

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

Данченко Максим Миколайович



УДК 577.218

**ЗМІНИ ПРОТЕОМУ НАСІННЯ В УМОВАХ
ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ ЗОНИ ВІДЧУЖЕННЯ**

03.00.01 – радіобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

Дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії
Національної академії наук України

Науковий керівник – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Рашидов Намік Мамед огли
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
завідувач лабораторії біофізики сигнальних систем

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
Дружина Микола Олександрович
Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології імені Р.Є. Кавецького
старший науковий співробітник

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Сорочинський Борис Володимирович
Інститут харчових біотехнологій та геноміки
завідувач лабораторії проблем біобезпеки

Захист відбудеться 6 липня 2017 о 11:00 на засіданні спеціалізованої вченої ради
К 26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної
академії наук України за адресою: вул. Академіка Заболотного 148, м. Київ 03143.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту клітинної біології та
генетичної інженерії Національної академії наук України за адресою:
вул. Академіка Заболотного 148, м. Київ 03143.

Автореферат розіслано __ травня 2017

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



К.В. Листван

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми. Використання атомної енергії навіть на сучасному технологічному рівні пов'язане з ризиком радіаційних аварій. Наймасштабніший в історії інцидент відбувся на території України, наслідком чого стало радіонуклідне забруднення значних територій. Також нещодавно екологічна радіаційна катастрофа трапилась у Японії, нагадавши світу про небезпеку використання атомних електростанцій (Mimura et al., 2014). Незважаючи на те, що з часу аварії на чорнобильському реакторі минув 31 рік, у довкіллі залишаються радіоактивні ізотопи, головним чином ^{137}Cs і ^{90}Sr (Møller and Mousseau, 2006). Таким чином, екосистеми зони відчуження продовжують зазнавати хронічного опромінення. У численних експериментах було виявлено різні феномени-ефекти дії радіації: зниження фертильності та продуктивності, мінливі радіоморфози, зростання частоти хромосомних аберацій, гіперметильовання ДНК, синтез стресових білків та навіть популяційні зміни (Møller and Mousseau, 2015; Vornam et al., 2012). Врешті між експертами виник консенсус, що адаптація рослин до хронічного впливу радіонуклідів є складним процесом, який включає індуковані генетичні мутації, ендогенні епігенетичні зміни і регуляцію експресії генів.

Відомо, що ефекти гострого опромінення пропорційно залежать від дози та у першу чергу опосередковані вільними радикалами. Пошкодження ДНК у ядрі є основною ініціюючою подією, що викликає ураження органів і тканин організму. З іншого боку, при малих дозах часто спостерігається нелінійність ураження. Досі відсутній консенсус, щодо деталей дії хронічного опромінення на біохімічному рівні у живих клітинах (Hayashi et al., 2014; Kovalchuk et al., 2004). Вивчення онтогенезу культурних рослин у забруднених радіонуклідами ґрунтах чорнобильської зони відчуження може дозволити прояснити перспективи використання земель у господарській практиці для нехарчових цілей (Wang et al., 2012). Радіочутлива соя широко використовується у сільському господарстві через високу пропорцію вмісту білків у насінні, а традиційний для України радіостійкий льон йде на виробництво натуральних волокон або цінної олії (Hajdich et al., 2005; Klubíková et al., 2011).

Історично у радіобіології широко використовувались класичні біологічні методи, наприклад спостереження за циклами розвитку, фіксування морфологічних змін і цитогенетичне дослідження мутацій (Shevtsova and Gudkov, 2013). Протягом останніх років відбувався вибуховий розвиток системної біології, яка дозволяє провести об'єктивний аналіз феномену стрес-реакції живих систем, без чіткої попередньої гіпотези. Ця нова дисципліна намагається впорядкувати функціональний каталог ключових біополімерів клітини, інтегруючи дані "омік". Найкориснішим інструментом є пошукова протеоміка, що проводить одночасний моніторинг змін сотень білків, які беруть участь у різноманітних біохімічних шляхах метаболізму клітин. Для глибокого аналітичного розділення протеому використовується двовимірний гель електрофорез (2-DE) інтактних білків або ультрависокоєфективна рідинна хроматографія (УВЕРХ) пептидів, поєднана з мас-спектрометрією (Rabilloud and Lelong, 2011; Zhang et al., 2010). Результатом порівняльного дослідження є список білків, вміст яких зазнав змін за експериментальних умов. Об'єктивний біоінформатичний аналіз цих даних дозволяє створювати корисні гіпотези-моделі для пояснення досліджуваних явищ (Laukens et

al., 2015). У літературі є чимало прикладів успішного використання протеоміки для пояснення роботи сигнальних шляхів, фізіології насіння, а також радіаційного стресу (Azimzadeh et al., 2014; Miernyk et al., 2011).

Зв'язок роботи з науковими програмами та проектами. Дисертаційне дослідження реалізовувалось у рамках наступних проектів: 1) фундаментальна тема відділу радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії 0113U000228 "Роль епігеномних механізмів у адаптогенезі рослин"; 2) персональний грант Національної академії наук України для молодих учених 0111U007141 "Дистанційний моніторинг та молекулярно-генетична оцінка адаптації рослин в умовах чорнобильської зони відчуження"; 3) міжнародний партнерський проект Словацької агенції підтримки досліджень і розвитку APVV-0740-11 "Розуміння адаптації рослин у радіоактивно забрудненій чорнобильській зоні".

Мета і завдання дослідження. Мета дослідження: системно оцінити онтогенез рослин у забрудненому середовищі зони відчуження шляхом аналізу протеому насіння.

Завдання дослідження:

- ✓ визначити накопичену дозу протягом вегетаційного сезону, а також оцінити загальний фізіологічний стан насіння хронічно опромінених рослин;
- ✓ провести аналіз протеому зрілого насіння сої та льону, вирощеного за дії радіонуклідного забруднення, використавши 2-ВЕ;
- ✓ комплексно дослідити функціональні зміни протеому рослин, обумовлені їх зростанням на забруднених радіонуклідами ґрунтах;
- ✓ інтегрувати отриману інформацію молекулярно-біологічних змін у теоретичні схеми відповіді сої та льону, виявивши потенційно критичні для виживання в умовах хронічного опромінення білки;
- ✓ охарактеризувати динаміку білків протягом різних фаз розвитку насіння другого покоління в умовах чорнобильської зони відчуження;
- ✓ створити підсумкову модель змін протеому за впливу радіонуклідного забруднення, окресливши універсальні та унікальні реакції.

Об'єкт дослідження – відповідь сої (*Glycine max*) і льону (*Linum usitatissimum*) на радіонуклідне забруднення чорнобильської зони.

Предмет дослідження – зміни протеому насіння, що відображають молекулярну фізіологію, внаслідок хронічного опромінення протягом двох ростових сезонів.

Методи дослідження. Вирощування рослин у забрудненому радіонуклідами середовищі чорнобильської зони відчуження. Морфометрія та фізіологічні аналізи насіння, а також вимірювання специфічної активності дозоформуєчих радіонуклідів у ґрунті та тканинах рослин. Аналіз протеому: а) виділення білків; б) якісне розділення, використовуючи 2-ВЕ; в) кількісне фарбування гелів колоїдним кумасі та аналіз за допомогою програми "ImageMaster"; г) ензиматичне розщеплення білків; д) УВЕРХ на колонках зворотної фази, поєднана з тандемною мас-спектрометрією; е) ідентифікація білків шляхом пошуку співпадінь у базах даних. Функціональна анотація та встановлення субклітинної локалізації ідентифікованих білків за допомогою біоінформатичних алгоритмів. Статистична обробка даних.

Наукова новизна. У дисертації вперше використано кількісну пошукову протеоміку, щоб показати участь білкових складових у реакції на забруднення

середовища радіонуклідами. Високоєфективний аналіз протеому насіння дав можливість пояснити можливі механізми, за допомогою яких соя і льон здатні витримати хронічне опромінення. Робота є першим комплексним дослідженням білків рослин, вирощених у забрудненій радіонуклідами зоні Чорнобильської атомної електростанції (ЧАЕС). Розроблено модель онтогенетичної реакції сої і льону на хронічний вплив малих доз іонізуючої радіації. Новітній аналіз фізіологічних змін рослин у чорнобильському середовищі показав, що характерним для сої було коригування балансу запасних білків, опосередковане транспортерами, а унікальним для льону – модифікований сигналінг із впливом на алармони та зворотне фосфорилування. Універсальні реакції включали перенаправлення первинного метаболізму (завдяки мультифункціональним ензимам гліколізу) на синтез гліцин бетаїну, фітохелатинів і дегідринів, а також підвищену активність експресії генів із наслідками на синтез і пакування білків. Результати, отримані у ході виконання дисертаційної праці, оцінено премією Національної академії наук України для молодих учених і грамотою Словацької академії наук за міжнародну співпрацю.

Практичне значення одержаних результатів. Реалізований проект важливий для розробки майбутньої стратегії відновлення сільського господарства на забруднених радіонуклідами територіях для непродуктивних цілей, наприклад виробництва біопалива. В перспективі результати допоможуть розробити ефективну стратегію рослинництва в умовах зростаючого техногенного навантаження на довкілля. Дані, отримані в ході експериментів, депоновані в інтерактивну базу даних доступну за адресою <http://www.chernobylproteomics.sav.sk>. Цей портал використовується для забезпечення доступу до наших результатів широкому колу користувачів, включаючи наукову спільноту.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем виконано більшу частину експериментів, починаючи від вирощування рослин у зоні відчуження і закінчуючи новітніми аналізами протеому досліджених рослин. Самостійно проаналізовано отримані результати, сформульовано основні висновки та написано значну частину тексту публікацій. Спільно з науковим керівником розроблено загальний напрямок досліджень і структуру дисертації. Для виконання окремих завдань дисертаційної праці, що вимагали використання унікального обладнання, здобувач пройшов стажування на базі Інституту генетики і біотехнології рослин Словацької академії наук за підтримки конкурсної урядової стипендії. Матеріально-технічну і консультаційну підтримку проекту здійснював керівник партнерської лабораторії доктор біологічних наук Мартін Хайдух.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення дисертації оприлюднено на 16-му конгресі Федерації європейських товариств біології рослин (Тампере, 2008) – опубліковано у *Physiologia Plantarum*, конференції FA0306 Організації науково-технічного співробітництва (Кордоба, 2008), 5-му і 6-му конгресах Українського радіобіологічного товариства (Ужгород, 2009 і Славутич, 2011) – 2 грамоти за найкращу доповідь серед молодих дослідників, конференції Федерації європейських біохімічних товариств "Адаптаційний потенціал рослин" (Відень, 2009), 10-му молодіжному форумі проведеному спільно з 35-им конгресом Федерації європейських біохімічних товариств (Гетеборг, 2010) – опубліковано у *FEBS Journal*, молодіжній конференції "Актуальні проблеми біохімії та біотехнології" (Київ, 2010)

– опубліковано в Українському біохімічному журналі, 3-ій конференції Чеського товариства мас-спектрометрії (Градец Кралове, 2013), 1-му і 2-му світовому конгресах Міжнародної організації протеоміки рослин (Гамбург, 2014 і Братислава, 2016).

Публікації. Результати представлені у дисертаційній праці опубліковано у 18 наукових працях, з яких: 5 статей у рецензованих міжнародних часописах, 1 розділ у книзі, 2 статті у матеріалах конференцій та тези 10 доповідей на конференціях.

