

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений

ЛАЗЕРКО Надежда Владимировна

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ МОДИФИКАЦИИ ПРОТЕОМА КОРНЕЙ
ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АБИОТИЧЕСКИХ
ФАКТОРОВ СРЕДЫ**

Аннотация к

магистерской диссертации

специальность 1-31 80 11

Научный руководитель:
член-корр. НАН Беларуси, доктор
биологических наук, декан
биологического факультета
Демидчик Вадим Викторович

Допущена к защите

«__»_____2022 г.

Зав. кафедрой клеточной биологии
и биоинженерии растений

_____И.И.Смолич

кандидат биологических наук, доцент

Минск, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСКА РАБОТЫ	6
ВВЕДЕНИЕ	9
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Свойства и функции АК	11
1.1.1 Физико-химические свойства АК	11
1.1.2 Транспорт и аккумуляция АК в живых организмах	12
1.1.3 Восстановление АК в растительном организме	13
1.1.4 Особенности синтеза и катаболизма АК у растений	15
1.1.5 Регуляция синтеза АК в растениях	18
1.2 Функции АК в растениях: антиоксидантная, прооксидантная и регуляторная роль АК	18
1.3 Краткая характеристика белков, для функционирования которых необходима АК	20
1.3.1 Структура и функции аскорбатпероксидаз	20
1.3.2 2-оксоглутарат-зависимые диоксигеназы	22
1.4. Основные типы АФК и АФА, их свойства и пути генерации	25
1.4.1 АФК, встречающиеся в клетках растений	25
1.4.2 Генерация АФК, возможности их накопления и транспортировки в растительных клетках	28
1.4.3 Функции АФК как регуляторов различных процессов в растительных системах	29
1.4.4 Модификации белков, связанные с влиянием АФК и АФА	33
1.4.5 Глута-, перокси- и тиоредоксины как агенты поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза	34
1.4.6 Пероксидазы как регуляторы уровня сигнала АФК	36
1.5 Протеомика	36
1.5.1 Анализ модификаций протеома	37
1.5.2 Масс-спектрометрия как основа современного протеомного анализа	40
1.5.3 Основные исследовательские подходы протеомики	43
1.6 Современные тенденции биоинформационного анализа протеомных данных	46
1.6.1 Препроцессинг протеомных данных	47
1.6.2 Пост-процессинг протеомных данных	49
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	51
2.1 Объект исследования	51

2.2 Методы исследования.....	51
2.2.1 Ростовой тест с заменой среды.....	51
2.2.2 Статистическая обработка результатов ростового теста.....	53
2.3 Анализ изменения протеома корней <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh	54
2.3.1 Подготовка растительного материала.....	54
2.3.2 Выделение и очистка белка из корней <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
2.4 Анализ пептидов при помощи масс-спектрометрии	57
2.5 Анализ протеомных данных	58
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1 Изменение длины основного корня <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh при выращивании на средах, содержащих АФК, АК и модельные стрессоры....	62
3.2 Сравнительный анализ данных протеома корня из открытых источников	66
3.3 Результаты обработки данных масс-спектрометрии	72
3.4 Общая характеристика дифференциально экспрессированных белков в экспериментальных группах	73
3.5 Распределение дифференциально экспрессированных белков по группам локализации	76
3.6 Оценка функциональной принадлежности дифференциально экспрессированных белков через сети взаимодействия между ними	77
3.6.1 Функциональные группы дифференциально экспрессированных белков при обработке АК и АФК	77
3.6.2 Построение сетей взаимодействия между дифференциально экспрессированными белками	81
3.7 Поиск закономерностей в изменении экспрессии для групп, выделенных с помощью STRING-анализа	91
3.7.1 Влияние обработок на процессы первичного метаболизма	91
3.7.2 Влияние АФК и АК на окислительно-восстановительный метаболизм	93
3.7.3 Изменения экспрессии белков, вовлеченных в передачу сигналов в клетке.....	94
3.7.4 Сравнительный анализ дифференциально экспрессированных белков при обработке абиотическими стрессорами и АФК.....	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	106
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	108

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Магистерская диссертация состоит из 122 страниц, 18 рисунков, 3 таблицы, 200 источников литературы.

Перечень ключевых слов: активные формы кислорода, L-аскорбиновая кислота, *Arabidopsis thaliana*, корень растений, гидроксильные радикалы, перекись водорода, протеомика, осмотический стресс, засоление.

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

Цель: анализ модификации экспрессии белков корней *Arabidopsis thaliana* L. под действием обработок АФК, экзогенным аскорбатом и модельными абиотическими стрессорами.

