

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

ЛАЗЕРКО
Надежда Владимировна

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОМА КОРНЕЙ
***ARABIDOPSIS THALIANA* L. В ОТВЕТ НА ЭКЗОГЕННЫЙ L-**
АСКОРБАТ И АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

Аннотация дипломной работы

Научный руководитель:
доктор биологических наук, декан
биологического факультета
Демидчик Вадим Викторович

Допущена к защите
«___» _____ 2021 г.
зав. кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений
доцент, к.б.н. И.И. Смолич

Минск, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
РЕФЕРАТ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Свойства и функции АК.....	12
1.1.1 Физико-химические свойства АК.....	12
1.1.2 Химические формы АК и продукты его окисления.....	13
1.1.3 Транспорт и аккумуляция АК в живых организмах.....	15
1.1.4 Особенности синтеза АК у растений.....	17
1.1.5 Катаболизм АК в растениях.....	21
1.1.6 Регуляция синтеза АК в растениях.....	22
1.2 Функции АК в живых системах.....	23
1.2.1 Общие закономерности влияния АК на функционирование живых систем.....	23
1.2.2 АК как анти- и прооксидант.....	25
1.2.3 АК как регулятор экспрессии генов и посттрансляционных модификаций белков.....	26
1.3 Краткая характеристика белков, для функционирования которых необходима АК.....	27
1.3.1 Структура и функции аскорбатпероксидаз.....	27
1.3.2 2-оксоглутарат-зависимые диоксигеназы (2-ODD).....	30
1.4. Основные типы АФК и АФА, их свойства и пути генерации.....	35
1.4.1 Типы АФК, встречающиеся в клетках растений.....	35
1.4.1.1 Синглетный кислород.....	35
1.4.1.2 Супероксидный анионный радикал.....	36
1.4.1.3 Гидроксильный радикал.....	37
1.4.1.4 Перекись водорода.....	37
1.4.2 Генерация АФК, возможности их накопления и транспортировки в животных и растительных клетках.....	38
1.4.3 Функции АФК как регуляторов различных процессов в живых системах.....	40
1.4.4 Взаимодействие АФК и АФА в физиологических процессах.....	45

1.4.5 Модификации белков, связанные с влиянием АФК и АФА.....	46
1.4.6 Роль антиоксидантных систем растений в передаче сигнала АФК и АФА.....	48
1.4.6.1 Глута-, перокси- и тиоредоксины как агенты поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза.....	49
1.4.6.2 Пероксидазы как регуляторы уровня сигнала АФК.....	51
1.5 Протеомика.....	52
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	56
2.1 Объект исследования.....	56
2.2 Методы исследования.....	56
2.2.1 Ростовый тест с заменой среды.....	56
2.2.2 Статистическая обработка результатов.....	58
2.3 Анализ изменения протеома корней <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh....	59
2.3.1 Подготовка растительного материала.....	59
2.3.2 Выделение и очистка белка из корней <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.....	59
2.3.2.1 Подготовительный этап.....	59
2.3.2.2 Фенольная экстракция белков.....	60
2.3.2.3 Восстановление белковых образцов и определение концентрации белка.....	61
2.3.2.4 Трипсинолиз.....	61
2.3.2.5 Твердофазная экстракция и высушивание.....	62
2.4 Анализ пептидов при помощи масс-спектрометрии.....	62
2.5 Анализ протеомных данных.....	63
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	67
3.1 Изменение длины основного корня <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh при выращивании на средах, содержащих АК и АФК.....	67
3.2 Изменение экспрессии белков в корнях арабидопсиса в ответ на обработку различным концентрациями АК и АФК.....	69
3.2.1 Анализ локализации белков, дифференциально экспрессирующихся при обработке АК и АФК.....	70
3.2.2 Функциональные группы дифференциально экспрессированных белков.....	74
3.2.3 Построение сетей взаимодействия между дифференциально экспрессированными белками.....	78

3.2.4 Анализ некоторых групп дифференциально экспрессированных белков.....	80
3.2.4.1 Метаболизм белков и аминокислот.....	80
3.2.4.2 Влияние АК и АФК на окислительно-восстановительный метаболизм.....	81
3.2.4.3 Изменения экспрессии белков, вовлеченных в передачу сигналов в клетке.....	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	89
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	91

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: 105 страниц, 11 рисунков, 1 таблицу, 182 источника литературы.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, L-АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА, *ARABIDOPSIS THALIANA*, КОРЕНЬ РАСТЕНИЙ, ГИДРОКСИЛЬНЫЕ РАДИКАЛЫ, ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА, ПРОТЕОМИКА.

Объект исследования: корни *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. экотипа Col-0.

Цель: анализ изменения протеома корней *Arabidopsis thaliana* L. в ответ на воздействие экзогенного L-аскорбата и активных форм кислорода.

Предмет исследования: закономерности физиологических изменений и протеома корня высших растений под действием L-аскорбата, H_2O_2 и гидроксильного радикала.

Методы исследования: ростовые тесты с заменой среды *in vitro*, методы выделения белка, трипсинизация, жидкостная хромато-масс-спектрометрия.

