

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ**

ПОКОТИЛО

Ігор В'ячеславович

УДК 577.152.314+577.112.6+577.175.19

**МОЛЕКУЛЯРНІ АСПЕКТИ УЧАСТІ ФОСФАТИДИЛХОЛІН-
ГІДРОЛІЗУЮЧИХ ФОСФОЛІПАЗ С РОСЛИН У ФОРМУВАННІ
ВТОРИННИХ ПОСЕРЕДНИКІВ ЗА ДІЇ БІОРЕГУЛЯТОРІВ**

02.00.10 – біоорганічна хімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ–2015

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділ молекулярних механізмів регуляції метаболізму клітини Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

Науковий керівник: Доктор біологічних наук, професор
КРАВЕЦЬ Володимир Степанович
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
завідувач відділу молекулярних механізмів регуляції
метаболізму клітини

Офіційні опоненти: Член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор
ЄМЕЦЬ Алла Іванівна
Інститут харчової біотехнології та
геноміки НАН України,
завідувач лабораторією клітинної біології та
нанобіотехнології

Кандидат біологічних наук
ВЕДЕНИЧОВА Ніна Петрівна
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
старший науковий співробітник відділу фітогормонології

Захист відбудеться «5» червня 2015 р. о 10-й годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.220.01 в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України за адресою 02660, Київ-94, вул. Мурманська, 1.

З дисертацією можна ознайомитись в науковій бібліотеці Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

Автореферат розісланий «30» квітня 2015 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

В.О. Євдокименко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ефективний синтез, скринінг та впровадження нових біологічно активних сполук (біорегуляторів) безпосередньо пов'язані з дослідженнями спрямованими на з'ясування природи механізмів їх дії на молекулярному рівні. Серед поширених біологічних мішеней дії біорегуляторів – підвищення стійкості рослин за умов дії біотичного стресу обумовленого ураженням шкідниками, патогенними грибами або бактеріями. У більшості випадків дія синтетичних біорегуляторів пов'язана з природними шляхами регуляції метаболізму клітини. Саме тому, визначення особливостей молекулярних механізмів реалізації біологічної дії природних фітогормонів (на прикладі саліцилової кислоти та метил жасмонату), а також їх синтетичних похідних та еліситорів, є важливим фактором розробки біотехнологічних підходів до підвищення якісних та кількісних параметрів врожайності рослин у зонах ризикованого землеробства.

Реакція рослин на дію чинників біотичного стресу (гормонів та еліситорів) відбувається на рівні плазматичної мембрани клітин, що опосередковує трансдукцію екзогенних регуляторних сигналів спрямованих на контроль внутрішньоклітинних реакцій метаболізму у цитозолі, а також експресії генів у ядрі (Canonne et al. 2011). Саме тому, мембрано-зв'язані фосфоліпази, та фосфатидилхолін-гідролізуючі фосфоліпази С (ФХ-ФЛС) зокрема, можуть відігравати ключову роль у формуванні сигнальних систем клітин рослин як на ранніх етапах дії біотичного стресу (Gonorazky et al. 2014), так і за умов дії біорегуляторів (Raho et al. 2011). Окрім цього добре відомою є участь ФХ-ФЛС у реакціях рослин на дію абіотичних стресів (Peters et al. 2010, Kocourcova et al. 2011, Rejchar et al. 2015). ФХ-ФЛС (ЕС 3.1.4.3) здатні гідролізувати низку структурних фосфоліпідів мембран серед яких найбільш поширеним є фосфатидилхолін (ФХ). Результатом даної реакції є продукція діацилгліцеролу (ДАГ) та фосфорильного залишку функціональної групи фосфоліпиду. Відомо, що ФХ-ФЛС приймають участь у реакції метаболізму рослин на дію низки чинників гормональної та стресової природи (Pokotylo et al. 2013). Тим не менш, механізми регуляції активності ФХ-ФЛС *in planta*, а також клітинні мішені дії ДАГ у шляхах реакції метаболізму рослин на дію біорегуляторів залишаються маловідомими. Зважаючи на це, аналіз механізмів реалізації біологічної дії природних та штучних біорегуляторів за участю ФХ-ФЛС на етапах продукції вторинних посередників ліпідної природи, а також на рівні змін експресії окремих ізоферментів ФХ-ФЛС, розширює уявлення щодо залучення фосфоліпаз у контроль росту, розвитку та захисних реакцій рослин на молекулярному рівні. Отримані дані свідчать про перспективність розгляду ФХ-ФЛС у якості мішені дії нових синтезованих біорегуляторів та біотехнологічних підходів спрямованих на підвищення стійкості рослин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у відділі Молекулярних механізмів регуляції метаболізму клітини Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України в рамках бюджетних тем №2.1.10.32 та ЦНП 9.1–12, а також за підтримки грантів

Міжнародного фонду «Вишеград» №50810511–2008 і гранту уряду Франції №816361Н–2014.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи є встановлення участі фосфатидилхолін-гідролізуючих фосфоліпаз С у продукції вторинних посередників та опосередкуванні внутрішньоклітинної дії ряду природних та синтетичних біорегуляторів.

Для виконання поставленої мети вирішувались наступні завдання:

1. Дослідити вплив фітогормонів (на прикладі саліцилової кислоти та метил жасмонату), а також природних та штучних елісаторів, зокрема флагеліну, на активність ФХ-ФЛС *in situ* у суспензійних культурах клітин Арабідопсису та тютюну.
2. Дослідити роль окремих ізоферментів ФХ-ФЛС у формуванні стійкості рослин Арабідопсису до дії біотичного стресу.
3. Вивчити динаміку змін експресії ізоферментів ФХ-ФЛС Арабідопсису за дії патогенів та біорегуляторів.
4. З'ясувати роль ФХ-ФЛС у продукції вторинних посередників та опосередкуванні внутрішньоклітинної дії біорегуляторів на молекулярному рівні.

Об'єкт дослідження – фосфатидилхолін-гідролізуючі фосфоліпази С клітин рослин у якості компонента сигнального каскаду рецепції дії чинників біотичного стресу та біорегуляторів.

Предмет дослідження – рівень продукції діацилгліцеролу за участю фосфатидилхолін-гідролізуючих фосфоліпаз С у суспензійних культурах клітин, а також зміни рівня експресії генів ФХ-ФЛС та рівня стресової стійкості рослин Арабідопсису.

Методи дослідження – використання флуоресцентних ліпідних зондів; тонкошарова хроматографія; біотест на визначення стресової стійкості рослин; виділення РНК; агарозний гель-електрофорез; аналіз експресії генів (ПЛР у реальному часі).

Наукова новизна отриманих результатів. За допомогою використання флуоресцентних зондів у суспензійних культурах клітин тютюну та Арабідопсису досліджено вплив фітогормонів (на прикладі саліцилової кислоти та метил жасмонату), а також природних та штучних елісаторів, на рівень продукції вторинного посередника ДАГ за участю фосфатидилхолін-гідролізуючих фосфоліпаз С. Вперше встановлено швидке зростання рівня активності ФХ-ФЛС за умов дії метил жасмонату – метильного похідного природного гормону жасмонової кислоти. Вперше показано, що рівень експресії ізоферменту ФХ-ФЛС4 Арабідопсису суттєво зростає за умов дії патогенів та елісаторів, в той час як мутантні лінії рослин Арабідопсису *fx-flc4*, що не експресують ізофермент ФХ-ФЛС4, характеризуються зниженою стресовою стійкістю. Встановлено, що експресія маркерних генів клітинної відповіді до дії стресу (*CYP81*, *FRK1*, *PP2C5*, *WRKY29*) є зниженою у мутантних лініях рослин Арабідопсису з нефункціональним ізоферментом ФХ-ФЛС4. Отримані результати вказують на участь фосфатидилхолін-гідролізуючих фосфоліпаз С рослин у первинних механізмах

трансдукції сигналів у відповідь на дію біорегуляторів та в умовах дії біотичного стресу. Результати досліджень також дозволяють вказати на специфічну роль ізоферменту ФХ-ФЛС4 у реалізації біологічної дії біорегуляторів на рівні змін експресії генів, а також на рівні продукції вторинних посередників ліпідної природи.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати розширюють уявлення щодо молекулярних механізмів реалізації біологічної дії біорегуляторів у клітинах рослин на рівні систем трансдукції сигналів ліпідної природи, що може бути використано в біотехнології та агровиробництві. Запропонований метод вивчення активності фосфоліпаз за допомогою використання флуоресцентних зондів може бути застосованим для дослідження активності інших ферментів що метаболізують фосфатидилхолін (наприклад фосфоліпази А та Д). Використана модельна система на основі мутантних ліній рослин Арабідопсису з дефектними ізоферментами ФХ-ФЛС може бути використана для дослідження функціональної ролі окремих ізоформ ФХ-ФЛС у реакціях рослин на дію екзогенних стимулів різної природи. Визначення ролі ізоферменту ФХ-ФЛС4 у формуванні стійкості рослин за умов дії патогенів обумовлює його позиціонування у генно-інженерній біотехнології з метою створення ліній рослин стійких до дії шкідників та патогенів. Отримані дані щодо ролі ФХ-ФЛС у клітинній регуляції та опосередкуванні внутрішньоклітинної дії фізіологічно активних сполук природного та штучного походження можуть використовуватись на навчальних курсах з біоорганічної хімії, біохімії, молекулярної біології та фізіології рослин, а також слугувати основою для подальших досліджень у даному напрямку.

