

На правах рукописи

Петрова Наталья Валентиновна

**ВЛИЯНИЕ РЕДОКС-АГЕНТОВ НА ТИРОЗИНОВОЕ
ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ РАСТЕНИЙ**

03.00.12. – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань 2008

Работа выполнена в лаборатории сигнальных систем Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Каримова Фатима Габдуллазяновна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
Минибаева Фарида Вилевна

доктор биологических наук,
Клячко Нелла Леопольдовна

Ведущая организация: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН
(г. Москва)

Защита состоится « 26 » декабря 2008 г. в 12 час. на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН (420111, г. Казань, а/я 30, ул. Лобачевского, 2/31, тел./факс: (843)2927347).

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке Казанского научного центра РАН.

Автореферат разослан « 24 » ноября 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Б. Иванова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Исследование роли обратимых посттрансляционных модификаций (ПТМ) белков и их взаимодействия в регуляции клеточной активности – одна из важнейших задач в постгеномную эру. ПТМ могут формировать более 1 млн. молекулярных форм белков, в то время как в геноме человека обнаружено лишь около 30000 генов, кодирующих белки. ПТМ могут контролировать время жизни белков, их активность, клеточную локализацию, фолдинг, секрецию, связывание белков-партнеров и т.д. (Shelton et al., 2005; Walsh et al., 2005).

Наиболее распространенной ПТМ белков является фосфорилирование по специфическим остаткам аминокислот, которое контролируется балансом активности протеинкиназ и протеинфосфатаз. Вычислено, что активность более 30% истинных белков эукариот контролируется фосфорилированием-дефосфорилированием (Cohen, 2004). Внимание привлекает тирозиновое фосфорилирование белков, составляющее небольшую долю от общего фосфорилирования, но являющееся преимущественным механизмом трансмембранного сигналинга в клетках позвоночных, а также играющее ключевую роль в регуляции основных клеточных процессов у различных организмов (Hunter, 2000; Гарчевский, 2001; Manning et al., 2002; Gupta, Luan, 2003).

Активность многих белков регулируется более, чем одним типом ПТМ. Наряду с фосфорилированием редокс-зависимая ПТМ белков влияет на множество аспектов регуляции клеточного гомеостаза во всех типах живых организмов, включая каждую стадию развития растений. ПТМ тиоловых групп остатков цистеина белков пероксидом водорода является преимущественным механизмом редокс-регуляции сигнальной трансдукции (Buchanan, Balmer, 2005). Выявлен редокс-контроль уровня фосфотирозиновых белков позвоночных (Denu, Tanner, 1998). На растениях убедительно показан контроль активности очищенных ферментов, дефосфорилирующих белки по тирозину *AtPTP1*, *GmPTP* их окислением/восстановлением (Xu et al., 1998; Gupta, Luan, 2003, Dixon et al., 2005). Эти результаты указывают на универсальность каталитического механизма протеинтирозинфосфатаз (ПТФ) эукариот и позволяют исследовать уровень тирозинового фосфорилирования (УТФ) белков растений *in vivo*. Другие **фосфотирозиновые** регуляторные белки и белки сигнальных систем растений - мишени редокс-контроля, за небольшим исключением, остаются неидентифицированными. Редокс-регуляция тирозинового фосфорилирования белков в адаптивных реакциях растений при действии стресс-факторов практически не изучена.

Цель и задачи исследования. В связи с изложенным **цель** работы заключалась в выявлении влияния редокс-агентов на уровень тирозинового фосфорилирования белков растений и в идентификации конкретных редокс-регулируемых фосфотирозиновых белков корней гороха.

В связи с этим были поставлены следующие **задачи**:

1. Выявить фосфотирозиновые белки, уровень фосфорилирования которых регулируется прооксидантами и антиоксидантами.
2. Идентифицировать фосфотирозиновые белки в корнях гороха методом MALDI-TOF MS (MS/MS).
3. Выявить действие физиологической и токсической концентрации H_2O_2 на уровень тирозинового фосфорилирования белков корней гороха и изучить их влияние на пролиферативную активность клеток корней гороха.

Научная новизна работы. Выявлена редокс-регуляция тирозинового фосфорилирования ряда белков растений с помощью экзогенных прооксидантов и антиоксидантов. При поранении и действии *in situ* прооксидантов выявлен высокий уровень эндогенного содержания H_2O_2 в корнях, что коррелировало с повышением уровня тирозинового фосфорилирования белков. Впервые показан значительный вклад активности ПТФ в уровень тирозинового фосфорилирования белков растений, что согласуется с данными, полученными на клетках позвоночных.

Впервые идентифицированы фосфотирозиновые белки растений (21 белок), уровень фосфорилирования которых редокс-зависим; среди них оказались компоненты сигнальных систем, регуляторные, защитные белки, компоненты различных метаболических путей и 3 белка с неизвестной функцией.

Обнаружено, что пероксид водорода в физиологической концентрации вызывает более активное вступление клеток в митоз, в токсической концентрации увеличивает длительность клеточного цикла. Восстанавливающий агент ДТТ элиминирует действие токсической концентрации пероксида водорода, что подтверждает редокс-контроль клеточной пролиферативной активности растений.

Научно-практическая значимость работы. Результаты работы могут быть использованы в фундаментальных исследованиях клеточной активности, в биотехнологических производствах, а также для чтения лекций в университетах, сельскохозяйственных ВУЗах.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование. Часть исследований автора выполнялась в рамках гранта ведущей научной школы № 5492.2008.4. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора. Идентификация белков с помощью MALDI-TOF MS (MS/MS) проводилась на базе центра постгеномных технологий института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН (г. Москва). Данные с использованием конфокальной микроскопии получены при сотрудничестве с н.с. КИББ КазНЦ РАН к.б.н. Мухитовым А.Р.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на 14-ом международном конгрессе FESPB (Краков, Польша, 2004), на 8-ой молодежной школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пушино, 2004), на международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2005), на I (IX) международной конференции молодых

ботаников (Санкт-Петербург, 2006), на втором международном симпозиуме «Сигнальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 2006), на итоговых конференциях КИББ КазНЦ РАН (2004, 2007), на конференции молодых ученых КИББ КазНЦ РАН (2005).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 11 научных работ, в том числе 3 статьи, из них 2 статьи в реферируемых журналах и 1 – в сборнике.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа содержит 5 таблиц, 7 схем и 23 рисунка. Список литературы включает 265 источников.

1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Объекты исследования. В работе использовали корни 7-ми дневных проростков гороха *Pisum sativum* L. и культуру одноклеточной водоросли (в логарифмической фазе роста, 10^6 клеток/мл) *Dunaliella maritima* Theod. Одноклеточная морская водоросль *D. maritima* Theod. интенсивно используется как удобная модельная система в биохимических и физиологических исследованиях. Обнаружено, что фотосинтез и дыхание этих микроводорослей имеют тесное сходство с высшими растениями (Pick, Israel, 1998; Coa et al., 2001; Katz, Pick, 2001). Кроме того, отсутствие клеточной стенки облегчает проникновение антител в клетки. Растения гороха и культуру водоросли выращивали при 25 С и люминесцентном освещении (10 кЛюкс) с 10-ти часовым фотопериодом. Растения выращивали на ? среды Хогланда-Арнона 1; для выращивания *D. maritima* использовали жидкую среду (Абдуллаев, Семененко, 1974).

Корни гороха после отделения от побегов помещали в среду роста, куда добавляли эффекторы. После инкубации кончики корней (0,8 см) фиксировали в жидком азоте и гомогенизировали в среде, содержащей: 50 мМ HEPES, pH 7.5, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ПМСФ, 10 мМ ЭГТА, 0,1 мМ ортованадата, 1 мМ теофиллина и 3% поливинилпирролидона, затем центрифугировали при 14000 g в течение 5 мин. Для анализа брали супернатант.

1.2. Определение тирозинового фосфорилирования белков в супернатанте гомогената корней гороха проводили с помощью одномерного или двумерного электрофорезов в 6-20% ПААГ при силе тока 10 мА на гель в течение 120-150 мин с последующим Вестерн-блоттингом при силе тока 150 мА в течение 1 часа. Изофокусировку проб для двумерного электрофореза проводили на стрипах с иммобилизованным градиентом pH 3-10 при силе тока 50 мкА на стрип в течение 40 кВольт-часов. Иммунодетекцию фосфотирозиновых белков на мембране проводили с использованием моноклональных антител PY20 (Amersham). Визуализацию

связывания антител с белками выявляли с помощью ECL-реагента (Amersham). Полученное фиксированное свечение на пленке и гели сканировали на Epson Scanner Perfection 3170 Photo (Япония) для дальнейшей обработки.

1.3. Анализ данных одномерного электрофореза проводили с помощью программы Image Master 1D (Англия), а двумерного электрофореза – с помощью программы Flicker (<http://open2dprot.sourceforge.net/Flicker>) (США). Удельное тирозиновое фосфорилирование выражали как отношение оптической плотности фосфорилированного белка (хемиллюминисценция), идентифицированного на радиоавтографической пленке, к оптической плотности того же белка, идентифицированного на мембране, окрашенной Кумасси R-250.