Структура та обсяг. Кваліфікаційна праця складається з анотації, змісту, переліку скорочень, вступу й основних розділів (огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, а також узагальнення), додатково містить висновки, список літератури й один додаток. Обсяг включає 155 сторінок тексту, 22 ілюстрації, 5 таблиць та 188 літературних джерел.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У першому розділі дисертації розглянуто масштаби і наслідки найбільших антропогенних аварій на ядерних реакторах. Охарактеризовано механізми поглинання дозоформуєчих радіонуклідів зони відчуження ЧАЕС та особливості їх накопичення рослинами різних таксономічних категорій. Описано ґрунтові фактори, які визначають фітомобільність ^{137}Cs і ^{90}Sr , а також ризики їх потрапляння у харчовий раціон людини. Вказано можливі контрзаходи зниження вмісту радіонуклідів у господарських продуктах. Визначено поняття радіаційного стресу та систематизовано попередні експерименти по вивченню адаптації. Описано гіпотетичну роль сигнальних каскадів у адаптивній реакції. Наголошено важливість вивчення впливу низьких доз у сучасній радіобіології. Розглянуто молекулярно-біологічні механізми відповіді рослин на умови радіаційного стресу, який часто опосередкований реактивними формами кисню (РФК). Узагальнено радіобіологічні ефекти на різних рівнях організації живого: а) біохімічний – аномалії метаболічних процесів за рахунок гліколітичних ензимів, б) онтогенетичний – раннє цвітіння і зниження фертильності, в) екосистемний – зниження біорізноманіття. Охарактеризовано об'єкти дослідження сою і льон. Визначено поняття системної біології, її основних методів та переваг використання для глибокого дослідження радіобіологічних явищ. Наголошено важливість пошукової протеоміки як ефективного інструменту вивчення радіаційного стресу. Перераховано ключові кроки альтернативних протоколів аналізу протеому для розуміння молекулярної фізіології, включаючи відповідь рослин на стрес.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Рослинний матеріал і умови вирощування. Сою (*Glycine max*, сорт "Сонячна") і льон (*Linum usitatissimum*, сорт "Київський") вирощували на експериментальних ділянках. Контрольні рослини вирощувались на чистій практично вільній від радіонуклідів ділянці, котру було закладено приблизно в 70 км від ЧАЕС (N51°16'572" E30°13'160"). Радіоактивно забруднена ділянка була вибрана в 10-ти км зоні відчуження (N51°22'379" E30°01'384"). Ґрунт на обох ділянках є дерново-

підзолистим, має суглинково-піскову текстуру, містить 2,5% органічної речовини та має слабо-кислу реакцію рН 5,5. Вміст основних елементів живлення істотно не відрізнявся.

Морфометричні аналізи сої та льону. Спочатку виміряли розміри і масу зібраного насіння. Схожість оцінювали інкубуванням насіння при 25 °С у темряві на чашках Петрі з мокрим фільтрувальним папером, динаміку набухання – за довжиною протягом 6 год. Вміст білка міряли стандартним методом (Bradford, 1976), а кількість олії визначали як описано в літературі (Akbar et al., 2009).

Вимірювання активності дозоформуєчих радіонуклідів. У зрілому насінні рослин, а також у зразках ґрунту, визначали активність двох антропогенних радіонуклідів, що зазнають β -розпаду з періодом напіврозпаду близько 30 років – ^{137}Cs і ^{90}Sr . Питома активність ^{137}Cs у ґрунті була встановлена з використанням низькорівневої сцинтиляційної γ -спектрометрії на приладі СЕГ-001 (Атом Комплекс Прилад). Специфічну активність ^{90}Sr міряли методом β -радіометрії на низькофоновому приладі UMF-1500M (Ortec) як описано у літературі (Berlizov et al., 2005). Для характеристики переходу радіонуклідів ^{137}Cs та ^{90}Sr з ґрунту в тканини рослин розраховували коефіцієнти накопичення. Еквівалентну дозу хронічного опромінення обчислювали за константами рівноважної дози.

Аналіз протеому насіння сої та льону. Для виділення білків наважку зрілого насіння 500 мг розтирали до стану дрібного порошку у простерилізованій фарфоровій ступці з рідким азотом. Білки екстрагували за допомогою буферу з фенолом, на основі протоколу описаному в літературі (Isaacson et al., 2006). Ізольовані білки висушували вакуумним центрифугуванням в апараті SpeedVac (Bachofer) і розчиняли в 0,5 мл буфера для ізоелектричного фокусування (ІЕФ), що містив 8 М сечовину, 2 М тіосечовину, 2% CHAPS, 2% Triton X-100, 50 мМ ДТТ і 2% амфолітів. Розділення білків проводили використовуючи їх ортогональні властивості, а саме ізоелектричні точки (pI) та молекулярні маси (Mr). Спочатку, в першому вимірі провели ІЕФ, використавши стрічки з іммобілізованим градієнтом рН. Об'єм зразка, що містив 700 μg білка, нанесли на стрічки. Пристрій Protean IEF Cell (Bio-Rad) програмували для покрокового протоколу фокусування 70000 В·год із обмеженою силою струму 50 μA на лінію при максимальній напрузі 8000 В. Після врівноваження стрічки розмістили на поверхні 12% поліакриламідного геля з ДСН. Другий вимір – поліакриламід гель електрофорез, проводили з використанням камери Protean II XI Cell (Bio-Rad) при силі струму 10 мА.

Гелі протягом ночі фарбували в колоїдному кумасі (20% етанолу, 1,6% фосфорної кислоти, 8% сульфату амонію і 0,08% кумасі діамантовий синій G-250). Двовимірні гелі були оцифровані з використанням денситометру Umax UTA-1100 (GE Healthcare) при графічній роздільній здатності 300 точок на дюйм і 14-бітній глибині відтінків сірих пікселів. Цифрові зображення аналізували комплексним програмним пакетом ImageMaster 2D Platinum версія 4.9 (GE Healthcare), який включає оптимізовані алгоритми для виявлення плям, кількісного обрахунку і співставлення плям. До уваги брали лише 2-ВЕ плями, виявлені принаймні в двох біологічних повторях. Для встановлення достовірних відмінностей використали інтегрований t-тест для двох зразків, лише плями з $p \leq 0,05$ вирізали з гелю для

подальшої ідентифікації. Ензиматичне розщеплення білків за допомогою трипсину проводили згідно стандартного протоколу (Shevchenko et al., 2007).

Для ідентифікації білків висушені пептиди розчиняли у 20 μl 2% ацетонітрилу та 0,1% мурашиної кислоти і розділяли шляхом УВЕРХ на автоматичній модульній установці nanoAcquity (Waters). Швидке градієнтне елюювання здійснювали на аналітичній колонці зворотної фази ВЕН 130 С18 (Waters) при швидкості потоку 350 $\text{nl}\cdot\text{хв}^{-1}$. Градієнт утворювався лінійним зростанням концентрації ацетонітрилу від 7% до 40% у водному розчині 0,1% мурашиної кислоти протягом 15 хв. Аналітична колонка була з'єднана з іонізатором високої напруги типу електроспрей модифікації для нанопотоку тандемного мас-спектрометра Micromass Premier з гібридним аналізатором типу квадрупол часу прольоту (Q-TOF, Waters). Для запису мас-спектрів було використано мультиплексний метод – паралельні почергові сканування при низькій енергії 3 еВ в камері зіткнення, щоб отримати інформацію про іони-попередники; та при високій енергії 20-35 еВ, для отримання повних точних мас фрагментів (Plumb et al., 2006). Збирали інформацію про іони 300-1900 $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$.

Отримані дані були оброблені біоінформатичним пакетом ProteinLynx Global Server версія 2.4 (Waters). Використали наступні критичні порогові значення для фільтрування шуму: низька енергія 200 імпульсів, висока енергія 100 імпульсів, сумарний сигнал піку 1000 імпульсів. Первинне спряження попередників і можливих іонів-фрагментів здійснювали за допомогою співставлення хроматографічного часу вимивання. Отримані мас-спектри використовували для пошуку з наступними критеріями: фіксована модифікація карбамідометилування цистеїну, змінна модифікація окислення метіоніну, фрагменти від розщеплення трипсином з одним пропущеним сайтом, похибка вимірювання мас 50 часток на мільйон проти баз отриманих з UniProt <http://www.uniprot.org> (соя 15416 видоспецифічних послідовностей, льон 586858 послідовностей вищих рослин). Інтегрований аналіз функціональних категорій здійснили за допомогою біоінформатичного серверу ProteinCenter (Thermo Scientific).

Статистична обробка даних. Статистична обробка даних, окрім випадків описаних окремо, проводилась у програмі Excel пакету Microsoft Office 2010.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Накопичення радіонуклідів і морфометричні параметри насіння досліджених рослин. Обидві дослідні ділянки були закладені в одному регіоні поблизу ЧАЕС, для забезпечення подібних ґрунтових і кліматичних умов росту. Активність ^{137}Cs в ґрунті забрудненої ділянки була майже у 15 разів більшою, ніж контрольної, а активність ^{90}Sr відрізнялась приблизно у 9 разів. Для обох досліджених видів і обох дозоформуєчих радіонуклідів коефіцієнти накопичення радіоактивності були значно вищими в умовах зони відчуження. Врешті варто зазначити, що соя в усіх випадках мала вищий вміст радіонуклідів порівняно з льоном (табл. 1). Це суперечить літературним даним про поглинання ^{137}Cs зі забруднених внаслідок чорнобильської катастрофи ґрунтів, де дослідники зробили висновок про захисну дію азотфіксуючих симбіонтів бобових (Douka and Xenoulis, 1991). Отже, ключові дані дисертації – зміни протеому отримані на вивчених рослинах

взаємодоповнюватимуться, в тому числі завдяки різниці в накопиченні радіонуклідів зрілим насінням.

Таблиця 1.

Вміст дозоформуєчих радіонуклідів у ґрунті та насінні рослин, коефіцієнт накопичення (КН) й еквівалентна доза.

нуклід	ґрунт, кБк·кг ⁻¹	льон, кБк·кг ⁻¹	КН льон	доза льон, сЗв	насіння сої, кБк·кг ⁻¹	КН соя	доза соя, сЗв
контрольна ділянка							
¹³⁷ Cs	1,410±0,071	0,01±0,01	0,01	0,4	0,01±0,01	0,01	0,4
⁹⁰ Sr	0,550±0,055	0,08±0,02	0,15		0,09±0,02	0,16	
забруднена ділянка							
¹³⁷ Cs	20,650±1,050	0,78±0,04	0,04	11,4	2,13±0,21	0,10	13,2
⁹⁰ Sr	5,180±0,550	3,55±0,36	0,69		11,84±1,80	2,29	

Поглинання радіонуклідів значно варіює залежно від тканини/органу рослини, а також залежно від виду (Kozhakhpanov et al., 2014). Дослідники раніше довели, що цей показник залежить від фази розвитку насіння, кислотності ґрунту, присутності мікроорганізмів та концентрації мінералів (Choi et al., 2004; Pareniuk et al., 2015). Для соняшнику методом авторадіографії було показано, що багато ⁹⁰Sr накопичується в листках, провідних пучках і головному корені, а ¹³⁷Cs переважно акумулюється в молодих листках, прожилках і вузлових сегментах (Soudek et al., 2006). Ці результати свідчать, що рослини мають механізм захисту майбутнього потомства шляхом обмеження транспорту радіонуклідів у насіння.

Ми обчислили еквівалентну дозу хронічного опромінення, яка вплинула на рослини з дослідних ділянок протягом повного вегетаційного сезону: а) забруднена ділянка мала радіаційний фон 4 мР·год⁻¹, льон протягом 111 днів росту отримав 11,4 сЗв поглинутої дози, а соя за 130 днів – 13,2 сЗв; б) контрольна ділянка мала радіаційний фон 25 мкР·год⁻¹, поглинута доза для експериментальних рослин не перевищила 0,4 сЗв.

