формування енергетичного гомеостазу органел.

За результатами роботи опубліковано 10 статей, в тому числі в Environmental and Experimental Botany (**Impact Factor:** 3.359), Acta Physiologiae Plantarum (**Impact Factor:** 1.584) та Plant Growth Regulation (**Impact Factor:** 1.672), та 19 тез доповідей міжнародних конференцій. *Сумарний імпакт-фактор наукових видань – 7.12.* *Загальний індекс цитування(h-індекс) складає понад 1.0 згідно з базами даних Scopus.*

**Перелік публікацій**

**представлених на здобуття Премії Президента**

1. Деревянчук М.В., Грабельных О.И., Литвиновская Р.П, Войников В.К., Савчук А.Л., Хрипач В.А, Кравец В.С. Роль брассиностероидов в адаптации функционирования митохондрий растений in vivo при действии абиотических стрессов// Доповіді НАН України. – 2015. - №1. – с. 153-158.
2. Деревянчук М.В., Литвиновская Р.П., Савчук А.Л., Хрипач В.А., Кравец В.С.Влияние ауксинового производного брассиностероида на регуляцию роста и развития растений в условиях солевого стресса // Доповіді НАН України. – 2015. – №3. –с. 148-151.
3. Деревянчук М.В., Литвиновская Р.П., Черноморченко С.С., Хрипач В.А., Кравец В.С., Кухарь В.П. Влияние брассиностероидов на формирование фосфатидной кислоты in vivo у растений пшеницы // Доповіді НАН України. – 2015. – №4 . – C. 139-144.
4. Derevyanchuk M .V., Grabelnyh O.I., Litvinovskaуа R.P., Voinikov V.K., Sauchuk A.L., Khripach V .A., Kravets V.S. Influence of brassinosteroids on plant cell alternative respiration pathway and antioxidant systems activity under abiotic stress conditions // Biopolymers and Cell. – 2014. – Vol.30. – №6–P. 436-442.
5. Litvinovskaya R.P., Minin P .S., Raiman M.E., Zhilitskaya G.A., Kurtikova A.L., Kozharnovich K.G., Derevyanchuk M.V., KravetsV.S., Khripach V.A. Indolyl-3-acetoxy derivatives of brassinosteroids: synthesis and growth-regulating activity // Chemistry of Natural Compounds. – 2013. – Vol. 49. – №3. – P. 478-485.
6. Покотило И.В., Колесников Я.С., Деревянчук М.В., Харитоненко А.И., Кравец В.С. Липоксигеназы и регуляция метаболизма клеток растений // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. – 87. – N2. – P.41-55.
7. M. Derevyanchuk, R. Litvinovskaya, V.Khripach, V.Kravets. Brassinosteroid-induced de novo protein synthesis in *Zea mays* under salinity and bioinformatic approach for identification of heat shock proteins // Plant Growth Regulation.– 2015. – P. 1-9. DOI: 10.1007/s10725-015-0093-3.
8. M.Derevyanchuk, R.Litvinovskaya, V.Khripach, J.Martinec, V.Kravets. Effect of 24-epibrassinolide on *Arabidopsis thaliana* alternative respiratory pathway under salt stress // Acta Physiologiae Plantarum. – 2015. Vol.37 – №215–. P. 1-10. DOI: 10.1007/s11738-015-1967-8
9. Кравец В.С , Кретинин С.В., Деревянчук М.В, Драч С.В., Литвиновска Р.П., Хрипач В.А. Влияние низких температур на уровень эндогенных брассиностероидов // Доповіді НАН України. – 2011. - №8, с. 155-159.
10. E. Ruelland, V. Kravets, M. Derevyanchuk, J. Martinec, A. Zachowskia, I. Pokotylo. Role of phospholipid signalling in plant environmental responses // Environmental and Experimental Botany. – 2015. – V. 114, P. 129–143.
11. Дерев’янчук М.В., Литвіновська Р.П., Хрипач В.А., Кравець В.С. Вплив брасиностероїдів на активацію альтернативного шляху дихання у модельній рослині *Arabidopsis thaliana* за умов засолення // ХХІХ Наукова конференція біоорганічної хімії та нафтохімії, 27-28 березня 2014, Київ.
12. Derevyanchuk M.V., Litvinovskaуа R.P., Sauchuk A.L., Khripach V.A., Kravets V.S. Brassinosteroids activates chaperones synthesis in Zea mays L. plants under salinity //Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня, 2014, Київ / The Ukrainian biochemical journal. – Vol. 86. – N5(supplement 1). – 2014. – P. 148.
13. Дерев’янчук М.В., Литвіновська Р.П., Хрипач В.А., Кравець В.С. Брасиностероїди врегуляції метаболізму рослин за умов дії абіотичних стресів // ХХХ Наукова конференція біоорганічної хімії та нафтохімії, 26-27 березня 2015, Київ.
14. Деревянчук М.В., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А., Кравец В.С. Влияние брассиностероидов на белковый профиль тканей кукурузы при действии солевого стресса //«Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», Украина АР Крым , п.г.т. Новый Свет,  27 мая – 1 июня 2013, с.189
15. Колесников Я.С., Дерев’янчук М.В., Кретинін С.В., Кравець В.С., Волотовський І.Д. Роль фосфоліпази D у реалізації дії гравітації в пагонах рослин // «Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», Украина АР Крым , п.г.т. Новый Свет,  27 мая – 1 июня 2013, с.213
