

**Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Данченко Максим Миколайович

УДК 577.218

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

03.00.01 "Радіобіологія"
біологічні науки

**Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
(доктора філософії)**

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



Данченко М. М.

Науковий керівник
Рашидов Намік Мамед огли
доктор біологічних наук
старший науковий співробітник

Київ – 2017

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 проекті показана різна акумуляція радіонуклідів насінням сої та льону, які належать віддаленим таксономічним категоріям. Активність ^{137}Cs в ґрунті ділянки у зоні відчуження Чорнобильської атомної електростанції була майже у 15 разів більшою, ніж у контролі; активність ^{90}Sr відрізнялась приблизно у 9 разів. Для обох досліджених видів і дозоформуючих радіонуклідів, коефіцієнти накопичення були значно вищими в умовах забруднення, а зріле насіння сої в усіх випадках мало вищу активність радіонуклідів порівняно з льоном. Протягом онтогенезу вивчені рослини отримали наступні еквівалентні дози опромінення: а) забруднена ділянка – 11,4 сЗв льон, 13,2 сЗв соя; б) контрольна ділянка – менше 0,4 сЗв для обох рослин. Оцінка морфометричних характеристик показала, що насіння рослин сої зі забрудненої ділянки є меншим, а динаміка його набухання сповільнена порівняно з контролем. Навпаки, не виявлено істотних відмінностей у сирій вазі насіння льону, проте відсоток проростання був нижчим, внаслідок впливу низьких доз хронічного опромінення.

Ми застосували пошукову протеоміку на основі дво-вимірного гелю електрофорезу для встановлення молекулярних змін на білковому рівні. Стрічки з іммобілізованим рН градієнтом вузького діапазону забезпечили практичну відсутність перекриття білкових плям. У випадку сої чітко розділено 698 білкових плям зрілого насіння, 9,2% з них мали різний відносний об'єм, внаслідок розвитку у забрудненому середовищі чорнобильської зони. Використання ультрависокоефективної рідинної хроматографії в поєднанні з тандемною мас-спектрометрією дозволило встановити природу 26 послідовностей. Із 720 плям льону, відносний об'єм 4,9% достовірно відрізнявся в експериментальних зразках. Ми однозначно ідентифікували 28 білків насіння льону, кількість яких змінилась

внаслідок хронічного опромінення. Усі білки сої та льону, на які вплинуло вирощування у забруднених радіонуклідами ґрунтах протягом одного покоління, було розділено на 11 функціональних категорій. Із них 2 (запасні білки та ріст клітин) унікальні для першого об'єкту, а 4 (синтез білків, транскрипція, вторинний метаболізм і некласифіковані) – для другого.

Домінуючу відповідь на хронічне опромінення показали запасні білки насіння сої. Їх комплексна неоднозначна поведінка в забруднених умовах чорнобильської зони, додає аргументів для підтримки гіпотези про додаткові функції цієї групи. Напевно саме перерозподіл складу окремих запасних білків насіння, є критичним фактором, який забезпечує функціонування рослин за умов хронічного впливу радіонуклідного забруднення. Іншою принциповою складовою стрес-відповіді стала неспецифічна реакція схожа на стрес викликаний важкими металами. Ензиму цистеїн синтази, який лімітує синтез фітохелатинів, було втричі більше в насінні зі забрудненої ділянки. Додатково знайдено 4 дегідрини, з них трьох виявилось більше, а одного – менше в насінні з ділянки в зоні відчуження Чорнобильської атомної електростанції. Також дані показали, що вміст пероксисомальної бетаїн альдегід дегідрогенази зріс на 30% внаслідок впливу низьких доз. Ймовірно, що специфічна захисна активність гліцин бетаїну проявляється у зрілому насінні сої.

Серед білків насіння льону, кількість яких змінилась під впливом радіонуклідного забруднення, є складові декількох сигнальних шляхів. Вміст ліпоксигенази знижується в протеомі льону, вирощеному на ґрунтах забруднених радіонуклідами. Це може означати, що пригнічується сигнальний шлях, який включає оксиліпіни, логічним наслідком чого є зниження стійкості до фітопатогенів. Також показано знижений вміст GF14ω, що входить до родини 14-3-3 молекулярних адаптерів. Білки-адаптери контролюють ключові клітинні функції, які мають глобальні наслідки на молекулярну фізіологію рослин. Оскільки усі білки льону задіяні в сигналінгу мали знижений вміст у насінні, вирощеному за дії радіонуклідів, доречно припустити, що вони є ланками одного ланцюга. Додатково ми показали, що вміст двох ферментів гліколізу – фруктозо-1,6-дифосфат альдолази і 3-фосфогліцерат кінази, зріс на 50% у насінні льону, зібраному зі забрудненої ділянки. Альтернативні

реакції гліколізу цитоплазми забезпечують метаболічну гнучкість, необхідну для розвитку рослин та адаптації до стресових факторів довкілля. Гомолог пумілію білку 5 зв'язуючого рибонуклеїнову кислоту APUM5, є специфічним репресором трансляції та приймає участь у захисті від вірусної атаки. Зниження вмісту ізоформ цього білку внаслідок хронічного опромінення, може означати, що імунітет льону пригнічений. Вміст двох членів родини фактора елонгації 1 α зріс в умовах радіаційного стресу, що вказує на загальну активацію синтезу білків.

Для подальшого вдосконалення концепції реакції на хронічне опромінення, досліджено зміни протеому насіння протягом дозрівання другого покоління рослин, вирощених на експериментальних ділянках. Це дозволило доповнити та підвищити точність інтегрованої схеми. Охарактеризовано вміст 211 білків сої на забрудненій радіонуклідами та контрольній ділянках. Вміст кількох ізоформ цукрозо-зв'язуючого білку, який забезпечує транспорт енергетичних попередників запасних продуктів насіння, знизився в умовах радіоактивного забруднення. Комлементарних змін зазнали 2 ізоформи цукрозо синтази, яка розщеплює імпортований цукор. Отже, насіння сої на забруднених радіонуклідами територіях отримує менше енергії, що супроводжувалось зниженням накопиченням β -конгліцинінів. Домінантний вплив на активність циклу трикарбонових кислот у мітохондріях здійснили фосфоенолпіруват карбоксилаза та гомолог піруват дегідрогенази. Для льону ми прослідкували 79 ідентифікованих білків на різних фазах дозрівання насіння. Показано підвищений вміст гліколітичних ензимів фосфогліцерат кінази і енолази на ранніх фазах розвитку насіння, внаслідок впливу радіонуклідного забруднення. Такий тренд добре узгоджується зі збільшеним вмістом кількох гліколітичних ензимів у першому поколінні. Ключові зміни відбувались у хлоропластах льону. Піруват декарбоксилаза і кетоацил синтаза мали схожі закономірності змін – їх було більше на ранніх етапах розвитку, але менше у зрілому насінні. Ці білки задіяні у шляху біосинтезу жирних кислот, а фенотиповим проявом стало накопичення ліпідів у насінні льону, вирощеному на ділянці в зоні відчуження Чорнобильської атомної електростанції.

Наукова новизна. У дисертації вперше використано кількісну пошукову протеоміку (двовимірний гель електрофорез у поєднанні з тандемною мас-спектрометрією), 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. Розроблено концептуальну модель онтогенетичної реакції сої і льону на хронічний вплив малих доз іонізуючої радіації. Новітній аналіз фізіологічних змін рослин у чорнобильському середовищі показав, що специфічним 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. Результати отримані у ході виконання дисертаційної праці оцінено премією Національної академії наук України для молодих учених, а також 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. Пошукова протеоміка показала комплекс біохімічних змін насіння сої та льону за дії хронічного опромінення, включаючи відомі алергени. 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 змін протеому насіння сої та льону,

внаслідок впливу радіонуклідного забруднення, широкому колу користувачів, включаючи наукову спільноту.

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

Список публікацій:

1. Danchenko M, Skultety L, Rashydov NM, Berezhna VV, Mátel L, Salaj T, et al. 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.
2. Škultéty L, Danchenko M, Pret’Ová A, Hajduch M. Techniques in plant proteomics. In: Molecular Techniques in Crop Improvement: 2nd Edition. 2009. p. 469–91.
3. Klubicová K, Danchenko M, Skultety L, Miernyk JA, Rashydov NM, Berezhna VV, et al. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Klubicová K, Danchenko M, Skultety L, Berezhna VV, Uvackova L, Rashydov NM, et al. Soybeans Grown in the Chernobyl Area Produce Fertile Seeds that Have Increased Heavy Metal Resistance and Modified Carbon Metabolism. PLoS ONE. 2012;7(10).
7. 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.

8. Данченко ММ, Клубісова К, Кривохижа МВ, Бережна ВВ, Сакада ВІ, Хайдук М, et al. Системна біологія як ефективний інструмент дослідження впливу малих доз хронічного опромінення на рослини в чорнобильській зоні. Цитология И Генетика. 2016;50(6):60–79.
9. Danchenko M, Rashydov N, Hajduch M. Comparative quantitative proteomics – The elucidation of adaptation mechanisms in Chernobyl grown plants. *Physiol Plant*. 2008;133:S197.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Danchenko M, Klubicova K, Rashydov N, Hajduch M. Proteome changes in mature seeds suggest adaptation toward chernobyl environment. *Febs J*. 2010 Jun;277:278–278.
14. 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.
15. Данченко М, Клубицова К, Шкультэты Л, Бережна В, Рашидов Н, Хайдух М. Концепция адаптации аграрных культур к условиям Чернобыля на основе данных протеомики семян. In: Радиобиологические и радиэкологические аспекты чернобыльской катастрофы Тезисы. Славутич, Украина: Украинский фитосоциологический центр; 2011. p. 74.

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.
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.
18. Danchenko M, Klubicova K, Berezhna V, Sakada V, Skultety L, Hajduch M, et al. 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.

SUMMARY

Danchenko M. M. Seed proteome changes in the Chernobyl exclusion zone. – Manuscript of the qualificalional 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.

Herein we showed a different accumulation of radionuclides in soybean and flax seeds, which belong to distant taxonomic categories. The soil activity of ^{137}Cs in the test field inside of the Chernobyl Nuclear Power Plant exclusion zone, was almost 15 times higher comparing to control; ^{90}Sr activity differed about 9 times. For both studied species and dose-forming radionuclides, accumulation rates were much higher in contaminated area and mature soybean seeds in all cases had higher radionuclide activity then flax. 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. Morphometry showed that soybean seeds from contaminated area are smaller and their imbibition is delayed comparing to control. There were no significant fresh weight differences of flax seeds grown in the radionuclide-contaminated field, but germination percentage was lower due to the chronic low-dose irradiation.

We used discovery proteomics, based on the two-dimensional gel electrophoresis to reveal molecular changes on the protein level. Narrow range immobilized pH gradient strips, ensured virtual absence of overlapping protein spots. We clearly separated 698 soybean protein spots from mature seeds, 9.2% of them had a different relative volume, because of the development in the contaminated environment of the Chernobyl zone. Using ultrahigh performance liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometry, we identified 26 sequences. Out of 720 flax spots, the relative amount of 4.9% was significantly different in the experimental samples. We clearly identified 28 flax seed proteins, those abundance changed as a result of chronic irradiation. All soybean and flax proteins, affected by growth in radionuclide-contaminated soil during one generation, were sorted into 11 functional categories. Interestingly, 2 classes (storage proteins and cell growth) were unique

to the first object, on the other hand 4 (proteins synthesis, transcription, secondary metabolism and unclassified) – for the second.