Насіння сої зі забрудненої ділянки є меншим за розмірами, що можна було помітити навіть візуально, оскільки маса окремої насінини відрізнялась майже вдвічі. Динаміка набухання насіння є сповільнена порівняно з контролем (рис. 1А). У літературі також було показано, що хронічне опромінення істотно впливає на набухання насіння арабідопсису (Da Costa-Nunes et al., 2006). Ми не виявили помітних відмінностей у зовнішньому вигляді чи сирій вазі насіння льону, вирощеного на забруднених радіонуклідами ділянках зони відчуження ЧАЕС. Тим не менше, відсоток проростання був трохи нижчим (рис. 1В). Підсумовуючи, фенотипові реакції досліджених рослин істотно відрізнялись, безумовно відображаючи їх різну радіочутливість (Danchenko et al., 2008b, 2008a).

Пошукова протеоміка на основі двовимірного гель електрофорезу. За допомогою 2-ВЕ ми отримали білкові карти-гелі з високою аналітичною роздільною здатністю (рис. 2). Для порівняння відносних об'ємів плям з усіх гелів, було використано корекційний коефіцієнт. Важливою перевагою використання 2-ВЕ у пошуковій протеоміці є можливість візуалізації різних білкових ізоформ та посттрансляційних модифікацій (ПТМ), котрі часто мають функціональне значення (Škultéty et al., 2009).

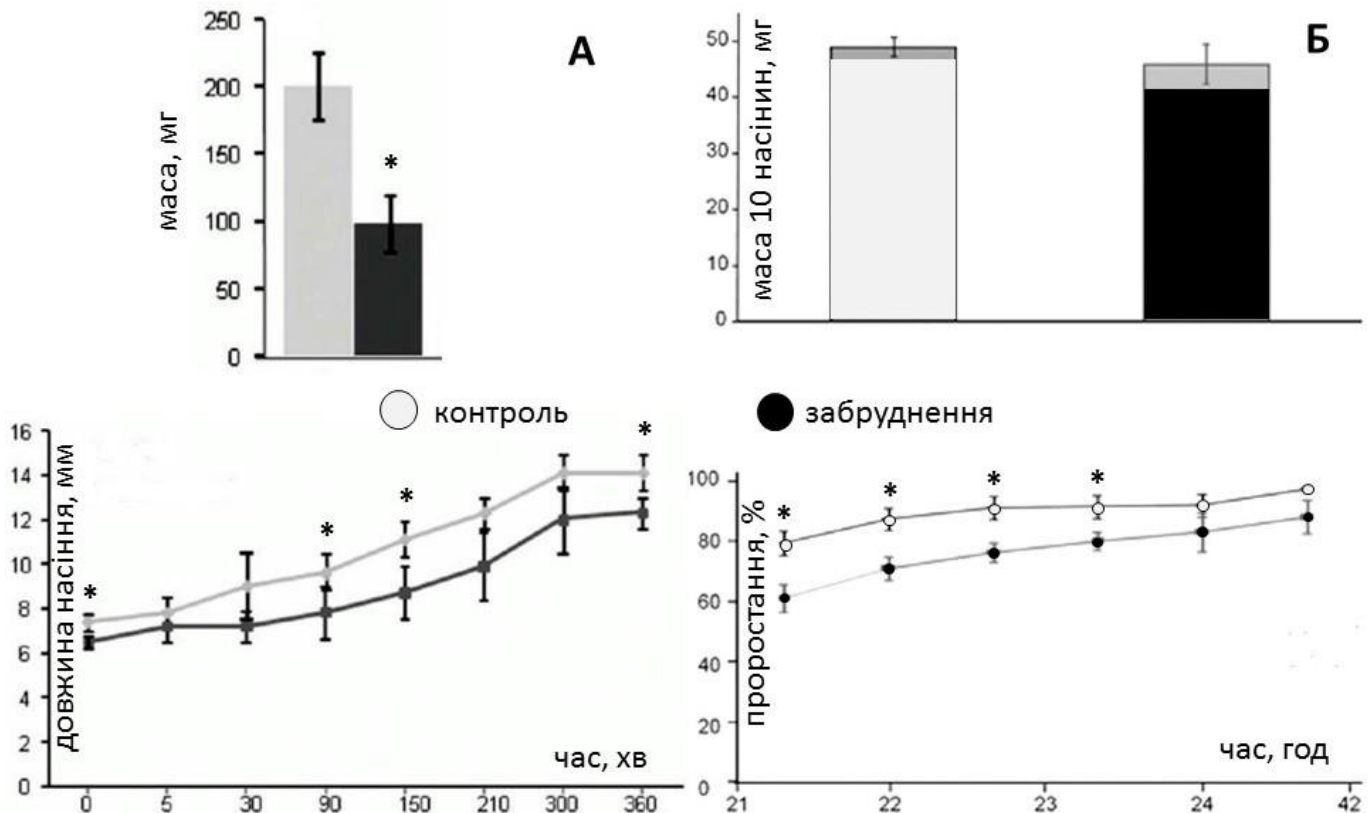


Рис. 1. Морфометрія зрілого насіння першого покоління сої (А) та льону (Б).

* – різниця достовірна при $p \leq 0,05$.

У випадку сої ми чітко розділили 698 білкових плям зрілого насіння, з них 9,2% мали різний відносний об'єм (%V), який відображає кількість конкретного білка, при статистичній достовірності різниці $p \leq 0,05$. Ці дані узгоджуються з попередніми дослідженнями, щодо впливу низької активності радіоцезію на коріння *Arabidopsis thaliana* (Sahr et al., 2005). Нам вдалося встановити природу 26 послідовностей. Із 720 розділених 2-ВЕ плям льону, відносний об'єм 4,9% достовірно відрізнявся у контрольних зразках, порівняно з матеріалом зібраним на ділянці забрудненій антропогенними радіонуклідами. Пропорція білків, вміст яких змінився в насінні льону, вирощеному на ділянках зони відчуження ЧАЕС, є майже вдвічі нижчою від результатів дослідження сої. Вивчивши протеом ссавців при експериментальному опроміненні, дослідники виявили лише кілька змінених білків (Park et al., 2006). Ми однозначно ідентифікували 28 білків. В багатьох випадках теоретичні й експериментальні Mr та pI відрізняються, через ідентифікацію гомологічних білків, присутніх в електронних базах даних, які належать іншим видам рослин (Klubíková et al., 2011).

Усі білки сої та льону, вміст яких змінився у зрілому насінні як результат вирощування у забруднених радіонуклідами ґрунтах протягом одного покоління, було розділено на 11 функціональних категорій, використовуючи модифіковану схему (Bevan et al., 1998). Із них дві (запасні білки та ріст клітин) характерні для першого об'єкту, а чотири (синтез білків, транскрипція, вторинний метаболізм та некласифіковані) – для другого. З точки зору субклітинної локалізації, зміни білків вакуолі, плазмалеми і пероксисом були унікальними для сої, а протеасом, хлоропластів, мітохондрій, клітинної стінки та невстановленої локалізації – для льону.

Зміни протеому насіння сої першого покоління внаслідок розвитку в умовах хронічного опромінення. Майже половина ідентифікованих плям сої належала групі запасних білків насіння (ЗБН), першочерговою функцією яких є постачання азоту при проростанні. Дві з трьох ідентифікованих ізоформ гліциніну G2 (GY2, P04405) були виявлені у більшій кількості, в той час як одна – у меншій кількості в насінні зі забруднених ділянок (табл. 2). Іншими представниками основних запасних білків стали дві плями гліциніну G1 (GY1, P04776), однієї з яких було вдвічі більше, а другої – в 5,5 разів менше в насінні з чорнобильської зони. Розміщення на гелі усіх ідентифікованих плям G1/G2 гліцинінів вказувало на часткову фрагментацію поліпептидних ланцюгів. У літературі вже було описано подібний феномен (Gábrišová et al., 2016). Три β -субодиниці β -конгліциніну (дві ізоформи Q50JD8 та одна O22121) накопичувались у насінні зі забруднених ділянок. У випадку α -субодиниці β -конгліциніну (O22120), дві 2-ВЕ плями були виявлені у більшій кількості і одна меншій у насінні зі забрудненої ділянки, також під впливом радіонуклідів зріс вміст α' -субодиниці β -конгліциніну (Q948Y0). Теоретичні Mr субодиниць конгліцинінів були близькі експериментально встановленим. Тобто вплив радіонуклідного забруднення не викликав фрагментацію конгліцинінів.

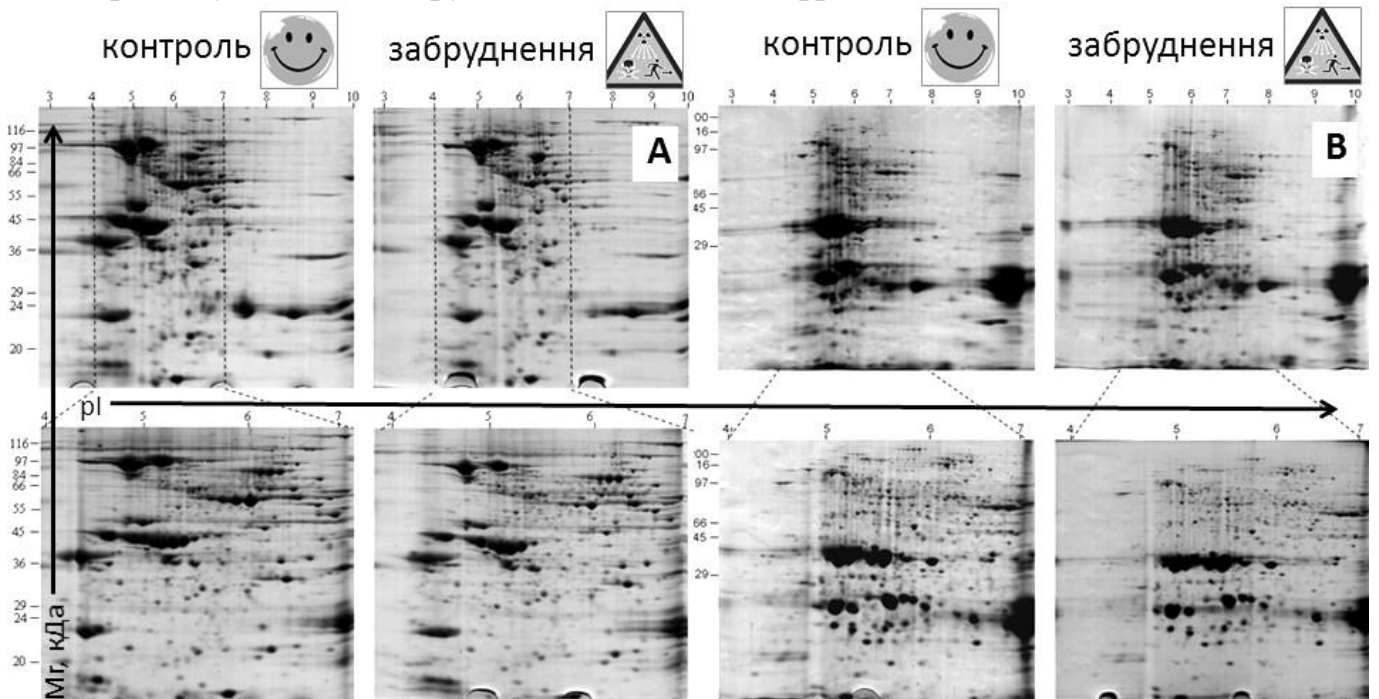


Рис. 2. Репрезентативні гелі-мапи білків сої (А) і льону (В) з матеріалу першого покоління.