Основний внесок здобувача. Дослідження рівня активності ФХ-ФЛС у суспензійних культурах клітин рослин, визначення рівня стійкості мутантних ліній рослин Арабідопсису до дії біотичного стресу, визначення змін експресії генів рослин Арабідопсису, систематизація літературних даних, аналіз і узагальнення отриманих результатів виконані дисертантом особисто на базі Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, а також Інституту експериментальної ботаніки АН Чеської Республіки. Експериментальні дані, використані в дисертації та представлені в статтях зі співавторами, отримані за безпосередньої участі автора. Постановка мети та схеми дослідження, а також обговорення результатів здійснено разом з науковим керівником докт. біол. наук., проф. В.С. Кравцем.

Апробація результатів дисертаційної роботи. Матеріали дисертаційної роботи були представлені на шести наукових конференціях: міжнародному конгресі «VII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology» (Валенсія, Іспанія, 2010 р.), науковій конференції Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії (Київ, Україна, 2010 р.), X Українському біохімічному з'їзді (Одеса, Україна, 2010 р.), конференції «Біологія рослин та біотехнологія» (Біла Церква, Україна, 2011 р.), конференції «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Новий Світ, Україна, 2011 р.), міжнародному симпозиуму «III International Symposium: Intracellular signaling and bioactive molecules design» (Львів, Україна, 2012 р.)

Публікації. Матеріали дисертаційної роботи викладені у 6 статтях у фахових наукових журналах та у тезах 6 доповідей.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, опису отриманих результатів та їх обговорення, висновків та списку використаних джерел (440 найменувань). Дисертаційна робота викладена на 159 сторінках друкованого тексту та містить 35 рисунків і 1 таблицю.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. Розділ присвячено теоретичному обґрунтуванню ролі ФХ-ФЛС у функціонуванні сигнальних каскадів та продукції вторинних посередників ліпідної природи у рослин, тварин та бактерій. Представлено дані щодо ізоферментного складу ФХ-ФЛС у модельних рослин Арабідопсису. Проаналізовано біохімічні властивості та субстратну специфічність клонованих ізоферментів ФХ-ФЛС3, 4 та 5 Арабідопсису. За допомогою методів біоінформатичного аналізу продемонстровано особливості первинної структури ФХ-ФЛС, а також проведено філогенетичний аналіз ізоферментів ФХ-ФЛС у різних груп рослинних організмів. Показано особливості локалізації ізоферментів ФХ-ФЛС Арабідопсису на клітинному та тканинному рівнях. Проаналізовано молекулярні механізми залучення ФХ-ФЛС у реакцію клітин рослин на дію чинників біотичного та абіотичного стресів, а також у відповідь на дію біорегуляторів.

Матеріали та методи дослідження. Для досліджень були використані рослини Арабідопсису (*Arabidopsis thaliana*), а також суспензійні культури клітин Арабідопсису та тютюну BY-2.

З метою визначення активності ФХ-ФЛС *in situ*, до суспензії клітин вносилося 0.66 мкг·мл⁻¹ флуоресцентно-активного BODIPY фосфатидилхоліну (2-деканол-1-(O-(11-(4,4-дифлюоро-5,7-диметил-4-бора-3а,4а-діаза-*s*-індацен-3-пропіоніл)аміно)унде-цил)-*sn*-гліцери-3-фосфохолін, Invitrogen). Після 10 хв інкубації до середовища вносились біорегулятори згідно з планом експерименту. У якості діючих сполук у роботі використовувались препарати саліцилової кислоти, метил жасмонату, 4-гідроксибензойної кислоти (Sigma), ендо-1,3-β-ксиланази (Fluka), пептиду flg22 (Genscript), *S*-метил ефіру бензо(1,2,3)тіадіазол-7-карботіонової кислоти (бензотіадіазол, препарат Bion™, Syngenta Crop Protection) та ліпополісахаридів з клітинних стінок *Pseudomonas syringae* pv. *Coriandricola* отримані від університету Утрехту, Нідерланди. Після завершення інкубації, флуоресцентно-активні продукти розщеплення фосфатидилхоліну у дослідних та контрольних зразках екстрагувались шляхом додавання 4 мл охолодженої суміші хлороформ:метанол (2:1, об./об.). Після розділення та ресуспендування, ліпідні зразки наносились на немодифіковані силікагелеві пластини для тонкошарової хроматографії (Merck) самплером ATS4 (Camag) та розділялись у горизонтальній хроматографічній камері з використанням системи розчинників хлороформ:метанол:вода (65:25:4, об./об.). Візуалізація та кількісний підрахунок

продуктів розщеплення флюоресцентного фосфатидилхоліну (поглинання 473нм, емісія 520 нм) відбувався з використанням лазерного сканеру FLA-7000 (Fujifilm).

З метою визначення рівня стресової стійкості мутантних ліній рослин Арабідопсису з дефектними ізоферментами ФХ-ФЛС, листя рослин інокулювалося штамом бактерій *Pseudomonas Syringae* pv. *Maculicola* стійких до дії стрептоміцину. Концентрація бактерій в інокулюмі становила $3 \cdot 10^5$ бактерій·мл⁻¹ у розчині 10мМ MgCl₂. Через дві доби після інфікування гомогенат з листових пластинок розводився та наносився на позначені треки чашок Петрі, що містили тверде поживне середовище LB (Lysogeny broth) з 25 мг/л стрептоміцину. Чашки Петрі термостатувались при 26 °С протягом доби та аналізувались з метою підрахунку окремих бактеріальних колоній.

Зміни експресії генів інтересу визначались у листі рослин Арабідопсису, що вирощувались протягом трьох тижнів у ґрунтовій суміші. Після проведення відповідної експериментальної дії, тканини Арабідопсису заморожувались у рідкому азоті та гомогенізувались у охолоджених керамічних ступках не допускаючи їх передчасного розмороження. Виділення РНК з гомогенізованих тканин відбувалось за допомогою набору реактивів Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich). Деструкція залишків ДНК у виділеній РНК проводилась за допомогою набору Turbo DNA-free Kit (Applied Biosystems). Якість, концентрація та рівень контамінації РНК оцінювалась за допомогою агарозного гелю електрофорезу та шляхом визначенням коефіцієнту поглинання 260/280 нм спектрофотометрично. Синтез кДНК на базі виділеної РНК шляхом зворотної транскрипції відбувався за допомогою набору Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) з використанням 1 мкг РНК та оліго (dT)₁₈ праймеру, що дозволяє використовувати у якості матриці для синтезу кДНК зрілі мРНК зі сформованим полі-А хвостом. Кількісна оцінка експресії генів Арабідопсису здійснювалась за допомогою проведення полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. З цією метою використовувався набір реактивів LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche), що передбачає використання несиметричного ціанінового барвника у якості інтеркалюючого флюоресцентного маркеру синтезу дволанцюгової ДНК. У якості референтного використовувався ген актину. Визначення коефіцієнту змін експресії генів визначалось за формулою:

$$\text{коефіцієнт зміни експресії} = \frac{E1 \Delta CP1 (\text{контроль} - \text{експеримент})}{E2 \Delta CP2 (\text{контроль} - \text{експеримент})}$$

де E1 – ефективність ампліфікації гену інтересу, E2 – ефективність ампліфікації референтного гену, ΔCP1 – різниця точок ампліфікації гену інтересу у контрольних рослин та рослин що зазнавали експериментальної дії, ΔCP2 – різниця точок ампліфікації референтного гену у контрольних рослин та рослин що зазнавали експериментальної дії.

Статистична обробка даних здійснювалася за допомогою обрахування стандартного відхилення, стандартної похибки та довірчих інтервалів на рівні значущості 95%. Всі досліди повторювали 3 рази. На діаграмах представлені середні значення ± стандартна похибка середнього значення.

Визначення змін активності ФХ-ФЛС у відповідь на дію гормонів саліцилової кислоти та метил жасмонату, а також їх синтетичних аналогів, за допомогою флуоресцентних зондів. Аналіз рівня активності фосфоліпаз є важливим інструментом вивчення їх функціональної ролі у живих системах. Серед методологічних підходів, що використовуються з цією метою, вирізняють методи розділення та ідентифікації ліпідів шляхом застосування радіоізотопного мічення (Kravets et al. 2010), а також використання флуоресцентних фосфоліпідних зондів. Останній метод довів свою успішність у якості ефективного інструменту вивчення активності фосфоліпаз рослин *in situ* та *in vivo* (Rejchar et al. 2010). У дисертаційній роботі використовувалась методика аналізу активності ФХ-ФЛС шляхом гідролізу BODIPY фосфатидилхоліну у суспензійних культурах клітин тютюну та Арабідопсису. Продуктом даної реакції є продукція фосфохоліну та флуоресцентно-активного діацилгліцеролу (ДАГ) (Рис. 1), підрахунок рівня накопичення якого виступає безпосереднім маркером активності ФХ-ФЛС.