1.4. Определение уровня тирозинового фосфорилирования в клетках *Dunaliella maritima* Theod. проводили с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия). Клетки водоросли после воздействия эффекторов *in vivo* фиксировали параформальдегидом (ПФА), обрабатывали 100 мкМ раствором дигитонина, затем первичными антителами к фосфорилированному тирозину (Biosource, USA) и вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором ФИТЦ (Calbiochem, USA). Для возбуждения флуоресценции ФИТЦ применяли аргоновый лазер с длиной волны 488 нм. Для исключения автофлуоресценции применяли λ -режим сканирования препаратов с последующей обработкой изображений при использовании алгоритма линейного разложения, позволяющего разделить сигналы, близкие по спектральным характеристикам. Для учета автофлуоресценции исследовали контрольные необработанные клетки *D. maritima* Theod. Как показали наши исследования, они обладают интенсивной автофлуоресценцией в области 505-528 нм при длине волны возбуждающего лазера 488 нм, что затрудняет локализацию сигнала от ФИТЦ (эмиссия – 519 нм). Для выделения автофлуоресценции от ФИТЦ применяли сканирование препаратов в λ -режиме LSM. Полученные спектры флуоресценции затем были использованы при обработке изображений с помощью алгоритма линейного разложения программой LSM 5 (Release version 4.0).

1.5. Идентификация белков проводилась методом MALDI-TOF MS (MS/MS). Поиск проводился в базе данных NCBI.nr, поддерживаемой NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) с ограничением по таксону *Viridiplantae* (зеленые растения). Последовательность аминокислот фрагментов белков, идентифицированных при помощи MALDI-TOF MS (MS/MS), экзаменовали на наличие сайтов фосфорилирования по тирозину, используя базу данных NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk>).

1.6. Определение содержания перекиси водорода в корнях гороха проводили с использованием ксиленолового оранжевого (Wolff, 1994).

1.7. Определение митотической активности и хромосомных aberrаций проводили, анализируя клетки меристематической зоны главного корня с помощью

светового микроскопа (Carl Zeiss, Германия). Обработывали проклюнувшиеся семена 20 мин растворами эффекторов в среде Хогланда-Арнона, затем выращивали на ? среды Хогланда-Арнона в течение 5 суток при оптимальных условиях. Фиксировали корни каждые сутки в одно и то же время. Митотический индекс вычисляли, учитывая не менее 3000 клеток на точку фиксации.

1.8. Определение количества белка в растворе проводили по методу Бредфорд.

1.9. Статистика. Эксперименты проводили в двух-трех биологических повторностях. Для электрофореза и конфокальной микроскопии приведены результаты одного характерного опыта. В опытах по определению эндогенного содержания H_2O_2 стандартные ошибки не превышали 11%. Ошибку выборочной доли при вычислении митотического индекса определяли по стандартным методикам (Лакин, 1990).

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Механизмы редокс-регуляции базируются на посттрансляционной окислительной модификации белков, а пероксиду водорода отводится роль вторичного посредника в трансдукции разнообразных сигналов (Rhee et al., 2005, Fedoroff, 2006). Мишенями H_2O_2 являются сульфгидрильные, или тиоловые, SH- группы белковых молекул. Несмотря на наличие многочисленных белков, содержащих тиоловые группы, круг возможных мишеней H_2O_2 ограничен для характерного времени трансдукции из-за различной реакционной способности тиоловых групп в различных белках. Константа ионизации (pK_a) SH-групп большинства цистеиновых остатков составляет около 8,5, и при физиологическом значении pH в клетке (~7,4) существенные SH-группы большинства белков остаются неионизированными из-за высокого значения pK_a , поэтому они устойчивы к окислению (Kim et al., 2000). Окислению активными формами кислорода (АФК) подвергаются SH-группы с низким значением pK_a с образованием сульфеновых (-SOH), сульфиновых (-SO₂H) и сульфоновых (-SO₃H) групп или формированием межмолекулярных и внутримолекулярных дисульфидных мостиков. Остатки цистеина активного сайта ПТФ – ферментов дефосфорилирующих фосфотирозинового белка – имеют низкие значения pK_a и существуют как тиолат-анионы при нейтральном pH из-за соседства положительно заряженных аминокислотных остатков, которые способны взаимодействовать с отрицательно заряженным тиолатом; таким образом, существенная SH-группа ПТФ ионизирована даже при физиологическом значении pH в клетке и может быть окислена, что влечет за собой ингибирование активности ПТФ (Denu, Tanner, 1998). Ингибирование активности ПТФ окислением существенных SH-групп может вызывать значительное повышение содержания фосфотирозинового белка, так как активность ПТФ выше активности ПТК в 10 раз (Hunter, 1995). Кроме того, окисление существенных SH-групп некоторых ПТК активирует их, также увеличивая содержание фосфотирозинового белка. Таким образом, окисление ПТФ и ПТК вызывает

повышение содержания фосфотирозиновых белков, а восстановление ферментов тирозинового фосфорилирования – значительное понижение (рис. 1).

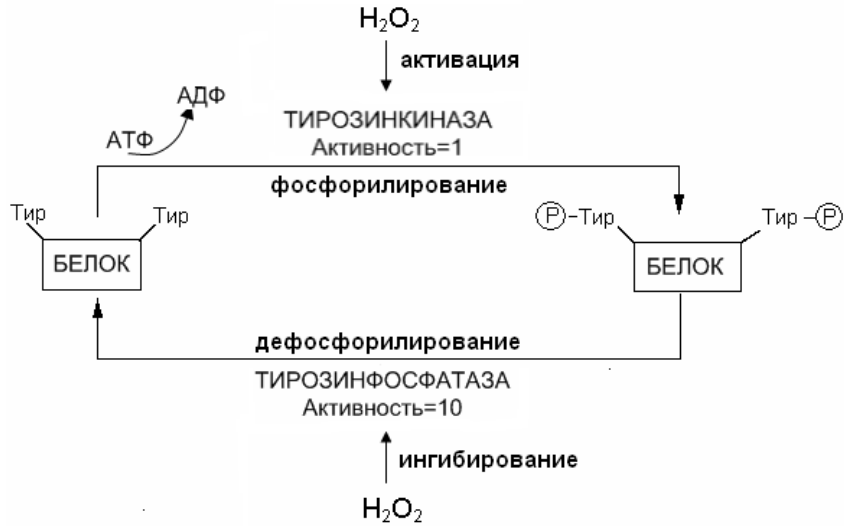


Рис. 1. Схема регуляции тирозинового фосфорилирования белков.

2.1. Выявление фосфотирозиновых белков корней гороха. Наши эксперименты (рис. 2, 3) показали высокую (микромольную) специфичность использованных моноклональных антител РУ20 к фосфотирозиновым белкам растений. Инкубация антител с 5 мкМ фосфотирозина вызвала драматическое уменьшение связывания антител с фосфотирозиновыми белками корней гороха (рис. 2-2). Повышение концентрации антигена (фосфотирозина) до 1 мМ (рис. 2-4) привело к полному ингибированию связывания антител с фосфотирозиновыми белками растений.

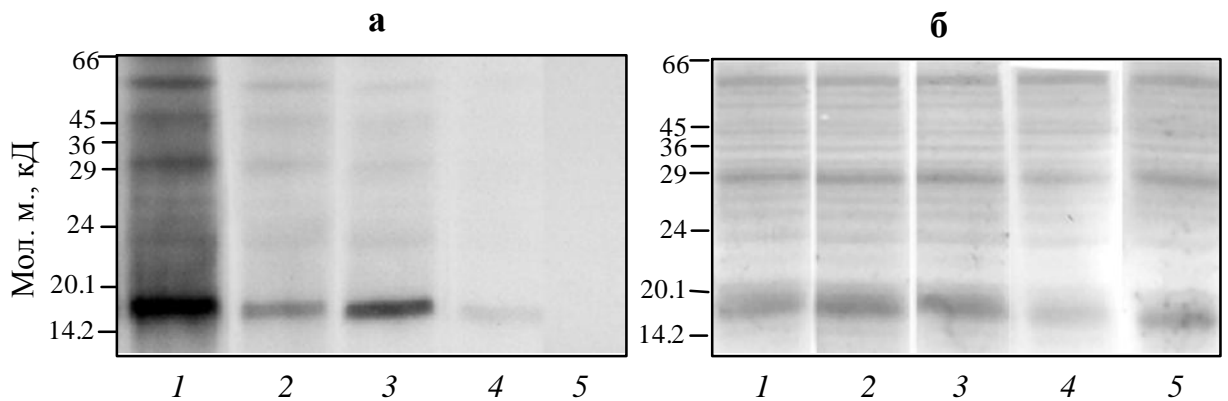


Рис. 2. Специфичность связывания антител РУ20 с белками экстракта корней *Pisum sativum* L. (антитела предварительно инкубировали с соответствующим количеством фосфотирозина): **а** – автограф фосфорилированных по тирозину полипептидов, **б** – окрашенные Кумасси R-250 полипептиды: 1 – контроль (без добавления фосфотирозина), 2 – 5 мкМ фосфотирозина, 3 – 100 мкМ фосфотирозина, 4 – 1 мМ фосфотирозина и 5 – 10 мМ фосфотирозина.

