

Использование bottom-up протеомного подхода в изучении гликированных белков хлоропластов

**Лукашева Е. М.^{А*}, Соловьева М. А.^А, Горбач Д. П.^Б, Соболева А. В.^Б,
Фролов А. А.^Б**

^А Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра физиологии и биохимии растений, Санкт-Петербург, Россия. *E-mail: elena_lukasheva@mail.ru

^Б Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Лаборатория аналитической биохимии и биотехнологии, Москва, Россия

Гликирование белков это совокупность реакций взаимодействия amino и гуанидиновых групп белков с восстанавливающими сахарами или карбонильными продуктами их деградации. Этот процесс протекает с образованием как ранних (обратимо формирующихся), так и менее химически лабильных конечных продуктов глубокого гликирования (КПГГ). Как нами было показано ранее, гликирование широкого спектра белков по специфическим сайтам, так называемым «горячим точкам», сопровождает ответ растения на действие стрессора. В этом контексте, процесс фотосинтеза является важным контрибьютером гликирования растительных белков. Действительно, с одной стороны он является поставщиком активных форм кислорода радикальной природы, с другой - высокореактивных производных сахаров. В присутствии свободных радикалов и следовых количеств переходных металлов происходит аутоокисление сахаров и их лабильных производных сахаров, приводящее к образованию высокореактивных α -дикарбонильных соединений. Взаимодействие этих соединений с боковыми радикалами остатков лизина и аргинина приводит к образованию широкого спектра КПГГ. В этом отношении наибольший интерес представляют так называемые амидные КПГГ, которые, по результатам наших исследований *in vitro*, являются продуктами таких интермедиатов цикла Кальвина, как рибулозо-1,5 дифосфат и триозофосфаты. В настоящее время в литературе имеется информация о гликированном протеоме как целых растений, так и отдельных органов, однако данных о протеоме таких органелл, как пластыды, в том числе постраниционных модификаций белков хлоропластов под действием стресса недостаточно. Поэтому целью данной работы стало охарактеризовать паттерны гликирования протеома хлоропластов в норме и при стрессе.

Для ответа на этот вопрос была выделены изолированные хлоропласты листьев 45-дневных растений *Nicotiana benthamiana*. Для экспериментальных растений были смоделированы условия засухи в течении пяти дней. Оценены физиологические параметры стрессированных и контрольных растений (устичная проводимость, относительное влагосодержание

листьев, содержание хлорофилла и активность фотосистемы II). Были подобраны условия для изолирования фракции хлоропластов в градиенте перколя. Из выделенных хлоропластов после лизиса был изолирован белок, который гидролизовали трипсином с применением техники FASP (Filter Aided Sample Preparation). Полученные пептиды были проанализированы на тандемном жидкостном хромато-масспектрометре (nanoLC-MS/MS). Всего было найдено 116 сайтов, несущих модификацию Nε-(ацетил)лизин и Nε-(формил)лизин. В растениях, выращенных в нормальных условиях всего выявлено 39 таких сайтов, из них 13 сайтов Nε-(ацетил)лизина и 27 сайтов Nε-(формил)лизина, тогда как у экспериментальных растений после 5 дней засухи – всего 47 сайтов, из них 20 и 27 сайтов Nε-(ацетил)лизина и Nε-(формил)лизина соответственно. В настоящее время проводится количественная оценка изменений, происходящих по отдельным сайтам. В частности, относительное количественное содержание гликированного пептида DQYIA_{YVK_{acetyl}}DK, относящегося к большой субъединице RuBisCo увеличилось в 1,5 раза в хлоропластах растений экспериментальной группы по сравнению с контролем.

Таким образом показаны качественные и количественные изменения в протеоме хлоропластов *Nicotiana benthamiana* при стрессе засухой; обсуждается их физиологическая роль, в том числе сигнальная и регуляторная.

НО-опосредованная аутофагия в высших растениях: от идентификации аутофагических генов до посттрансляционной модификации белков

**Мазина А. Б.^{А*}, Газизова Н. И.^А, Даминова А. Г.^А, Лексин И. Ю.^А,
Лукашева Е. М.^Б, Шумилина Ю. С.^Б, Горбач Д. П.^Б, Фролов А. А.^Б,
Минибаева Ф. В.^А**

^А Казанский институт биохимии и биофизики - обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия. *E-mail abmazina@gmail.com

^Б Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

^В Институт физиологии растений РАН им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Аутофагия является универсальным механизмом деградации поврежденных или токсичных компонентов во время развития или стрессового ответа в эукариотических клетках. В ходе аутофагии нежелательные компоненты окружаются аутофагосомами (двойными мембранными везикулами), посредством которых эти компоненты доставляются в вакуоли для последующей деградации (Yang, Klionsky, 2009). Нами показано, что в растениях одними из индукторов аутофагии являются активные формы