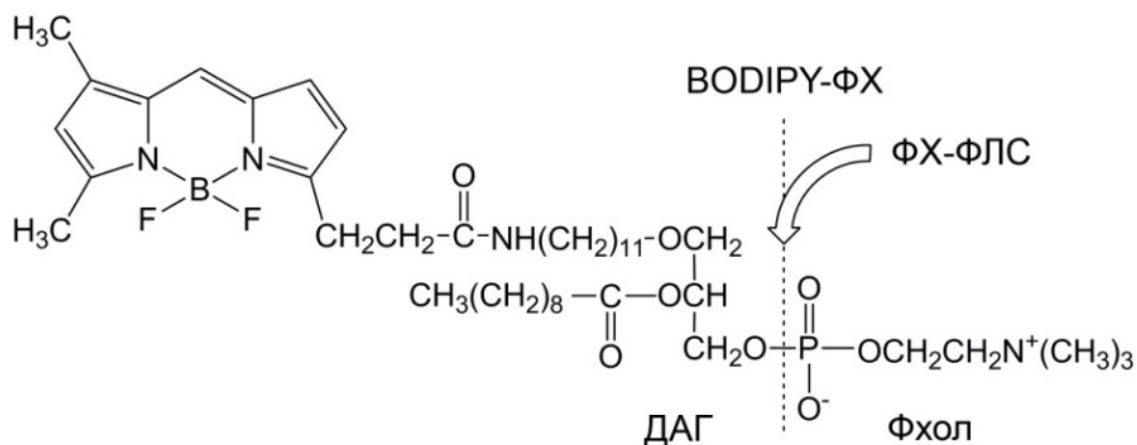


Рис. 1. Схема гідролізу флуоресцентного зонду BODIPY-фосфатидилхоліну за участю ФХ-ФЛС.

У дисертаційній роботі було проаналізовано ефекти дії низки біорегуляторів на рівень активності ФХ-ФЛС. До класу біорегуляторів відносяться сполуки природного та штучного походження, дія яких у малих концентраціях здатна обумовлювати формування специфічних реакцій метаболізму клітин. За умов біотичного стресу до таких сполук відносять білкові та небілкові еліситори, а також гормони, що обумовлюють специфічну активацію захисних систем клітин рослин (Kanno et al. 2012). Було визначено, що рівень активності ФХ-ФЛС змінюється за умов дії природних (саліцилової кислоти та метил жасмонату) та штучних (бензотіадіазол) гормонів у суспензійних культурах клітин рослин. Показано, що дія саліцилової кислоти (СК) викликає швидке зниження рівня накопичення ДАГ у суспензійній культурі клітин Арабідопсису у порівнянні з контролем (Рис. 2).

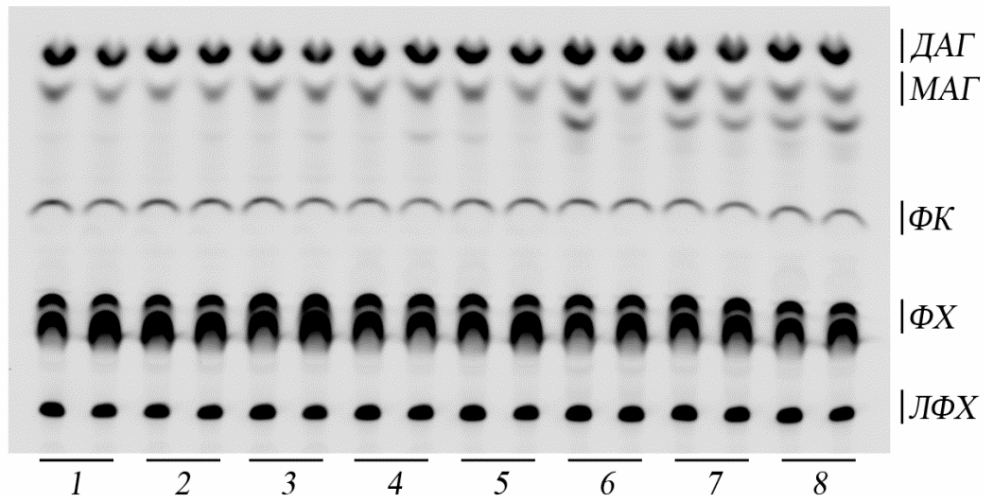


Рис. 2. Хроматографічне розділення флуоресцентно-мічених ліпідів у суспензійній культурі клітин Арабідопсису за умов дії СК та фізіологічно неактивного аналогу СК. 1 – контроль 30 хв; 2 – СК 0,5 мМ; 3 – Na-сіль СК 0,5 мМ; 4 – 4-ГБК 0,5 мМ; 5 – контроль 60 хв; 6 – СК 0,5 мМ; 7 – Na-сіль СК 0,5 мМ; 8 – 4-ГБК 0,5 мМ; ДАГ – діацилгліцерол; ЛФХ – лізофосфатидилхолін; МАГ – моноацилгліцерол; ФК – фосфатидна кислота; ФХ – фосфатидилхолін.

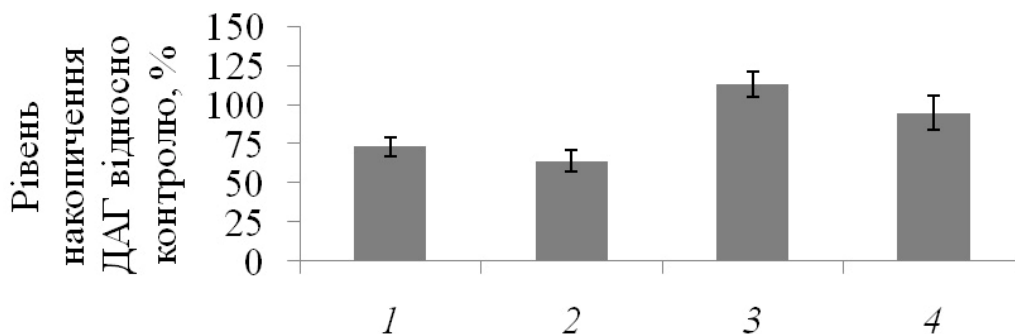


Рис. 3. Підрахунок рівня накопичення ДАГ у дослідних пробах. Рівень накопичення ДАГ у контрольних пробах прийнятий за 100%. 1 – СК 0,5 мМ, 30 хв; 2 – СК 0,5 мМ, 60 хв; 3 – 4-ГБК 0,5 мМ, 30 хв; 4 – 4-ГБК 0,5 мМ, 60 хв.

Дані кількісного підрахунку рівня накопичення ДАГ свідчать про те, що активність ФХ-ФЛС знижується більш ніж на 25% в результаті короткого часу експозиції (30 хв) до дії 0,5 мМ СК (Рис. 3). Ефект пригнічення активності ФХ-ФЛС незначно посилювався (до 30 %) після 60 хвилин дії 0,5 мМ СК та був подібним до такого за дії водорозчинної натрієвої солі СК. В той же час, дія 4-гідроксибензойної кислоти (4-ГБК) не обумовлювала достовірних змін активності ФХ-ФЛС у тих же часових та концентраційних інтервалах (Рис. 3). Відомо, що 4-ГБК, яка за своєю хімічною структурою є близькою до СК (2-гідроксибензойної кислоти), не виявляє біологічної активності у клітинах рослин (Chen et al. 1993). Таким чином, використання 4-ГБК у якості негативного контролю дозволяє стверджувати щодо специфічності ефекту дії СК на зниження рівня продукції ДАГ за участю ФХ-ФЛС. Окрім цього, швидкі зміни рівня активності ФХ-ФЛС (у межах 30 хв) вказують на залучення пост-трансляційних механізмів у регуляцію активності ФХ-ФЛС за умов

дії СК. Природа таких механізмів наразі залишається маловідомою та може включати дію алостеричних регуляторів або відбуватись в результаті змін у внутрішньоклітинній локалізації ферменту (Pokotylo et al. 2013).

Бензотіадіазол (*S*-метил ефір бензо(1,2,3)тіадіазол-7-карботіонової кислоти) у клітин рослин здатен виступати у якості функціонального аналогу СК та на сьогодні використовується у якості перспективного індуктора резистентності рослин (Akagi et al. 2014). У роботі було проаналізовано вплив бензотіадіазолу на активність ФХ-ФЛС у суспензійній культурі клітин тютюну ВУ-2 (Рис. 4). Встановлено, що бензотіадіазол, подібно до СК, обумовлює дозозалежне зниження рівня продукції ДАГ за участю ФХ-ФЛС. Більш того, зниження рівня продукції ДАГ за участю ФХ-ФЛС спостерігалось вже після 10 хв дії бензотіадіазолу (Рис. 5). Натомість найбільший інгібуючий ефект бензотіадіазолу на рівень продукції ДАГ (70%) досягався після 30 хв дії 0,25 мМ сполуки. Важливо зауважити, що інгібуючий ефект бензотіадіазолу на активність ФХ-ФЛС, порівняно з таким у СК (Рис. 3), досягався за нижчих концентрацій діючої речовини та був більшим в абсолютному вираженні. Ці дані дозволяють стверджувати про високу ефективність застосування синтетичних біологічно активних сполук, що діють у природних шляхах клітинної регуляції, з метою контролю реакцій метаболізму за нормальних умов росту, а також за умов дії стресів.