Определение фосфотирозиновых белков методом электрофореза с последующим иммуноблоттингом имеет ограничение из-за низкого содержания фосфотирозиновых

минорных белков (ПТК, ПТФ и ряд других белков сигнальных систем и регуляторных белков, существующих в клетках в единичных копиях (Gygi et al., 2000)), поскольку наблюдается зависимость интенсивности пятен фосфотирозиновых полипептидов (ПП) от содержания белка. В ранних исследованиях на клетках человека фосфотирозиновые белки не обнаруживались у здоровых пациентов или обнаруживались в малом количестве (0,01-0,1% от содержания всех фосфобелков). Причиной тому является более высокая (по крайней мере, в 10 раз) активность ПТФ в клетках позвоночных в сравнении с ПТК (Hunter, 1995). В связи с этим мы использовали корни, отделенные от стеблей – модель стресса, а также другой метод – конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, который позволяет регистрировать общий уровень тирозинового фосфорилирования нативных белков.

Высокую (микромольную) специфичность использованных для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии первичных (PY20) антител показывают данные рис. 3. После инкубации первичных антител с антигеном (5 мкМ фосфотирозина) интенсивность флуоресцентного свечения ФИТЦ и, соответственно, уровень фосфорилирования белков клеток водорослей по тирозину, уменьшились на 65% (табл. 1) по сравнению с контролем.

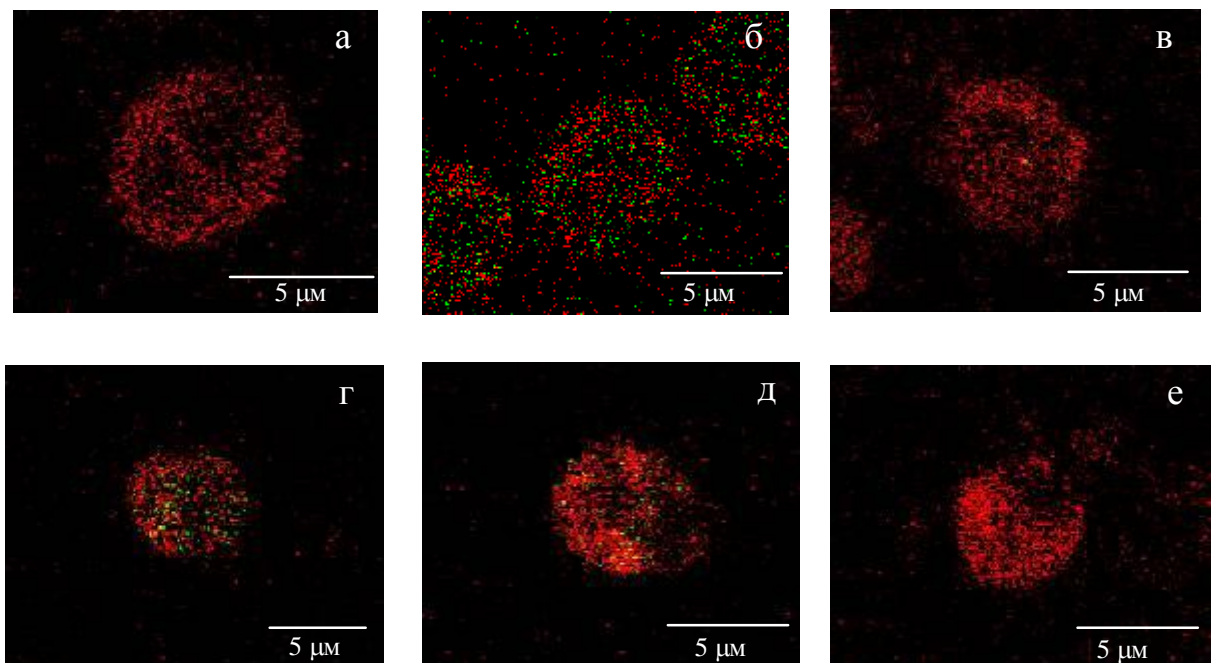


Рис. 3. Специфичность связывания фосфотирозиновых антител PY20 с белками клеток *Dunaliella maritima* Theod. (красным показана автофлуоресценция, зеленым - флуоресценция ФИТЦ): **а** – автофлуоресценция, **б** – контроль, **в** – контроль специфичности вторичных антител, **г-е** – контроль специфичности первичных антител (антитела предварительно инкубировали с соответствующим количеством фосфотирозина): **г** – 5 мкМ фосфотирозина, **д** – 10 мкМ фосфотирозина, **е** – 100 мкМ фосфотирозина.

Данные по обработке клеток водорослей лишь вторичными антителами, согласно которым свечение ФИТЦ не детектировалось (рис. 3, в), указывают на отсутствие неспецифического связывания вторичных антител.

Уровень тирозинового фосфорилирования белков зависит от активности ферментов фосфорилирования/дефосфорилирования белков – ПТК и ПТФ. Невысокий (0,3 – 0,5 %) вклад ПТК в уровень тирозинового фосфорилирования белков растений гороха был показан в нашей лаборатории ранее в работах Е.О. Феединой с сотр. (2006). Вклад тирозиновых фосфатаз в содержание фосфотирозиновых белков мы выявляли с помощью специфического ингибитора ПТФ ортованадата натрия. Ванадат ингибирует тирозиновые фосфатазы различных семейств, однако серин/треониновые фосфатазы нечувствительны к ванадату (Huyer et al., 1997; Hulley et al., 2003). По данным 1D-электрофореза ванадат натрия вызывал *in situ* за 10 минут значительное повышение УТФ 5 полос ПП, а также понижение УТФ 3х полос ПП (рис. 4), что указывает на присутствие в клетках растений различных типов ПТК и ПТФ, регуляция которых осуществляется разными механизмами (Крутецкая, 1998). Повышение УТФ 5 ПП может объясняться ингибированием ПТФ ванадатом (связыванием остатка цистеина ПТФ, что ингибирует образование фосфорильного интермедиата в первой ступени каталитического акта (Huyer et al., 1997)). Понижение УТФ 3х полос ПП могло быть вызвано ингибированием, через ПТФ, ПТК, подобных ПТК src-семейства, обнаруженных в растениях P. Rudrabhatla с сотр. (2006).

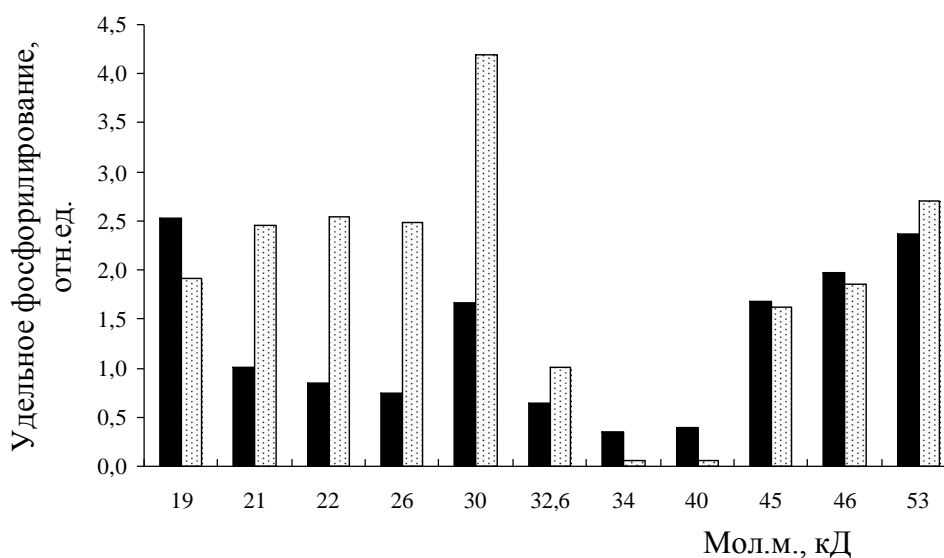


Рис. 4. Влияние ванадата натрия *in situ* (10 мин) на тирозиновое фосфорилирование белков корней *Pisum sativum* L.:

■ – контроль, ▨ – ванадат (0,1 мМ).

Данные по влиянию ингибитора ПТФ – ванадата, полученные с использованием конфокального микроскопа на одноклеточной водоросли *D. maritima* Theod. (рис. 5, табл. 1) позволяют количественно оценить уровень фосфорилирования белков по тирозину. Анализ данных рис. 5 свидетельствует о 17-ти кратном увеличении уровня фосфорилированных по тирозину белков в клетках водоросли под действием экзогенного ванадата, что указывает на высокий вклад активности ПТФ в определяемый уровень тирозинового фосфорилирования белков.