Seed storage proteins of soybean responded dominantly to the chronic irradiation. Their complex ambiguous behavior in the contaminated environment of the Chernobyl zone, adds arguments in favor of the hypothesis about additional functions of this group. Seems likely that redistribution of individual seed storage proteins is a crucial factor enabling plants to survive under chronic influence of radionuclide contamination. Nonspecific reaction, similar to the heavy metals stress, is another fundamental component of the response to chronic irradiation. It includes cysteine synthase hyperaccumulation in the seeds from contaminated field. This stress enzyme limits the synthesis of phytochelatins. Additionally, we identified 4 dehydrins: three of them were more abundant and one less abundant in seeds from the field in the Chernobyl Nuclear Power Plant exclusion zone. Also, data showed that the content of the peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase increased by 30% upon low-dose impact. It is likely that the specific protective activity of a glycine betaine against a radiation works in mature soybean seeds.

Several components of signaling pathways are among the proteins of flax seeds, which abundance changed under the influence of radionuclide contamination. Lipxygenase content decreased in the proteome of flax grown in the soil contaminated by radionuclides. This may mean that the signaling pathway that includes oxylipins is inhibited, the logical consequence is reduced resistance to phytopathogens. Also we showed lower content of GF14 ω , a member of the 14-3-3 family of molecular adapters. Adapter proteins control key cellular functions that have global impact on the molecular physiology of plants. Since all flax proteins involved in signaling had lower abundance in seeds grown under the influence of radionuclides, it is appropriate to assume that they are links of one chain. Additionally, we showed that abundance of two glycolytic enzymes – fructose-1,6-biphosphate aldolase and 3-phosphoglycerate kinase increased by 50% in flax seeds collected from contaminated field. Alternative glycolytic reactions in cytoplasm provide metabolic flexibility necessary for plant development and adaptation to environmental stress factors. Homologue of the pumilio ribonucleic acid binding protein 5 APUM5 is a specific repressor of translation and participates in the defense against viral attack. Reduced amount of several isoforms of this

protein as a result low-dose influence, can mean that flax immune system is suppressed. The contents of the two family members of the elongation factor 1 α is increased in the conditions of radiation stress, indicating the principal activation of the protein synthesis.

To improve further the concept of response to chronic irradiation we investigated proteome changes during seeds maturation in the second generation of plants grown in experimental areas. This allowed to supplement and improve the accuracy of the integrated model. We evaluated the abundance of 211 soybean proteins from the radionuclide-contaminated and control fields. Several isoforms of the sucrose binding protein that transports energetic precursors for seed storage compounds had lower abundance in radioactively contaminated conditions. Sucrose synthase isoforms (cleaves imported sugar) showed complementary behavior. Hence, soybean seeds in the territories which are contaminated by radionuclides received less energy, this was accompanied by a reduced accumulation of β -conglycinins. Phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase homologue directly influenced the activity of citric acid cycle in mitochondria. We followed 79 identified flax proteins on different seed developmental stages. This allowed showing increased abundance of glycolytic enzymes phosphoglycerate kinase and enolase on the early stages of seed development due to the impact of radionuclide contamination. Such trend is consistent with the increased content of multiple glycolytic enzymes in the first generation. Nevertheless, key changes took place in chloroplasts. Pyruvate decarboxylase and ketoacyl synthase had similar patterns of changes: they were more abundant early in the development, but their amount decreased in mature seeds. These proteins are involved in the fatty acids biosynthesis; also, we detected accumulation of lipids as a phenotypic manifestation in the seeds of flax grown in the field at the Chernobyl Nuclear Power Plant exclusion zone.

Scientific novelty. The thesis used quantitative discovery proteomics (two-dimensional gel electrophoresis combined with tandem mass spectrometry) to show how protein components responded to environmental contamination with radionuclides. High-throughput seed proteomics enabled explanation of the possible mechanisms by which soybean and flax can withstand chronic irradiation. This work is the first comprehensive study of proteins from plants grown in the radionuclide-contaminated area of Chernobyl

Nuclear Power Plant. We developed the conceptual model of ontogenetic reactions of soybean and flax toward chronic low doses of ionizing radiation. The novel analysis of physiological changes of plants in Chernobyl environment showed that: (i) storage proteins balance adjustment mediated by transporters was specific to soybean; (ii) modified signaling with effects on alarmones and reversible phosphorylation was unique to flax; (iii) primary metabolism rerouting (multifunctional glycolytic enzymes) for the synthesis of glycine betaine, phytochelatins and dehydrins, as well as increased activity of the gene expression, which in turn activated protein synthesis were general reactions. The results, obtained during the thesis work, were recognized by National Academy of Sciences of Ukraine award for young scientists and Slovak Academy of Sciences diploma for international collaboration.

The practical significance of the results. Implemented project is important for the development of future strategy for agriculture in the contaminated areas for non-food purposes, as biofuel production. Discovery proteomics elucidated complex biochemical changes of soybean and flax seeds under the influence of chronic irradiation, including known allergens. In the future, our results will help to develop an effective strategy for sustainable crop yield despite of technologically modified environment. Data obtained during the experiments, were uploaded to an online database available at <http://www.chernobylproteomics.sav.sk>. This portal provides access to results on proteome changes of soybean and flax seeds, due to the impact of radionuclide contamination, to wide range of users, including the scientific community.

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

Publications:

1. Danchenko M, Skultety L, Rashydov NM, Berezhna VV, Mátel L, Salaj T, et al. 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.
2. Škultéty L, Danchenko M, Pret’Ová A, Hajduch M. Techniques in plant proteomics. In: *Molecular Techniques in Crop Improvement: 2nd Edition.* 2009. p. 469–91.

3. Klubíková K, Danchenko M, Skultety L, Miernyk JA, Rashydov NM, Berezhna VV, et al. 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.
4. Danchenko M, Klubíková 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.
5. Klubíková 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.
6. Klubíková K, Danchenko M, Skultety L, Berezhna VV, Uvackova L, Rashydov NM, et al. Soybeans Grown in the Chernobyl Area Produce Fertile Seeds that Have Increased Heavy Metal Resistance and Modified Carbon Metabolism. *PLoS ONE*. 2012;7(10).
7. Klubíková 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.
8. Данченко ММ, Клубісова К, Кривохижа МВ, Бережна ВВ, Сакада ВІ, Хайдук М, et al. Системна біологія як ефективний інструмент дослідження впливу малих доз хронічного опромінення на рослини в чорнобильській зоні. *Цитологія И Генетика*. 2016;50(6):60–79.
9. Danchenko M, Rashydov N, Hajduch M. Comparative quantitative proteomics – The elucidation of adaptation mechanisms in Chernobyl grown plants. *Physiol Plant*. 2008;133:S197.
10. 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.

11. 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.
12. 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.
13. Danchenko M, Klubicova K, Rashydov N, Hajduch M. Proteome changes in mature seeds suggest adaptation toward chernobyl environment. *Febs J.* 2010 Jun;277:278–278.
14. 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.
15. Данченко М, Клубицова К, Шкультэты Л, Бережна В, Рашидов Н, Хайдух М. Концепция адаптации аграрных культур к условиям Чернобыля на основе данных протеомики семян. In: Радиобиологические и радиозэкологические аспекты чернобыльской катастрофы Тезисы. Славутич, Украина: Украинский фитосоциологический центр; 2011. p. 74.
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.
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.
18. Danchenko M, Klubicova K, Berezhna V, Sakada V, Skultety L, Hajduch M, et al. 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.

ЗМІСТ

ПЕРЛІК СКОРОЧЕНЬ	18
ВСТУП.....	20
Обґрунтування вибору теми	20
Зв'язок роботи з науковими програмами та проектами.....	21
Мета і завдання дослідження	22
Методи дослідження.....	22
Наукова новизна.....	23
Практичне значення одержаних результатів.....	23
Особистий внесок здобувача	24
Апробація матеріалів дисертації	24
Структура та обсяг	25
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
1.1. Радіоактивний фон як антропогенний фактор довкілля	26
1.1.1. Найбільші антропогенні на ядерних реакторах.....	26
1.1.2. Поглинання радіонуклідів рослинами	27
1.1.3. Механізми дії радіації на живі організми.....	31
1.2. Стрес та адаптація до іонізуючого опромінення	33
1.2.1. Концепція стресу та феномен адаптації рослин	33
1.2.2. Молекулярні й біохімічні механізми реакції рослин на іонізуючу радіацію	36
1.2.3. Нові парадигми радіобіологічних ефектів хронічного опромінення низькими дозами	41
1.3. Сучасні методики радіобіології культурних рослин	44
1.3.1. Перспективи та засоби системної біології	44
1.3.2. Пошукова протеоміка інструмент поглибленого розуміння суті фізіологічних процесів	48
1.3.3. Характеристика об'єктів дослідження	55
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	59
2.1. Рослинний матеріал і умови вирощування	59

2.2. Морфометрія та фізіологічні аналізи сої та льону.....	61
2.3. Вимірювання активності дозоформуючих радіонуклідів	61
2.4. Аналіз протеому насіння сої та льону.....	62
2.4.1. Виділення білків.....	62
2.4.2. Якісне розділення білків	63
2.4.3. Фарбування і кількісний аналіз гелів.....	65
2.4.4. Ензиматичне розщеплення білків	67
2.4.5. Ультрависокоєфективна рідинна хроматографія поєднана з тандемною мас-спектрометрією	67
2.4.6. Ідентифікація й анотація послідовностей	69
2.5. Статистична обробка даних	71
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	72
3.1. Накопичення радіонуклідів і морфометричні параметри досліджених рослин	72
3.1.1. Накопичення радіонуклідів зрілим насінням сої та льону	72
3.1.2. Морфометричні параметри змінюються в умовах хронічного опромінення	75
3.2. Пошукова протеоміка на основі двовимірної гелі електрофорезу забезпечує глибокий молекулярний аналіз рослин.....	78
3.2.1. Стрічки з іммобілізованим рН градієнтом вузького діапазону необхідні для зменшення ефекту перекриття білкових плям	78
3.2.2. Розвиток у радіоактивно забрудненому середовищі чорнобильської зони спричинив зміни протеому насіння.....	80
3.2.3. Білкові гелі-мапи насіння сої та льону зібраного протягом дозрівання після двох років вирощування на дослідних ділянках.....	84
3.3. Функціональна класифікація для об'єктивного аналізу протеому та концептуальні моделі реакції рослин на зростання в умовах хронічного опромінення	86
3.3.1. Функціональна систематизація ідентифікованих білків сої на сім основних категорій.....	86

3.3.2. Складові моделі молекулярних реакцій сої на хронічне опромінення	96
3.3.3. Функціональна класифікація білків льону на дев'ять груп.....	101
3.3.4. Комплексна відповідь льону на забруднення радіонуклідами	119
3.3.5. Субклітинна локалізація білків вивчених рослин	123
3.4. Дослідження молекулярних змін у наступному поколінні протягом розвитку	123
3.4.1. Функціональна класифікація змін другого покоління насіння.....	123
3.4.2. Радіаційний стрес істотно модифікує біохімічні шляхи первинного метаболізму насіння.....	124
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ	128
ВИСНОВКИ.....	134
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	136
ДОДАТОК. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ	153
Список публікацій:.....	153
Апробація матеріалів	155