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

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

В ходе проведенных опытов были выявлены физиологические реакции корня в ответ на присутствие в среде смесей, генерирующих гидроксильные радикалы, L-аскорбата и абиотических стрессоров. В низких концентрациях АК (<1 мМ), СГГР (0,1 мМ), H_2O_2 (1 мМ), D-сорбит (<251 мОсм/кг) стимулировался, а в более высоких концентрациях – замедлялся рост корня *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Все протестированные концентрации NaCl вызывали снижение скорости роста корня. Анализ дифференциальной экспрессии протеома корней выявил 768 уникальных белков. Обработка АФК, D-сорбитом и NaCl вызывала в основном снижение экспрессии белков, а АК – повышение, причем эффект повышения концентрации на экспрессию при обработке СГГР был слабее выражен, чем у АК. Изменения протеома под действием высоких уровней L-аскорбата, H_2O_2 и смесей, генерирующих гидроксильные радикалы, носили качественно схожий характер: подавлялась экспрессия систем, участвующих в метаболизме цитоплазматических белков и возрастала экспрессия белков, ответственных за синтез, фолдинг и транспорт митохондриальных белков. При этом большинство белков со сниженной экспрессией в вариантах АФК и абиотических стрессоров относились к функциональным группам, участвующим в первичном метаболизме, реакциях на стресс и поддержании окислительно-восстановительного баланса клетки, клеточной сигнализации.

АГУЛЬНАЯ ХАРАКТАРЫСТЫКА РАБОТЫ

Магістарская дысертация складзена з 122 старонак, 18 малюнкаў, 3 табліцы, 200 крыніц літаратуры.

Пералік ключавых слоў: актыўныя формы кіслароду, L-аскарбінавая кіслата, *Arabidopsis thaliana*, карань раслін, гідраксільныя радыкалы, пераксід вадароду, пратэоміка, асматычны стрэс, засаленне.

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

Мэта: аналіз мадыфікацыі экспрэсіі каранёў *Arabidopsis thaliana* L. у адказ на ўздзеянне актыўных формаў кіслароду, экзагеннага L-аскорбату і мадэльных абіятычных стрэсараў.

Прадмет даследавання: заканамернасці фізіялагічных змяненняў пратэома караня вышэйшых раслін пад уздзеяннем L-аскорбата, H_2O_2 , гідраксільнага радыкала, хларыда натрыя, D-сарбіту.

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 актыўных формаў кіслароду, L-аскорбату і абіятычных стрэсараў. L-аскорбат у нізкіх канцэнтрацыях (<1 mM), СГТР (0,1 mM), H_2O_2 (1 mM), D-сарбіт (<251 мОсм/кг) выклікае стымуляцыю, а ў высокіх канцэнтрацыях - інгібіраванне росту караня *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Аналіз дыферэнцыйнай экспрэсіі выявіў 768 унікальных бялкоў. Апрацоўка АФК, D-сарбітам і NaCl выклікала галоўным чынам зніжэнне экспрэсіі бялку, а АК – павышэнне, пры гэтым эфект канцэнтрацыі на экспрэсію пры апрацоўке СГТР быў менш паказаны, чым для АК. Змяненні пратэома пад уздзеяннем высокіх узроўняў L-аскорбата, H_2O_2 і сумесей, якія генерыруюць гідраксільныя радыкалы, насілі якасна падобны характар: экспрэсія сістэм, якія ўдзельнічаюць у метабалізме бялкоў цытаплазмы, падаўлялася, і ўзрастала экспрэсія бялкоў, адказных за сінтэз, фолдынг і транспарт мітахандрыяльных бялкоў. Пры гэтым большасць бялкоў са зніжанай экспрэсіяй у варыянтах АФК і абіятычных стрэсараў належала да функцыянальных груп першаснага метабалізму, рэакцый на стрэс і падтрыманні акісляльна-аднаўляльнага балансу клеткі і клетачнай сігналацыі.

GENERAL DESCRIPTION OF WORK

Master's work contains 122 pages, 18 figures, 3 table, 200 references.

Keywords: reactive oxygen species, L-ascorbic acid, *Arabidopsis thaliana*, plant root, hydroxyl radicals, hydrogen peroxide, proteomics, osmotic stress, salt stress.

Object of research: *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, hydroxyl radical, sodium chloride, D-sorbitol.

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

The experiments of this study resulted in the identification of plant root physiological reactions to the presence of L-ascorbate, reactive oxygen species and abiotic stress factors in the medium. L-ascorbic acid at low level (<1 mM), hydroxyl radical (0.1 mM), H₂O₂ (1 mM), D-sorbitol (<251 mOsm/kg) was stimulating, while higher levels were inhibiting root growth *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. All tested NaCl concentration variants inhibited root growth. Differentiation expression analysis of root proteome found 768 unique proteins. ROS, D-sorbitol and NaCl treatment down-regulated proteins, while ascorbic acid mostly up-regulated proteins. Concentration effect after the hydroxyl radical generating mixture treatment was less than after ascorbic acid treatment. Proteome change under the treatment with high level of ascorbic acid, H₂O₂ and hydroxyl radical generating mixture were quantitatively similar: under these conditions, expression of systems involved in cytoplasmic protein metabolism was suppressed and expression of proteins involved in the synthesis, folding and transport of mitochondrial proteins induced. At the same time, most of the proteins with reduced expression in ROS variants and abiotic stressors belonged to functional groups involved in primary metabolism, reactions to stress and maintenance of the redox balance of the cell, and cell signaling.