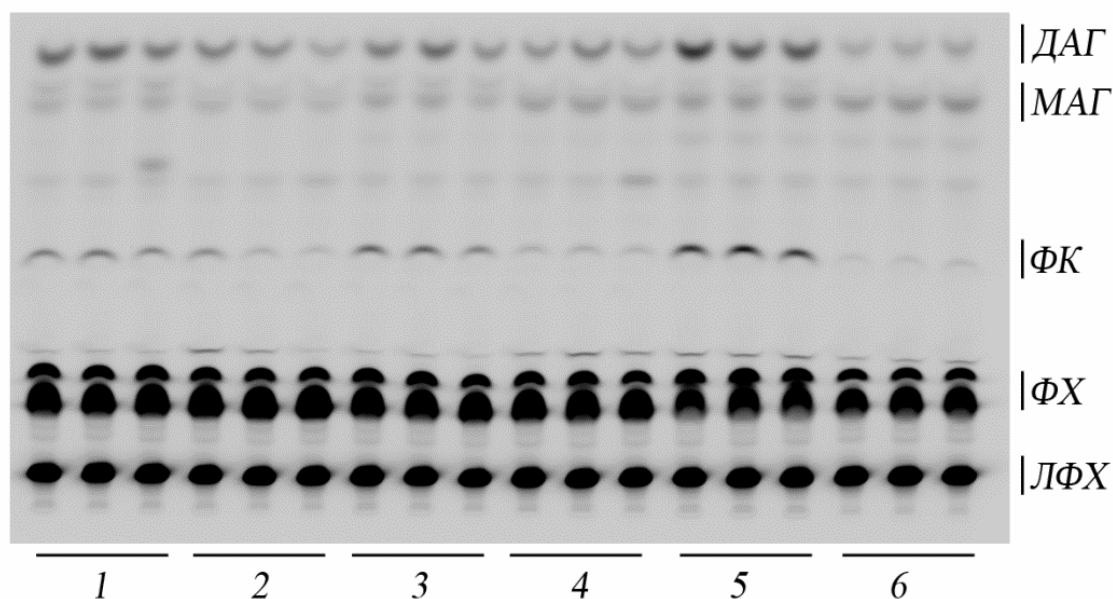


Рис. 4. Хроматографічне розділення флуоресцентно-мічених ліпідів у суспензійній культурі клітин тютюну ВУ-2 за умов дії пептиду банзотіадіазолу. 1 – контроль 10 хв; 2 – бензотіадіазол 0,25 мМ; 3 – контроль 20 хв; 4 – бензотіадіазол 0,25 мМ; 5 – контроль 30 хв; 6 – бензотіадіазол 0,25 мМ; ЛФХ – лізофосфатидилхолін; МАГ – моноацилгліцерол; ФК – фосфатидна кислота; ФХ – фосфатидилхолін.

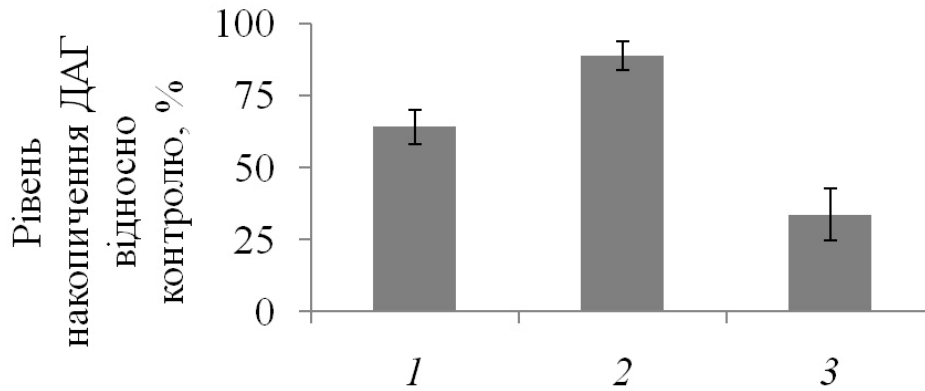


Рис. 5. Підрахунок рівня накопичення DAG у дослідних пробах. Рівень накопичення DAG у контрольних пробах прийнятий за 100%. 1 – бензотіадіазол 0,25 мМ, 10 хв; 2 – бензотіадіазол 0,25 мМ, 20 хв; 3 – бензотіадіазол 0,25 мМ, 30 хв.

Жасмонати відносяться до іншої важливої групи гормонів рослин, дія яких безпосередньо пов'язана з формуванням захисних реакцій клітин рослин у відповідь на дію біотичного стресу (Wasternack and Hause 2013). В результаті виконання дисертаційної роботи було встановлено, що дія легкої форми жасмонової кислоти – метил жасмонату (МЕЖ) – обумовлює швидке підвищення рівня накопичення DAG у суспензійних культурах клітин тютюну ВУ-2 (Рис. 6), що вказує на активацію ФХ-ФЛС.

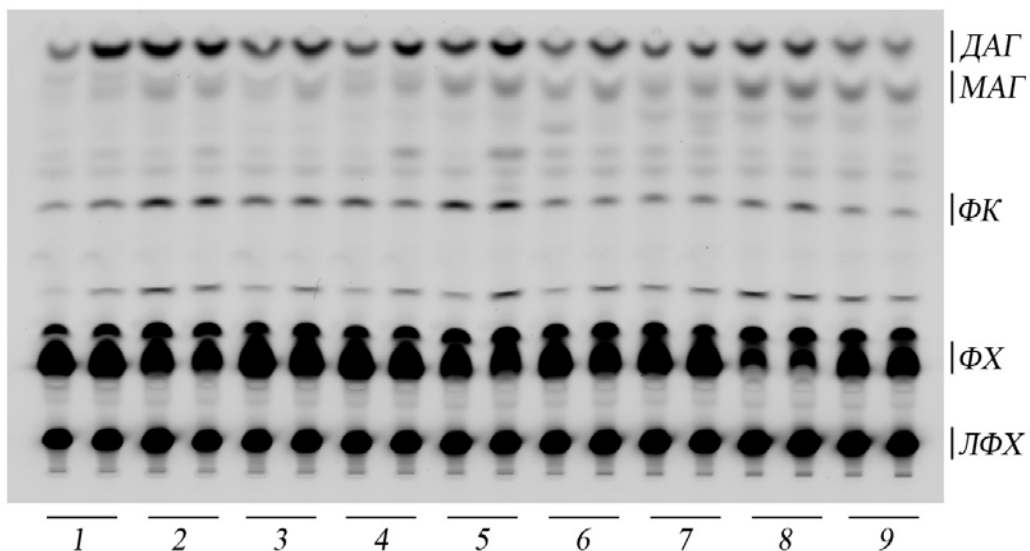


Рис. 6. Хроматографічне розділення флюоресцентно-мічених ліпідів у суспензійній культурі клітин тютюну ВУ-2 за умов дії МЕЖ. 1 – контроль 15 хв; 2 – МЕЖ 0,5 мМ; 3 – МЕЖ 1 мМ; 4 – контроль 30 хв; 5 – МЕЖ 0,5 мМ; 6 – МЕЖ 1 мМ; 7 – контроль 60 хв; 8 – МЕЖ 0,5 мМ; 9 – МЕЖ 1 мМ; ЛФХ – лізофосфатидилхолін; МАГ – моноацилгліцерол; ФК – фосфатидна кислота; ФХ – фосфатидилхолін.

Підрахунок рівня накопичення DAG у дослідних пробах показав, що дія 0,5 мМ МЕЖ впродовж 15 хв обумовлює підвищення рівня активності ФХ-ФЛС більш ніж на 30% (Рис. 7). Даний ефект зберігався впродовж 60 хв дії МЕЖ. Ці дані

вказують на роль ФХ-ФЛС у якості однієї з первинних мішеней дії МЕЖ у шляхах реалізації її внутрішньоклітинної дії у рослин. Однак, збільшення діючої концентрації МЕЖ до 1мМ обумовлювало зниження ефекту активації ФХ-ФЛС, що може вказувати на концентраційну залежність ефектів дії МЕЖ у живих системах. Окрім цього, залишається нез'ясованим як швидка активація ФХ-ФЛС внаслідок дії МЕЖ на рівні мембран узгоджується з відомими шляхами реалізації біологічної дії МЕЖ внаслідок зв'язування з рецепторними білками та змін транскриптому на рівні ядра (Katsir et al. 2008).

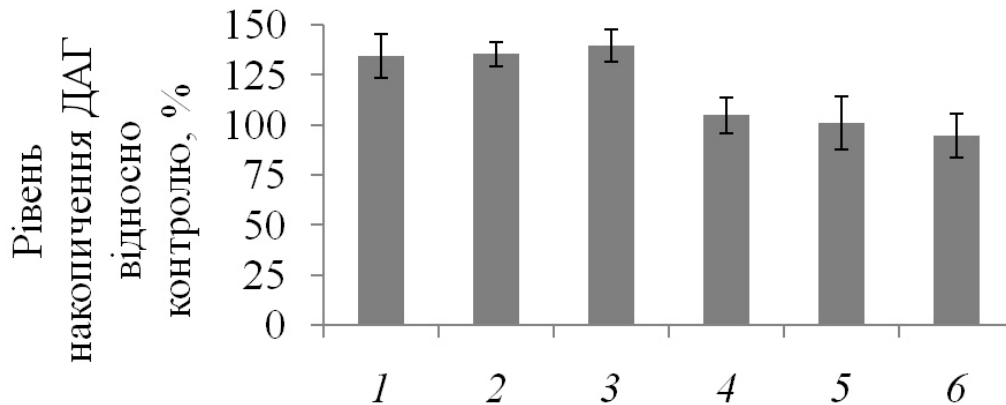


Рис. 7. Підрахунок рівня накопичення ДАГ у дослідних пробах. Рівень накопичення ДАГ у контрольних пробах прийнятий за 100%. 1 – МЕЖ 0,5 мМ, 15 хв; 2 – МЕЖ 0,5 мМ, 30 хв; 3 – МЕЖ 0,5 мМ, 60 хв; 4 – МЕЖ 1 мМ, 15 хв; 5 – МЕЖ 1 мМ, 30 хв; 6 – МЕЖ 1 мМ, 60 хв.