ПЕРЛІК СКОРОЧЕНЬ

ЧАЕС – Чорнобильська атомна електростанція
КН – коефіцієнт накопичення
SOD – супероксид дисмутаза
САТ – каталаза
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
МАРК – мітоген-активуючі протеїн кінази
РФК – реактивні форми кисню
РНК – рибонуклеїнова кислота
НАДФН – нікотинамід динуклеотид фосфат
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
AFLP – поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів
QTL – локуси кількісних ознак
ГХ – газова хроматографія
МС – мас-спектрометрія
УВЕРХ – ультрависокоефективна рідинна хроматографія
ЯМР – ядерний магнітний резонанс
ПТМ – посттрансляційні модифікації
2-ВЕ – двовимірний гель електрофорез
pI – ізоелектрична точка
Mr – молекулярна маса
ДСН – додецилсульфат натрію
EST – експресовані секвеновані послідовності
MALDI – лазерна десорбція іонізація за допомогою матриці
ESI – іонізатор типу електроспрей
РУБІСКО – рибулозо біфосфат карбоксилаза оксигеназа
ЗБН – запасні білки насіння
ІЕФ – ізоелектричне фокусування
ПАГЕ – поліакриламід гель електрофорез
Q – мас-аналізатор типу квадрупол

TOF – мас-аналізатор типу часу прольоту

PLGS – програма ProteinLynx Global Server

NCBI – Національний центр біотехнологічної інформації

LEA – білок пізнього ембріогенезу

GAPDH – гліцеральдегід-3-Р дегідрогеназа

HSP – білки теплового шоку

АТФ – аденозин трифосфат

FAB – фруктозо біфосфат альдолаза

тРНК – транспортна рибонуклеїнова кислота

АДФ – аденозин дифосфат

ВСТУП

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 (1). 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 (2). Таким чином, екосистеми зони відчуження продовжують зазнавати хронічного опромінення. У численних експериментах дослідники вивчали зміни біоти під впливом опромінення на онтогенетичному, морфологічному, генетичному та молекулярному рівнях. Було знайдено різні феномени: зниження фертильності та продуктивності, мінливі загадкові радіоморфози, зростання частоти хромосомних аберацій, гіперметилування дезоксирибонуклеїнової кислоти, синтез стресових білків та навіть популяційні зміни (3,4). Врешті між експертами виник консенсус, що адаптація рослин до хронічного впливу радіонуклідів є складним процесом, який включає індуковані генетичні мутації, ендегенні епігенетичні зміни, але також регуляцію експресії генів.

Відомо, що ефекти гострого опромінення пропорційно залежать від дози та опосередковані у першу чергу вільними радикалами. Пошкодження дезоксирибонуклеїнової кислоти у ядрі є основною ініціюючою подією, що викликає ураження органів і тканин організму. З іншого боку, при малих дозах часто спостерігається нелінійність ураження. Ключовими поняттями при описі ефектів малих доз стали: ефект свідка, геномна нестабільність та радіоадаптація (5). Досі в експертному середовищі відсутній консенсус, щодо деталей дії хронічного опромінення на біохімічному рівні у живих клітинах (6,7). Вивчення росту і розвитку сільськогосподарських рослин у забруднених радіонуклідами ґрунтах чорнобильської зони відчуження, може дозволити прояснити перспективи використання земель у господарській практиці для нехарчових цілей (8). Зокрема,

соє широко використовується у сільському господарстві через високу пропорцію вмісту білків у насінні, а традиційний для України льон йде на виробництво натуральних волокон або цінної олії (9,10).

Історично у радіобіології широко використовувались класичні біологічні методи, наприклад спостереження за циклами розвитку, фіксування морфологічних змін і цитогенетичне дослідження мутацій (11). Протягом останніх років відбувався вибуховий розвиток методів системної біології, які дозволяють 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 може провести одночасний моніторинг змін сотень білків, які беруть участь у різноманітних біохімічних шляхах метаболізму клітин. Для глибокого аналітичного розділення протеому використовується двовимірний гель електрофорез інтактних білків або ультрависокоєфективна рідинна хроматографія пептидів спряжена з мас-спектрометрією (12,13). 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 (14). У літературі є чимало прикладів успішного використання протеоміки для пояснення роботи сигнальних шляхів, фізіології насіння, а також радіаційного стресу після гострого опромінення (15,16).

Зв'язок роботи з науковими програмами та проектами

Дисертаційне дослідження реалізувалось 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

"Understanding of Plant Adaptation in the Radioactive Chernobyl Area" ("Розуміння адаптації рослин у радіоактивно забрудненій чорнобильській зоні").

Мета і завдання дослідження

Мета дослідження: оцінити здатність рослин рости і розвиватись у забрудненому середовищі зони відчуження шляхом аналізу протеому насіння.

Завдання дослідження:

- ✓ визначити накопичену еквівалентну дозу від радіонуклідів ґрунту, а також оцінити загальний фізіологічний стан насіння хронічно опромінених рослин, порівнявши морфометричні параметри;
- ✓ провести аналіз протеому зрілого насіння вирощеного за дії радіонуклідного забруднення, використавши двовимірний гель електрофорез;
- ✓ системно проаналізувати функціональні зміни протеому рослин, обумовлені їх зростанням на забруднених радіонуклідами ґрунтах;
- ✓ охарактеризувати динамічні тренди протеому протягом різних фаз розвитку насіння другого покоління в умовах чорнобильської зони відчуження;
- ✓ інтегрувати отриману інформацію молекулярно-біологічних змін у теоретичні схеми реакцій сої та льону, виявивши потенційно критичні для виживання в умовах хронічного опромінення білки;
- ✓ створити модель змін протеому за впливу радіонуклідного забруднення, окресливши універсальні та видоспецифічні реакції.

Об'єкт дослідження – процес реакції сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорт "Сонячна" і льону (*Linum usitatissimum* L.) сорт "Київський" 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 стандартні фізіологічні аналізи насіння, а також вимірювання специфічної активності дозоформуючих радіонуклідів у ґрунті та тканинах рослин. Аналіз протеому: а) виділення білків; б) якісне

розділення, використовуючи двовимірний гель електрофорез; в) кількісне фарбування гелів колоїдним кумасі та аналіз за допомогою програми "ImageMaster"; г) ензиматичне розщеплення білків; д) ультрависокоєфективна рідинна хроматографія на колонках зворотної фази поєднана із 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 (двовимірний гель електрофорез у поєднанні з тандемною мас-спектрометрією), 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. Розроблено концептуальну модель онтогенетичної реакції сої і льону на хронічний вплив малих доз іонізуючої радіації. Новітній аналіз фізіологічних змін рослин у чорнобильському середовищі показав, що специфічним для сої було коригування балансу запасних білків опосередковане транспортерами, а унікальним для льону – модифікований сигналінг із впливом на алармони та зворотне фосфорилювання; 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. Результати отримані у ході виконання дисертаційної праці оцінено премією Національної академії наук України для молодих учених, а також 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

непродовольчих цілей, наприклад виробництва біопалива. Пошукова протеоміка показала комплекс біохімічних змін насіння сої та льону за дії хронічного опромінення, включаючи відомі алергени. 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 змін протеому насіння сої та льону, внаслідок впливу радіонуклідного забруднення, 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. Для виконання окремих завдань дисертаційної праці, що вимагали використання унікального обладнання, здобувач пройшов стажування на базі Інституту генетики і біотехнології рослин Словацької академії наук. Стажування фінансувалось конкурсною урядовою стипендією Словацької Республіки.

Апробація матеріалів дисертації

Результати представлені у дисертаційній праці було представлено на 10 конференціях в Україні та закордоном, за матеріалами яких опубліковано тези, з них 3 – в наукових журналах та 2 оцінені грамотами за найкращу доповідь серед молодих дослідників.

Основні положення дисертації були представлені та доповідались 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 конгресам Міжнародної організації протеоміки рослин (Гамбург, 2014 і Братислава, 2016). Також окремі результати дисертації доповідались на наукових семінарах Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України і Інституту генетики і біотехнології рослин Словацької академії наук.

Результати представлені у дисертаційній праці було оприлюднено у 8 повнотекстових публікаціях, включаючи 5 статей у рецензованих міжнародних часописах, один розділ у книзі та 2 рукописи у матеріалах конференцій.

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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Радіоактивний фон як антропогенний фактор довкілля

1.1.1. Найбільші антропогенні на ядерних реакторах

Ядерна енергія вважається економічно вигідною та відносно чистою, оскільки внаслідок її виробництва не відбувається масштабних викидів забрудників довкілля (якщо враховувати нормативні радіоактивні викиди). Тим не менше за роки її використання відбулося кілька інцидентів більшого чи меншого масштабів. Вибух одного з чотирьох реакторів Чорнобильської атомної електростанції (ЧАЕС) 26 квітня 1986 викликав найбільшу ядерну екологічну катастрофу в історії людства. Аварія вивільнила в атмосферу величезну кількість радіонуклідів, котрі забруднили значну частину Європи радіоактивними опадами. За приблизними оцінками в довкілля було викинуто $5,3 \cdot 10^{18}$ Бк радіації, без врахування благородних газів (17). Можна сказати, що руйнівний потенціал вибуху поблизу Чорнобиля дорівнює близько 100 атомних бомб. Експерти вважають, що лише 20% ядерного палива зруйнованого реактора (близько 40 тон) вступило в реакцію під час аварії (18). Таким чином, згаслий зруйнований реактор залишається потенційним джерелом викиду забрудників довкілля.

Аварія на ЧАЕС мала глобальні екологічні наслідки, оскільки великі площі сільськогосподарських угідь України, Білорусії та інших країн Європи були забруднені радіонуклідами. Незважаючи на факт, що більшість із вивільнених радіонуклідів розпалися за кілька днів, навіть тепер, через 31 рік після аварії, в навколишньому середовищі залишаються довгоживучі ізотопи, такі як ^{137}Cs та ^{90}Sr (2). За декади після аварії, радіаційна обстановка в зоні відчуження стабілізувалася і гостре опромінення із високою потужністю дози змінилось постійним хронічним опроміненням із низькою потужністю дози (19). Тим не менше, радіонуклідне забруднення великих територій залишається істотним. На основі дослідження проведеного в 2004 році, ефективна річна доза перевищила 1 мЗв в 290 населених пунктах де загалом проживає понад 100000 мешканців. Цей факт підкреслює важливість проблеми, яку необхідно вирішити для використання територій забруднених радіоактивністю в довгостроковій перспективі. Саме тому, масштабні

проекти з метою розробки найбільш ефективної стратегії майбутнього використання забруднених земель (20). Наша дослідницька група використовує чорнобильську зону відчуження як відкриту польову лабораторію для спостереження змін протеому в насінні сої та льону в процесі адаптації до радіоактивного середовища.

Важливо зазначити, що нещодавно (2011) відбулася інша значна катастрофа поблизу Фукусіми. Використовуючи авторадіограми, дослідники показали, що поверхневі тканини диких рослин Японії були сильно забруднені радіоактивним осадом. Зокрема, рослини зібрані навесні 2011 мали високий вміст радіоцезію, але вже під кінець літа вони практично не відрізнялись від контролю, незважаючи на стабільно високий вміст нуклідів в ґрунті (1). Тому ймовірно, що первинний пік вмісту забрудника був зумовлений радіоактивним пилом.