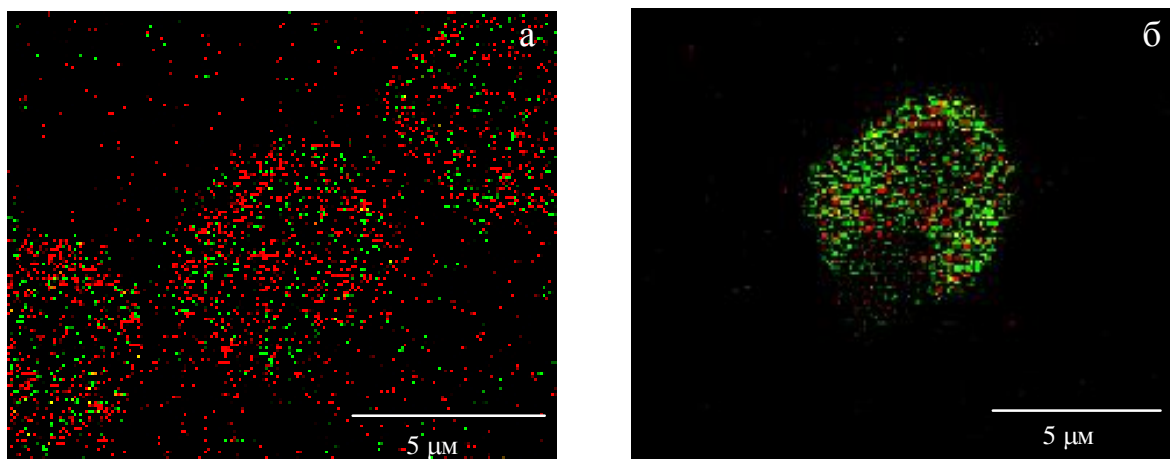


Рис. 5. Влияние ванадата натрия *in vivo* (10 мин) на уровень тирозинового фосфорилирования белков клеток *Dunaliella maritima* Theod. (красным показана автофлуоресценция, зеленым - флуоресценция ФИТЦ): **а** – контроль, **б** – ванадат (0,1 мМ).

Табл. 1. Уровень тирозинового фосфорилирования белков *D. maritima* Theod. при действии *in vivo* (10 мин) ванадата и после действия антигена на антитела (средняя интенсивность флуоресценции (рис. 3 и 5), полученная с применением программы LSM 5 (Release version 4.0)).

Варианты	Средняя интенсивность флуоресценции с учетом площади клеток, отн. ед.
Контроль	1,21
Ванадат (0,1 мМ)	20,53
Обработка антител 5 мкМ фосфотирозина	0,79

Итак, согласно нашим данным (табл. 1, рис. 5), использование ингибитора ПТФ позволило нам выявить 17-ти кратное повышение уровня тирозинового фосфорилирования белков в клетках водоросли в сравнении с выявляемым в контрольных образцах, что согласуется с данными, полученными на клетках позвоночных, свидетельствующими о том, что активность ПТФ выше активности ПТК в 10 раз (Hunter, 1995).

Значительный уровень фосфорилирования белков по тирозину, обнаруженный нами в контрольных вариантах, обусловлен стрессом (отрезанием корней от стеблей и центрифугированием клеток водорослей в ходе эксперимента), который может вызывать повышение внутриклеточного содержания H_2O_2 , способного подавлять активность ПТФ окислением их существенных SH-групп. Для того чтобы проверить это, мы измерили внутриклеточное содержание H_2O_2 в корнях гороха после их отрезания от стеблей.

2.2. Изменение содержания перекиси водорода в корнях гороха при механическом стрессе и действии экзогенных эффекторов. Содержание эндогенного H_2O_2 , определенное в корнях после их отделения от побегов характеризует динамику стресса (рис. 6). Полученные результаты указывают на высокое содержание эндогенного H_2O_2 в корнях уже через 30 сек после отрезания, что свидетельствует о быстрой продукции пероксида водорода в ответ на стресс. По абсолютным значениям содержание H_2O_2 в наших экспериментах сопоставимо с данными литературы (Amory et al., 1992; Bellincampi et al., 2000).

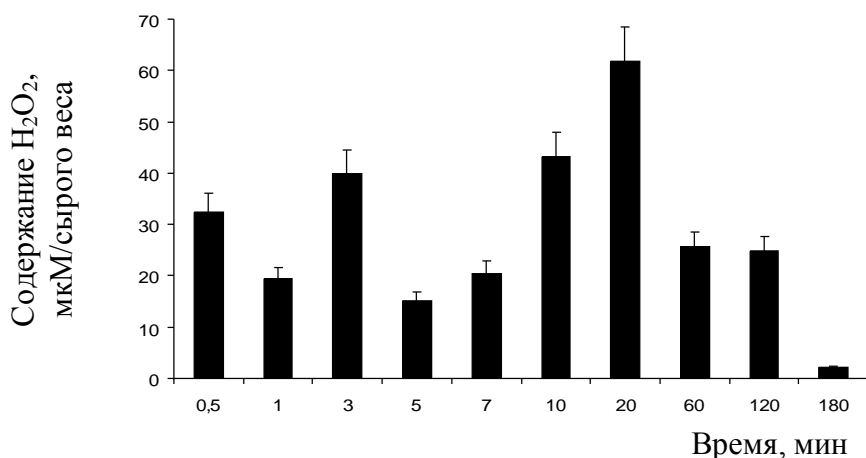


Рис. 6. Влияние механического стресса (отрезание) на эндогенное содержание H_2O_2 в клетках корней *Pisum sativum* L.

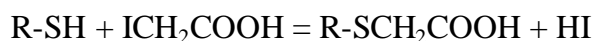
Действие *in situ* прооксидантов: форболового эфира (ФМА), активирующего через протеинкиназу С НАДФН-оксидазу, (Li et al., 1994; Curnutte et al., 2002) и ингибитора каталазы аминотриазола (Gechev, 2002) вызывало повышение содержания H_2O_2 в корнях гороха за все исследуемое время в сравнении с контролем (данные приведены в диссертации). При действии салициловой (СК) и аскорбиновой кислот *in situ* на отрезанные корни гороха нами также выявлено изменение содержания эндогенной H_2O_2 . СК отводят роль ингибитора каталазы (Тарчевский и др., 1999). В наших экспериментах СК повышала эндогенное содержание H_2O_2 в корнях лишь через 30 мин, тогда как за 5-20 минут – понижала в сравнении с контролем. Аскорбат в наших экспериментах вызывал также неоднозначное изменение эндогенного

содержания H_2O_2 за разное время наблюдения. В литературе описана как протекторная функция аскорбата, так и его прооксидантная роль, которая связана с генерацией супероксиданион-радикала (Smirnoff, 2000). По-видимому, с этой функцией аскорбата связано наблюдаемое в наших экспериментах после трех минут действия *in situ* повышенное содержание эндогенной H_2O_2 . Прооксидантная функция некоторых экзогенных соединений при их действии на растения показана в работе Ф.В. Минибаевой и Л.Х. Гордона (2003).

Данные, полученные в этой серии экспериментов, показывают, что механический стресс, а также кратковременное действие экзогенных соединений вызывают значительное изменение внутриклеточного содержания H_2O_2 в корнях гороха, что согласуется с данными литературы (Pastori, Foyer, 2002; Fedoroff, 2006), и могут объяснить наблюдаемый в наших экспериментах значительный уровень тирозинового фосфорилирования белков в контрольных вариантах (рис. 2, 3, 5) окислением пероксидом водорода существенных SH-групп ПТФ и ПТК.

2.3. Редокс-регуляция уровня тирозинового фосфорилирования белков растений.

Влияние редокс-агентов на уровень тирозинового фосфорилирования белков позвоночных опосредуется регуляцией активности ферментов ПТК и ПТФ окислением SH-групп в каталитическом центре фермента. По данным литературы, для выявления участия SH-групп в каталитическом механизме ферментов используют алкилирующий агент – йодуксусную кислоту (ЙУК) (Kim et al., 2000; Shelton et al., 2005). Основываясь на этих данных, мы использовали ЙУК, чтобы показать непосредственное участие SH-групп цистеиновых остатков ПТФ в изменении уровня тирозинового фосфорилирования белков. Реакция алкилирования идет по следующей схеме:



ЙУК, модифицируя цистеиновые остатки белковых молекул (Michaelis et al., 1934), определяет невозможность функционирования каталитического цистеина ПТФ в качестве акцептора фосфата в первой ступени тирозинфосфатазной активности, что приводит к ингибированию его активности, соответственно, повышению уровня фосфотирозиновых белков. Данные наших экспериментов убедительно демонстрируют повышение йодуксусной кислотой уровня тирозинового фосфорилирования белков за 5 мин действия (рис. 7) в сравнении с контролем: выявлено не менее 20 фосфотирозиновых ПП со значительным уровнем фосфорилирования (рис. 7, б). Известно, что ЙУК связывается только со свободными SH-группами, но не с окисленной формой цистеина и не с дисульфидными комплексами (Lee et al., 1998). Результаты наших экспериментов с йодуксусной кислотой однозначно указывают на непосредственное участие тиоловых групп в регуляции активности ферментов фосфорилирования/дефосфорилирования белков.