Результатом данного исследования является выявление физиологических реакции корня растений на присутствие в среде L-аскорбата и активных форм кислорода. Показано, что L-аскорбат в низких концентрациях (<1 мМ) вызывает стимуляцию, а в высоких концентрациях (≥ 1 мМ) ингибирование роста корня. В ответ на присутствие в среде L-аскорбата, H_2O_2 и смесей, генерирующих гидроксильные радикалы, в протеоме корней изменялась экспрессия 390 белков. Изменения протеома под действием высоких уровней L-аскорбата, H_2O_2 и смесей, генерирующих гидроксильные радикалы, носили качественно схожий характер. При этом подавлялась экспрессия систем, участвующих в метаболизме цитоплазматических белков и возрастала экспрессия белков, ответственных за синтез, фолдинг и транспорт митохондриальных белков. К характерным регуляторным протеомным модификациям в ответ на низкие уровни L-аскорбата можно отнести увеличение экспрессии таких систем как гормональные сигнальные и ответа на стресс. Это указывает на сложный характер изменений протеома, приводящий к регуляторным изменениям физиологических процессов, направленных на формирование новых сигнальных и метаболических сетей в корнях высших растений.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа: 105 старонак, 11 малюнкаў, 1 табліцы, 182 крыніц літаратуры.

АКТЫЎНЫЯ ФОРМЫ КІСЛАРОДУ, L-АСКАРЫНАВАЯ КІСЛАТА, *ARABIDOPSIS THALIANA*, КОРАНЬ РАСЛІН, ГІДРАКСІЛЬНЫЯ РАДЫКАЛЫ, ПЕРАКСІД ВАДАРОДУ, ПРАТЭОМІКА.

Аб'ект даследавання: карані *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. экатыпу Col-0.

Мэта: аналіз змянення пратэома карней *Arabidopsis thaliana* L. у адказ на ўздзеянне экзагеннага L-аскорбату і актыўных формаў кіслароду.

Прадмет даследавання: законымерности фізіялагічных змяненняў і пратэома караня высшых раслін пад уздзеяннем L-аскарбату, H_2O_2 і гідраксільнага радыкала.

Метады даследавання: раставыя тэсты са зменай асяроддзя *in vitro*, метады выдзялення бялку, трыпсінізацыя, вадкасная храмата-масс-спектраметрыя.

У выніку праведзенага даследавання былі выяўленыя фізіялагічныя рэакцыі караня раслін на наяўнасць у асяроддзі L-аскорбату і актыўных формаў кіслароду. Паказана, што L-аскарбат у нізкіх канцэнтрацыях (<1 мМ) выклікае стымуляцыю, а ў высокіх канцэнтрацыях (≥ 1 мМ) - інгібіраванне росту караня. У адказ на прысутнасць у асяроддзі L-аскорбату, H_2O_2 і сумесяў, якія генерыруюць гідраксільныя радыкалы, у пратэоме каранёў змянялася экспрэсія 390 бялкоў. Змяненні пратэома пад уздзеяннем высокіх узроўняў L-аскарбата, H_2O_2 і сумесей, якія генерыруюць гідраксільныя радыкалы, насілі якасна падобны характар. Пры гэтым экспрэсія сістэм, якія ўдзельнічаюць у метабалізме бялкоў цытаплазмы, падаўлялася, і ўзрастала экспрэсія бялкоў, адказных за сінтэз, фолдынг і транспарт мітахандрыяльных бялкоў. Да характэрных рэгуляторных мадыфікацый пратэома ў адказ на нізкія узроўні L-аскарбату можна аднесці павелічэнне экспрэсіі такіх сістэм, як сігнальныя сістэмы гармонаў і адказу на стрэс. Гэта паказвае складаны характар змяненняў пратэома, які вядзе да рэгуляторных змяненняў фізіялагічных працэсаў, накіраваных на фарміраванне новых сігнальных і метабалічных сетак у каранях вышэйшых раслін.

ABSTRACT

Thesis: 105 pages, 11 figures, 1 table, 182 references.

REACTIVE OXYGEN SPECIES, L-ASCORBIC ACID, *ARABIDOPSIS THALIANA*, PLANT ROOT, HYDROXYL RADICALS, HYDROGEN PEROXIDE, PROTEOMICS.

Object of reserch: *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. ecotype Col-0 roots.

Objective: analysis of *Arabidopsis thaliana* L. root proteome changes in response to a treatment with exogenous L-ascorbate and reactive oxygen species.

Subject of research: patterns of physiological changes and proteome of the root of higher plants under the action of L-ascorbate, H₂O₂ and hydroxyl radical.

Research methods: *in vitro* medium exchange growth test, protein isolation methods, trypsinization, liquid chromatomass spectrometry.

The result of this study is the identification of plant root physiological reactions to the presence of L-ascorbate and reactive oxygen species in the medium. L-ascorbate at low concentrations (<1 mM) has been shown to stimulate root growth and to inhibit it at high concentrations (≥1 mM). The expression of 390 proteins in the root proteome changed in response to the presence of L-ascorbate, H₂O₂ and hydroxyl radical in the medium. Changes in the proteome after a treatment with high levels of L-ascorbate, H₂O₂ and hydroxyl radical generating mixtures were qualitatively similar. Under these conditions, expression of systems involved in cytoplasmic protein metabolism was suppressed and expression of proteins involved the synthesis, folding and transport of mitochondrial proteins increased. The most noticeable regulatory proteomic modification in response to low levels of L-ascorbate is an increase in the expression of proteins of hormonal signaling systems and proteins involved in the response to stress. This indicates the complex nature of proteome changes, leading to regulatory changes in physiological processes aimed at the formation of new signaling and metabolic networks in the roots of higher plants.