Важливим питанням залишається ліквідація наслідків катастрофи на ЧАЕС. Таким чином, інший аспект аварії включає рекультивацію забруднених ділянок. Заходи дезактивації розпочалися відразу після цієї жахливої події та включали: а) миття будівель і доріг спеціальним дезактиваційним розчином; б) застосування і подальше видалення полімерної плівки здатної поглинати радіоактивні забруднювачі; в) ущільнення поверхонь асфальтом; г) додавання чистого ґрунту на забруднені ділянки, таким чином досягаючи ефекту розведення (21,22). Крім того, протягом 31 року після аварії, мали місце і природні процеси ремедіації в чорнобильській зоні відчуження. Природна ремедіація відбувається за рахунок розпаду радіоізотопів та їх міграції в глибші шари ґрунту. Протягом останніх двох десятиліть, вміст радіонуклідів у сільськогосподарській продукції значно знизився, в основному завдяки розпаду ізотопів та застосуванню різних стратегій ремедіації в постраждалих районах України, Росії та Білорусії (23). Ліквідація наслідків аварії залишається болючим економічним питанням для України.

1.1.2. Поглинання радіонуклідів рослинами

Рослини є ключовою складовою екосистеми. Також вони опосередковують надходження радіонуклідів у організм людини. Теоретично можуть існувати нестабільні ізотопи будь-якого природного елементу. На практиці, усі елементи важчі за бісмут, що містить 83 протони, мають нестабільне ядро. Усі радіоактивні

елементи відрізняються за типом і енергією радіоактивного випромінювання. Радіонукліди спричиняють тривалий вплив на живі організми, тому що мають довгий період піврозпаду та високу біологічну доступність. Незважаючи на існування сотень радіонуклідів, абсолютна більшість із них є надзвичайно рідкісними. В довкіллі частіше зустрічаються: америцій-241 α γ , цезій-137 β γ , кобальт-60 β γ , йод-129 і йод-131 β γ , плутоній (кілька ізотопів) α β γ , радій (численні ізотопи) α γ , радон (численні ізотопи) α , стронцій-90 β , технецій-99 β γ , тритій β , торій (кілька ізотопів) α γ , уран (численні ізотопи) α γ . Саме вони є основними дозоутворювачами для живих організмів. Реальна фізична концентрація радіоактивних ізотопів у довкіллі є насправді дуже низька.

Радіоцезій – це один із головних антропогенних джерел внутрішнього та зовнішнього γ - та β -опромінення. Цезій хімічно схожий до калію елемент, тому Cs^+ ефективно транспортується ізольованими високоафінними до K^+ переносниками клітин кореня пшениці. Коефіцієнт накопичення (КН) – це співвідношення радіоактивності елемента в рослині до радіоактивності в розчині чи ґрунті. Цей параметр для радіоцезію істотно знижується при зростанні вмісту калію в середовищі. Дослідження конкурентних взаємодій на ізольованих переносниках калію, чудово узгоджуються із цілісною картиною поглинання цезію при різних концентраціях. Мінеральне голодування може індукувати експресію транспортерів, що мають низький ступінь селективності одновалентних катіонів, а це пришвидшує поглинання радіонукліду.

Міжвидова різниця по КН радіоцезію може перевищувати 10 разів. Загальним висновком є те, що представники родин *Amarantaceae*, *Chenopodiaceae* і *Brassicaceae* виявляють найвищий ступінь накопичення, але генетичні відмінності аграрних культур дуже незначні (24). Для радіоцезію КН особливо залежить від структури ґрунту та балансу калію. Зазвичай, його значення складає 0,001-1 для мінеральних глинистих ґрунтів, але може досягати 28 для органічних піщаних, також КН не залежить від фізичної концентрації радіоцезію в ґрунті. Цезій має високу мобільність у рослині, проте вміст при перерахунку на суху вагу завжди більший у коренях. Хоча варто зазначити, що для різних рослин характерні різні закономірності розподілу по

тканинах. Калієві канали, ідентифіковані в клітинах листя рослин, малоефективно транспортують радіоцезій. Швидкість фітоекстракції нукліду можна прискорити застосуванням добавок, наприклад було доведено, що додавання NH_4NO_3 чи $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, призводить до зростання акумулювання радіоцезію. Переносники K^+ мають низький ступінь дискримінації Cs^+ , а канали високий (25). Поглинання рослинами є головним шляхом міграції нукліду з ґрунту до харчового раціону людини. Радіоцезій ще дуже довго залишатиметься у ризосфері ґрунтів зони відчуження.

Іншим важливим дозоутворюючим фактором є радіостронцій. Результати досліджень показують – Cs^+ краще адсорбується із ґрунту ніж Sr^{2+} . Звичайно накопичення радіонуклідів, включаючи ^{90}Sr варіює для різних рослин. Підвищену акумуляцію різних небезпечних радіоактивних елементів було виявлено в розетковому листі дикоростучого арабідопсису зони відчуження (25). Цезій є розчинним у воді, а також мобільнішим за стронцій. Радіостронцій є хімічним аналогом кальцію, тому використовує однакові мембранні транспортні системи; аналогічно потрапляє у харчовий ланцюг людини у першу чергу шляхом міграції з ґрунту в рослини. Поглинання радіонуклідів істотно відрізняється навіть у різних сортів рослин. Наприклад, дослідження на забруднених ґрунтах чорнобильської зони відчуження довели, що сорти капусти накопичують різну кількість ^{90}Sr , причому КН між крайніми точками відрізнявся аж у 23 рази (26). Це дослідження показало, що вибір правильного сорту може забезпечити вирощування відносно безпечних продуктів навіть на істотно забруднених територіях. Інший проект мав на меті знайти чутливий біоіндикатор забруднення ^{90}Sr . *Tillandsia usneoides* є ефективним індикатором забруднення повітря. Виявилось, що рослина є стійкою до відносно високих концентрацій радіостронцію. Цікаво, що низькі концентрації цього важкого металу викликали зростання вмісту хлорофілів, але надлишок токсичного елементу навпаки, знижував вміст основних фотосинтетичних пігментів (27). З іншого боку, проникність плазматичної мембрани достовірно зростала в усьому діапазоні концентрацій, ймовірно внаслідок окисного стресу, а статистичний аналіз показав тісну позитивну кореляцію між відносною електропровідністю листя та вмістом ^{90}Sr .

Тому, саме цей параметр можна використовувати як непрямий біомаркер забруднення середовища радіостронцієм.

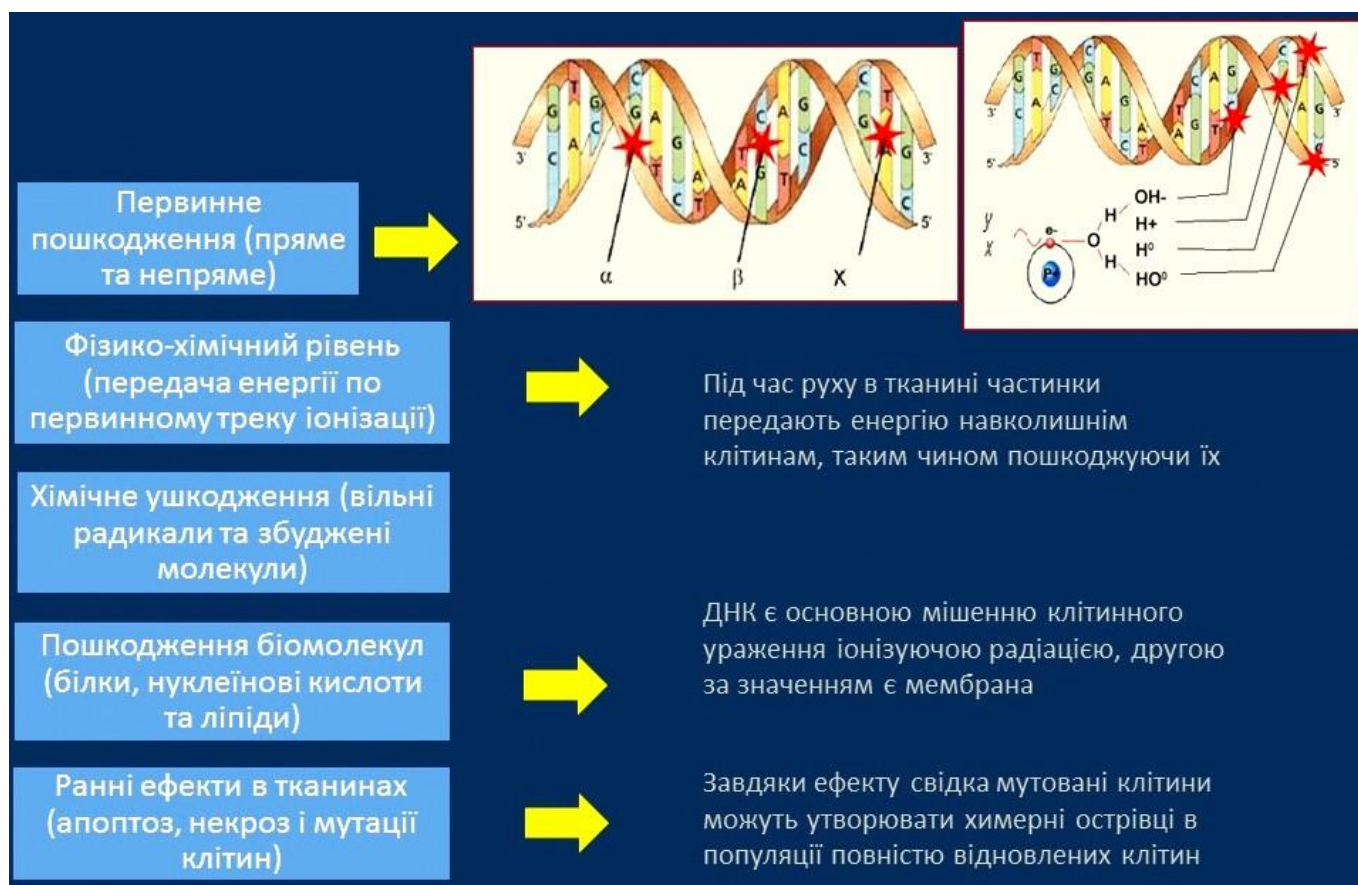


Рис. 1.1. Рівні біологічного ураження викликані іонізуючою радіацією.

Скорочення: дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК).

Різні культурні рослини мають широкий діапазон КН радіонуклідів із ґрунту. Зокрема, група дослідників показала, що співвідношення концентрацій рослина/ґрунт для ^{90}Sr є в діапазоні 0,02-2,44, а для ^{137}Cs – між 0,01-2,29. У першу чергу, концентрацію радіонуклідів вимірювали у господарсько цінних частинах рослин. Найнижче накопичення активного стронцію спостерігалось в органічних ґрунтах. Найбільше радіонуклідів накопичували листові культури наприклад салат та капуста (26). Отже, вирощування належного типу господарсько цінних рослин може істотно знизити небезпеку забруднення врожаю радіонуклідами. Мобільність радіонуклідів дуже сильно залежить від фізико-хімічних і механічних властивостей субстрату (28). Радіоцезій іммобілізується глинистими частинками ґрунтів, проте на багатих органікою ґрунтах характерна висока мобільність елементу. Оскільки спостерігався легкий перехід радіоцезію через харчовий ланцюг у органи овець, була накладена

заборона пасовищного використання мокрих і кислих ґрунтів (боліт) (29). Необхідне фундаментальне розуміння біогеохімічного шляху різних екосистем для комплексного прогнозування впливу забруднення. Хвойні та широколистяні породи лісових дерев вбирають радіоактивні частинки як фільтр. Потім мертве листя та голки переносять забруднення в ґрунт.