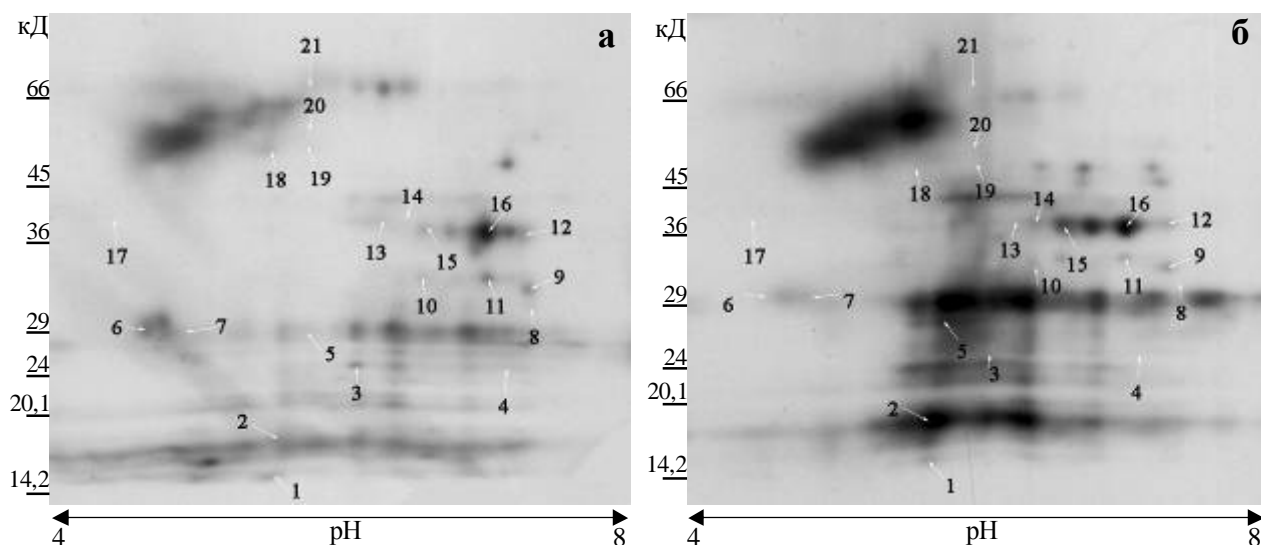


Рис. 7. Влияние йодуксусной кислоты *in situ* (5 мин) на уровень тирозинового фосфорилирования полипептидов корней *Pisum sativum* L. **а** – контроль, **б** – йодуксусная кислота (50 мМ). Нагрузка белка в вариантах одинакова.

За 10 мин после отрезания корней (механический стресс) наблюдается значительное число (свыше 50) фосфорилированных по тирозину белков в контрольном варианте (рис. 8, а), что коррелирует с повышенным содержанием эндогенного H_2O_2 по данным рис. 6. По данным 2D-электрофореза инкубация отсеченных корней в среде роста с восстанавливающим SH-группы агентом ДТТ *in situ* за 10 мин вызывала значительное уменьшение числа фосфотирозиновых белков (рис. 8, б), в сравнении с контролем (рис. 8, а). Эти результаты могут объясняться восстановлением активности протеинтирозинфосфатаз, дефосфорилирующих фосфотирозиновые белки. Наши данные по действию ДТТ доказывают, что клетки корней контрольного варианта находятся в состоянии стресса и согласуются с представлениями, принятыми в литературе (Finkel, 2003), что окисление SH-групп цистеина белков пероксидом водорода может предотвращаться инкубацией с восстанавливающим агентом ДТТ, способным проникать через мембраны клеток (Мурина и др., 2005), и что результаты, полученные при действии оксидантов, возможно, следует также сравнивать с вариантом с добавлением экзогенного восстанавливающего агента ДТТ.

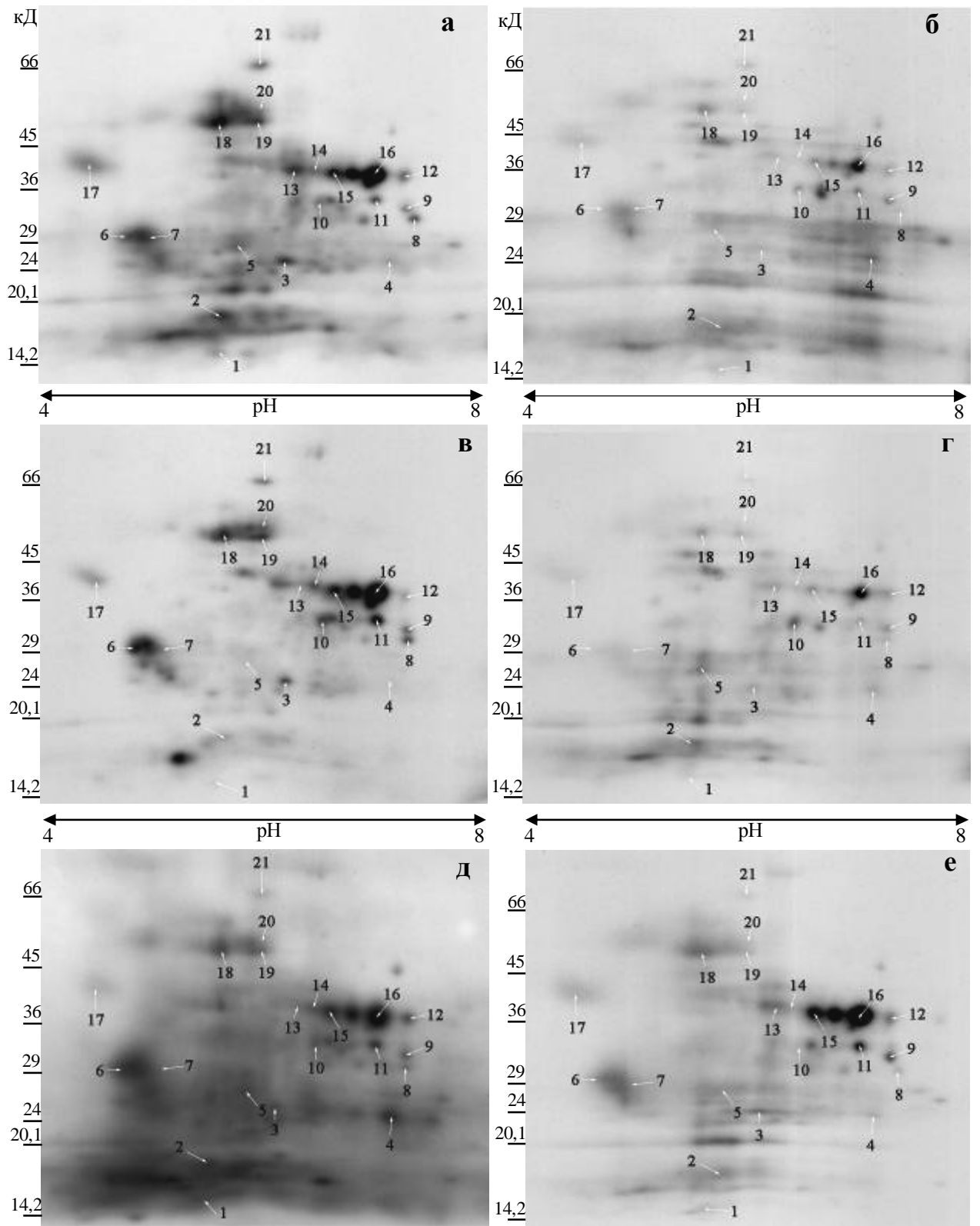


Рис. 8. Влияние редокс-агентов *in situ* на тирозиновое фосфорилирование белков корней *Pisum sativum* L. **а** – контроль, **б** – ДТТ (10 мМ), **в** – H_2O_2 (1 мкМ), **г** – H_2O_2 (1 мкМ) + ДТТ (10 мМ), **д** – H_2O_2 (10 мМ), **е** – ФМА (2 мкМ).

Удельное тирозиновое фосфорилирование 21 полипептида, идентифицированного методом MALDI-TOF MS (MS/MS), было вычислено с учетом содержания белков в образце (табл. 2).

Табл. 2. Влияние редокс-агентов *in situ* на удельное тирозиновое фосфорилирование белков корней гороха (отн. ед.).

№ белка на 2D-геле	контроль	10 мМ ДТТ	1 мкМ H ₂ O ₂	1 мкМ H ₂ O ₂ + 10 мМ ДТТ	2 мкМ ФМА	10 мМ H ₂ O ₂
1	1,30	0,60	<u>1,57</u>	<u>0,79</u>	<u>1,53</u>	<u>2,67</u>
2	1,18	0,79	<u>1,02</u>	<u>1,03</u>	<u>1,12</u>	<u>1,42</u>
3	1,37	0,33	<u>1,23</u>	<u>0,41</u>	<u>1,28</u>	<u>1,49</u>
4	0,91	1,22	0,78	0,87	0,66	<u>2,43</u>
5	0,92	0,58	<u>0,76</u>	<u>0,75</u>	<u>0,86</u>	<u>1,26</u>
6	1,77	0,64	<u>1,90</u>	0,43	<u>1,27</u>	<u>2,07</u>
7	1,45	0,55	<u>1,85</u>	0,48	<u>1,52</u>	<u>1,83</u>
8	1,36	0,74	<u>1,07</u>	<u>1,65</u>	<u>1,50</u>	<u>1,41</u>
9	0,87	1,03	0,81	1,02	<u>1,75</u>	<u>1,35</u>
10	1,11	0,86	<u>1,46</u>	<u>0,97</u>	0,96	<u>1,33</u>
11	1,40	1,44	<u>1,69</u>	1,07	<u>3,43</u>	<u>1,97</u>
12	1,21	1,01	1,08	<u>2,29</u>	<u>2,87</u>	<u>2,05</u>
13	1,27	0,43	<u>0,91</u>	<u>0,72</u>	<u>1,15</u>	<u>1,60</u>
14	1,03	0,83	<u>2,96</u>	0,42	<u>1,15</u>	<u>1,36</u>
15	1,73	0,98	<u>2,04</u>	<u>1,51</u>	<u>2,64</u>	<u>1,74</u>
16	1,64	1,90	1,70	<u>2,54</u>	<u>2,60</u>	<u>1,83</u>
17	1,15	0,75	<u>1,22</u>	<u>0,88</u>	<u>1,36</u>	<u>0,66</u>
18	1,43	0,56	<u>1,15</u>	0,60	<u>1,01</u>	<u>1,26</u>
19	1,27	0,49	<u>1,11</u>	0,48	<u>0,88</u>	<u>1,04</u>
20	1,05	0,38	<u>1,15</u>	0,42	<u>0,84</u>	<u>0,89</u>
21	1,12	0,86	<u>1,05</u>	0,50	0,97	0,61

Полужирным шрифтом выделены значения выше контроля, подчеркнуты значения выше варианта ДТТ.