Функціональний зв'язок між ФХ-ФЛС та реакцією рослин на дію стресів та біорегуляторів є малодослідженим. Також, до сьогоденного часу, не було вивчено роль ФХ-ФЛС у реалізації внутрішньоклітинної дії СК або жасмонатів. Протилежні ефекти дії МЕЖ та СК на рівень активності ФХ-ФЛС добре узгоджуються з антагоністичними відносинами між даними гормонами у клітинах рослин (Takahashi et al. 2004). Раніше різноспрямовану роль фосфоліпаз у реакціях рослин на дію СК та МЕЖ було показано на прикладі фосфоліпази Дβ1 Арабідопсису, що забезпечує продукцію спорідненого до ДАГ вторинного посередника ліпідної природи – фосфатидної кислоти (Zhao et al. 2013). Отримані дані вказують на залучення ФХ-ФЛС до функціонування ранніх етапів трансдукції сигналів спрямованих на реалізацію біологічної дії біорегуляторів гормональної природи, а також свідчать про те, що антагонізм між МЕЖ та СК у рослин може реалізовуватись на рівні змін рівня продукції ДАГ за участю ФХ-ФЛС.

Визначення реакції ФХ-ФЛС на дію природних та штучних біорегуляторів з елісаторними властивостями на прикладі пептиду флагеліну. Елісатори формують окрему групу біорегуляторів, що діють у шляхах індукції захисних реакцій шляхом взаємодії з білковими рецепторами клітин рослин. Серед найпоширеніших елісаторів – білок флагелін джгутіків бактерій та його N-кінцевий 22-х амінокислотний пептид flg22 (Meindl et al. 2000). У процесі виконання дисертаційної роботи було встановлено, що дія пептиду flg22 у наномолярних концентраціях викликає швидку та значну активацію ФХ-ФЛС у суспензійній

культури клітин Арабідопсису (Рис. 8). Кількісний підрахунок рівня накопичення ДАГ показав, що дія 1 нМ flg22 викликає більш ніж двократне зростання активності ФХ-ФЛС після 30 хв експозиції (Рис. 9). Натомість, за умов дії 10нМ та 100 нМ flg22 активність продукції ДАГ за участю ФХ-ФЛС зростала майже втричі. Молекулярні механізми дії флагеліну на рівень активності фосфоліпаз клітин рослин є маловивченими. Тим не менш, зважаючи на мембранну локалізацію як рецепторного білку флагеліну FLS2 (Danna et al. 2011), так і окремих ізоферментів ФХ-ФЛС (Pokotylo et al. 2013), можна припустити можливість їх просторової та функціональної асоціації на ранніх етапах формування адаптивних реакції рослинного організму у відповідь на дію біорегуляторів.

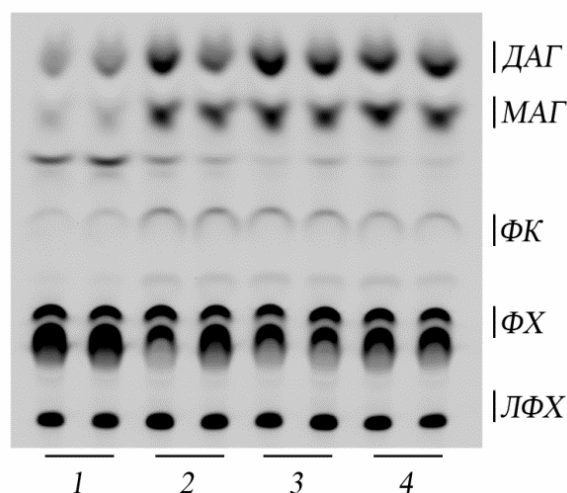


Рис. 8. Хроматографічне розділення флюоресцентно-мічених ліпідів у суспензійній культурі клітин Арабідопсису за умов дії пептиду flg22. 1 – контроль 30 хв; 2 – flg22 1 нМ, 30 хв; 3 – flg22 10 нМ, 30 хв; 4 – flg22 100 нМ, 30 хв; ЛФХ – лізофосфатидилхолін; МАГ – моноацилгліцерол; ФК – фосфатидна кислота; ФХ – фосфатидилхолін.

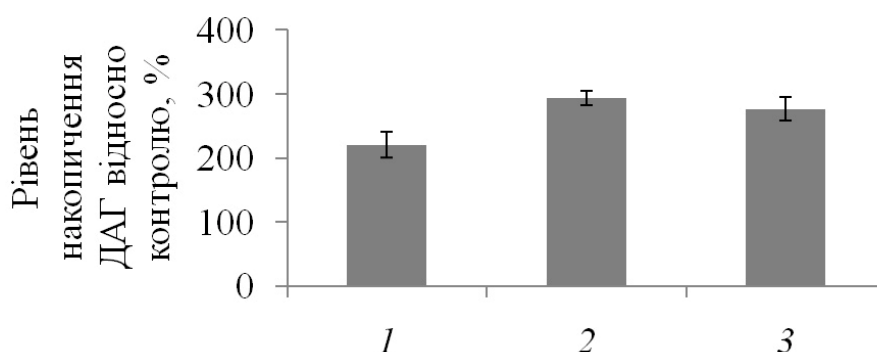


Рис. 9. Підрахунок рівня накопичення ДАГ у дослідних пробах. Рівень накопичення ДАГ у контрольних пробах прийнятий за 100%. 1 – flg22 1 нМ, 30 хв; 2 – flg22 10 нМ, 30 хв; 3 – flg22 100 нМ, 30 хв.

Відомо, що низка фосфоліпаз є залученими у реалізацію захисних реакцій клітин рослин у відповідь на дію біорегуляторів (Raho et al. 2011). Раніше було встановлено, що два елісатори отримані з ооміцетів пригнічували активність

формування ДАГ за участю ФХ-ФЛС у суспензійних культурах клітин тютюну та петрушки (Scherer et al. 2002). В результаті проведення досліджень спрямованих на з'ясування ролі ФХ-ФЛС в реалізації внутрішньоклітинної дії біорегуляторів, було встановлено, що ефект дії природних та синтезованих біорегуляторів (еліситорів) на активність ФХ-ФЛС у клітинах рослин різниться за силою та спрямованістю в залежності від часових та концентраційних параметрів, а також від молекулярної природи діючої сполуки.

Молекулярні основи участі ФХ-ФЛС у опосередкуванні внутрішньоклітинної дії біорегуляторів шляхом продукції вторинних посередників ліпідної природи. Отримані дані щодо змін активності ФХ-ФЛС *in situ* у суспензійних культурах клітин Арабідопсису та тютюну у відповідь на дію природних та штучних біорегуляторів (Рис. 2, 4, 6, 8) вказують на безпосередню участь ФХ-ФЛС у захисних реакціях клітин рослин. Однак, важливим є визначення кінцевого біологічного ефекту участі ФХ-ФЛС у механізмах формування стійкості рослин до дії патогенів. Існують дані, що вказують на пряму кореляцію між рівнем експресії окремих ізоферментів ФХ-ФЛС та рівнем стресової стійкості рослин (Peters et al. 2014). З метою визначення ролі ФХ-ФЛС у формуванні стійкості рослин за дії біотичного стресу у роботі використовувались лінії мутантних рослин Арабідопсису у яких експресія індивідуальних ізоферментів ФХ-ФЛС є нокаутованою внаслідок вбудовування Т-ДНК у відповідних локусах. Стійкість таких рослин до дії біотичного стресу оцінювалась шляхом проведення біотесту з використанням бактеріальних патогенів *P. syringae*. У якості позитивного контролю використовувались мутантні лінії рослин Арабідопсису *npr1*, що характеризуються високою сприйнятливістю до бактеріального ураження внаслідок втрати чутливості до ендogenous накопичення гормону СК (Cao et al. 1997).