На основі ідентифікації білків, вміст яких змінився, ми запропонували робочу схему відповіді сої на умови радіонуклідного забруднення (рис. 3). Домінуючу відповідь на хронічне опромінення показали ЗБН. Цікаво, що раніше дослідники припустили додаткові функції ЗБН, окрім власне резервної. Вони є факультативними для проростання, відповідно розвитку нової генерації рослин та відіграють істотну роль у захисті від шкідників (Sales et al., 2000). Більше того, дослідження показали зростання вмісту α -субодиниці β -конгліциніну при відповіді на засолення (Aghaei et al., 2009). Комплексна неоднозначна поведінка ЗБН в забруднених умовах

чорнобильської зони, додає аргументів для підтримки гіпотези про їх додаткові функції, окрім забезпечення метаболічних резервів.

Функціональний клас транспортерів був представлений цукрозо-зв'язуючим білком 2 (SBP2, Q84V19) і цукрозо-зв'язуючим білком (SPB, Q04672). Обидва білки були у меншій кількості в насінні сої, вирощеному на забруднених радіонуклідами ґрунтах. Перший бере участь у накопиченні запасних резервів, а другий локалізується в плазмалемі клітин, які активно транспортують глюкозу, включаючи сім'ядолі. Профіль експресії гену цукрозо-зв'язуючого білка тісно корелює зі швидкістю транспорту цукрози. Стосовно білків, пов'язаних із первинним метаболізмом, гліцеральдегід-3-Р дегідрогеназа (GAPDH, Q2I0H4) була знайдена у майже 5 разів меншій кількості в насінні зі забрудненої ділянки. Цей фермент гліколізу/глюконеогенезу може мати додаткові функції в стресових реакціях. Припускається, що GAPDH є метаболічним реле перенаправлення потоку вуглеводів на синтез додаткових відновних еквівалентів для швидкої та ефективної нейтралізації окисного стресу (Grant, 2008). Для малат дегідрогенази (MDH, Q6RIB6) виявлено 40% накопичення в насінні зі забрудненої зони.

Таблиця 2.

Список ідентифікованих білків насіння сої.

назва білка, скорочення або ген; ідентифікаційний номер "UniProt"	% V · 10 ² , забруднення	% V · 10 ² , контроль	субклітинна локалізація
запасні білки			
гліцинін G2, GY2; P04405	783,2±163,7	436,5±110,2	вакуоля
гліцинін G2, GY2; P04405	17,4±1,3	12,5±2,0	вакуоля
гліцинін G2, GY2; P04405	3,5±3,1	10,0±1,3	вакуоля
α-сб. β-конгліциніну; O22120	17,3±8,3	41,8±3,5	вакуоля
α-сб. β-конгліциніну; O22120	11,6±2,5	6,7±0,9	вакуоля
α-сб. β-конгліциніну; O22120	4,1±0,6	2,5±0,6	вакуоля
α'-субодиниця β-конгліциніну; Q948Y0	16,0±0,8	8,5±0,9	вакуоля
β-сб. β-конгліциніну; Q50JD8	31,4±4,9	58,1±0,5	вакуоля
β-сб. β-конгліциніну; Q50JD8	10,1±2,7	39,2±1,9	вакуоля
β-сб. β-конгліциніну; O22121	5,7±0,8	25,4±9,6	вакуоля
гліцинін G1, GY1; P04776	12,1±2,6	5,7±2,2	вакуоля
гліцинін G1, GY1; P04776	9,1±3,1	50,8±5,6	вакуоля
стрес			
дегідрин, LEA8; Q5K3Q9	12,0±1,0	5,2±1,3	ядро
дегідрин, LEA8; Q5K3Q9	4,9±4,3	19,4±3,2	ядро
дегідрин, LEA-D-11; Q70EL8	14,1±2,0	5,1±4,4	ядро
б. дозрівання MAT1 (родина дегідринів); Q42447	2,8±0,4	0,9±0,8	цитоплазма
цистеїн синтаза, CSY; Q8W1A0	3,3±0,4	1,1±1,0	цитоплазма
бетаїн альдегід дегідрогеназа, BADH2; B0M1A5	4,0±0,2	3,6±0,1	пероксисома
ріст клітин			
б. дозрівання рPM32; Q9SPJ6	11,4±1,8	7,1±1,0	цитоплазма
35 кДа б. дозрівання рPM18; Q9ZTY1	29,5±3,9	20,2±2,8	цитоплазма

транспортери

цукрозо-зв'язуючий б., SBP; Q04672	-	14,0±1,7	плазмалема
цукрозо-зв'язуючий б. 2, SBP2; Q84V19	2,5±0,3	3,6±0,1	плазмалема

первинний метаболізм

гліцеральдегід-3-Р дегідрогеназа, GAPDH; Q2I0H4	1,2±2,2	6,0±0,9	цитоплазма
малат дегідрогеназа, MDH; Q6RIB6	10,0±1,4	7,3±0,6	цитоплазма

сигналінг

лінолеат 9S-ліпоксигеназа-3 насіння, LOX1.3; P09186	3,9±0,9	11,2±3,3	цитоплазма
---	---------	----------	------------

пакування білків

кальретикулін 1, CRT1; A0A762	2,4±0,8	4,9±0,2	ER
-------------------------------	---------	---------	----

Скорочення: ендоплазматичний ретикулум (ER).

Вміст більшості білків, задіяних у стрес реакціях, був більшим у зрілому насінні сої, зібраному на ділянці поблизу ЧАЕС (табл. 2). Цистеїн синтаза (CSY, Q8W1A0) накопичувалась за умов хронічного опромінення. Вміст цистеїну в рослинах відіграє важливу роль в адаптації до стресу, викликаного впливом важких металів. Рослини застосовують стратегію синтезу та накопичення збагачених цистеїном коротких пептидів фітохелатинів, які утворюються з глутатіону (Steffens, 1990). Вважається, що CSY лімітує синтез фітохелатинів, її захисну роль в адаптації рослин до важких металів було раніше доведено у трансгенному тютюні з підвищеною експресією гену (Harada et al., 2001; Kawashima et al., 2004). Таким чином, соя вирощена на забруднених ділянках чорнобильської зони, проявляє реакцію подібну до дії важких металів (рис. 3).

Іншими компонентами системи адаптації рослин до стресу, викликаного важкими металами, є дегідрини. Дві плями (LEA8, Q5K3Q9; LEA-D-11, Q70EL8) й одна пляма (LEA8, Q5K3Q9) дегідринів виявились у більшій і меншій кількості у зразках насіння, що зазнало впливу дозоформуєчих радіонуклідів відповідно. Додатково ми ідентифікували одну пляму як білок дозрівання MAT1 (Q42447), який належить родині дегідринів. Цього білка було в 3 рази більше в насінні сої, що зазнало хронічного опромінення. Локалізація дегідринів у ядрі, дозволяє припустити роль у роботі біохімічних комплексів, задіяних у реалізації спадкової інформації (Close, 1997). Роль цієї групи білків у захисті рослин від важких металів, була підтверджена на *Phaseolus vulgaris* (Zhang et al., 2006). Суперечливе накопичення різних ізоформ дегідринів, внаслідок впливу радіонуклідного забруднення, можна пояснити специфічними метаболічними функціями конкретних поліпептидів.

Наші дані показали, що вміст пероксисомальної бетаїн альдегід дегідрогенази (BADH2, B0M1A5) зріс на 30% у насінні зі забрудненої ділянки (табл. 2). Цей ензим каталізує останній крок у синтезі гліцин бетаїну, який продемонстрував захисний ефект проти радіаційних пошкоджень в *in vivo* експериментах на мишах (Mopobe et al., 2005). Отже, цілком ймовірно, що схожа захисна активність гліцин бетаїну проти радіації може проявлятися у насінні сої (рис. 3). Ці міркування інтегровано у схему відповіді сої на хронічний вплив радіонуклідного забруднення (Danchenko et al., 2009b, 2009c, 2009a).

Дія малих доз викликала зміни протеому насіння льону першого покоління. У відповідь на радіаційний стрес, може бути задіяно кілька сигнальних шляхів (Наимовitz-Friedman, 1998; Kim et al., 2012). Серед білків насіння льону, кількість яких змінилась у насінні, вирощеному під впливом хронічного опромінення, є складові декількох сигнальних шляхів (табл. 3). Вміст ліпоксигенази (LOX1, B9IJA0) знижується в протеомі насіння, вирощеного на ґрунтах забруднених радіонуклідами. Білок працює в шляху біосинтезу оксиліпінів – групи біологічно активних антимікробних сполук, які утворюються внаслідок окислення поліненасичених жирних кислот. Це може призвести до зниження стійкості до фітопатогенів. Подібний феномен внаслідок дії хронічного опромінення описано в літературі (Дмитриев та ін., 2011). Паралельне дослідження білків сої, також виявило втрічі знижений вмісту цього ензиму в насінні, вирощеному на забрудненій території. Протеом насіння льону, вирощеного в умовах радіоактивного забруднення, має знижений вміст GF14ω, що входить до родини 14-3-3 молекулярних адаптерів (Q9AT81). Молекулярні адаптери, зазвичай, взаємодіють із білками, які мають фосфосеринові чи фосфотреонінові мотиви. Внаслідок приєднання білків-адаптерів регулюються міжбілкові взаємодії та контролюються ключові клітинні функції (Chevalier et al., 2009; Oecking and Jaspert, 2009). Таким чином, зниження вмісту GF14ω у насінні льону може мати глобальні наслідки на молекулярну фізіологію.

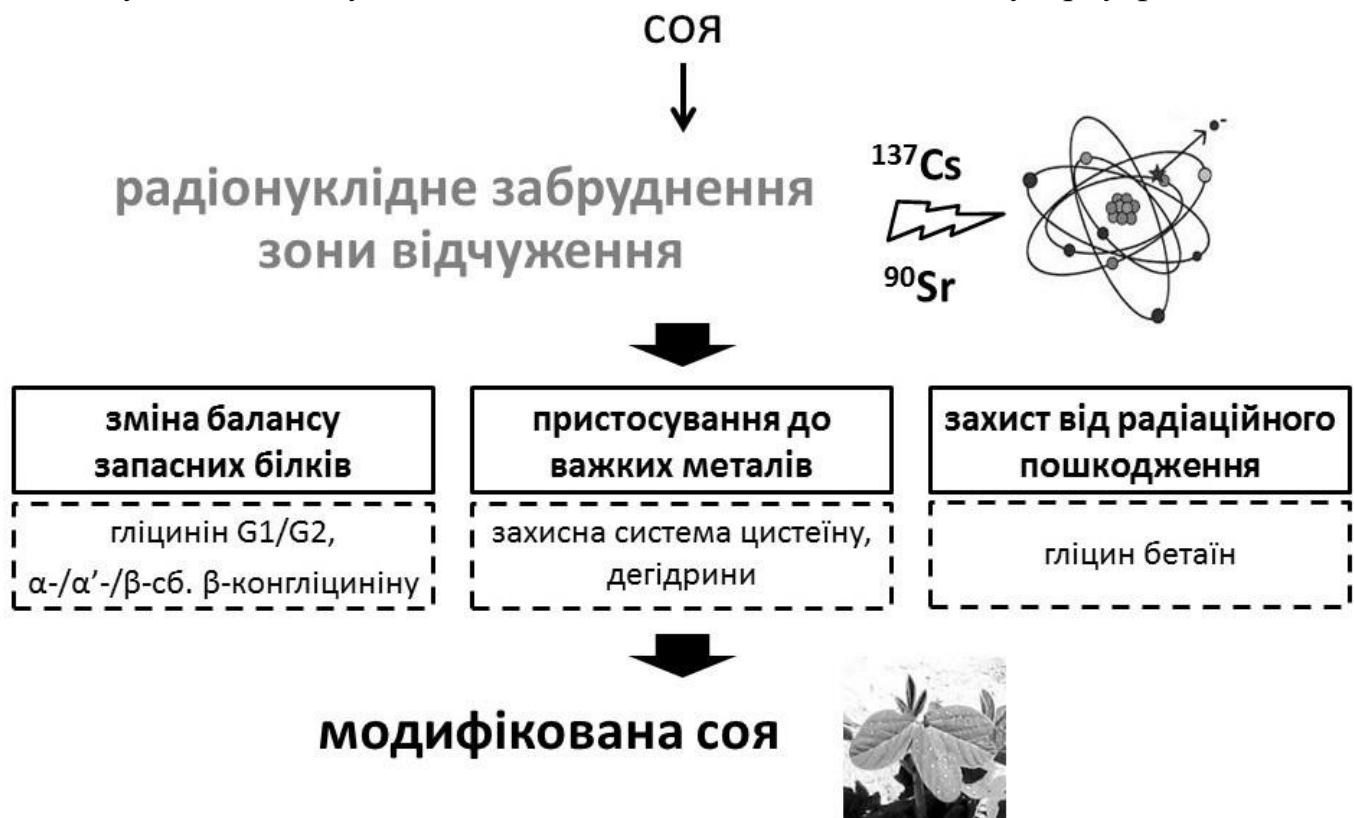


Рис. 3. Схема відповіді сої на умови середовища зони відчуження на основі даних порівняльної протеоміки зрілого насіння першого покоління.