1.1.3. Механізми дії радіації на живі організми

Фактор спричиняє пряму та опосередковану дію на макромолекули. Головною мішенню серед біополімерів є дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК). Ефект, що розпочинається на фізичному рівні реалізовується хімічним ушкодженням. Іонізуюче випромінювання викликає порушення роботи макромолекул, виникнення вільних радикалів, які в свою чергу ініціюють окисний вибух у клітинах. Ключові ензими, які задіяні у знешкодженні вільних радикалів: супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) та аскорбат пероксидаза. Первинне пошкодження часто призводить до мутацій або навіть загибелі клітин. Це в свою чергу може порушити життєдіяльність клітин та цілого організму, в результаті чого спостерігається зниження темпів росту, морфологічні аномалії або порушення онтогенетичної програми (рис. 1.1). Крім того, при низьких дозах виявлено ряд химерних нелінійних явищ, наприклад нестабільність геному або диференційну експресію генів. У довгостроковій перспективі іонізуюче випромінювання впливає на генетичну структуру популяцій, часто знижуючи генетичну мінливість (30). Оскільки клітини реагують на іонізуюче випромінювання через складну мережу взаємопов'язаних сигнальних каскадів, які регулюють різні функції, постгеномні методи мають величезний потенціал для скринінгу усієї метаболічної мережі. Реакція біоти на умови в зоні відчуження ЧАЕС є складною функцією між дозою опромінення та індивідуальною чутливістю різних видів. Пробіг частинок у речовині зростає зі збільшенням енергії. Значна частина біологічного ураження обумовлена високоагресивним OH^* радикалом. Різні типи випромінювань мають різну біологічну ефективність, зокрема щільноіонізуюче (α -частинки) спричиняє істотно більше ураження при інших рівних умовах (31). Найнебезпечнішими радіонуклідами зони відчуження, завдяки широкому розповсюдженню, є ^{90}Sr , ^{137}Cs та ізотопи плутонію; з часом зростає вплив америцію.

Крива доза-ефект для рослин і тварин, зазвичай швидко зростає за низьких доз, а потім з'являється широке плато. З іншого боку, в умовах хронічного опромінення спостерігаються складніші закономірності (32).

Ключовим компонентом відповіді на опромінення є те, що будь-яка взаємодія цього фактора з ДНК призводить до пошкодження; якщо пошкодження не виправлене або невірно виправлене – це може ініціювати патологічні процеси. Мутації генів зазвичай викликають зміни їх експресії, а часто і повне зникнення відповідних білків, або принаймні зміни їх властивостей. Таким чином, може порушитись біохімічний баланс клітини, змінитись контроль клітинної сигналізації, а також порушитись проліферація і диференціювання. Як наслідок, замість перевірки ДНК і апоптозу мутантні клітини здатні перейти до клонального розмноження (рис. 1.1). Деякі немутаційні (епігенетичні) зміни чи пошкодження можуть бути залучені або навіть сприяти згаданим змінам (187). Іноді геном втрачає стабільність, дозволяючи накопичення подальших мутацій. Пошкодження ДНК в ядрі є основною ініціюючою подією, що викликає ураження органів і тканин організму. Дволанцюгові розриви в ДНК вважаються найбільш ймовірними кандидатами, що здатні заподіяти критичну шкоду. Одиночні треки випромінювання мають потенціал спричинити дволанцюгові розриви і за відсутності ефективної репарації призводять до тривалого ушкодження навіть при найнижчих дозах (33). Наявна значна гетерогенність досліджень мутацій як функції опромінення, тим не менше більшість авторів чітко показують підвищення мутаційного фону або цитогенетичні аномалії (34). Зокрема, нещодавній метааналіз літератури показав істотний ефект чорнобильського середовища на частоту мутацій при використанні жорстких статистичних критеріїв для оцінки достовірності впливів (3). Назагал, ефект забрудненого радіонуклідами довкілля на рослини виявився вищим у порівнянні з тваринами. Ймовірним віддаленим наслідком дослідженого феномену будуть зміни на популяційному рівні, навіть за межами забрудненої зони (3). Хоча наслідок підвищення частоти мутацій для цілісного організму залишається недостатньо зрозумілим.

1.2. Стрес та адаптація до іонізуючого опромінення

1.2.1. Концепція стресу та феномен адаптації рослин

Очевидно іонізуюче випромінювання можна і варто розглядати як класичний стресовий чинник. Рослини еволюційно пристосовані до різноманіття умов природного середовища. Інтенсифікація антропогенного тиску чи перенесення живих створінь до іншого екотопу призводить до появи градієнту селективних стресових факторів. Стрес – це реакція особини на стимул, що виходить за межі оптимуму для виду на даній фазі розвитку. Принципово різними є реакції на несприятливі впливи різні за тривалістю чи інтенсивністю. Стійкість до абіотичного стресу є комплексною ознакою, тож незважаючи на ідентифікацію численних задіяних генів, у нашому розумінні цієї властивості залишаються помітні прогалини. Сигнальні шляхи відіграють головну роль у розвитку тканин, проліферації клітин і фізіології гормонів. Після первинного сприйняття, сигнали спрямовуються на каскади трансдукції, які їх ампліфікують і збуджують паралельні шляхи. Шляхи передачі внутріклітинних сигналів є значною мірою універсальними та консервативними, вони здатні регулювати більшість фізіологічних та біохімічних процесів (35). В рослинах, що є геномними моделями, присутня велика кількість генів, які кодують складові каскадів мітоген-активуючих протеїн кіназ (МАРК). Цілком ймовірно, що ці каскади принаймні опосередковано задіяні в реалізації ефектів радіаційного ураження. Шляхи МАРК слугують як висококонсервативні сигнальні регулятори. Специфіка роботи різних каскадів у одній клітині забезпечується доменами взаємодії та білками адаптерами. В усіх рослин МАРК мають TEY чи TDY мотиви фосфорилювання в активних центрах. Для більшості МАРКК знайдено функціональні докази їхньої ролі. Також ідентифіковано кілька комплексних МАРК модулів, які іноді перекриваються, що відіграють головну роль у трансдукції сигналів як біотичних так і абіотичних стресів (36). Функціональні приклади ролі кіназ: AtANP1 – окисний стрес; MsSAMK – вплив важких металів; NtSIPK – осмотичний стрес; LeMPK2 – дія ультрафіолету В.

Результати дослідження адаптивних реакцій на опромінення в клітинах отримано на широкому експериментальному матеріалі. Явище радіоадаптації було

витлумачено як результат початкової невеликої (ініціюючої) дози, що активує механізми репарації та, як наслідок, знижує реакцію на подальшу більшу (тестуючу) дозу. Схоже діапазон ініціюючих доз є вузьким, а час застосування істотної тестуючої дози є критичним. У свою чергу, реакція сильно варіює між окремими суб'єктами. Тим не менше, адаптивну відповідь чітко спостерігали у різних системах, включаючи лімфоцити людини та різні клітини мишей. Фракціонування ініціюючої дози також істотно впливає на виживання організму при наступній тестуючій дозі іонізуючої радіації (37). Адаптивну відповідь здатні викликати деякі хімічні агенти, наприклад перекис водню і блеоміцин. Феномен адаптації рослин до іонізуючого випромінювання, тобто набуття підвищеної стійкості, чи навпаки радіосенсибілізації залишається контрверсійним, особливо у природних умовах.

Незважаючи на величезні масштаби аварії на ЧАЕС, місцева флора продовжує рости і розмножуватися в радіаційно забруднених ґрунтах. Однак чіткі механізми виживання рослин у радіаційно забрудненому середовищі залишаються не встановленими. Генетичне ураження ДНК може виправлятися репараційними системами. В літературі описано зниження активності систем репарації в пилку, внаслідок дії хронічного опромінення. З часом ефективність репарації ДНК повернулась до норми, але на ділянках із істотним α -фоном залишилось інгібування цих систем. Дані свідчать що на γ - та β -забруднених місцях відбувається адаптація, але на α -радіоактивних ділянках ні (38,39). Рослини є прикріпленими до субстрату та на відміну від тварин не можуть змінити місце існування для уникнення несприятливого впливу забрудненого довкілля. Тому логічно, що для виживання вони повинні адаптуватися до складних умов зростання. В іншій роботі дослідники додатковим опроміненням зробили тест на появу хромосомних аберацій в апікальній меристемі кореня. Для більшості тестованих видів рослини зібрані зі забруднених ділянок виявилися більш чутливими порівняно з контролем. Отже, зроблено висновок про відсутність адаптації та потенційно шкідливі мутації за дії екстремального фактору (40). Дикорослі рослини навколо ЧАЕС зазнали впливу високих доз іонізуючого опромінення після вибуху. Було проведено аналіз ефективності репарації розривів ДНК через 3 роки після аварії. Підвищення кількості

розривів ДНК після тест-дозы виявили у α -опромінених рослин, але цей ефект був відсутній у β -опромінених. З іншого боку, змін в інтенсивності репарації не виявлено (41). Лісові екосистеми найчутливіші до дії радіації, проте відсутнє достовірне підвищення частоти мутацій навіть у найзабрудненіших місцях.

Наявність чи відсутність радіоадаптації живих організмів важко спрогнозувати. Хронічний вплив радіації може відігравати роль екологічного фактора, змінюючи генетичну структуру природних популяцій (42). Генетичне різноманіття рудої полівки (модель генотоксичного впливу) у чорнобильській зоні достовірно не відрізняється порівняно з контролем. Генетичні дані цих популяцій не підтверджують гіпотезу, що мутації в забруднених регіонах є прямим наслідком аварії на ЧАЕС. Тобто робиться висновок, що мутації є лише результатом природної географічної варіабельності (43). Насіння опромінених популяцій може мати підвищену чутливість до подальшого впливу радіації. Інші дослідники навпаки стверджують, що рослини, які ростуть у зоні відчуження, проявляють ознаки адаптації. Ця неочікувана здатність рослин адаптуватися до забрудненого навколишнього середовища погано зрозуміла. У доповіді експертів Організації Об'єднаних Націй щодо чорнобильської катастрофи, також було формально заявлено, що екосистема відновилася до природного стану (44).

Власне ступінь ураження екосистем істотно залежить від дози отриманої протягом перших років після аварії. Фітоценози і тваринні угруповання, що зазнали найбільшого впливу, показують істотне зниження різноманіття, але ці ефекти відсутні в популяціях дрібних ссавців. Задokumentовано нелінійне зростання темпів мутацій залежно від дози. Спосіб запилення рослин є важливим фактором процесу адаптації. Самозапильні та перехреснозапильні рослини по-різному пристосовуються до опромінення впродовж кількох поколінь. У літературі показано, що самозапильні рослини мають більшу кількість пошкоджень ДНК (186). Цей феномен пов'язаний із надходженням зовнішнього генетичного матеріалу з територіально віддалених популяцій перехреснозапильних рослин. Накопичення пошкоджень у клітинах, зрештою впливає на біологічні параметри важливі для популяцій у цілому, наприклад продуктивність (34).

1.2.2. Молекулярні й біохімічні механізми реакції рослин на іонізуючу радіацію

Цікавим є питання про співвідношення специфічних і неспецифічних стрес реакцій. Глобальний профіль експресії при відповіді рослини на несприятливі умови прямо показав, що незважаючи на можливе перекриття різних реакцій: холод, засолення, зневоднення, тепло, надлишкове освітлення чи механічне ураження; виявляється низка генів унікальних для кожної відповіді. Зокрема відомо, що реактивні форми кисню (РФК) відіграють центральну роль як у біотичному так і абіотичному стресах, але різні гени РФК мережі мають унікальні закономірності експресії чи активності за різних стресових факторів. У регулюванні вмісту РФК арабідопсису беруть участь аж 152 гени. Стійкість до стресу – це комплексна ознака. Інформація від повногеномних аналізів стійкості до стресу в майбутньому допоможе висвітлити мережу реакцій відповіді на стрес та, ймовірно, скерує цільові зміни для підвищення продуктивності рослин (45). Будь-який організм для виживання повинен розвинути механізми стійкості, адаптації чи уникнення (втечі). Менше відомо про ефекти стресу на рівні цілої екосистеми. Можна навести чимало прикладів індукованих стресом змін спадкового апарату. Зокрема інфікування грибом *Peronospora parasitica* втричі підвищило геномні рекомбінації арабідопсису.