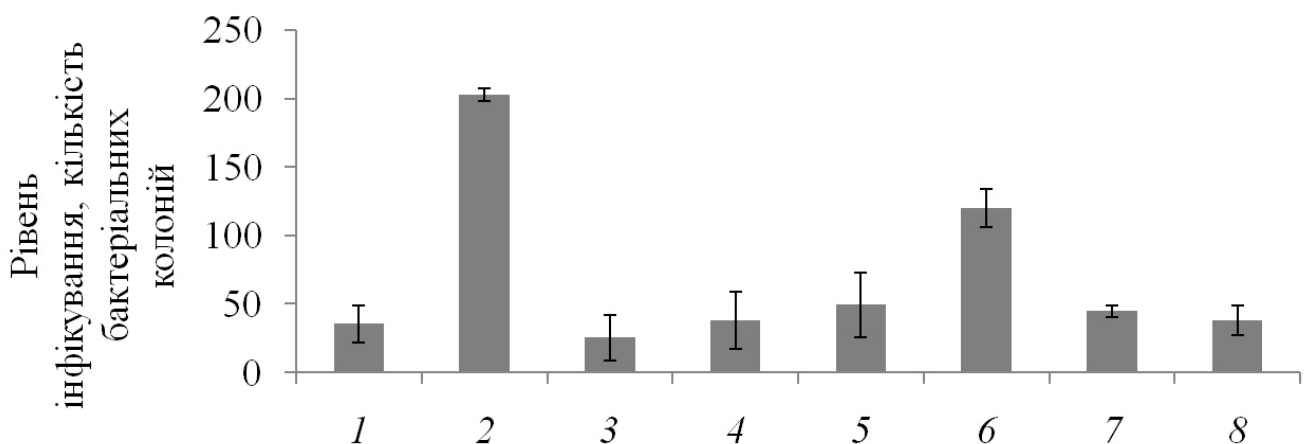


Рис. 10. Підрахунок кількості життєздатних бактерій у листових пластинках рослин Арабідопсису через 48 годин після інфікування. 1 – рослини дикого типу; 2 – *npr1*; 3 – *fch-flc1*; 4 – *fch-flc2*; 5 – *fch-flc3*; 6 – *fch-flc4*; 7 – *fch-flc5*; 8 – *fch-flc6*.

В результаті проведеного біотесту було встановлено, що мутантні лінії рослин Арабідопсису з нокаутованою експресією ізоферменту ФХ-ФЛС4 характеризуються значно зниженою стійкістю до бактеріального ураження. Ці дані були отримані в результаті аналізу рівня розмноження бактерій у тканинах листа мутантів *fch-flc4*

через дві доби інфікування, що було більш ніж у 4 рази вищим у порівнянні з таким у контрольних рослин дикого типу (Рис. 10). Роль ФХ-ФЛС4 у формуванні захисних реакцій клітин рослин може бути пов'язаною з порушенням ендогенної чутливості до дії СК, подібно до такої у ліній рослин *npr1*, що характеризувались низьким рівнем стресової стійкості та накопичували більш ніж у 8 разів більше бактерій у порівнянні з контролем (Рис. 10). На підтвердження цього, специфічна біологічна реакція ФХ-ФЛС на дію СК буда встановленою *in situ* (Рис. 2). Стійкість інших п'яти ліній мутантних рослин Арабідопсису з нокаутуваними генами ФХ-ФЛС1, 2, 3, 5 та 6 достовірно не відрізнялась від такої у контрольних рослин. Отримані дані добре узгоджуються з результатами досліджень, що вказують саме на ФХ-ФЛС4 у якості ферменту залученого у клітинний регуляторний сигналінг за дії стресів та гормонів (Kocourková et al. 2011, Peters et al. 2010, Wimalasekera et al. 2010). Саме тому, результати змін активності ФХ-ФЛС *in situ*, що спостерігались за умов дії біорегуляторів, можуть прямо асоціюватись з активністю ФХ-ФЛС4 Арабідопсису (або гомолога ФХ-ФЛС4 у тютюну). Більш того, рівень експресії ізоферменту ФХ-ФЛС4 Арабідопсису зростав більш ніж у 10 разів через 30 год дії бактерій *P. syringae* (Рис. 11), що додатково вказує на залучення механізмів регуляції активності ферменту на транскрипційному рівні. Таким чином, результати досліджень роботи дозволяють вказати на ключову роль ФХ-ФЛС4 у формуванні захисних реакцій клітин рослин, що реалізуються внаслідок змін активності ФХ-ФЛС та продукції ДАГ на ранніх етапах дії біорегуляторів.

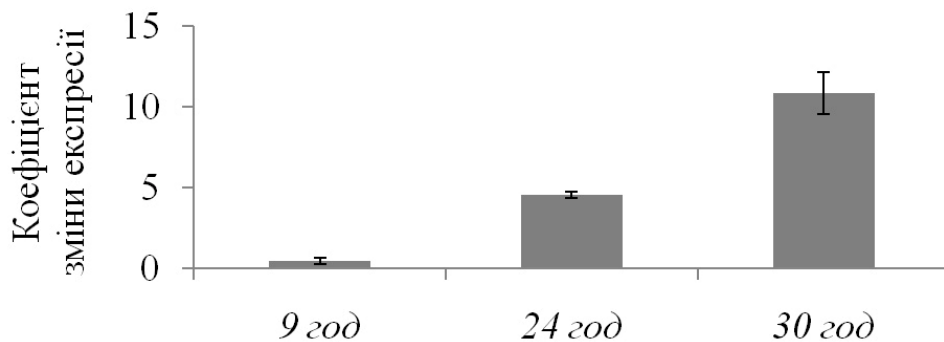


Рис. 11. Зміна експресії ізоферменту ФХ-ФЛС4 Арабідопсису у відповідь на дію патогенних бактерій *P. syringae*.

З метою визначення ролі ФХ-ФЛС у регуляторних каскадах клітин рослин за умов дії біорегуляторів на молекулярному рівні було проаналізовано експресію низки маркерних генів у мутантних ліній рослин Арабідопсису *fx-fls4* у якості реакції на дію пептиду *flg22*. Встановлено, що рівень експресії гену, що кодує рецепторну кіназу FRK1 (Flagellin-responsive kinase 1), у відповідь на дію пептиду *flg22* є майже в 0.4 рази зниженим у мутантних ліній рослин Арабідопсису *fx-fls4* у порівнянні з рослинами дикого типу (Рис 11). Рецепторна кіназа FRK1 приймає безпосередню участь у регуляторних шляхах індукованих дією *flg22* в клітинах рослин в той час як рівень активації її експресії може слугувати безпосереднім маркером ефективності формування захисних систем клітин рослин (Yi et al. 2014). Знижений рівень експресії FRK1 у рослин з нефункціональною ФХ-ФЛС4 вказує на

залучення останньої у реалізацію ранніх етапів дії *flg22* на рівні відповідного рецептору та подальшої реалізації механізмів клітинного захисту у регуляторному каскаді що залучає FRK1. Цей висновок також підтверджується результатами аналізу рівня активності ФХ-ФЛС *in situ* за умов дії пептиду *flg22* (Рис. 8).

Окрім FRK1, експресія низки інших генів також може виступати маркером формування захисних реакцій клітин рослин. Серед таких – ген що кодує мітоген-активовану фосфатазу протеїнкіназ PP2C5 (Brook et al. 2010), ген цитохрому CYP81 (Kandel et al. 2007) та транскрипційний фактор WRKY29 (Wang et al. 2014). Експресія даних генів також була достовірно зниженою у рослин Арабідопсису *fx-flc4* за умов дії *flg22* у порівнянні з рослинами дикого типу (Рис. 12). Отримані дані вказують на те, що ФХ-ФЛС4 може розглядатись не лише у якості ключового ефектору у шляхах реалізації внутрішньоклітинної дії флагеліну, але також виступати у якості інтегрального компоненту систем клітинної регуляції у відповідь на дію біорегуляторів.