Білок інгібування транспорту (Q2R3K5) було на 30% менше в насінні льону, зібраному на забрудненій ділянці. Він задіяний у біохімічному шляху убіквітинування, зокрема є складовим комплексу убіквітин лігази та містить так званий F-домен, що відповідає за специфічне зв'язування фосфорильованих білків-

субстратів для подальшого розщеплення в протеасомах. Іншим білком, вміст якого знизився на 50% в умовах хронічного опромінення, є α -субодиниця протеасоми типу 6A (PAA1, O81146), що є складовою 20S каталітичного ядра еукаріотичних протеасом. Відомі факти взаємодії α -субодиниці протеасоми з 14-3-3 білками. Убіквітин С-кінцевої гідролази (D7T3A6) було майже в 6 разів менше в зрілому насінні з ділянки, забрудненої радіонуклідами. У літературі описано прямий експеримент по дослідженню активності 26S протеасом за дії різних доз іонізуючої радіації. Було зроблено висновок, що ця субклітинна структура є безпосередньою мішенню стресового чинника (Pervan et al., 2005).

Підсумовуючи, ми запропонували схему відповіді, яка дозволяє відтворення льону в умовах хронічного опромінення (рис. 4). Схема представлена у вигляді мережі теоретичних взаємодій, що широко застосовуються в системній біології. Безпосередні наслідки змін у передачі сигналу, перетворюються за допомогою утворення активних комплексів фосфорильованих білків GF14 ω , які призводять до синтезу алармонів за участю LOX1, а паралельно інгібується протеоліз PAA1.

Таблиця 3.

Список ідентифікованих білків насіння льону.

назва білка, скорочення або ген; ідентифікаційний номер "UniProt"	% V·10 ² , забруднення	% V·10 ² , контроль	субклітинна локалізація
синтез білків			
фактор елонгації 1 α , EF1 α ; A8MSE8	34,3 \pm 3,6	12,9 \pm 11,4	цитоплазма
фактор елонгації 1 α , EF1 α ; Q58I24	37,1 \pm 8,8	7,6 \pm 13,2	цитоплазма
метіоніл тРНК синтаза; B9RWD7	82,6 \pm 8,3	39,5 \pm 16,8	цитоплазма
гомолог пумілію 5 РНК-зв'язуючий б., APUM5; Q9LJX4	1,3 \pm 2,2	29,8 \pm 12,2	цитоплазма
гомолог пумілію 5 РНК-зв'язуючий б., APUM5; Q9LJX4	1,1 \pm 1,0	6,5 \pm 0,7	цитоплазма
сигналінг			
схожий на ліпоксигеназу, LOX1; B9IJA0	4,2 \pm 0,8	8,9 \pm 0,5	цитоплазма
убіквітин С-кінцева гідролаза; D7T3A6	0,6 \pm 1,0	3,3 \pm 0,6	протеасома
α -сб. протеасоми типу 6A, PAA1; O81146	9,8 \pm 1,9	14,9 \pm 2,0	протеасома
б. інгібування транспорту; Q2R3K5	16,9 \pm 0,7	21,9 \pm 3,0	протеасома
б. родини 14-3-3, GF14 ω ; Q9AT81	29,5 \pm 21,6	69,2 \pm 21,2	цитоплазма
первинний метаболізм			
фруктозоди-Р альдолаза, FAB6; Q9SJK9	37,4 \pm 4,7	24,9 \pm 6,0	цитоплазма
3-Р-гліцерат кіназа, PGK; B9RHY3	4,3 \pm 0,7	2,8 \pm 0,7	цитоплазма
мітохондріальна аспартат амінотрансфераза, ASP1; P46643	9,1 \pm 0,8	4,8 \pm 2,5	мітохондрія
гліцерол-3-Р О-ацилтрансфераза, GPAT; A9SY86	3,0 \pm 2,8	13,9 \pm 2,4	хлоропласт
некласифіковані			
неохарактеризований б.; A9NUZ8	27,6 \pm 3,1	5,5 \pm 6,6	невідомо
експресований б.; Q2R9Q1	11,4 \pm 4,2	23,4 \pm 4,2	невідомо
неохарактеризований б.; Q84W28	102,6 \pm 17,1	67,3 \pm 34,4	невідомо

транскрипція			
ТФ bHLH90; Q0WNR2	51,1±4,3	19,0±17,5	ядро
схожий на ТФ цинкових пальців; A2WUV8	22,1±5,6	42,4±3,5	ядро
б. родини інтрон матураз II; Q94JV3	9,0±0,3	14,0±0,5	ядро
стрес			
холін монооксигеназа, СМО; Q9LKN0	4,7±0,9	9,5±0,7	хлоропласт
гомолог гену С7 (родина глутатіон трансфераз); Q42269	6,5±0,4	11,4±2,6	цитоплазма
б. патогенезу 10, PR-10; Q2VT55	1,3±1,2	6,5±2,7	цитоплазма
пакування білків			
α-сб. б. 1 безхвостого комплексу, TCP1α; P28769	0,8±0,7	3,1±0,5	цитоплазма
б. зв'язування люмену 2, VIP2; F4K007	7,4±1,4	11,1±2,0	ЕР
вторинний метаболізм			
ензим берберинового мосту 8, VBE8; Q9SA85	17,1±3,6	23,9±4,9	клітинна стінка
путресцин N-метилтрансфераза, РМТ; Q70EW6	12,4±2,2	19,7±2,2	цитоплазма
транспортери			
мітохондріальний АДФ/АТФ транспортер 1, AAC1; P31167	5,9±7,6	22,7±7,5	мітохондрія

Скорочення: ендоплазматичний ретикулум (ЕР), транскрипційний фактор (ТФ).

Відомо, що вплив несприятливого довкілля призводить до збільшення швидкості дихання і гліколізу (Ralser et al., 2007). Ми виявили, що вміст двох ферментів гліколізу – фруктозоди-Р альдолази (FAB6, Q9SJQ9) і 3-Р-гліцерат кінази (PGK, V9RHY3), зріс на 50% у насінні льону, зібраному зі забрудненої ділянки (табл. 3). В літературі показано, що FAB6 індукується абіотичними стресорами: засоленням, забрудненням іонами кадмію, посухою чи високою температурою (Lu et al., 2012). Альтернативні реакції гліколізу цитоплазми забезпечують метаболічну гнучкість, необхідну для розвитку рослин та адаптації до стресових факторів середовища (Plaxton, 1996). Зростання вмісту двох ферментів гліколізу може посунути баланс різних сегментів шляху, таким чином призвівши до накопичення багатофункціональних проміжних продуктів.

Рослини накопичують чимало осмопротекторних сполук, серед них виділяється гліцин бетаїн, що ймовірно відіграє роль у стійкості до стресових факторів середовища. Ми включили гліцин бетаїн як принциповий компонент реакції сої на іонізуючу радіацію. Навпаки, в льону вміст холін монооксигенази (СМО, Q9LKN0), яка каталізує перший етап шляху біосинтезу цього метаболіта, падає вдвічі у зрілому насінні, вирощеному на забрудненому радіонуклідами ґрунті. Обернене накопичення ензимів короткого біосинтетичного шляху гліцин бетаїну в тканинах насіння сої та льону, можна пояснити різною фенотиповою реакцією цих рослин. Також ми виявили, що в насінні льону, зібраному на забрудненій ділянці, знижується вміст стресового білка глутатіон трансферази (Q42269). Цей білок знешкоджує забрудники середовища шляхом приєднання глутатіону. Внаслідок впливу хронічного

опромінення в п'ять разів знизився вміст білка патогенезу 10 (PR-10, Q2VT55). Родина PR-10 включає малі цитоплазматичні білки, які індукуються атакою рослинних тканин патогенами, але також при дії абіотичних стресових факторів.

Отже іншим компонентом схеми мережі відповіді льону на вплив малих доз є короткий ланцюг: активація відповіді на метаболічний стрес, зміни у синтезі гліцин бетаїну СМО і налаштування балансу сегментів гліколізу FAB6 (рис. 4).

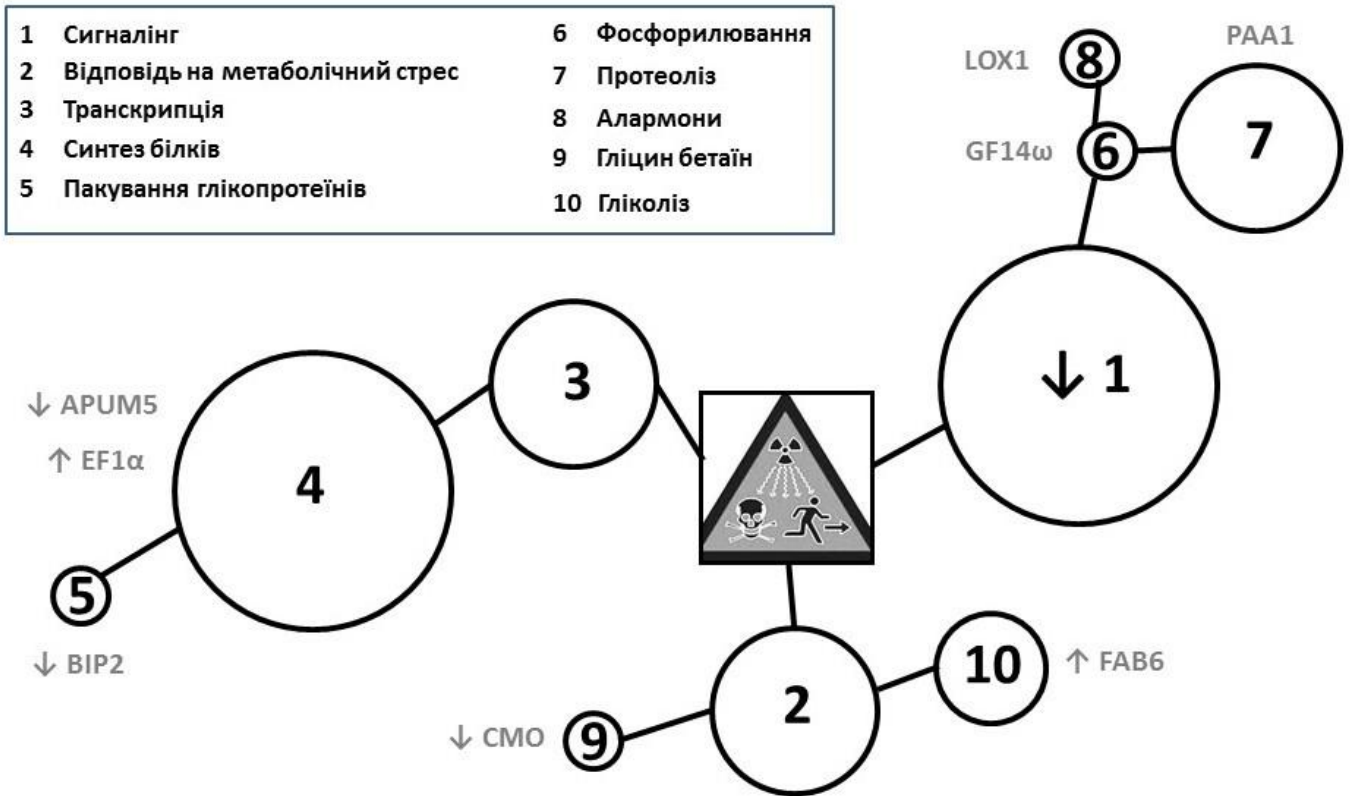


Рис. 4. Схема молекулярної мережі відповіді льону на зростання в ґрунтах зони відчуження ЧАЕС, використовуючи дані змін протеому зрілого насіння першого покоління.