16. Derevyanchuk M.V., Litvinovskaya R.P., Khripach V.A., Kravets V.S. Role of brassinosteroids in activation of alternative oxidase under stress conditions // Symposium “Mitochondria in life, death and disease“, Heraclione, Crete, Greece, 9-13 of May, 2012, p.98
17. P.S.Minin, R.P.Litvinovskaya, M.E.Rayman, M.V.Derevyanchuk, V.S.Kravets, V.A.Khripach Synthesis of new indole-3-acetic acid conjugates with brassinosteroids and their biological effects // 3d International Symposium Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design, 17-23 September 2012, Lviv, Ukraine / Abstract book. – P. 90
18. Volotovsky I.D., Kretynin S.V., Kolesnikov Y.S., Derevyanchuk M.V., Lyakhnovoch G.V., Kabachevskaya E.M., Kravets V.S. Role of calcium-dependent phospholipase D in gravity signal transduction // 3d International Symposium Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design, 17-23 September 2012, Lviv, Ukraine / Abstract book. – P. 165.
19. M.V. Derevyanchuk, R.P. Litvinovskaya, V.K. Voinikov, V.A. Khripach, V.S. Kravets. Brassinosteroid signaling is mediated via phospholipids in *Arabidopsis thaliana* // 3d International Symposium Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design, 17-23 September 2012, Lviv, Ukraine / Abstract book. – P. 106
20. M.V. Derevyanchuk, P.S. Minin, R.P. Litvinovskaya, V.K. Voinikov, V.A. Khripach, V.S. Kravets. Brassinosteroids in regulation of oxidative stress development under abiotic stress action // 3d International Symposium Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design, 17-23 September 2012, Lviv, Ukraine / Abstract book. – P. 60
21. Деревянчук М.В., Кретинин С.В., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А., Кравец В.С. Влияние брассиностероидов на продукцию вторичных мессенджеров липидной природы. // Материалы первой конференции молодых ученых «Биология растений и биотехнология», Украина, г. Белая Церковь, 5-7 октября 2011, с. 29.
22. Деревянчук М.В., Кретинин С.В., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А., Кравец В.С. Влияние 24-эпибрассинолида на адаптацию метаболизма клеток *Arabidopsis thaliana* к действию абиотических стрессов // «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», Украина АР Крым , п.г.т. Новый Свет,  23-28 мая 2011, с.659
23. Деревянчук М.В., Кретинин С.В., Драч С.В., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А., Кравец В.С. Влияние брассиностероидов на активность ферментативних антиоксидантов при действии осмотического стресса // Симпозиум «Растения и стресс», 9-12 ноября 2010, С. 120
24. Хрипач В.А., Литвиновская Р.П., Драч С.В., Куртикова А.Л., Кравец В.С., Кретинин С.В., Деревянчук М.В. Анализ содержания эндогенных брассиностероидов в кукурузе в условиях температурного стресса // Симпозиум «Растения и стресс», 9-12 ноября 2010, С. 145
25. Кравець В.С., Кретинін С.В., Драч С.В., Дерев’янчук М.В., Литвіновска Р.П., Хрипач В.А. Динаміка рівня ендогенних брасиностероїдів при дії низьких температур// Український біохімічний журнал. – 2010. – Т. 82, № 4 (додаток №1 – Матеріали Х Українського біохімічного з’їзду 13-17 вересня 2010 року, м. Одеса). – С. 198.
26. Кравец В.С., Кретинин С.В., Драч С.В., Деревянчук М.В., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А. Влияние низких температур на уровень эндогенных брассиностероидов // 6-та Міжнародна наукова конференція регуляції росту, розвитку і продуктивності рослин, 28-30 жовтня, 2009, стор 82.
27. Кретинин С.В., Деревянчук М.В., Драч С.В., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А., Кравец В.С. Влияние низких температур и брассиностероидов на фосфорилирование фосфолипидов клеток растений //6-та Міжнародна наукова конференція регуляції росту, розвитку і продуктивності рослин, 28-30 жовтня, 2009, стор стор 83.
28. Derevyanchuk M.V, Kretynin S.V., Kordyum E.L., Kravets V.S. Role of auxin-mediated formation of reactive oxygen species in gravity-directed pkant growth // 2nd International symposium “Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Agriculture Application”, 8-12 of October, 2007, p. 94.
29. М.В. Деревянчук, С.В. Кретинин, Е.Л. Кордюм, В.С. Кравец. Роль фосфолипазы D в реакции метаболизма клеток растений на изменение направления вектора гравитации // Международная конференция “Современная физиология растений: от молекул до экосистем”, 2007, С. 60.