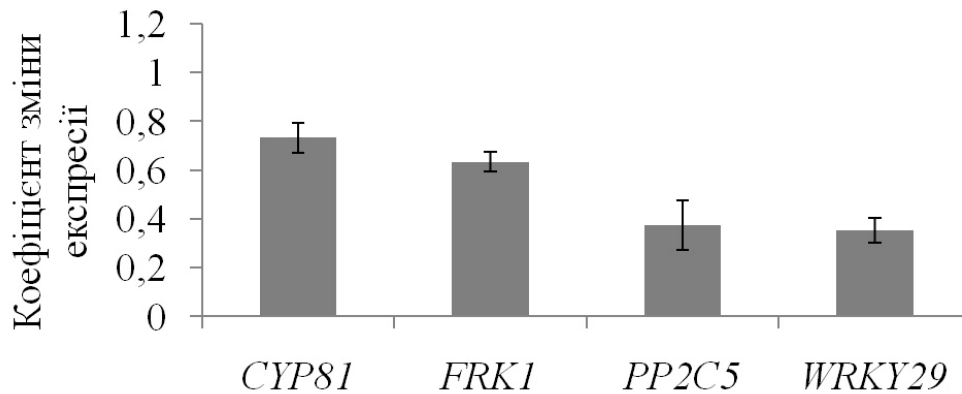


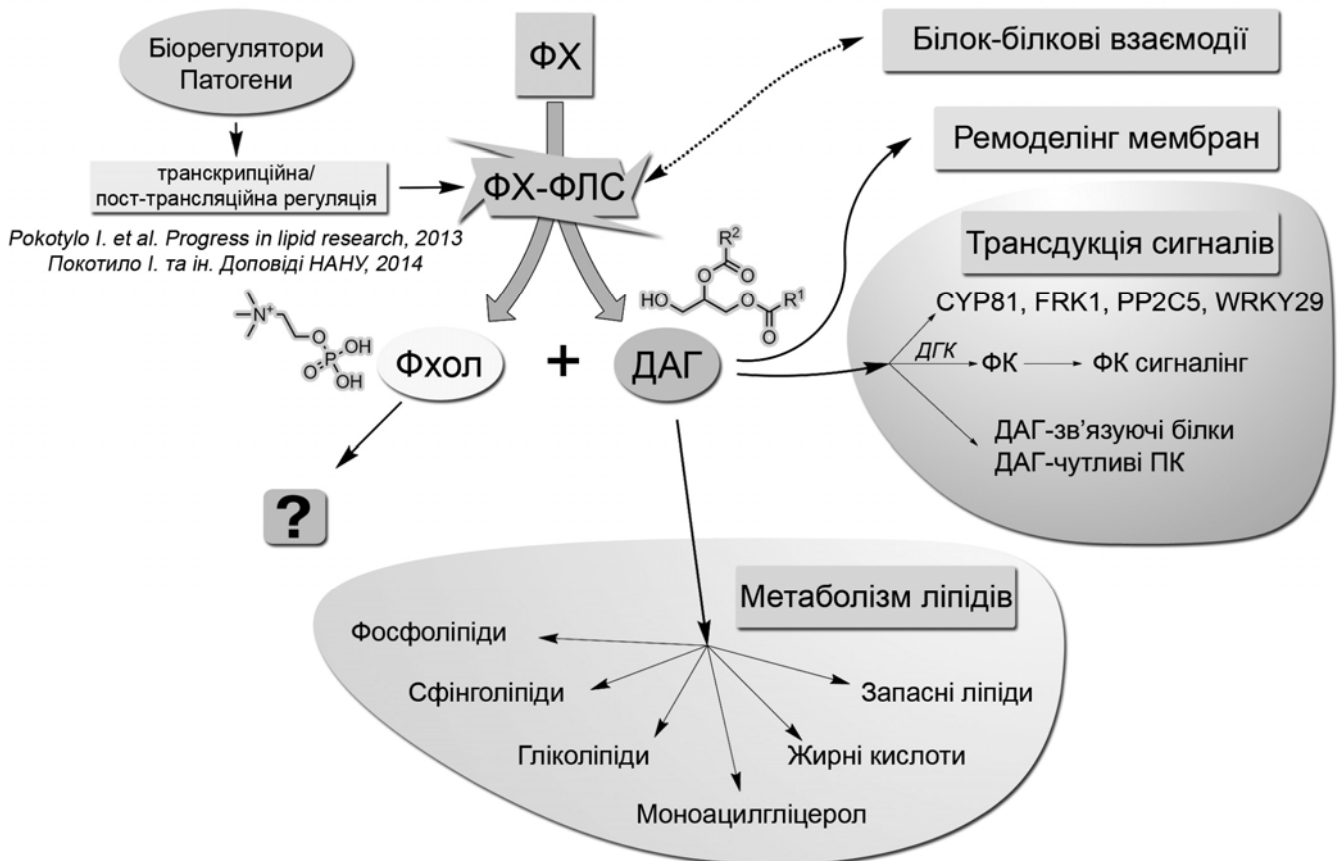
Рис. 12. Зниження рівня активації експресії маркерних генів у листі мутантів Арабідопсису *fx-flc4* у порівнянні з рослинами дикого типу за умов дії пептиду флагеліну *flg22* протягом 6 год. У якості контролю використовувались рослини що інокулювались неактивною формою пептиду.

Регуляторна роль ФХ-ФЛС у захисних реакціях рослин та опосередкуванні внутрішньоклітинної дії біорегуляторів може реалізовуватись шляхом продукції ДАГ, фосфохоліну або внаслідок зміни рівня ФХ (субстрату ФХ-ФЛС) у мембранах. Окрім цього, відомі також прямі білок-білкові взаємодії між фосфоліпазами та білками-мішенями (Guo et al. 2012), що також можуть справляти регуляторні ефекти у механізмах сигнальної трансдукції. Молекули ДАГ складаються з двох залишків жирних кислот приєднаних до гліцерину складноефірними зв'язками. Згадана структура ДАГ забезпечує йому властивості високо неполярного ацилгліцеролу, що здатен виконувати функції інтермедіату синтезу ліпідів, інтегрального компоненту мембран та вторинного посередника. ДАГ, що продукується за участю ФХ-ФЛС, може швидко перетворюватись у ФК за участю ДГК (Arisz et al. 2009) або у інші вторинні посередники ліпідної природи рослин (Munnik and Testerink 2009). Регуляторна роль ДАГ у клітинах рослин є маловивченою. Відомо, що ДАГ здатен включатися у механізми ремоделінгу ендомембран та обміну ліпідів. Окрім цього, результати останніх досліджень вказують на пряму роль ДАГ у якості агенту

клітинної регуляції та сигналіngu (Pokotylo et al. 2013). Також існують підтвердження того, що регуляторна дія ФХ-ФЛС у рослин може опосередковуватись активацією протеїнкіназ або рослинних аналогів ДАГ-зв'язуючої протеїнкінази С (ПКС) тварин (Griner and Kazanietz 2007).

Таким чином, за результатами представлених досліджень побудована модель участі ФХ-ФЛС у продукції вторинних посередників та опосередкуванні внутрішньоклітинної дії біорегуляторів (Схема 1). Згідно з цією моделлю фітогормони саліцилова кислота, метил жасмонат, а також їх синтетичні похідні та окремі еліситори, здатні впливати на активність ФХ-ФЛС шляхом пост-трансляційної регуляції та внаслідок змін транскриптому. У подальшому зміни рівня продукції ДАГ та його участь у шляхах трансдукції сигналів ліпідної природи, взаємодії з рослинними аналогами ПКС, обміні ліпідів, або контролі функцій мембран забезпечує внутрішньоклітинне опосередкування внутрішньоклітинної дії біорегуляторів у регуляторних шляхах що залучають продукти генів *FRK1*, *PP2C5*, *CYP81* та *WRKY29*.

Схема 1.



ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне викладення та експериментальне вирішення наукової задачі, що полягає у встановленні ролі ФХ-ФЛС рослин у формуванні стійкості рослин та опосередкуванні внутрішньоклітинної дії біорегуляторів на молекулярному рівні внаслідок продукції вторинних посередників ліпідної природи.

1. Встановлено, що рівень продукції вторинного посередника ДАГ за участю ФХ-ФЛС змінюється на ранніх етапах дії саліцилової кислоти та метил жасмонату у суспензійних культурах клітин тютюну та Арабідопсису *in situ*, що вказує на участь ФХ-ФЛС у сигнальній трансдукції за умов дії біорегуляторів гормональної природи.
2. Визначено, що вплив природних та штучних еліситорів на рівень активності ФХ-ФЛС залежить від часових та концентраційних параметрів, а також від молекулярної природи діючої сполуки.
3. Показано активацію ізоферменту ФХ-ФЛС4 Арабідопсису на рівні змін транскриптому за умов дії біорегуляторів або бактеріальних патогенів *P. syringae*.
4. Отримані експериментальні дані вказують на те, що ізоформа ФХ-ФЛС4 відіграє безпосередню роль у формуванні захисних реакцій рослин Арабідопсису в умовах ураження бактеріями *P. syringae*.
5. Визначено, що регуляторна роль ФХ-ФЛС4 за умов дії біорегуляторів опосередковується продукцією вторинного посередника ДАГ та білковими продуктами генів *CYP81*, *FRK1*, *PP2C5* та *WRKY29* експресія яких є зниженою у мутантних ліній рослин Арабідопсису *fx-flc4*.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Покотило І.В.**, Кравець В.С., Мартінець Я. Реакція фосфоліпази D суспензійної культури клітин тютюну на дію осмотичного та сольового стресів // Доповіді НАН України. – 2012. – №2. – С. 180-185.
2. **Pokotylo I.**, Pejchar P., Potocky M., Ruelland E., Kravets V., Martinec J. Plant nonspecific phospholipase C gene family. Novel competitors in lipid signalling // Progress in Lipid Research. – 2013. – №52. – С. 62-79.
3. **Pokotylo I.**, Kolesnikov Y., Kravets V., Zachowski A., Ruelland E. Plant phosphoinositide-dependent phospholipases C: Variations around a canonical theme // Biochimie. – 2014. – №96. – С. 144-157.
4. Ruelland E., **Pokotylo I.**, Cantrel C., Djafi N., Repellin A., Zachowski A. Salicylic acid modulates levels of phosphoinositide dependent-phospholipase C substrates and products to remodel the Arabidopsis suspension cell transcriptome // Frontiers in Plant Science. – 2014. – №5 (608). – <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00608>.
5. **Покотило І.В.**, Мартінець Я., Кравець В.С. Регуляція активності фосфатидилхолін-гідролізуючих фосфоліпаз C за умов дії чинників біотичного стресу у рослин // Доповіді НАН України. – 2014. – №9. – С. 134-140.