Однако действие ДТТ за 10 мин было неоднозначно: наряду со снижением УТФ большинства ПП, ДТТ также вызывал появление дополнительных фосфотирозиновых ПП мол. массы 17 – 22 кД с *pI* равным 7.0-7.3 (рис. 8, б). Эти данные могут быть объяснены различием в величинах *pK_a* каталитического цистеина у разных ПТФ и в возможности образовывать тиолатные ионы, а также структурным расстоянием между двумя цистеинами, образующими дисульфиды, что может сильно влиять на возможность быстрой регуляции активности различных ПТФ и других белков изменением внутриклеточного редокс-статуса (Chiarugi, Girgi, 2003). Наши результаты о появлении новых фосфотирозиновых белков в присутствии ДТТ указывают на то, что не все ПТФ корней гороха имеют одинаковые *pK_a* и, соответственно, по-разному

подвергаются редокс-регуляции, что также согласуется с данными, свидетельствующими о том, что ПТФ фасоли относительно нечувствительна к инактивации пероксидом водорода (Dixon et al., 2005).

В качестве экзогенного прооксиданта использовали пероксид водорода (рис. 8, в) в концентрации 1 мкМ, в которой он является сигнальной молекулой (Foyer, 1997; Neill et al., 2002), и действие которой направлено на оптимизацию клеточного метаболизма (Orozco-Cardenas et al., 2001; Vranova et al., 2002). H_2O_2 , генерируемый в клетках при любом стрессе или физиологическом стимуле, приводит к окислению активного цистеина белков в стабильную, один раз окисленную сульфеновую кислоту (-SOH); однако эта модификация обратима и может служить основой для механизма временного ингибирования активности ПТФ. Эффекты H_2O_2 , образуемой при стрессе различными прооксидантными системами, в том числе и за пределами цитоплазмы (в клеточной стенке и плазмалемме) (Pastori, Foyer, 2002), могут также объясняться способностью H_2O_2 проникать в клетки через мембраны и непосредственно окислять SH-группы каталитических центров ПТК и ПТФ в цитозоле. Обнаружено, что H_2O_2 может диффундировать через мембрану по водным каналам (Henzler, Steudle, 2000). Данные 2D-электрофореза и иммуноблоттинга показывают, что 1 мкМ экзогенного H_2O_2 за 10 мин *in situ* (рис. 8, в, табл. 2) вызывал в корнях в сравнении с контрольным вариантом (рис. 8, а, табл. 2) уменьшение УТФ большинства ПП и повышение у 7 ПП, что указывает на сигнальную функцию 1 мкМ H_2O_2 . Однако, в сравнении с вариантом, где корни были инкубированы с ДТТ, 1 мкМ H_2O_2 вызывал повышение общего числа и уровня фосфотирозиновых ПП (рис. 8, б, табл. 2), за исключением 3 ПП (№ 4, 9 и 16) для которых наблюдалось понижение УТФ.

При совместном действии 1 мкМ H_2O_2 и ДТТ (рис. 8, г и табл. 2) наблюдается значительное снижение УТФ большинства ПП в сравнении с действием 1 мкМ H_2O_2 отдельно, что убедительно демонстрирует редокс-регуляцию тирозинового фосфорилирования белков корней гороха.

Токсическая концентрация H_2O_2 (10 мМ) вызывала значительное повышение тирозинового фосфорилирования большинства ПП корней гороха за 10 мин *in situ* (рис. 8, д, табл. 2), что коррелировало с появлением хромосомных aberrаций и удлинением клеточного цикла (фаз митоза) (данные приведены в диссертации).

Чтобы продемонстрировать участие внутриклеточных ферментов, катализирующих образование АФК и их гидролиз в изменении уровня тирозинового фосфорилирования белков, были проведены эксперименты с воздействием форболового эфира (рис. 8, е) и аминотриазола (рис. 9) на уровень тирозинового фосфорилирования белков. Действие ФМА (табл. 2, рис. 8) сравнимо с действием 1 мкМ H_2O_2 относительно контроля для 11 ПП (понижение для 8 ПП и повышение для 3 ПП). Неоднозначные изменения УТФ ПП, вызванные ФМА в сравнении с контролем (рис. 8, е, табл. 2) указывают, что кроме действия через супероксидсинтазную сигнальную систему в механизмы действия ФМА, возможно, вносят вклад и другие

сигнальные системы клеток. Известно, что эффект форболового эфира, связанный с увеличением содержания АФК, реализуется через протеинкиназу С, которая помимо активации НАДФН-оксидазы, изменяет содержание ионов Ca^{2+} в клетках (Li et al., 1994; Curnutte et al., 2002). Возможно, изменения уровня тирозинового фосфорилирования белков, наблюдаемые нами при действии ФМА, могут быть связаны с регуляцией активности тирозиновых киназ и фосфатаз компонентами сигнальной сети, чувствительными к изменению содержания Ca^{2+} в клетке, поскольку сами ПТК и ПТФ являются Ca^{2+} -зависимыми ферментами (Крутецкая, 1998). Ингибитор каталазы аминотриазол (рис. 9) вызывал при действии *in situ*, как и ожидалось, повышение уровня тирозинового фосфорилирования белков у большинства полос ПП, увеличивающееся со временем.

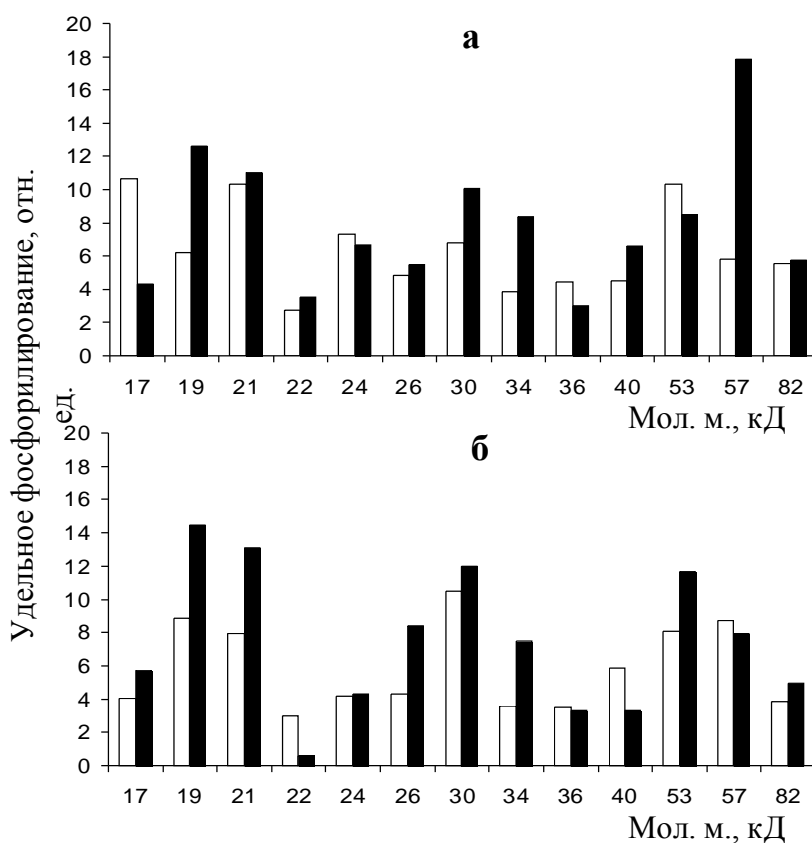


Рис. 9. Влияние аминотриазола *in situ* за 5 (а) и 10 (б) минут на тирозиновое фосфорилирование полипептидов корней *Pisum sativum* L.

□ - контроль, ■ - аминотриазол (10 мМ).

Нами было показано действие аминокислоты пролина на уровень тирозинового фосфорилирования белков корней гороха. Это соединение мы выбрали в связи с тем, что в литературе кроме протекторной роли в качестве осмолита, описана его прямая роль в качестве ловушки синглетного кислорода (Alia et al., 1991), чем определяется его защитная функция в высокой концентрации при повреждениях, вызванных свободными радикалами. В наших экспериментах (данные приведены в диссертации)

инкубация отсеченных корней с 20 мМ пролина вызвала снижение уровня тирозинового фосфорилирования большинства полос ПП корней гороха. Очевидно пролин, вызывая снижение внутриклеточных АФК, предупреждает окисление ПТК и ПТФ, от активности которых зависит уровень тирозинового фосфорилирования белков.

Способность ДТТ восстанавливать *in vivo* существенные SH-группы ПТФ, соответственно их активность, была продемонстрирована на клетках *D. maritima* Theod. с использованием конфокального лазерного микроскопа: по данным экспериментов наблюдается значительное уменьшение уровня фосфотирозиновых белков (рис. 10, б) в сравнении с контролем (рис. 10, а). Данные рис. 10 свидетельствуют об антиоксидантной функции аскорбата, т.к. инкубация клеток *D. maritima* Theod. с 10 мМ аскорбата в среде роста вызвала *in vivo* за 10 мин уменьшение уровня фосфотирозиновых белков (рис. 10, в), по сравнению с контролем (рис. 10, а).