Підвищення генетичної гнучкості має полегшити еволюційну адаптацію популяцій до стресових умов середовища (46). Загадковий і вражаючий приклад стрес індукованих перебудов геному виявлено у льону – деякі сорти експоновані до різних умов середовища утворюють нащадків із різними стабільними спадковими ознаками; схоже що ці "варіанти" мають численні епігенетичні зміни у структурі ДНК. Стрес індукована транскрипція генів досягається через сигнальні шляхи. Такі відповіді вимагають присутності лігандів та участі сигнальних каскадів, які закінчуються транскрипційними факторами, що здатні коригувати відповідь. Звичайною відповіддю на стрес може бути послаблення епігенетичної регуляції, що призводить до активації репресованих послідовностей. Епігенетична перебудова структури хроматину може викликати широкомасштабні геномні ефекти та тісно корелює із транскрипційною активністю генів. Зокрема, припускається ключова роль інтерференції рибонуклеїнової кислоти (РНК) у цих змінах. Наслідком абіотичного

стресу можуть бути не лише запрограмовані фізіологічні відповіді, але також загальногеномні зміни. Наприклад, активація транспозонів, транспозиції та структурні зміни геному. В літературі було запропоновано модель стрес індукованого геномного шоку, де епігенетичні шляхи є одночасно як цілями програмованих реакцій так і наслідками уражень (47). Результатом є експресія послідовностей, що мовчать в оптимальних умовах, у свою чергу це веде до активації системи сайлінсингу, оскільки клітина намагається відновити регуляторний баланс.

Очевидно, що опромінення викликає істотні перебудови життєдіяльності клітин, які реалізуються зміною експресії генів, синтезу білків й активності ензимів. Протягом останніх 30 років були проведені численні дослідження з метою виявлення наслідків впливу радіаційно забрудненого навколишнього середовища на флору і фауну зони відчуження ЧАЕС. Гіпотетично вважається, що епігенетичні перебудови і зміни експресії генів задіяні в адаптації до хронічного опромінення низькими дозами. Контroversійним є питання мінімальної ушкоджуючої дози (48). Для сосни показано цитогенетичне пошкодження кореневої меристеми, що корелює з рівнем радіонуклідного забруднення (49). Було встановлено зниження генетичного різноманіття як функцію γ -доз. Чимало попередніх досліджень також виявили численні хромосомні аберації *Crepis tectorum* і *Secale cereale* популяцій чорнобильської зони та встановили факт, що дестабілізація геному дозозалежна, причому відносна ефективність низьких доз є вищою (50).

Варто зазначити, що було здійснено лише кілька глибоких молекулярних аналізів рослин, які зростають у радіаційно забруднених ґрунтах чорнобильської зони; отже, відсутнє чітке розуміння механізмів, що лежать в основі виживання. При мутагенній експозиції виявлено зростання експресії RAD1 (ексцизійна репарація) і CAT1, а також зниження частоти міжхромосомних гомологічних рекомбінацій (6). Можливим механізмом адаптації є стабілізація геному шляхом гіперметилування. Було показано, що ДНК рослин, зібраних у перші роки після аварії, була більш гіперметильованою, відповідно рослини пізніших років мали дещо вищу частоту рекомбінацій, але на ділянці із найбільшим радіаційним навантаженням ситуація була оберненою. Експресія антиоксидантних ензимів за норми репресована у досліджених

популяцій (6). При двогодинній експозиції на X-променях чи мутагені імітуючому радіацію "Rose Bengal", спостерігались різні тренди змін вивчених генів CAT1, SOD, RAD1 і RAD54 (репарація розривів ниток, найчастіший феномен при радіаційному пошкодженні) – це свідчить про відсутність універсального механізму адаптації. Полімодальний ефект маркеру окисних уражень показано при хронічному опроміненні різної інтенсивності (51).

Рослини забруднених територій виправляють розриви ниток ДНК не ефективною, але помилко-акумулюючою гомологічною рекомбінацією, а іншими репаративними системами. Крім того відзначалось, що нащадки рослин, які зростали в радіоактивному середовищі біля Чорнобиля, витримують більш високі дози мутагенів, а також мають знижену в 10 разів частоту міжхромосомних гомологічних рекомбінацій. Підсумовуючи, адаптація рослин до хронічного опромінення являє собою складний процес, який включає епігенетичну складову, стабілізацію геному, а також посттрансляційне регулювання (6). Нащадки *Arabidopsis thaliana*, зібрані у зоні відчуження, були стійкі до більш високих концентрацій мутагенів, ніж рослини контрольної популяції. Виявлено також гіперметилування ДНК в сосни, що вказує на роль епігенетичних ефектів у адаптації цієї рослини на забруднених радіонуклідами територіях.

В іншому дослідженні насіння дикорослих злаків було зібране із чистої зони і двох радіоактивно забруднених після випробування зброї ділянок; оцінена еквівалентна доза γ -опромінення у контролі становила $0,23 \text{ мкЗв} \cdot \text{год}^{-1}$, у забруднених зонах – $5,4$ та $25 \text{ мкЗв} \cdot \text{год}^{-1}$. Далі було проведено лабораторний експеримент із ґрунтовою активністю на початку культивування $461 \text{ Бк} \cdot \text{кг}^{-1}$ радіоцезію та $154,5 \text{ Бк} \cdot \text{кг}^{-1}$ радіостронцію. Аналіз варіантів виявив, що відповідь аскорбат пероксидази, монодегідроаскорбат редуктази і глутатіон редуктази не визначається місцем походження насіння, але активності SOD, CAT і глюкозо-6-Р дегідрогенази (постачає нікотинамід динуклеотид фосфат (НАДФН) для ефективного функціонування аскорбат глутатіонового циклу та інших систем знешкодження H_2O_2) сильно залежали від даного фактора. Більш чи менш істотне підвищення активності досліджених ензимів виявлено у рослин із популяцій, що зазнавали хронічного

впливу іонізуючої радіації за експериментального зовнішнього γ -опромінення (52). Врахування попередньо опублікованих результатів на тютюні дозволило припустити, що стійкість до окисного стресу обумовлена підвищеною експресією Cu/Zn SOD й аскорбат пероксидази, а активності монодегідроаскорбат редуктази та глутатіон редуктази залишаються незмінними. Модифікації активності ензимів мають генетичну природу, оскільки виявлені у нащадків десятиліттями хронічно опромінюваних рослин. У досліді із комбінованим зовнішнім γ - та внутрішнім β -опроміненням зафіксовано достовірне підвищення специфічних активностей SOD та глюкозо-6-Р дегідрогенази (52). Зростання в умовах впливу низькоінтенсивної іонізуючої радіації у природному середовищі призвело до селекції адаптованих генотипів, що характеризуються ефективною індукцією антиоксидантних ензимів, особливо SOD. Постає питання, чи можна незначне радіоактивне забруднення вважати селективним фактором, що призводить до генетичної модифікації локальної популяції.

Дуже важливо тестувати гіпотези у коректно модельованих експериментах. Припускається, що мінімальною фоновною інтенсивністю для статистично достовірних ефектів є $100 \text{ мкГр} \cdot \text{год}^{-1}$. Цікаві результати отримано при дослідженні експресії генів аналізом інгібування гібридизації – ізольовано 46 клонів зміненої експресії при активності радіоцезію у розчині $30 \text{ Бк} \cdot \text{см}^{-3}$. У цьому експерименті було показано, що ^{134}Cs викликає зміни профілю транскрипції. Досліджені активності не вплинули на морфологію чи розвиток об'єктів (53). Умови експерименту можна співставити із природною активністю чорнобильської зони, власне виявлено 41 індукований ген та 5 репресованих. Важлива група індукованих матричних РНК задіяна у рості, поділі та розвитку клітини (7 транскриптів). Кілька ідентифікованих транскриптів виявляють схожу динаміку при генотоксичному стресі. Індукувались лише 2 гени клітинної комунікації та трансдукції сигналу. Серед групи спорідненої із захистом та стресом виявлено наступні матриці: ексцизійної репарації ДНК, Mre11 (частина комплексу рекомбінації ДНК), тіоредоксин, САТ. Також змінену експресію мали 17 транскриптів невідомих функцій (53). Хоча необхідно зазначити, що дане

дослідження не дає повної картини транскрипційних змін, але навіть низькі дози хронічної іонізуючої радіації впливають на важливі клітинні процеси.

цитогенетичні пошкодження: аберації, мікросателітні мутації, геномні рекомбінації



епігенетика гіперметилування



індукція нестабільності геному, апоптоз

індукція репаративних систем

α - β + γ + RAD1 $\uparrow$

індукція антиоксидантних ензимів

CAT1 $\uparrow$ SOD $\uparrow$ пероксидаза $\uparrow$



передача сигналу ефекту свідка

MAPK каскади? p53?

аномалії метаболічних процесів

гліколітичні ензими

зміна онтогенезу



раннє цвітіння, зниження фертильності

зниження біологічного різноманіття



Рис. 1.2. Контroversійний феномен адаптації рослин до генотоксичного стресу внаслідок хронічного опромінення.

Скорочення: каталаза (CAT1), супероксид дисмутаза (SOD), мітоген-активуючі протеїн кінрази (MAPK).

Міжнародна група науковців вивчила зміни експресії генів рису на ділянках із підвищеним фоном γ -випромінювання внаслідок аварії поблизу Фукусіми. Кількісною полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР) було виявлено індукцію шляхів репарації ДНК, біосинтезу фенілпропаноїдів, а також апоптозу. Аналіз транскриптому виявив тисячі генів експресія котрих змінилась внаслідок дії радіації (7). Завдяки глибокому біоінформатичному аналізу було виявлено ключові біохімічні шляхи, задіяні в реакції на опромінення.

Відсутній універсальний механізм адаптації. Результати молекулярно-генетичного аналізу сосни, вирощеної у зоні відчуження ЧАЕС показали істотне

пошкодження ДНК геному та триразове збільшення кількості мутацій виявлених методом поліморфізму довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP). Було використано мікросателітні маркери як типові соматичні мутації, оскільки іонізуюча радіація є сильним мутагенним фактором. Частота мікросателітних мутацій істотно зросла порівняно із контролем (54). Також у сосни виявлено вищу варіабельність нуклеотидів генів CAT та глутатіон пероксидази. Древа мусять адаптуватись до хронічного опромінення чорнобильської зони, бо вони мають довгий життєвий цикл. У голках 50-річних дерев сосни було знайдено вищу варіабельність нуклеотидів досліджених генів, але в 20-річних, висаджених після аварії (не зазнали гострого опромінення), помітних змін не виявлено. Також відсутня кореляція між дозою та частотою мутацій генів CAT та глутатіон пероксидази. Аналіз профілів експресії CAT показав зростання вмісту транскриптів у обох опромінених популяціях (4). Ріст рослин у радіаційно забрудненому середовищі характеризується підвищеною частотою мутацій ДНК. Незважаючи на значний рівень захисту генома, рослини зони відчуження не здатні запобігти мутаціям, як це було показано в експериментах на зародковій лінії пшениці. Власне було використано ПЛР для характеристики пшениці, вирощеної на забруднених радіонуклідами і контрольних ділянках. Як результат, виявлено підвищену частоту мутацій мікросателітів. У більш пізніх поколіннях, ДНК пшениці характеризувалась появою і зникненням повторюваних послідовностей та збільшенням частоти гетерозиготних структурних варіантів пов'язаних із 13 однокопійними мономорфними локусами (55). Підсумовуючи, у рослин вирощених на радіаційно забруднених ґрунтах чорнобильської зони протягом одного покоління, послідовності 6 мікросателітних локусів містять складні мутації зародкової лінії, в тому числі випадки видалення локусів і вставок невідомого походження.

