

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений**

ГРИУСЕВИЧ Полина Вацлавовна

**ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ РЕДОКС-АКТИВНЫХ АГЕНТОВ
НА ИОННЫЕ ПОТОКИ ЧЕРЕЗ ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ
КЛЕТОК КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**

Аннотация магистерской диссертации

специальность 1-31 80 01 «Биология»

Научный руководитель
заведующий кафедрой
Демидчик Вадим Викторович
доктор биологических наук, доцент

Допущена к защите

«__» _____ 2018 г.

Зав. кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений

_____ В.В. Демидчик

доктор биологических наук, доцент

Минск, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ	10
1.1 Катионные каналы растений	10
1.2 Анионные каналы растений	17
1.3 Редокс-зависимая регуляция ионных каналов высших растений	18
1.3.1 Первые работы по изучению АФК-активируемых ионных потоков	18
1.3.2 Cu^{2+} -активируемые неселективные катионные проводимости в харовых водорослях	20
1.3.3 АФК-активируемые катионные каналы корней	21
1.3.4 Структура и функции АФК-активируемых K^+ -каналов	24
1.3.5 Аннексины как АФК-активируемые ионные каналы	26
1.3.6 Механизмы активации ионных каналов АФК	27
1.3.7 Функционирование АФК- Ca^{2+} хаба	28
1.3.8 Роль L-аскорбиновой кислоты в формировании АФК	31
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1 Объект исследования	33
2.2 Культивирование проростков арабидопсиса в лабораторных условиях	33
2.3 Выделение протопластов из корней арабидопсиса	34
2.4 Регистрация электрофизиологических характеристик ионных каналов	36
2.5 Статистическая обработка результатов	38
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	39
3.1 Экзогенное добавление смеси, генерирующей гидроксильные радикалы	39
3.2 Измерение и анализ выходящих токов аскорбат-аниона	44
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	50

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Магистерская диссертация: 57 страниц, 11 рисунков, 3 таблицы, 108 источников

ПЭТЧ-КЛАМП, АФК, GORK, *ARABIDOPSIS THALIANA*, L-АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА, КЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

Регуляция процессов ионного транспорта и сигнальной трансдукции активными формами кислорода лежит в основе контроля ключевых физиологических процессов в растении, таких как рост, развитие, стрессовые ответы и переключение метаболических программ. Центральными реакциями редокс-зависимых перестроек ионного транспорта являются модификации в работе ионных каналов, ответственных за калиевый и кальциевый обмен.

Целью работы являлось выявление особенностей воздействия редокс-активных агентов, таких как гидроксильные радикалы и аскорбат-анион на ионные каналы плазматической мембраны клеток корня арабидопсиса.

В качестве объекта исследования использовались корни проростков *Arabidopsis thaliana*. Методы исследования включали технику пэтч-кламп, методику культивирования растений в стерильных условиях, выделение протопластов и поддержание изоосмотических условий.

В результате проведенных исследований установлено, что растения арабидопсиса, лишённые редокс-чувствительного центра в K^+ -канале GORK, утрачивают способность к АФК-индуцированной активации выходящих K^+ -токов. Показано, что Цис-151 участвует в редокс-зависимой регуляции калиевой проводимости и утечке электролитов из растительной клетки при стрессе. Продемонстрировано, что выходящий ток важнейшего редокс-агента растительной клетки – аскорбата, реализуется через конститутивные анионные каналы плазматической мембраны.

Работа имеет фундаментальное значение, так как активация канала GORK под действием АФК может вовлекаться в реакции, связанные с регуляторными функциями АФК, а также лежать в основе индукции запрограммированной клеточной гибели и автофагии в корне высших растений. Установление механизма выхода аскорбат-аниона через анионные каналы существенно дополняет имеющиеся представления о транспорте данного вещества в организме растения. Возможность пассивного выхода аскорбата позволяет глубже понять механизмы антиоксидантной защиты растений, распределение этого антиоксиданта, а также возможность его участия в качестве противоиона при стресс-индуцированной деполяризации и утечке электролитов.