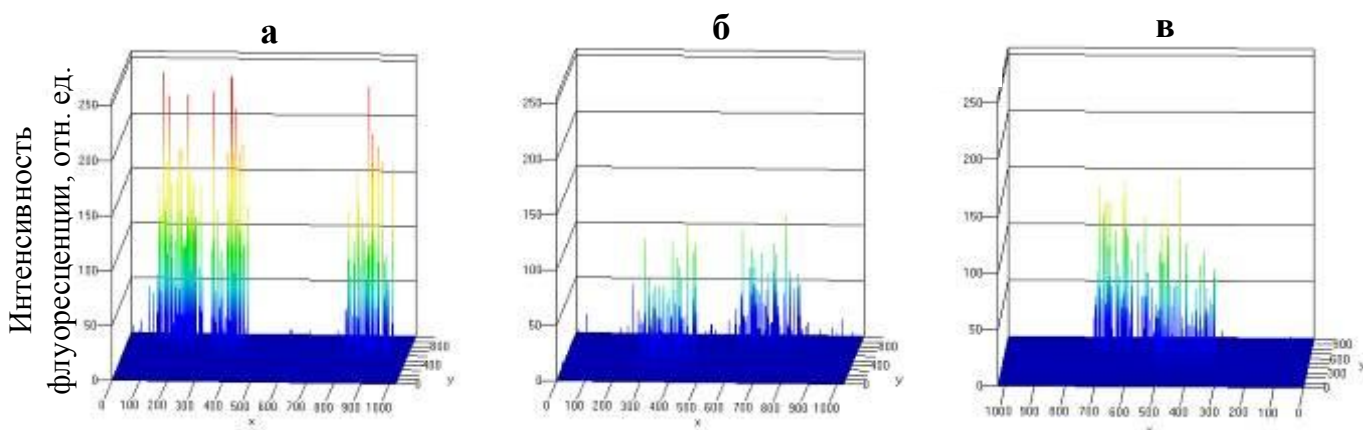


Рис. 10. Влияние восстанавливающего агента ДТТ и аскорбиновой кислоты *in vivo* на тирозиновое фосфорилирование белков клеток *D. maritima* Theod. за 10 минут воздействия. Показано распределение интенсивности флуоресценции, отражающее уровень тирозинового фосфорилирования. **а** – контроль, **б** – ДТТ (10 мМ), **в** – аскорбиновая кислота (10 мМ). Скопления пиков на графиках отражают отдельные клетки. Координаты X-Y соответствуют плоскости клетки. Изменения цвета от синего к красному отражает увеличение интенсивности флуоресценции (уровень фосфорилирования белков).

Итак, результаты проведенных нами экспериментов указывают на редокс-зависимость тирозинового фосфорилирования значительного числа белков растений. Приведенные данные подтверждают, что экзогенный H_2O_2 в концентрации 1 мкМ (рис. 8, табл. 1) может служить в клетках растений сигнальной молекулой, вызывающей регуляцию внутриклеточного уровня тирозинового фосфорилирования белков. Принимая во внимание доказанную высокую специфичность использованных нами антител к фосфотирозиновым белкам растений, мы можем сделать вывод, что редокс-агенты влияют именно на уровень **тирозинового** фосфорилирования белков через

изменение активности в значительной степени ПТФ (следует отметить, что серин/треониновые фосфатазы нечувствительны к окислению пероксидом водорода (Denu, Tanner, 1998; Chiarugi, Buricchi 2007)). Неоднозначный характер этих изменений указывает на множественность ПТФ в клетках растений (Luan, 2002), у которых может различаться pK_a , а также на регуляцию ПТК и ПТФ через редокс-чувствительные белки других сигнальных каскадов в клетке, например, Ca^{2+} -зависимой сигнальной системы.

2.4. Идентификация белков корней гороха, тирозинное фосфорилирование которых контролируется редокс-статусом клетки. Особый интерес для нас представляет идентификация фосфотирозиновых белков сигнальных систем, поэтому 21 белок, уровень тирозинного фосфорилирования которых изменялся под действием редокс-агентов были нами идентифицированы методом MALDI-TOF MS (MS/MS) (табл. 3). Некоторые белки с высоким уровнем фосфорилирования не удалось вырезать для идентификации из-за их низкого содержания в геле. Среди идентифицированных белков можно выделить белки сигнальных систем, регуляторные, защитные и метаболические белки (табл. 3). Характеристика этих белков приведена в диссертации. Последовательность аминокислот фрагментов белков, идентифицированных при помощи MALDI-TOF MS (MS/MS), экзаменовали на наличие сайтов фосфорилирования по тирозину, используя базу данных NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk>). Их количество составляет от 1 до 9 (табл. 3, графа N¹).

Табл. 3. Белки, идентифицированные из корней *Pisum sativum* L., фосфорилированные по тирозину (достоверны значения выше 65 единиц mowse score, для белков № 11, 13, 14 – достоверны значения выше 42 единиц mowse score).

№ пятна	мМ/рI в геле	мМ/рI теор.	N ¹	Достоверность mowse score ²	№ белка по базе данных NCBI	Название белка
1*	15/5.75	114/7.75	8	68	gi 6681366	белок родственный ретинобластоме*
2*	17/5.7	16.6/5.07	4	78	gi 20631	АБК-респонсивный белок ABR17*
3	25/6.35	47.8/5.56	5	85	gi 1169534	енолаза (2-фосфоглицерат дегидрогеназа)
4	28	28.7/7.07	3	79	gi 27375647	фактор регуляции транскрипции
5*	27/5.7	27/5.52	3	99	gi 20648	L-аскорбатпероксидаза*
6*	30/4.95	29.4/4.71	6	110	gi 4775555	14-3-3 подобный белок*
7*	30/5.2	29.4/4.71	6	102	gi 4775555	14-3-3 подобный белок*
8	31.2/7.5	35.6/7.07	3	93	gi 3023847	белок, подобный β-субъединице G-белка*
9*	33.5/7.4	37.4/5.98	3	67	gi 261212	β-1,3-глюканаза*
12*	38/7.4	38.5/6.77	5	112	gi 1168410	Цитоплазматическая фруктозо-бисфосфат альдолаза*
13	39/6.45	33.96/5.5	3	65	gi 3114905	редуктаза бензилового эфира фенилкумаровой кислоты
14	39.3/6.5 5	33.95/6.4 6	7	221	gi 6525021	НАД(Ф)Н-зависимая оксидоредуктаза, подобная изофлаворедуктазе
15*	39/6.8	38.5/6.77	5	113	gi 1168410	Цитоплазматическая фруктозо-бисфосфат альдолаза*

16*	38.5/7.2	38.5/6.67	5	174	gi 927505	фруктозо-бисфосфат альдолаза*
17	40/4.5	118/7.85	4	49	gi 39636757	Белок устойчивости к гнили RGA4 [Solanum bulbocastanum]
18	56/5.6	47.7/5.31	5	135	gi 42521309	енолаза
19	56/5.7	53/5.69	5	48	gi 29691168	аденозилгомоцистеиназа
21	57.5/6.0 1	42.2/7.1	5	92	gi 2055273	гидроксипируваредуктаза
Неизвестные белки						
10	34/6.45	75.3/9.3	6	65	gi 14716946	Предполагаемый полипротеин [Cicer arietinum]
11	34.5/7.2	37.6/7.7	1	60	gi 77745483	Неизвестный белок [Solanum tuberosum]
20	65/6.1	74.5/6.67	9	53	gb AL022580	Неизвестный белок [Arabidopsis thaliana]

¹Число сайтов тирозинового фосфорилирования по базе данных NetPhosK.

* - идентифицированы, как белки *Pisum sativum* L.

²Характеризующая величина достоверности mowse score определяется, исходя из уникальности регистрируемого набора масс для белка из базы данных, количества предполагаемых пептидов и полноты перекрытия последовательности белка.