Відносний розмір кола відповідає кількості білків певного функціонального блоку.

Один із транскрипційних факторів, білок bHLH90 (Q0WNR2), мав підвищений вміст у насінні льону, вирощеному на ділянці забрудненій радіонуклідами (табл. 3). Транскрипційні фактори групи основний домен спіраль-петля-спіраль регулюють широкий спектр реакцій розвитку. Навпаки, інший транскрипційний фактор, білок із доменами цинкових пальців (A2WUV8), був присутнім у меншій кількості в насінні, що зазнало впливу радіонуклідного забруднення. Вміст білка родини інтрон матураз типу II (Q94JV3), знизився на 60% внаслідок зростання в ґрунтах зони відчуження ЧАЕС. Дві плями, ідентифіковані як гомолог пумілію 5 РНК-зв'язуючий білок (APUM5, Q9LJX4), мали значно менший вміст у тканинах насіння, зібраного на забрудненій радіонуклідами ділянці. Було показано репресорну функцію кількох білків пумілію родини та їх участь у процесах розвитку чи захисті від вірусної атаки (Francischini and Quaggio, 2009; Nuh et al., 2013). Зниження вмісту ізоформ APUM5 внаслідок хронічного опромінення, може означати, що імунітет льону пригнічений. У насінні, що зазнало хронічного опромінення, виявлено вдвічі більше метіоніл тРНК синтази (B9RWD7). Також вміст двох членів родини фактора елонгації 1α (EF1α, A8MSE8 і Q58I24) зріс за дії радіації.

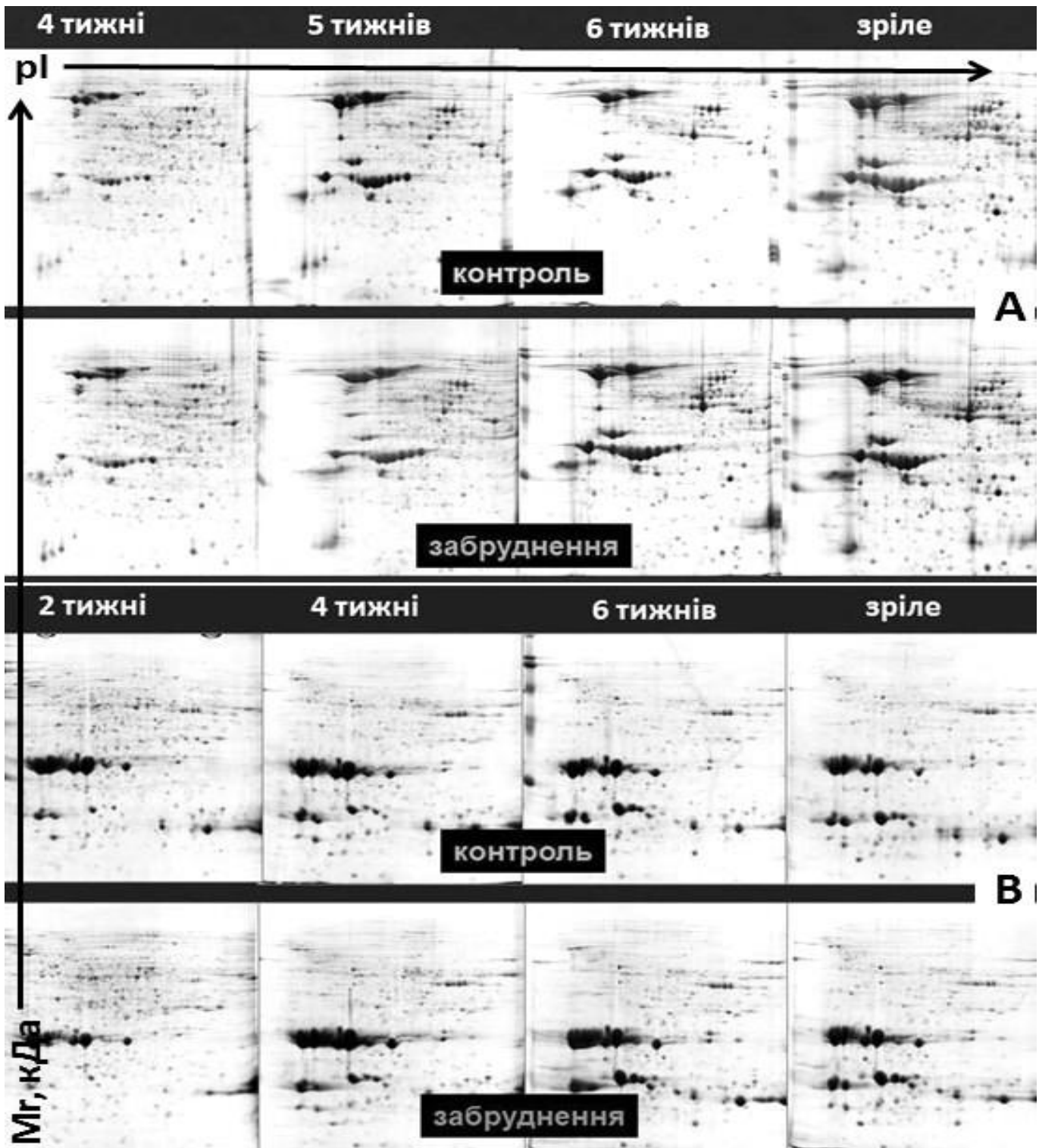


Рис. 5 Репрезентативні мапи білків сої (А) та льону (В) з матеріалу другого сезону, зібраного протягом різних фаз розвитку насіння.

Молекулярні шаперони можуть розпізнавати і зв'язувати проміжні стани білків, які мають порушену конформацію, дозволяючи правильну реалізацію просторової інформації (Clarke, 2006). Два білки, кількість яких знизилась у насінні, вирощеному на радіоактивно забруднених ділянках, є молекулярними шаперонами. Зокрема, α -субодиниця білка 1 безхвостого комплексу (TCP1 α , P28769) є складовою цитоплазматичного шапероніну. У літературі є повідомлення про участь цього шаперону в пакуванні білків цитоскелету (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Білок зв'язування люмену 2 (VIP2, F4K007) локалізується в ендоплазматичному

ретикулумі. Молекули VIP2 задіяні у реакції на важкі метали, зокрема, токсичні солі кадмію (Xu et al., 2013). В паралельному дослідженні протеому насіння сої, вміст іншого багатофункціонального молекулярного шаперону ендоплазматичного ретикулума – кальретикуліна, також знизився в насінні рослин, вирощених на забруднених радіонуклідами ділянках. Кальретикулін забезпечує контроль якості новосинтезованих глікозильованих білків (Christensen et al., 2008). Отже, можна припустити, що реакція рослин на хронічне опромінення включає зменшення потоку білків через секреторний шлях, оскільки виявлені шаперони задіяні в пакуванні глікопротеїнів клітинної стінки.

Таким чином, невід’ємною складовою радіаційної стрес-реакції льону є лінійний молекулярно-фізіологічний шлях (рис. 4): інтенсифікація транскрипції, синтез білків EF1 α /APUM5 і пакування глікопротеїнів клітинної стінки VIP2 (Danченко et al., 2010; Klubíková et al., 2010; Данченко та ін., 2010).

Дослідження молекулярних змін у наступному поколінні протягом розвитку насіння. У дисертації охарактеризовано вміст 211 білків протягом дозрівання другого покоління насіння сої на забрудненій радіонуклідами та контрольній ділянках. Насіння вибрали зі стручків на наступних фазах розвитку: 4-ох, 5-ти і 6-ти тижнів після цвітіння, а також зріле (рис. 5). Для льону ми показали динаміку 79 ідентифікованих білків протягом різних фаз дозрівання коробочок: 2-ох, 4-ох та 6-ти тижнів після цвітіння, а також зріле. Істотно менша кількість ідентифікованих експериментальних точок пояснюється незначною кількістю анотованих білкових послідовностей у доступних базах даних. Накопичення результатів аналізів протягом двох вегетаційних сезонів, дозволило виявити зміни протеому, стабільні протягом поколінь, які ймовірно успадковуються. У другому поколінні в основному помітних змін зазнали метаболічні ензими, причому знову реакції льону та сої дещо відрізнялись між собою. Ми візуалізували знайдені білки на схемах метаболічних шляхів.

Для сої вміст кількох ізоформ цукрозо-зв’язуючого білка, який забезпечує транспорт попередників вуглецевих скелетів запасних продуктів насіння, знижувався в умовах радіоактивного забруднення. Особливо помітним цей ефект був на пізніших фазах ембріогенезу. З іншого боку, вміст двох ізоформ цукрозо синтази був нижчим на фазі 4-ох тижнів після цвітіння. Цей ензим розщеплює імпортовану цукрозу на потреби фізіологічних процесів насіння (Williams et al., 2000). Тобто, логічно припустити, що насіння на забруднених радіонуклідами територіях, отримує менше енергії. Кумулятивні профілі вмісту показали достовірну різницю накопичення β -конгліцинінів на всіх фазах розвитку. Вміст іншого підкласу запасних білків – гліцинінів, зростав протягом розвитку насіння, але без істотних відмінностей кумулятивного профілю між експериментальними варіантами. Ми виявили кілька ензимів циклу Кальвіна, що свідчить про функціонування фотосинтезу під час ембріогенезу сої. В цілому, вміст ензимів гліколізу і циклу Кальвіна був найвищим на фазі 4-ох тижнів після цвітіння і найнижчим у зрілому насінні. На першій вивченій фазі росту в насінні, зібраному на забрудненій радіонуклідами ділянці, був підвищений вміст фосфоенолпіруват карбоксилази та Е3 складової комплексу гліцин декарбоксилази (гомолог піруват дегідрогенази). Аналогічний ефект було задокументовано за дії осмотичного стресу на тютюн (Zhang et al., 2011). Ймовірно,

ці зміни призводять до інтенсифікації потоку метаболітів у циклі трикарбонових кислот мітохондрій (Danchenko et al., 2013; Klubicová et al., 2012).