АГУЛЬНАЯ ХАРАКТАРЫСТЫКА РАБОТЫ

Магістэрская дысертацыя: 57 старонак, 11 малюнкаў, 3 табліцы, 108 крыніц

ПЭТЧ-КЛАМП, АФК, GORK, *ARABIDOPSIS THALIANA*,
L-АСКАРЫНАВАЯ КІСЛАТА, КЛЕТАЧНАЯ СІГНАЛІЗАЦЫЯ

Рэгуляцыя працэсаў іённага транспарту і сігнальнай трансдукцыі актыўнымі формамі кіслароду ляжыць у аснове кантролю ключавых фізіялагічных працэсаў у расліне, такіх як рост, развіццё, стрэсавыя адказы і пераклучэнне метабалічных праграм. Цэнтральнымі рэакцыямі рэдокс-залежных перабудоў іённага транспарту з'яўляюцца мадыфікацыі ў рабоце іённых каналаў, адказных за каліевы і кальцыевы абмен.

Мэтай работы з'яўлялася выяўленне асаблівасцяў уздзеяння рэдокс-актыўных агентаў, такіх як гідраксілыныя радыкалы і аскарбат-аніёны, на іённыя каналы плазматычнай мембраны клетак караня арабідопсіса. У якасці аб'екта даследавання выкарыстоўваліся карані праросткаў *Arabidopsis thaliana*. Метады даследавання ўключалі тэхніку пэтч-кламп, методыку культывавання раслін у стэрыльных умовах, вылучэнне пратапластаў і падтрыманне ізаасматычных умоў.

У выніку праведзеных даследаванняў устаноўлена, што расліны арабідопсіса, пазбаўленыя рэдокс-адчувальнага цэнтра ў K^+ -канале GORK, губляюць здольнасць да АФК-індуцыраванай актывацыі K^+ -токаў. Паказана, што Цыс-151 удзельнічае ў рэдокс-залежнай рэгуляцыі каліевай праводнасці і уцечцы электралітаў з клеткі пры стрэсе. Прадэманстравана, што ток важнейшага рэдокс-агента клеткі раслін – аскарбата, рэалізуецца праз канстытутыўныя аніённыя каналы плазматычнай мембраны.

Работа мае фундаментальнае значэнне, бо актывацыя канала GORK пад дзеяннем АФК можа ўключацца ў рэакцыі, звязаныя з рэгуляторнымі функцыямі АФК, а таксама ляжыць у аснове індукцыі запраграмаванай клеткавай гібелі і аўтафагіі ў карані вышэйшых раслін. Устанаўленне механізму выхаду аскарбат-аніёна праз аніённыя каналы істотна дапаўняе існуючыя ўяўленні аб транспарце дадзенага рэчыва ў арганізме расліны. Магчымасць пасіўнага выхаду аскарбата дазваляе глыбей зразумець механізмы антыаксідантнай абароны раслін, размеркаванне гэтага антыаксіданта, а таксама магчымасць яго ўдзелу ў якасці супрацыёна пры стрэс-індуцыраванай дэпалярызацыі і ўцечцы электралітаў.

GENERAL DESCRIPTION OF THE WORK

Master's thesis: 57 pages, 11 figures, 3 tables, 108 sources

PATCH-CLAMP, ROS, GORK, *ARABIDOPSIS THALIANA*, L-ASORBIC ACID, CELLULAR SIGNALING

Reactive oxygen species (ROS) are important plant cell signaling molecules involved in diverse physiological processes, such as programmed cell death, development, cell elongation and regulating plant metabolism. One target of ROS signal transduction is the activation of K⁺- and Ca²⁺-permeable channels in plant membranes.

The aim of this study was to examine ROS and ascorbyl radicals effects on ion channels.

The object of research: the roots of *Arabidopsis thaliana* (L.)

Methods: patch-clamp technique, cultivation of sterile *Arabidopsis* plants, isolation of protoplasts.

The results: ROS activation was not observed in *gork1-1* plants lacking the gene that encodes the K⁺-efflux channel, GORK. Mutations in ROS-sensitive moieties in K⁺-efflux GORK channel led to decreased of ROS-sensing capacity, suggesting that distinct molecular groups are responsible for ROS sensing by ion channels. Ascorbate efflux currents showed rapid activation kinetics in response to voltage steps, similar to anionic conductances

The work is of fundamental importance because ROS have been shown to activate GORK. ROS-activated K⁺-efflux through GORK channels results in dramatic K⁺ loss from plant cells, which stimulates proteases and endonucleases, and promotes PCD. Patch clamp experiments demonstrated that L-ascorbate leaks through anion channel under depolarization. This mechanism can underlie ascorbate release, signaling phenomena, apoplastic redox reactions and control of membrane ionic and electrical equilibrium.