2.5. Влияние H₂O₂ и ДТТ на пролиферацию клеток растений. Изменение уровня тирозинового фосфорилирования белков корней гороха в ответ на действие экзогенных соединений является динамическим показателем. Для характеристики влияния редокс-агентов на клеточную активность на интегральном уровне мы определили митотический индекс (МИ) и использовали анафазно-телофазный метод определения частоты хромосомных aberrаций. Результаты наших экспериментов показали, что увеличение МИ после кратковременного воздействия 1 мкМ H₂O₂ и 10 мМ ДТТ происходит за счет возрастания относительной длительности профазы, что указывает на активное вступление клеток в митоз; при действии 10 мМ H₂O₂ – за счет увеличения длительности клеточного цикла, главным образом, за счет метафазы, причем, присутствие ДТТ практически полностью снимает эффект 10 мМ H₂O₂. Токсическая концентрация H₂O₂ вызывала увеличение частоты хромосомных aberrаций типа мостов хромосом (данные приведены в диссертации). Наши данные о редокс-регуляции тирозинового фосфорилирования белков (рис. 8-10, табл. 2) и влиянии редокс-агентов на клеточную пролиферацию подтверждаются данными (Zhang et al., 1996) о критической роли тирозинового дефосфорилирования гистон-подобной киназы с помощью фосфатазы cdc25 для разрешения митоза в паренхимных клетках табака.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В литературе, несмотря на выявление редокс-чувствительных белков растений, практически отсутствуют данные о фосфотирозиновых белках и уровне их тирозинового фосфорилирования, критичных для передачи сигнала и регуляции клеточного метаболизма растений в норме и при адаптивных реакциях. Использование

адекватных объектов для выявления фосфотирозиновых белков (отсеченных от стеблей корней, испытывающих мощнейший механический стресс, и одноклеточной культуры водоросли *Dunaliella maritima* Theod., центрифугирование которой вызывало в клетках также стрессовое состояние), позволило нам выявить значительное (более 50) число фосфотирозиновых белков корней гороха. Экспериментальное обнаружение фосфотирозиновых белков в клетках позвоночных представляет проблему в оптимальных условиях, обусловленную более высокой (в 10 раз) активностью – ПТФ, в сравнении с активностью ПТК (Hunter, 1995). Использование специфического для ПТФ ингибитора (Huyer et al., 1997) позволило нам выявить до 10-17 раз больший уровень тирозинового фосфорилирования белков корней гороха и водоросли в сравнении с уровнем контрольных образцов.

Мы выявили более 50 растворимых белков корней гороха, уровень тирозинового фосфорилирования которых находится под редокс-контролем; из них 21 – были идентифицированы методом MALDI-TOF MS (MS/MS). Среди них оказались регуляторные, защитные белки, компоненты сигнальных систем и метаболических путей.

Нам удалось выявить высокую (микромольную) специфичность связывания использованных антител (PY20) с фосфотирозиновыми белками растений двумя независимыми методами: электрофореза и конфокальной лазерной микроскопии.

Использование хорошо проникающих через клеточные мембраны прооксидантов (экзогенный H_2O_2 , ФМА, аминотриазол), восстанавливающего агента ДТТ, аскорбата, аминокислоты пролина позволило нам изменять баланс клеточного редокс-статуса *in situ* в сторону окисления белковых SH-групп с низким pK_a и их восстановления. Измерение динамики изменения УТФ белков в этих условиях позволило выбрать время действия экзогенных соединений. Доказательством того, что мишенями действия экзогенных редокс-агентов являются SH-группы детектируемых нами с помощью антител PY20 фосфотирозиновых внутриклеточных белков, служат эксперименты с алкилирующим SH-группы белков агентом – йодуксусной кислотой.

Показана сигнальная функция 1 мкМ H_2O_2 , выражающаяся в неоднозначном изменении УТФ ПП корней гороха и в повышении митотического индекса за счет более активного вступления клеток в митоз (в профазе); тогда как токсическая концентрация 10 мМ H_2O_2 вызывала значительное повышение УТФ ПП, увеличение митотического индекса за счет увеличения длительности клеточного цикла и появление хромосомных aberrаций.

Итак, результаты проведенных нами экспериментов указывают на редокс-зависимость тирозинового фосфорилирования значительного числа белков корней гороха. Выявленное методом 2D-электрофореза и иммуноблоттинга число фосфотирозиновых белков корней гороха составляет более половины числа (94), обнаруженного в клетках *Arabidopsis th. N.* Sugiyama et al. (2008) с использованием новых техник протеомики. Принимая во внимание доказанную высокую

специфичность использованных нами антител к фосфотирозиновым белкам растений, мы можем сделать вывод, что редокс-агенты влияют именно на уровень **тирозинового** фосфорилирования белков растений через изменение активности в значительной степени ПТФ. Неоднозначный характер этих изменений указывает на множественность ПТФ в клетках растений (Luan, 2002), у которых может различаться pK_a , а также на регуляцию ферментов, осуществляющих тирозинное фосфорилирование/дефосфорилирование белков, через редокс-чувствительные белки других сигнальных каскадов в клетке, например, Ca^{2+} -зависимой сигнальной системы.

Мы не исключаем влияния редокс-регуляции белков-субстратов ПТК и ПТФ на их уровень тирозинового фосфорилирования.

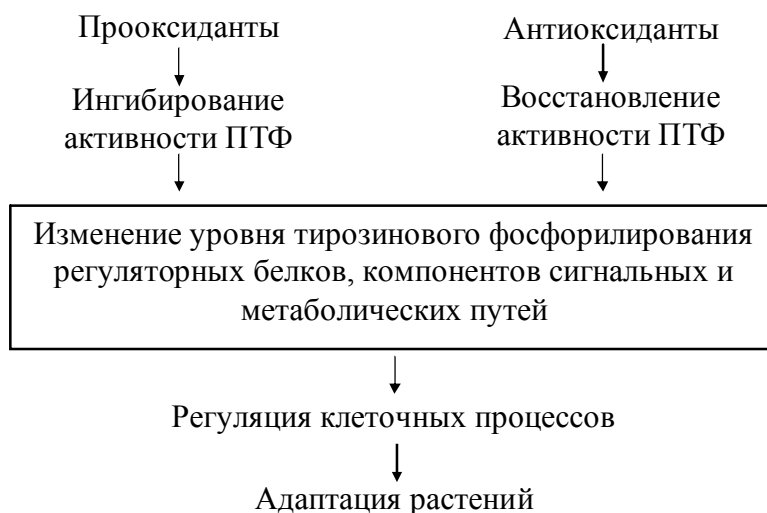


Рис. 11. Схема влияния редокс-агентов на тирозинное фосфорилирование белков растений через регуляцию сигнальных систем клеток.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано редокс-зависимое тирозинное фосфорилирование белков растений в экспериментах *in vivo* и *in situ*.

2. Идентифицирован методом MALDI-TOF MS (MS/MS) 21 редокс-регулируемый фосфотирозинный белок. В их число входили белки сигнальных систем, регуляторные, защитные белки и компоненты метаболических путей. Определено количество потенциальных сайтов (1-9) тирозинового фосфорилирования в идентифицированных редокс-регулируемых фосфотирозинных белках.

3. Подтверждена сигнальная функция H_2O_2 в физиологической концентрации 1 мкМ в редокс-регулируемом изменении уровня тирозинового фосфорилирования белков корней гороха, а также в пролиферативной активности клеток корней гороха, вызывая более активное вступление клеток в митоз. Установлено, что высокая

концентрация H_2O_2 (10 мМ) вызывала хромосомные aberrации и увеличение длительности клеточного цикла.

4. Впервые показано значительное (в 17 раз) увеличение уровня тирозинового фосфорилирования белков в клетках *D. maritima* Theod. при добавлении специфического ингибитора протеинтирозинфосфатаз ванадата. Это доказывает значительный вклад протеинтирозинфосфатаз в уровень тирозинового фосфорилирования белков растений.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Петрова, Н.В.** H_2O_2 и салициловая кислота индуцируют тирозинное фосфорилирование белков в растениях. / Н.В. Петрова, О.Ю. Захарова, Ф.Г. Каримова // Тез. докл. / Объед. научно-тех. изд-во ПНЦ РАН. – Пушкино, 2004. – С. 25.

2. **Petrova, N.** Plant protein tyrosine phosphorylation induced by H_2O_2 and salicylic acid / N. Petrova, O. Zakharova, F. Karimova // The 14th Federation of European Societies of Plant Biology: Abstracts. – Cracow. 2004. – P. 135.

3. **Петрова, Н.В.** Влияние H_2O_2 на тирозинное фосфорилирование белков растений / Н.В. Петрова, Ф.Г. Каримова // Сб. мат-в / Объед. научно-тех. изд-во ПНЦ РАН. – Пушкино, 2005. – С. 375-377.

4. **Петрова, Н.В.** H_2O_2 -индуцированное тирозинное фосфорилирование изоформ полипептидов корней гороха / Н.В. Петрова, Ф.Г. Каримова, И.А. Тарчевский // Тез. докл. / Объед. научно-тех. изд-во ПНЦ РАН. – Пушкино, 2005. – С. 89.

5. **Petrova, N.** Plant protein tyrosine phosphorylation is regulated by cell redox-state / N. Petrova, F. Karimova, // XV Congress of Federation of European Societies of Plant Biology: Abstracts. – Lyon. 2006. – P. 172.

6. Каримова, Ф.Г. Влияние H_2O_2 на фосфорилирование по тирозину белков гороха / Ф.Г. Каримова, **Н.В. Петрова** // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 3. – С. 365-372.

7. Метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в выявлении тирозинного фосфорилирования белков растений / А.Р. Мухитов, **Н.В. Петрова**, О.В. Власова, Ф.Г. Каримова // Ученые записки Казанского государственного университета, сер. Естественные науки. – 2008. – Т. 150, кн.2. – С. 141-153.

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю д.б.н., проф. Ф. Г. Каримовой за всестороннюю помощь в ходе выполнения и написания работы, акад. И.А. Тарчевскому за советы при обсуждении работы, к.б.н., н. с. лаборатории микроскопии КИББ КазНЦ РАН А.Р. Мухитову за помощь в проведении микроскопических исследований и обсуждении полученных результатов, И.Ю. Торопыгину за проведение идентификации белков с помощью метода MALDI-TOF MS, а также сотрудникам лаборатории сигнальных систем КИББ КазНЦ РАН за постоянную поддержку.