

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

**Новосельский
Илья Юрьевич**

**Электрофизиологический и молекулярно-генетический анализ ионных
каналов плазматической мембраны клеток корня
Arabidopsis thaliana L. Heynh., участвующих в ранних стрессовых ответах**

Аннотация дипломной работы

Научный руководитель:
д.б.н., доцент
Демидчик В.В.

Допущен к защите
«___» _____ 2020 г.
Зав. кафедрой
_____ И.И. Смолич

Минск, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
РЕФЕРАТ	5
ВВЕДЕНИЕ	9
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Молекулярно-генетическая природа катионных каналов растений	12
1.2 Анионные каналы растений	17
1.3 Генерация АФК в клетках высших растений и окислительный стресс	19
1.3.1 АФК, их роль в утечке K^+ при стрессовых ответах растительной клетки	20
1.4 АФК-активируемые K^+ -каналы и механизмы их активации	22
1.5. Воздействие засоления на растения подсолнечника	24
1.6. Воздействие тяжелых металлов на растения	25
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	29
2.1 Характеристика объекта исследования	29
2.2. Культивирование растений арабидопсиса в стерильных условиях	30
2.3 Культивирование растений пшеницы и подсолнечника	31
2.4 Выделение протопластов из корней экспериментальных объектов	32
2.5 Описание техники пэтч-кламп	34
2.6 Конфигурации пэтч-клампа	36
2.6.1 Первичный контакт	38
2.6.2 Внутренней стороной наружу	38
2.6.3 Целая клетка	38
2.7. Протоколы фиксации напряжения плазматической мембраны клеток растений	39
2.8. Регистрация электрофизиологических характеристик ионных каналов	40
2.9. Обработка данных	41
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	44
3.1 Функциональный анализ редокс-чувствительного центра K^+ -канала GORK на примере клеток корня <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Heynh	44
3.2 Изучение воздействия Ni^{2+} на проводимость плазматической мембраны клеток корня <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
3.3 Измерение и анализ выходящих токов аскорбат-аниона	51
3.4 Изучение воздействия медных НЧ на проводимость плазматической мембраны клеток корня пшеницы	54

3.5 Изучение воздействия солевого стресса на проводимость	58
плазматической мембраны клеток корня <i>Helianthus annuus</i> L.	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	62
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	64
ПРИЛОЖЕНИЕ А	74

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: 78 страниц, 21 рисунок, 1 таблица, 126 источников.

Ключевые слова: ИОННЫЙ КАНАЛ, АФК, ПЭТЧ-КЛАМП, ВЫХОД КАЛИЯ, НАНОЧАСТИЦЫ, СОЛЕВОЙ СТРЕСС, НИКЕЛЬ

Целью работы являлось установление роли ионных каналов в быстрых ответах растительной клетки на воздействие важнейших абиотических стресс-факторов среды с фокусом на АФК-зависимые механизмы модификации ионноканальной активности в корне высших растений.

В качестве объекта исследования использовались корни проростков *Arabidopsis thaliana* L. Heynh., *Helianthus annuus* L. и *Triticum aestivum* L. В работе была использована техника пэтч-кламп, методы культивирования растений в стандартизированных условиях, выделение протопластов и др..

В результате проведенных исследований было получено подтверждение роли Цис-151 в качестве АФК-сенсора в структуре калиевого канала GORK. Записанные токовые кривые демонстрируют отсутствие активации наружу-направленной калиевой проводимости под действием АФК в линиях, экспрессирующих GORK с заменой Цис-151 на серин. Показана роль конститутивных анионных каналов плазматической мембраны в выходе важнейшего редокс-агента растительной клетки – аскорбата. В работе продемонстрирована активация выхода калия под действием никель-гистидиновых комплексов. Изучение эффекта медных наночастиц на трансмембранные токи показало активацию внутри- и наружу-направленных проводимостей, а также нечувствительность их к блокаторам катионных каналов. Продemonстрировано ингибируется наружу-направленной K^+ -проводимости в присутствии высоких уровней Na^+ в протопластах, выделенных из клеток корня подсолнечника.

Работа имеет фундаментальное значение, так как демонстрирует механизм активации канала GORK под действием АФК, что объясняет его вовлечение в такие АФК-регулируемые процессы, как индукция ЗПГ и автофагии в корне высших растений. Установление возможности выхода аскорбата позволяет глубже понять механизмы антиоксидантной защиты растений, а также возможность его участия в качестве противоиона при стресс-индуцированном выходе K^+ . В работе демонстрируются эффекты никелевого, солевого стрессов, а также наночастиц на проводимость плазматической мембраны важнейших хозяйственных растений.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца: 78 старонкі, 21 малюнка, 1 табліцы, 126 крыніцы

Ключавыя словы: ІЁННЫ КАНАЛ, АФК, ПЭТЧ-КЛАМП, ВЫХАД КАЛІЯ, НАНАЧАСТЦЫ, САЛЯВЫ СТРЭС, НІКЕЛЬ

Мэта працы: ўстанаўленне ролі іённых каналаў у хуткіх адказах расліннай клеткі на ўздзеянне найважнейшых абіятычных стрэс фактараў асяроддзя з фокусам на АФК-залежныя механізмы мадыфікацыі іоннаканальнай актыўнасці ў карані вышэйшых раслін.