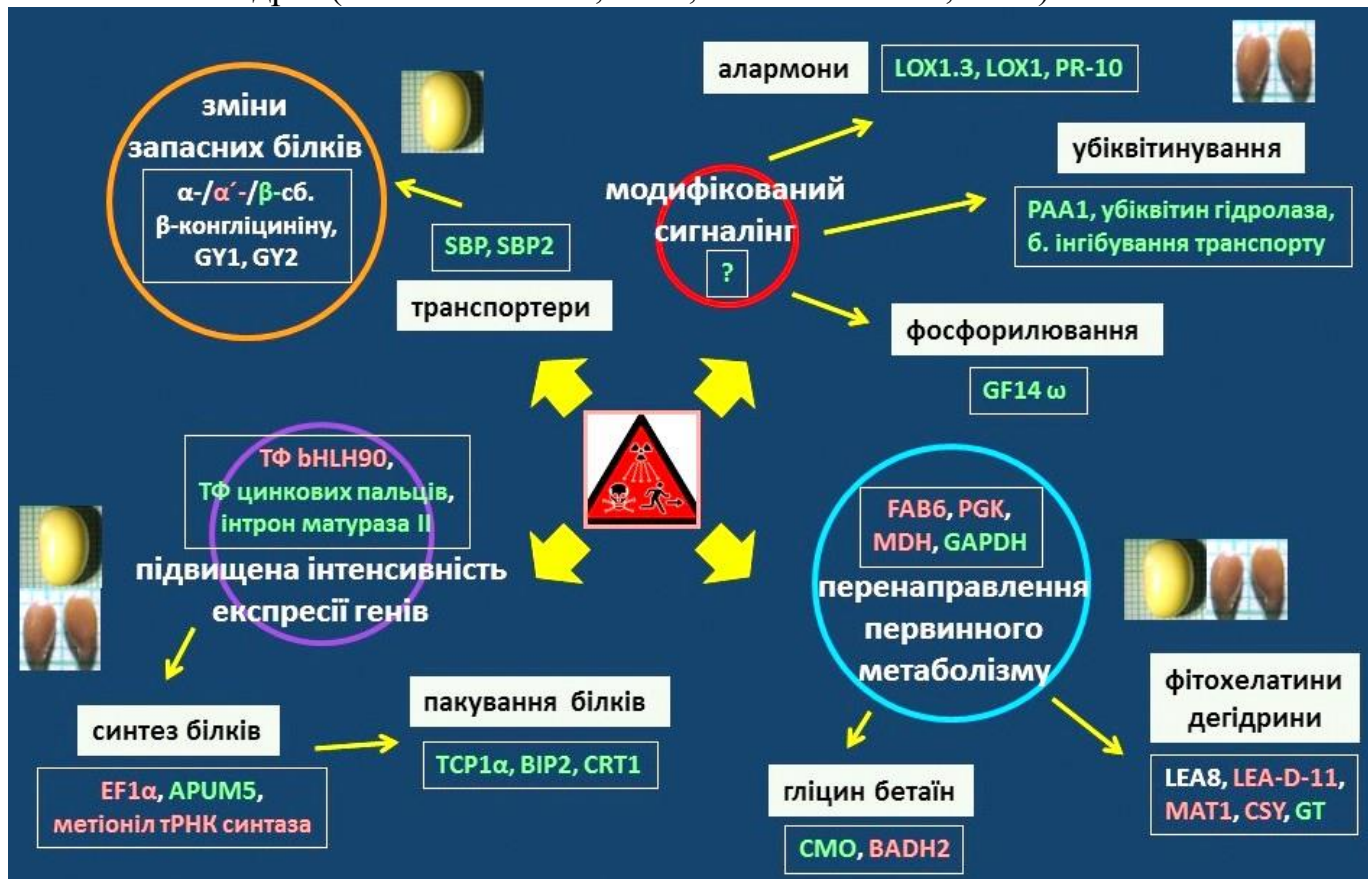


Рис. 6. Інтегрована модель відповіді протеому досліджених рослин на хронічне опромінення.

Відносний розмір кола відповідає кількості змінених білків певного функціонального блоку. Червоним шрифтом виділено білки, які накопичувались за дії радіонуклідного забруднення, зеленим – навпаки, білим – різнонаправлені зміни ізоформ.

У льону ми виявили підвищений вміст гліколітичних ензимів фосфогліцерат кінази і енолази на фазі 2-ох тижнів після цвітіння. Ізоцитрат дегідрогеназа синтезує важливий проміжний метаболіт, вона накопичувалась внаслідок хронічного радіаційного стресу на початку ембріогенезу. В літературі показано істотну роль цього ензиму в захисті від окисного стресу (Lee et al., 2002). Проте ключові зміни відбувались в хлоропластах насіння. Вміст РУБІСКО був більшим у насінні, вирощеному на забруднених радіонуклідами ґрунтах, на початку ембріогенезу. Цей ензим є відомим маркером стресу рослин (Nagy et al., 2013). Отже, доречно припустити, що в умовах помірного радіаційного стресу ефективно працює фотосинтез для забезпечення енергетичних потреб розвитку насіння. Піруват декарбоксилаза / ліпід дегідрогеназа і кетоацил синтаза мали схожі тренди змін – їх було більше на початкових етапах розвитку, але менше у зрілому насінні. Ці білки задіяні у шляху біосинтезу жирних кислот, а фенотиповим проявом стало збільшення кількості запасних ліпідів у зрілому насінні льону, вирощеному на ділянці в зоні відчуження ЧАЕС (Klubicova et al., 2014; Klubicová et al., 2013).

Підсумкова модель реакції рослин на зростання в ґрунтах зони відчуження. Ми інтегрували відповідь протеому насіння обох рослин, виділивши 4 блоки

фізіологічних реакцій (рис. 6). Масивні зміни запасних білків, опосередковані зниженим вмістом транспортерів, були характерні для зрілого насіння сої, навпаки модифікований (загальмований) сигналінг із впливом на фосфорилування, убіквітинування й алармони – для льону. Паралельно обидві рослини активували апарату транскрипції, що через трансляційні процеси впливало на пакування білків; додатково спостерігалось перенаправлення первинного метаболізму на накопичення фітохелатинів, дегідринів і радіопротектора гліцин бетаїну (Danchenko et al., 2011; Данченко та ін., 2011). Зведення результатів аналізів протягом двох вегетаційних сезонів, дозволило виявити зміни протеому, стабільні протягом поколінь, які ймовірно мають спадкову природу (Danchenko et al., 2016; Данченко та ін., 2016).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній праці вивчено ріст і розвиток рослин на територіях забруднених радіонуклідами, використовуючи глибокий аналіз протеому насіння для розуміння природи фізіологічних реакцій. Вперше отримано двовимірні білкові карти – це дозволило дослідити реакцію сотень білків клітини на хронічне опромінення протягом двох поколінь. Запропоновано оригінальну системну концепцію молекулярних змін задіяних у відповіді на радіаційний стрес внаслідок зростання у ґрунтах зони відчуження Чорнобильської атомної електростанції, що включає: зміни запасних білків, модифікований сигналінг, підвищену активність експресії генів і перенаправлення первинного метаболізму.

- ✓ Еквівалентна накопичена доза опромінення за період онтогенезу для сої на забрудненій радіонуклідами ділянці склала 13,2 сЗв, для льону – 11,4 сЗв; на контрольній ділянці для обох рослин вона не перевищувала 0,4 сЗв. Маса та ширина насіння сої зменшились, внаслідок хронічного опромінення, але для льону морфометричні зміни були незначними.
- ✓ Використовуючи двовимірний гель електрофорез, вперше розділено і кількісно проаналізовано зміни кількох сотень білків зрілого насіння сої та льону, в умовах радіонуклідного забруднення; польові експерименти першого покоління виявили, що зростання у ґрунтах чорнобильської зони відчуження спричинило помітну модифікацію протеому досліджених рослин – 9,2% білків сої та 4,9% білків льону мали достовірно інший вміст.
- ✓ Внаслідок розвитку на забрудненій радіонуклідами ділянці, змін зазнали наступні функціональні групи білків зрілого насіння сої: запасні білки, ріст клітин, стресові, первинний метаболізм, транспортери, сигналінг та пакування білків. У льону аналогічний ефект спостерігався для категорій: сигналінг (зокрема ліпоксигеназа та молекулярний адаптер), первинний метаболізм (гліколіз), транспортери, транскрипція, синтез білків, пакування білків (шаперони), стресові, вторинний метаболізм та неklasифіковані.
- ✓ Концептуальна модель реакції сої на хронічне опромінення включає: а) коригування балансу запасних білків (гліциніни G1/G2; α -, α' - і β -субодиниці β -конгліциніну), б) неспецифічну реакцію-приспосовування до важких металів (дегідрини та захисна система цистеїну), в) специфічний захист від радіаційного пошкодження (гліцин бетаїн). Мережа функціональних взаємодій молекулярних реакцій льону, де первинні події вибирали, виходячи із кількості змінених

внаслідок хронічного опромінення споріднених груп білків, розпочинається трьома блоками: а) сигналінг, б) відповідь на стрес, в) транскрипція.

- ✓ Вперше отримано інформацію динаміки змін 211 білків сої та 79 білків льону протягом дозрівання насіння другого покоління за впливу хронічного опромінення. Молекулярні зміни сої вказали на дефіцит вуглецевого скелету для біосинтезу запасних продуктів й активацію циклу трикарбонових кислот у мітохондріях; для льону першочергово спостерігались ефекти, пов'язані з підвищеним вмістом ензимів хлоропластів і накопиченням олії.
- ✓ Завершальна концепція показала, що специфічним для сої було коригування балансу запасних білків, опосередковане транспортерами, а унікальним для льону – модифікований сигналінг із впливом на алармони та зворотне фосфорилування. З іншого боку, універсальні реакції включали: 1) підвищену активність експресії генів із наслідками на синтез і пакування білків, 2) перенаправлення первинного метаболізму (завдяки мультифункціональним ензимам гліколізу) на синтез гліцин бетаїну, фітохелатинів і дегідринів.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Danchenko M, Skultety L, Rashydov NM, Berezhna VV, Mátel L, Salaj T, Pret'ová A, Hajduch M. Proteomic analysis of mature soybean seeds from the Chernobyl area suggests plant adaptation to the contaminated environment. *J Proteome Res.* 2009;8(6):2915–22. *(виращування рослин, якісний і кількісний аналіз протеому, ідентифікація білків, аналіз результатів і написання статті)*
2. Klubicová K, Danchenko M, Skultety L, Miernyk JA, Rashydov NM, Berezhna VV, Pret'ová A, Hajduch M. Proteomics analysis of flax grown in Chernobyl area suggests limited effect of contaminated environment on seed proteome. *Environ Sci Technol.* 2010;44(18):6940–6. *(виращування рослин, якісний і кількісний аналіз протеому, ідентифікація білків, аналіз результатів і написання статті)*
3. Klubicová K, Danchenko M, Skultety L, Berezhna VV, Uvackova L, Rashydov NM, Hajduch M. Soybeans grown in the Chernobyl area produce fertile seeds that have increased heavy metal resistance and modified carbon metabolism. *PLOS One.* 2012;7(10). *(хроматографічне розділення пептидів, ідентифікація білків за допомогою мас-спектрометрії та біоінформатичний аналіз результатів)*
4. Klubicová K, Danchenko M, Skultety L, Berezhna VV, Rashydov NM, Hajduch M. Radioactive Chernobyl environment has produced high-oil flax seeds that show proteome alterations related to carbon metabolism during seed development. *J Proteome Res.* 2013;12(11):4799–806. *(виращування рослин, хроматографічне розділення пептидів та ідентифікація білків за допомогою мас-спектрометрії)*
5. Данченко ММ, Клубіцова К, Кривохижа МВ, Бережна ВВ, Сакада ВІ, Хайдух М, Рашидов НМ. Системна біологія як ефективний інструмент дослідження впливу малих доз хронічного опромінення на рослини в чорнобильській зоні. *Цитологія и генетика.* 2016;50(6):60–79. *(пошук літературних джерел, критичний аналіз матеріалів, написання статті)*
6. Škultéty L, Danchenko M, Pret'ová A, Hajduch M. Techniques in plant proteomics. In: *Molecular Techniques in Crop Improvement: II Edition.* 2009. p. 469–91. *(пошук*