6. Ruelland E., Kravets V., Derevyanchuk M., Martinec J., Zachowski A., **Pokotylo I.** Role of phospholipid signalling in plant environmental responses // *Environmental and Experimental Botany*. – 2015. – №114. – С. 129–143.
7. **Покотило І.В.** Участь фосфатидилхолін-залежних фосфоліпаз С в реакції рослин на дію патогенних бактерій // *Катализ и нефтехимия*. – 2010. – №18. – С. 105.
8. **Покотило І.В.**, Кравець В.С., Мартінець Я. Зміна активності фосфатидилхолін-гідролізуючих фосфоліпаз с рослин у відповідь на дію біотичного стресу // *Х Український біохімічний з'їзд*. – Одеса. – 2010. – С. 145.
9. Martinec J., **Pokotylo I.**, Sasek V., Burketova L., Kocourkova D., Kravets V., Pejchar P. The potential role of phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C in plant defence reactions // *XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology*. – Валенсія. – 2010. – С. 17-022.
11. **Покотило І.В.**, Кравець В.С., Мартінець Я. Зміна активності фосфоліпаз С та D у відповідь на дію індукторів резистентності рослин // *Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладный вопросы получения и применения*. – Новий Світ. – 2011. – С. 689–690.
12. **Покотило І.В.**, Кравець В.С., Мартінець Я. Залучення фосфатидилхолін-гідролізуючих фосфоліпаз С до реакцій рослин на дію чинників біотичного стресу // *Біологія рослин та біотехнологія*. – Біла Церква. – 2011. – С. 42.
13. Martinec J., Kocourkova D., Pejchar P., Brouzdova J., Kravets V., **Pokotylo I.**, Krckova Z., Valentova O. The role of non-specific phospholipase C in plant response to environmental stresses // *III International Symposium: Intracellular signaling and bioactive molecules design*. – Львів. – 2012. – С. 42.

АНОТАЦІЯ

Покотило І.В. Молекулярні аспекти участі фосфатидилхолін-гідролізуючих фосфоліпаз С рослин у формуванні вторинних посередників за дії біорегуляторів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія. – Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ, 2015.

Дисертацію присвячено визначенню ролі фосфатидилхолін-гідролізуючої фосфоліпази С (ФХ-ФЛС) у продукції вторинних посередників ліпідної природи, механізмах опосередкування внутрішньоклітинної дії біорегуляторів та формуванні стійкості рослин за дії біотичного стресу.

Визначено динаміку змін рівня активності ФХ-ФЛС на пост-трансляційному рівні у суспензійних культурах клітин тютюну та Арабідопсису у відповідь на дію біорегуляторів дія яких пов'язана з формування захисних реакцій рослин за умов біотичного стресу – природних (саліцилова кислота, метил жасмонат) та синтетичних гормонів, а також деяких елісаторів (пептид флагелін). Активність ФХ-ФЛС визначалась шляхом аналізу рівня накопичення діацилгліцеролу (ДАГ) – продукту гідролізу флюоресцентного фосфатидилхоліну *in situ*. Показано взаємозв'язок між хімічною структурою та ефектом дії на активність ФХ-ФЛС

біорегуляторів на прикладі саліцилової кислоти, а також її структурного (2-гідроксибензойна кислота) та функціонального (бензотіадіазол) аналогів у рослин.

Встановлено, що активація ізоферменту ФХ-ФЛС4 на транскрипційному рівні відіграє важливу роль у формуванні стійкості рослин Арабідопсису за умов проведення специфічного біотесту з використанням бактеріальних патогенів *P. syringae*.

Показано, що роль ФХ-ФЛС у формуванні стійкості рослин та опосередкуванні внутрішньоклітинної дії біорегуляторів на молекулярному рівні реалізується внаслідок продукції ДАГ – вторинного посередника ліпідної природи – що діє у регуляторних каскадах клітин рослин що залучають ферменти та транскрипційні фактори – продукти генів *CYP81*, *FRK1*, *PP2C5* та *WRKY29*.

Ключові слова: фосфатидилхолін-гідролізуюча фосфоліпаза С, діацилглицерол, біорегулятори, саліцилова кислота, метил жасмонат, флагелін, трансдукція сигналів.

АННОТАЦІЯ

Покотило И.В. Молекулярные аспекты участия фосфатидилхолин-гидролизующих фосфолипаз С растений в формировании вторичных посредников при действии биорегуляторов. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия. – Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, 2015.

Диссертация посвящена установлению роли фосфатидилхолин-гидролизующей фосфолипазы С (ФХ-ФЛС) в продукции вторичных посредников липидной природы, механизмах опосредования внутриклеточного действия биорегуляторов и формировании стойкости растений при действии биотического стресса.

Установлено динамику изменения уровня активности ФХ-ФЛС на пост-трансляционном уровне в суспензионных культурах клеток табака и Арабидопсиса в ответ на действие биорегуляторов действие которых связано с формированием защитных реакций растений в условиях биотического стресса – природных (салициловая кислота, метил жасмонат) и синтетических гормонов, а также некоторых элиситоров (пептид флагелин). Активность ФХ-ФЛС определялась путем анализа уровня накопления диацилглицерола (ДАГ) – продукта гидролиза флюоресцентного фосфатидилхолина *in situ*. Показано взаимосвязь между химической структурой и эффектом действия на активность ФХ-ФЛС биорегуляторов на примере салициловой кислоты, а также её структурного (2-гидроксибензойная кислота) и функционального (бензотиадиазол) аналогов у растений.

Установлено, что активация изофермента ФХ-ФЛС4 на транскрипционном уровне осуществляет важную роль в формировании стойкости растений Арабидопсиса в условиях проведения специфического биотеста с использованием бактериальных патогенов *P. syringae*.

Показано, что роль ФХ-ФЛС в опосредовании действия внутриклеточного действия биорегуляторов и формировании стойкости растений на молекулярном уровне опосредуется в результате продукции ДАГ – вторичного посредника липидной природы который действует в регуляторных каскадах клеток растений которые вовлекают ферменты и транскрипционные факторы – продукты генов *CYP81*, *FRK1*, *PP2C5* та *WRKY29*.

Ключевые слова: фосфатидилхолин-гидролизующая фосфолипаза С, диацилглицерол, биорегуляторы, салициловая кислота, метил жасмонат, флагеллин, трансдукция сигналов.

ANNOTATION

Pokotylo I.V. Molecular aspects of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C involvement to second messengers production following treatment with bioregulators. – Manuscript.

Dissertation for the obtaining of Scientific Degree of Candidate of Biological Sciences on speciality 02.00.10 – bioorganic chemistry – Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

The dissertation work is dedicated to the disclosure of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C (PC-PLC) role in the production of lipid second messengers, mediation of intracellular effects of bioregulators and contribution to plant biotic stress resistance. The following findings have been disclosed by this study:

- Rapid changes to the enzymatic activity of PC-PLC *in situ* following treatment with bioregulators associated with biotic stress influence in *Arabidopsis* and tobacco cell suspensions have been demonstrated
- The role of PC-PLC4 isoenzyme in the conditioning of *Arabidopsis* plant stress resistance following exposure to pathogenic *P. Syringae* bacteria has been disclosed
- The activation of *Arabidopsis* PC-PLC4 on the gene level following exposure to pathogenic *P. Syringae* bacteria have been demonstrated
- The molecular mechanisms of PC-PLC role in mediation of bioregulators action and plant stress resistance mediated via diacylglycerol production have been demonstrated

The dynamics of PC-PLC activity changes in response to treatment with a wide range of bioregulators that act in biotic stress-induced plant resistance strategies were studied in tobacco and *Arabidopsis* cell suspensions suggesting a post-translational regulation.

It has been disclosed that treatment with salicylic acid evokes rapid decrease (by 30%) in PC-PLC activity. The similar effect was observed following a treatment with benzothiadiazole – a synthetic compound that acts as a salicylic acid functional analogue in plant cells. At the same time the PC-PLC activity has not reacted to a treatment with 2-hydroxybenzoic acid that is a biologically inactive structural analogue of salicylic acid hormone. These results indicate a specificity of a PC-PLC reaction to the early treatment with salicylic acid in plant cells.

It has been also established that treatment with salicylic acid antagonist – jasmonic acid hormone – induced PC-PLC activity by 40%. Moreover, a substantial activation of PC-PLC activity has been reported following the treatment with nanomolar levels of

flagellin elicitor. These results indicate that PC-PLC directly participate in the production of lipid second messengers as an intrinsic part of plant cell responses to bioregulators treatment.

It was shown that expression of PC-PLC4 gene in *Arabidopsis* is activated in the conditions of plant treatment with *Pseudomonas Syringae* pv. *Maculicola* bacterial pathogens. In addition, mutant lines of *Arabidopsis* containing the T-DNA insertion in PC-PLC4 gene that renders it non-functional were characterized by the increased level of pathogenic bacteria propagation in leaves following 2 days after initial inoculation. This suggests that PC-PLC4 acts as an important component of plant defense strategies that is activated on the transcriptional level in the conditions of biotic stress action.

Based on the experimental data, it has been disclosed that the role of PC-PLC in plant stress resistance and mediation of bioregulators intracellular effects on the molecular level is based on the production of diacylglycerol – a lipid second messenger molecule that acts in signal transduction pathways that implicate enzymes and transcriptional factors – the protein products of *CYP81*, *FRK1*, *PP2C5* and *WRKY29* genes, whose expression level in the conditions of flagellin elicitor treatment was lower in PC-PLC-deficient plants.

Key words: phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C, diacylglycerol, bioregulators, salicylic acid, methyl jasmonate, flagellin, signal transduction.