Аб'ект даследавання: карані *Arabidopsis thaliana* L. Heynh., *Helianthus annuus* L. і *Triticum aestivum* L.

Метады даследавання: У рабоце была выкарыстана тэхніка пэтч-кламп, метады культывавання раслін у стандартызаваных умовах, вылучэнне пратапластаў і інш.

Вынікі даследаванняў: было атрымана пацвярджэнне ролі Ціс-151 у якасці АФК-сэнсара ў структуры каліевае канала GORK. Запісаныя токавыя крывыя дэманструюць адсутнасць актывацыі вонкі-накіраванай каліевай праводнасці пад дзеяннем АФК ў лініях, экспрэсующих GORK з заменай Ціс-151 на серін. Паказана роля канстытутыўных аніённых каналаў плазматычнай мембраны ў выхадзе найважнейшага редокс-агента расліннай клеткі - аскарбата. У рабоце прадэманстравана актывацыя выхаду калію пад дзеяннем нікель-гісцідзінавых комплексаў. Даследванне эфекту медных наначасціц на трансмембранныя токі паказала актывацыю як унутр, так і вонкі-накіраваных праводнасцей, а таксама неадчувальнасць іх да блакатаў катыённых каналаў. Прадэманстравана інгібіраванне вонкі-накіраванай K^+ -праводнасці ў прысутнасці высокіх узроўняў Na^+ у пратапластах, выдзеленых з клетак караня сланечніка.

Работа мае фундаментальнае значэнне, бо дэманструе механізм актывацыі канала GORK пад удзеяннем АФК, што тлумачыць яго ўцягванне ў такія АФК-рэгуляваныя працэсы, як індукцыя ЗПГ і аўтофагіі ў карані вышэйшых раслін. Ўсталяванне магчымасці выхаду аскарбата дазваляе глыбей зразумець механізмы антіоксідантной абароны раслін, а таксама магчымасць яго ўдзелу ў якасці пратывоіона пры стрэс-індукаваны выхадзе K^+ . У рабоце дэманструюцца эфекты нікелевага, салевага стрэсаў, а таксама наначасціц на праводнасць плазматычнай мембраны найважнейшых гаспадарчых раслін.

ABSTRACT

Artwork: 78 pages, 21 figures, 1 tables, 126 sources.

Keywords: ION CHANNEL, PATCH-CLAMP, ROS, POTASSIUM EFFLUX, NANOPARTICLES, SALT STRESS, NICKEL

The object of research: the roots of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh., *Helianthus annuus* L. and *Triticum aestivum* L

Objective: investigation of ion channels role in plant cell quick responses to the most important environmental abiotic stress-factors with focus on ROS-dependent mechanisms of ion-channel activity modification in higher plants roots.

Methods: patch-clamp technique, plants growing in controlled environmental conditions, protoplast isolation from root cells via cellulytic enzymes and etc..

The results of research: received data confirm Cis-151 role as an ROS sensor in potassium channel GORK structure. Current curves demonstrate absence of outwardly directed potassium conductance activation under the treatment of ROS-generating mixtures in lines expressing GORK with the substitution of Cis-151 for Ser. Study demonstrates the role of plasma membrane constitutive anion channels in efflux of most important redox agent of plant cells, ascorbate. We also demonstrate effect of Ni^{2+} -histidine complexes on K^+ efflux from root cells. A study of copper nanoparticles effects on transmembrane currents has shown both inwardly- and outwardly-directed conductances activation, which were insensitive to cation channel blockers. Sunflower root cells plasma membrane outwardly-directed K^+ conductance was inhibited by high levels of bathing Na^+ . Also Na^+ influx was highly sensitive to bathing Ca^{2+} .

This work is of fundamental importance, since it demonstrates the activation mechanism of the GORK channel under the ROS action, which explains its involvement in such ROS-regulated processes as induction of PCD and autophagy in higher plants roots. Demonstrated possibility of ascorbate to leave the cell via anion channels allows deeper understanding of plant antioxidant protection mechanisms, also it can be transported as the counterion to maintain cell ionic and charge balance during K^+ efflux. Also, nickel, salt stress, and copper nanoparticles effects on the plasma membrane currents were studied for the main agricultural plants.