літературних джерел, критичний аналіз методів виділення білків та аналітичного розділення білків на гелях)

7. Danchenko M, Klubicova K, Skultety L, Berezhna V, Rashydov N, Hajduch M. Concept of crop adaptation to the Chernobyl environment based on proteomic data. In: Climate change: challenges and opportunities in agriculture Proceedings. Budapest, Hungary: Agricultural Research Institute HAS; 2011. p. 151–4. *(вирощування рослин, якісний і кількісний аналіз протеому, аналіз результатів і написання статті)*
8. Klubicova K, Danchenko M, Skultety L, Rashydov N, Hajduch M. Proteomics analysis of soybean and flax adaptation in radioactive Chernobyl area. In: Frontiers in agriculture proteome research Proceedings. Tsukuba, Japan: NARO Institute of Crop Science; 2011. p. 72–6. *(вирощування рослин, якісний і кількісний аналіз протеому, ідентифікація білків, аналіз результатів і написання статті)*
9. Danchenko M, Rashydov N, Hajduch M. Comparative quantitative proteomics – The elucidation of adaptation mechanisms in Chernobyl grown plants. *Physiol Plant*. 2008;133:S197. *(розробка концепції дослідження, вирощування рослин, виділення білків і написання тез)*
10. Danchenko M, Klubicova K, Rashydov N, Hajduch M. Proteome changes in mature seeds suggest adaptation toward Chernobyl environment. *Febs J*. 2010 Jun;277(S1):278. *(рідинна хроматографія спряжена з мас-спектрометрією для ідентифікації білків, біоінформатика змін протеому і написання тез)*
11. Данченко М, Клубіцова К, Рашидов Н, Хайдух М. Виявлені зміни протеому зрілого насіння дозволяють припустити адаптацію рослин до чорнобильського середовища. *Український біохімічний журнал*. 2010;82(3):81. *(вирощування рослин, ідентифікація білків, аналіз результатів і написання тез)*
12. Danchenko M, Berezhna V, Rashydov N, Pretova A, Hajduch M. Comparative proteomics of developing soybean and flax seed tissues in chronic ionizing radiation and control field conditions. In: COST FA0306 Meeting Abstracts. Cordoba, Spain: University of Córdoba; 2008. p. 31. *(вирощування рослин, виділення білків, якісний і кількісний аналіз протеому і написання тез)*
13. Danchenko M, Skultety L, Rashydov N, Hajduch M. Molecular mechanisms of soybean adaptation toward chronic ionizing radiation. In: FEBS Workshop Adaptation potential in plants Abstracts. Vienna, Austria: Gregor Mendel Institute of Molecular Plant Biology; 2009. p. 48. *(виділення білків, якісний і кількісний аналіз протеому, ідентифікація білків і написання тез)*
14. Danchenko M, Skultety L, Rashydov N, Hajduch M. Molecular mechanisms of the soybean adaptation toward chronic ionizing radiation. In: V Congress Ukrainian Radiobiological Society Abstracts. Uzhgorod, Ukraine: Ukrainian Radiobiological Society and Uzhgorod National University; 2009. p. 88–9. *(якісний і кількісний аналіз протеому, ідентифікація білків, аналіз результатів і написання тез)*
15. Данченко М, Клубіцова К, Шкультэты Л, Бережна В, Рашидов Н, Хайдух М. Концепция адаптации аграрных культур к условиям чернобыля на основе данных протеомики семян. В: Радиобиологические и радиоэкологические аспекты чернобыльской катастрофы Тезисы. Славутич, Украина: Украинский фитосоциологический центр; 2011. p. 74. *(якісний і кількісний аналіз протеому, ідентифікація білків, аналіз результатів і написання тез)*

16. Danchenko M, Klubicova K, Skultety L, Rashydov N, Hajduch M. Comparative proteomics of developing soybean seeds grown in the contaminated Chernobyl area. In: III Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry Abstracts. Hradec Kralove, Czech Republic: Czech Society for Mass Spectrometry and Faculty of Science Palacký University Olomouc; 2013. p. 25. (вирощування рослин, хроматографічне розділення пептидів, ідентифікація білків за допомогою мас-спектрометрії та біоінформатичний аналіз результатів)
17. Klubicova K, Danchenko M, Skultety L, Rashydov N, Hajduch M. The analysis of flax seeds harvested from Chernobyl area with increased oil content. In: I INPPO World Congress on plant proteomics Abstracts. Hamburg, Germany: University of Hamburg; 2014. p. 99. (хроматографічне розділення пептидів, ідентифікація білків за допомогою мас-спектрометрії та біоінформатичний аналіз результатів)
18. Danchenko M, Klubicova K, Berezhna V, Sakada V, Skultety L, Hajduch M, Rashydov N. Systems biology explains how agricultural plants withstand chronic ionizing radiation. In: II INPPO World Congress Abstracts. Bratislava, Slovakia: Institute of Plant Genetics and Biotechnology SAS and Biomedical Research Center SAS; 2016. p. 74. (пошук літературних джерел, критичний аналіз матеріалів і написання тез)

АНОТАЦІЯ

Данченко М. М. Зміни протеому насіння в умовах чорнобильської зони відчуження. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.01 "Радіобіологія". – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національна академія наук України, Київ, 2017.

У дисертації показано різну акумуляцію дозоформуєчих радіонуклідів насінням сої та льону, вирощеним на ґрунтах зони відчуження Чорнобильської атомної електростанції. Оцінено накопичену дозу опромінення, яку отримали вивчені рослини протягом вегетації та виміряно морфологічні характеристики їх насіння. В роботі використано кількісну пошукову протеоміку (двовимірний гель електрофорез у поєднанні з тандемною мас-спектрометрією), щоб показати участь білків рослин у стрес-реакції на вплив малих доз. Розроблено модель онтогенетичної відповіді рослин на хронічне опромінення. Показано, що характерним для сої було коригування балансу запасних білків опосередковане транспортерами, а унікальним для льону – модифікований сигналінг із впливом на алармони та зворотне фосфорилування. У свою чергу, універсальні реакції включали перенаправлення первинного метаболізму (завдяки мультифункціональним ензимам гліколізу) на синтез гліцин бетаїну, фітохелатинів і дегідринів, а також підвищену активність експресії генів із наслідками на синтез і пакування білків.

Ключові слова: хронічне опромінення, радіонуклідне забруднення, *Glycine max*, *Linum usitatissimum*, пошукова протеоміка, двовимірний гель електрофорез, перенаправлення первинного метаболізму.

АННОТАЦІЯ

Данченко М. Н. Изменения протеома семян в условиях чернобыльской зоны отчуждения. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.01 "Радиобиология". – Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальная академия наук Украины, Киев, 2017.

В диссертации показана различная аккумуляция дозоформирующих радионуклидов семенами сои и льна, выращенными на почвах зоны отчуждения Чернобыльской атомной электростанции. Оценена эквивалентная доза облучения, которую получили изученные растения во время вегетации и измерены морфологические характеристики их семян. В работе использовали количественную поисковую протеомику (двумерный гель электрофорез в сочетании с тандемной масс-спектрометрией), чтобы показать участие белков растений в стресс-реакции на воздействие малых доз. Разработана модель онтогенетического ответа растений на хроническое облучение. Показано, что характерной для сои была корректировка баланса запасных белков опосредствованная транспортерами, а уникальным для льна – модифицированный сигналинг с воздействием на алармоны и обратимое фосфорилирование. В свою очередь, универсальные реакции включали перенаправление первичного метаболизма (благодаря мультифункциональным ферментам гликолиза) на синтез глицин бетаина, фитохелатинов и дегидринов, а также повышенную активность экспрессии генов с последствиями на синтез и упаковку белков.

Ключевые слова: хроническое облучение, радионуклидное загрязнение, *Glycine max*, *Linum usitatissimum*, поисковая протеомика, двумерный гель электрофорез, перенаправление первичного метаболизма.

SUMMARY

Danchenko M. M. Adjustment of seed proteome in the Chernobyl exclusion zone. – Manuscript of the qualification scientific project.

Doctoral thesis for the PhD title application in 03.00.01 "Radiobiology". – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

The soil in the close vicinity of Chernobyl Nuclear Power Plant is still heavily contaminated with long-living radioisotopes, such as ^{137}Cs and ^{90}Sr . Doctoral thesis is focused on the investigation of soybean and flax response toward permanently increased level of radiation, using a quantitative high-throughput proteomics approach. During the ontogenesis, investigated plants received the following equivalent doses: a) at the contaminated field – 11.4 cSv flax, 13.2 cSv soybean; b) at the control field – less than 0.4 cSv for both plants. A total protein fraction was isolated from mature (first generation) and developing (second generation) seeds, and analyzed using two-dimensional gel electrophoresis combined with tandem mass spectrometry.

All soybean and flax proteins, affected by growth in a radionuclide-contaminated soil during one generation, were sorted into 11 functional categories. Notably, two classes (storage proteins and cell growth) were unique to the first object; on the other hand, four (proteins synthesis, transcription, secondary metabolism and unclassified) – for the second.

In the case of a soybean, seed storage proteins showed dominant response to the chronic irradiation. Their complex ambiguous behavior in the contaminated environment of the Chernobyl zone, adds arguments supporting the hypothesis about additional functions of this group. The nonspecific reaction, similar to the heavy metal stress, is another fundamental component of the response to a chronic irradiation. It includes cysteine synthase hyperaccumulation and dehydrins. In addition, data showed that the content of the peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase increased by 30% upon low-dose impact. Several components of signaling pathways are among flax seeds proteins, which changed abundance under the influence of a radionuclide contamination. Lipoxygenase content decreased in the flax proteome grown in the soil contaminated by radionuclides. This may mean that the signaling pathway that includes oxylipins is downregulated; the likely logical consequence is reduced resistance to phytopathogens. Furthermore, we showed lower content of GF14 ω , a member of the 14-3-3 family of molecular adapters. Additionally, abundance of two glycolytic enzymes – fructose-bi-P aldolase and 3-P-glycerate kinase increased by 50% in flax seeds collected from the contaminated field. Alternative glycolytic reactions in cytoplasm provide metabolic flexibility necessary for plant development and adaptation to environmental stress factors.

To improve further our understanding of response to a chronic irradiation we investigated proteome changes during seeds maturation of the second generation of plants grown in experimental areas. Based on data we concluded: proteome changes indicated that soybean had deficit of assimilates for the biosynthesis of seed storage compounds resulted in reduced accumulation of β -conglycinins. Additionally, citric acid cycle in mitochondria might be activated. For flax, we revealed that chloroplastic pyruvate decarboxylase and ketoacyl synthase had similar patterns of changes: they were more abundant early in the embryogenesis, but their amount decreased in mature seeds. This was accompanied by accumulation of oil in the field at the Chernobyl Nuclear Power Plant exclusion zone

The proposed model of onthogenetic reactions to chronic irradiation includes the following components: (i) changes in storage proteins, mediated by transporters (sucrose binding proteins) are specific for soybean; (ii) shifted signaling, which affects alarmones and reversible phosphorylation is unique for flax. On the other hand, activated expression that influences synthesis and packing of proteins (calreticulin and other chaperones), as well as redirection of the primary metabolism (through multifunctional glycolytic enzymes) for the synthesis of glycine betaine, phytochelatin and dehydrins are universal reactions. In the future, our results will help to develop an effective strategy for sustainable crop yield despite of technologically modified environment.

Key words: chronic irradiation, radionuclide contamination, *Glycine max*, *Linum usitatissimum*, discovery proteomics, two-dimensional gel electrophoresis, primary metabolism rerouting.