1.2.3. Нові парадигми радіобіологічних ефектів хронічного опромінення низькими дозами

Реалізація ефекту низьких доз є актуальним питанням сучасної радіобіології. Ключовими нещодавно описаними феноменами є ефект свідка, індукована нестабільність геному та радіоадаптація. Ефект свідка ймовірно реалізується ще не

описаними сигнальними молекулами і рецепторами. Геномна нестабільність може фенотипово проявитись апоптозом або злякисною трансформацією. В свою чергу, адаптивна відповідь має полімодальний характер. Відомо, що іонізуюча радіація спричиняє численні ефекти на рослини, від стимулювання росту до важких ушкоджень (5). Парадигми-концепції сучасної радіобіології: радіоадаптація, геномна нестабільність, втрата здатності сприйняття позиційної інформації, аномалії метаболічних процесів, кумулятивність доз, нееквівалентність зовнішнього та внутрішнього опромінення, теорія мішеней, відсутність порогу доз, соматичний гормезис, незалежні стохастичні та детерміністичні ефекти а також ефект свідка.

Важливим питанням сьогодення є ризик від низькодозового опромінення. Коли предметом вивчення є адаптація рослин до умов зони відчуження, при плануванні експерименту повинні враховуватись відмінності в реакції рослин на гостре і хронічне опромінення. Наприклад, рослини арабідопсису, що зазнали хронічного опромінення, показали раннє цвітіння в порівнянні з опроміненими рослинами, які зазнали рівної, але гострої дози. Крім того, на рівні транскриптому рослини відповідають на гостре опромінення подібно до інших абіотичних стресів (наприклад, важких металів), в той час як хронічно опромінені рослини відповідають кардинально інакше (56). Аналіз промоторів генів, які експресувались по-різному в хронічній і гострій групах, також підтвердив фундаментальні відмінності. Радіаційно індукована нестабільність геному при низьких дозах X- та γ -опромінення для клітин та цілісних організмів без виражених дефектів наразі експериментально не доведена. Іншими словами, для низьких доз єдиний відомий молекулярний механізм стохастичних ефектів ще не має чітких експериментальних доказів. Нелінійність ефектів при хронічному опроміненні можна пояснити варіабельною репарацією. Експресія генів внаслідок дії низькоінтенсивного опромінення є схожою на аналогічну при старінні. Опромінення в низьких дозах може викликати активну реакцію клітин як на сигнальний чинник. Вважається, що до ефекту свідка причетні продукти генів p53 і p23. Проте ще досі не існує надійного молекулярного маркера радіаційних уражень. Дослідження показали, що можливий пік біологічної дії малих доз є в діапазоні 1,0-2,5 сГр. Цікаво, що полімодальний характер змін виявлено як для наночастинок так і

низькоінтенсивної радіації, отже, токсикологічні закономірності для наночастинок можна використати для опису чи пояснення дії радіації та навпаки. Експерименти на ячмені, що зазнав внутрішнього опромінення радіостронцієм, довели вищу ефективність низьких доз, оцінену за частотою мутацій у пилковому тесті. Сучасне розуміння адаптації до іонізуючої радіації має багато компонентів (рис. 1.2). Ураження ДНК фенотипово проявляється хромосомними абераціями, що індукують нестабільність геному; цьому може запобігти гіперметилування. На молекулярно-біохімічному рівні рослини індукують антиоксидантні (CAT1 і SOD) та репараційні ензими, паралельно спостерігаються метаболічні аномалії (вміст ензимів гліколізу), а сигнал може поширюватись каскадами MAPK. Фізіологічним проявом є раннє цвітіння та зниження фертильності рослин, а на популяційному рівні відбувається зниження біорізноманіття.

Запропонована в дисертаційній роботі експериментальна модель потрапляє в діапазон дії низьких доз. Саме тому, було застосовано сучасні інструменти системної біології та розглянуто широкий спектр експериментальних досліджень радіаційних ефектів у клітинних системах, а також у цілісних рослинах і тваринах. Багата інформація про реакції рослин, а також фактори, що їх модифікують, дозволяє сформувати призму для вивчення ефектів опромінення людини. Крім того, фундаментальна радіобіологія в сучасності включає молекулярну радіобіологію, яка допомагає зрозуміти базові механізми відповіді на опромінення. Пошкодження субклітинних компонентів істотно впливає на функціонування цілісних клітин. Численні гени залучені в клітинну відповідь на радіацію, у тому числі репарації ДНК та регулювання клітинного циклу. Мутації цих генів викликають низку порушень в організмі людини, що проявляється у підвищеній чутливості до опромінення. Наприклад, мутації одного із багатьох генів контрольної точки можуть призвести до нестачі часу для відновлення пошкоджень, бо клітина втрачає здатність затримувати цикл поділу після шкідливого опромінення. Також може зростати ризик розвитку захворювань у наступних поколіннях (57). Клітини мають кілька біохімічних шляхів здатних розпізнати і боротись із конкретними формами ушкодження. Білок p53 контролює як арешт клітинного циклу так і один із шляхів апоптозу. Подальша

індукція геномної нестабільності шляхом мутацій у клонах клітин, напевно, є критичною подією. Немішенні ефекти опосередковані фундаментальними механізмами клітинного гомеостазу (58). Реалізація індивідуальної відповіді є, безумовно, функцією генотипу. Таким чином, мутації генів відповіді на пошкодження ДНК відіграють важливу роль у спонтанному розвитку геномної нестабільності. Репарація іноді комплексних подвійних розривів ДНК схильна до помилок і визначається дозою, потужністю дози та якістю радіаційних ефектів клітини. Новітні наукові досягнення підкреслили відмінності у складності та придатності для ефективної репарації між стихійно-виникаючими і радіаційно-індукованими пошкодженнями ДНК. Ці дані наголошують важливість врахування природи пошкоджень для оцінки ураження при відповіді на низькі дози, а не лише їх загальної кількості.

1.3. Сучасні методики радіобіології культурних рослин

1.3.1. Перспективи та засоби системної біології

Системна біологія перебуває у фазі вибухового революційного розвитку. Ця нова дисципліна намагається впорядкувати каталог ключових компонентів клітини: 1) генів, 2) матриць, 3) білків, 4) метаболітів (рис. 1.3). Вона застосовує інтегральні підходи дослідження функціонування рослинного організму. Сучасна системна теорія швидко поширюється на нові сфери знань та зайняла важливу нішу в моделюванні життєдіяльності. Одночасний аналіз геному, транскриптому, протеому і метаболому дозволяє отримати комплементарні, взаємодоповнюючі та вичерпні дані (59). На порядку денному стоять амбіційні завдання встановлення ролі усіх генів рослин, а також закономірностей узгодженої роботи програм розвитку чи реакції на подразники. Перевагою, але одночасно і джерелом застережень, є висока чутливість засобів системної біології; на статистично детерміновані похибки методик накладається біологічна мінливість та пластичність рослинного організму. Функціональна геноміка ставить питання перекладу інформації послідовностей та розміщення генів, у розуміння їх функцій; по суті – це спроба пояснення сукупної роботи генів організму. Транскрипційні експерименти слід інтерпретувати із застереженням, тому що відсутня чітка кореляція вмісту кодуєчих РНК та білків.

Порівняльний аналіз генів – це важливий засіб вивчення генетичних та фізіологічних відмінностей сортів, таким чином можна маркувати локуси кількісних ознак (QTL). У сучасності домінує бачення, що ключем інтегральної системної біології є феноміка – аналіз колекцій мутантів. Феноміка включає дослідження мутантів протягом циклу розвитку в реалістичних умовах, фіксуючи різні параметри та інтегруючи у базу даних (60). Актуальні дослідження увійшли у фазу швидкої характеристики усіх генів рослини, завдяки потужному синергізму комплементарних підходів (рис. 1.3). Проте постгеномні дослідження метаболізму, транскриптому і протеому ще не дали чіткого розуміння шляхів раціональної інженерії цінних властивостей господарських рослин.

Кінцевою метою системної біології є поєднання геному та феному (сукупність фенотипових проявів). Велику частину нашого сучасного розуміння рослинних мереж відповіді на стрес отримано від функціонального аналізу генів арабідопсису у трансгенах. Більшість таких експериментів мали на меті розшифрувати функції генів, кодуючих кінцеві елементи ефектори: антипортери, білки теплового шоку (HSP), SOD; а не початкові компоненти регулятори: транскрипційні фактори чи кінази. Наприклад, акумуляція трегалози рослинами рису спричиняла вищу стійкість до різних абіотичних стресів (61). Описане в літературі дослідження протеому апопласту листя тютюну ідентифікувало 20 білків, кількість яких змінилась внаслідок сольового стресу. Зокрема вміст хітиназ зростає, а білки переносники ліпідів експресувались *de novo* (61). Доступність анотованих послідовностей геному дозволила застосування таких стратегій, як повний аналіз експресії генів. Маніпулювання головними регуляторами стресової відповіді можна застосувати для підвищення стійкості рослин. Аналіз на мікрочіпах, для розшифрування регуляції абіотичного стресу, було також використано для сигнальних компонентів, зокрема кіназ і фосфатаз.

Високоєфективний метаболічний скринінг вимагає автоматизованого паралельного аналізу багатьох сполук. Метаболіти – це функціональні еквіваленти, а не пряме відображення активності генів. Метаболоміку можна вважати фундаментом системної біології. Метаболіти не мають спільних хімічних властивостей, тож

сучасні методи дозволяють екстрагувати та розділити лише певну фракцію. Профіль метаболітів визначають за допомогою газової хроматографії спряженої із мас-спектрометрією (ГХ-МС), ультрависокоєфективної рідинної хроматографії (УВЕРХ) з різними типами детекторів та ядерного магнітного резонансу (ЯМР). Для побудови метаболічної карти застосовують аналіз потоків. Істотні зміни фенотипу іноді викликаються дуже незначними флуктуаціями концентрацій метаболітів. Для повної та всебічної характеристики живої системи визначальними є як аналіз метаболітів так і потоків. Ціль мережевого аналізу потоків – одночасно виміряти максимальну кількість процесів для побудови функціональної карти. Особливості рослинних систем: 1) компартменти із однаковими метаболітами, 2) дуплікація реакцій, 3) зворотність та циклічність процесів (62). Ключовим викликом моделювання мережевого аналізу потоків є те, що більшість біологічних систем мають індетерміністичний характер, тому дуже складно окреслити простір рішень, використовуючи лише стохіометричні обмеження. Для полегшення розуміння даних у контексті комплексних метаболічних шляхів застосовують різноманітні засоби візуалізації, наприклад "BioCyc Omics Viewer".

Новими методами можна побачити практично цілу живу систему на молекулярному рівні, але інформація зашифрована у тисячах точок даних є поза людською здатністю інтуїтивної інтерпретації. Сучасною необхідністю системної біології стало застосування біоінформатичних алгоритмів для інтерпретації великих масивів даних. Біоінформатика використовує інформаційні технології для поглибленого аналізу живих об'єктів. Актуальними завданнями цієї галузі знань є розробка ієрархічних баз для впорядкування зростаючих обсягів експериментальних даних отриманих у рамках системної біології. Біоінформатика інтегрує дані транскриптоміки, протеоміки, метаболоміки та феноміки. Вона є наслідком конвергенції біології та інформаційних технологій. Головні знахідки в галузі нових ензимів відбуваються шляхом аналогій із типовими. Стандартним засобом ідентифікації схожості послідовностей є "BLAST" (інструмент пошуку порівнянням послідовностей). Цікаво, що для вторинного метаболізму часто не спрацьовує критерій схожості, навіть віддалені ензими можуть каталізувати однакові реакції;

іноді проявляється поліфункціональність. Основною багаторівневою базою даних білкових послідовностей залишається "UniProt" (універсальний білковий портал). На сучасному порядку денному стоїть важливе питання трансляції повної геномної ДНК у структури білків, а отже їх функції; даний крок поєднає генетику організму із фенотипом.



Рис. 1.3. Системна біологія – інтеграція "омік" забезпечує комплементарні, взаємодоповнюючі та вичерпні дані.

Скорочення: ядерний магнітний резонанс (ЯМР), газова хроматографія спряжена із мас-спектрометрією (ГХ-МС), двовимірний гель електрофорез (2-ВЕ), ультрависокоєфективна рідинна хроматографія (УВЕРХ).

Для білків характерні масові посттрансляційні модифікації (ПТМ). Наприклад, у геномі людини є близько 20000 генів, але виявлено в п'ять разів більше білків. Розмір і складність наборів даних, отриманих методами протеоміки та транскриптоміки (наприклад, списки білків/транскриптів кількість яких змінилась за

дії стресу) постійно зростає. Тому відбувається активний перехід від суб'єктивної експертної інтерпретації до об'єктивного аналізу за допомогою новітніх алгоритмів. Це забезпечує адекватну інтеграцію нових даних у існуючу систему знань (14). Першим кроком функціонального аналізу, зазвичай, є виявлення генних онтологій (функціональних класів), які збагачені за експериментальних умов. Другим кроком може бути картування знайдених білків, матриць і метаболітів на біохімічні шляхи. Корисним інструментом напівавтоматичного аналізу рослинних даних є програмний пакет "MapMan" (63).

1.3.2. Пошукова протеоміка інструмент поглибленого розуміння суті фізіологічних процесів

Протеоміка швидко перетворюється із молодого дисципліни до галузі знань із вагомим впливом на біологію рослин. Проте вона має чимало унікальних проблем, які необхідно вирішити. Раніше біохіміки вивчали дрібні кластери споріднених компонентів метаболічних шляхів, тепер можна прямо досліджувати комплексні фізіологічні процеси на молекулярному рівні. Питання протеоміки варіюють від ідентифікації білків до характеристики ПТМ чи міжбілкових взаємодій. Повний аналіз протеому створює найбільш адекватну картину фізіологічного стану системи в даний момент часу, тому критичний для розуміння регуляторних властивостей ознак організму. Екстрагування білків є важливим кроком для досягнення оптимального результату. Виділити білкову фракцію із рослинних тканин доволі складно, тому що вони багаті протеазами, окислювальними ензимами й сполуками котрі заважають розділенню чи ідентифікації білків (поліфеноли клітинної стінки, полісахариди включаючи крохмаль, олія та різноманітні вторинні метаболіти) (64). Найпоширеніші методи екстрагування білків рослин: 1) ізоляція фенолом із наступним осадженням амоній ацетатом у метанолі (метод було успішно використано, зокрема для дослідження протеому листя оливкового дерева, а також бідних білками тканин, наприклад шкірки помаранча чи фруктів томату); 2) осадження трихлорацетатом у ацетоні з інтенсивним промиванням (протокол чудово працює для ювенільних тканин, але дає гірші результати при високій концентрації

маскуючих сполук). Для ефективного виділення білків також використовують додавання детергентів, відновників, хаотропів та ензимів.

Повноти результатів можна досягти інтенсивним фракціонуванням протеому. Суть найбільш популярного методу розділення двовимірного гелю електрофорезу (2-ВЕ) – перший крок фокусування білків по ізоелектричним точкам (pI), а другий напрям розділення по молекулярним масам (Mr) (12). Відтворювана двовимірна протеомна карта є сталим візуальним джерелом. Після 2-ВЕ, що має високу роздільну здатність, білки проявляють колоїдним кумасі (чутливість 0,1-10 мг, широкий діапазон кількісного аналізу, безпечні реактиви), сріблом (чутливість 0,5-50 нг, вузький діапазон кількісного аналізу, токсичні реактиви) або флуоресцентними барвниками "Sypro Ruby" чи "Deep Purple" (чутливість 0,2-2000 нг, дуже широкий діапазон кількісного аналізу, але необхідний спеціальний дорогий сканер). Іноді джерелом проблем є недостатня відтворюваність гелів; також коректний аналіз та вибір плям, що накопичуються по різному, вимагає використання адекватних статистичних тестів. Найсучаснішою модифікацією методики, яка дозволяє уникнути більшості недоліків є "DIGE" (електрофорез багатьох зразків у одному гелі). Протокол передбачає попереднє маркування зразків різними флуоресцентними барвниками (Cy2, Cy3 і Cy5), що дозволяє нанести експериментальні варіанти на один гель. Методика 2-ВЕ технічно складна, оскільки відсутній універсальний протокол оптимальний для всіх зразків. Перевагою є легке поєднання з імуноблотингом, а головним недоліком – доведений факт, що трансмембранні спіралі білків дуже погано розділяються на денатуруючих 2-ВЕ гелях. Також існують флуоресцентні барвники здатні специфічно реагувати із фосфопротеїнами та глікопротеїнами, таким чином дозволяючи вивчати ПТМ. Для ефективного та об'єктивного аналізу 2-ВЕ гелів використовуються програмні пакети. Наприклад, "SameSpot" дозволяє виявлення та моделювання плям, знаходження аналогічних плям на гелях біологічних повторів, а також виявлення статистично достовірних змін між групами гелів різних експериментальних умов, вимагаючи лише невеликого досвіду від користувача.

Для ідентифікації мембранних білків найкраще підходить попереднє фракціонування в органічних розчинниках чи хроматографія. Різні типи УВЕРХ

широко застосовують для фракціонування білкової/пептидної суміші, гнучкість і універсальність методики забезпечується різноманіттям стаціонарних та мобільних фаз. Головні типи УВЕРХ корисні для протеоміки: а) зворотна фаза – розділення за гідрофобністю, б) катіон/аніон обмінна – повний заряд молекули, в) афінна – специфічні функціональні групи, г) гідрофільної взаємодії – наявність полярних груп. При хроматографії зворотної фази пептиди адсорбуються на гідрофобній поверхні пористих частинок вкритих алкільними ланцюгами, аналіти розділяються використовуючи градієнт гідрофобного розчинника. У випадку іонообмінної хроматографії пептиди зв'язуються з матрицею завдяки електростатичній взаємодії, аналіти вивільняються шляхом підвищення іонної сили мобільної фази. Для поглибленого дослідження протеому використовують багатовимірну хроматографію, комбінуючи колонки різних типів, відповідно використовуючи для ефективного розділення різні властивості аналітів (13). Достатню ортогональність проявляють наступні комбінації: 1) сильна катіонообмінна / зворотна фаза, 2) гідрофільної взаємодії / зворотна фаза, 3) комбінація зворотної фази при різних рН 10,0/2,6. Перевагою комбінації зворотної фази є висока чистота розділених аналітів, що практично виключає матричні ефекти, а також гомогенний розподіл пептидів у різних фракціях. Пошукова протеоміка, що базується на фракціонуванні пептидів також має свої недоліки. Зокрема, однакові послідовності пептидів можуть бути складовими різних ізоформ, це іноді призводить до неоднозначної ідентифікації білків зразку.

Оптимальні пептиди для МС та пошуку в базах даних мають 6-20 амінокислот, їх можна отримати використовуючи трипсин. Ця протеаза специфічно гідролізує білки на С-кінці аргініну або лізину, за винятком коли наступною амінокислотою є пролін. Ефективним протоколом підготовки екстрактів для аналізу на МС є "FASP" (підготовка зразків за допомогою фільтра), який комбінує вигоди протеолізу в гелі та розчині. При "FASP" білки екстрагують сильним детергентом додецилсульфатом натрію (ДСН), таким чином забезпечуючи кращу розчинність, а протеоліз проводять після заміни буфера сечовиною на центрифужних колонках із фільтром, який пропускає низькомолекулярні сполуки (65). Потім чиста фракція пептидів

вимивається з фільтру. Використання "FASP" для аналізу органел забезпечило значно більшу глибину дослідження порівняно із альтернативними методами.

Ідентифікація по масових відбитках пептидів – це швидкий та простий метод, що чудово працює за наявності секвенованої анотованої геномної інформації. Інформація, кодована у тандемному спектрі, дозволяє встановити послідовність та природу/положення модифікацій пептидів. Після отримання спектрів фрагментації пептида-попередника можна рухатись двома шляхами: а) пошук у базах даних, б) секвенування *de novo*. Хоча перша опція значно легша, проте очевидно, що якщо цільовий білок відсутній у базах даних, *de novo* шлях залишається єдиною альтернативою (66). Чимало факторів впливають на успішність ідентифікації, зокрема вибір послідовностей для порівняння, дозволені похибки співпадінь і вибрані ПТМ. Зазвичай, підвищення специфічності пошуку знижує чутливість, також іноді однакові пептиди можуть належати різним білкам, що особливо помітно при дослідженні ізоформ. Адекватна інтерпретація результатів пошуку вимагає належного досвіду експериментатора.

Прогрес протеоміки визначався швидкими досягненнями МС та зростанням даних експресованих секвенованих послідовностей (EST) і повних геномів. Існуючі методики дозволяють швидку ідентифікацію 10^{-15} - 10^{-12} моль пептидів за наявних даних послідовностей. М'які техніки іонізації: лазерна десорбція іонізація за допомогою матриці (MALDI) чи використовуючи іонізатор типу електроспрей (ESI) – не призводять до руйнування біомолекул, селективні для різних пептидів; одночасне застосування обох разом із тандемною МС покращує успішність ідентифікації (67). Недоліком EST баз є те, що чимало білків відсутні або лише частково присутні, з іншого боку, існує багато помилок у геномних даних. Зокрема, часто трапляються помилки анотації (розміщення екзонів та інтронів гену) секвенованих геномів, які виправляють додатково інтерпретуючи EST (68). Кількісний аналіз протеому можна проводити використовуючи дані МС, навіть без застосування дорогих реактивів для мічення білків чи пептидів. Для цього на даний момент існує два методи: а) підрахунок спектрів, що вважається більш чутливим; б) вимірювання площі піку для точніших вимірювань.

Для розуміння сигнальних шляхів рослин виникла потреба їх глобального дослідження, зокрема методами фосфопротеоміки. Зворотне фосфорилування білків відіграє головну роль у більшості регуляторних процесів, що лежать в основі життя. Доведена участь сигнальних каскадів у забезпеченні реакції організмів на впливи середовища. Оскільки фосфопротеїни становлять дуже малу фракцію протеому, для аналізу слід застосовувати стратегію попереднього збагачення, використовуючи афінну хроматографію. Зворотне фосфорилування – найважливіша та найпоширеніша ПТМ білків, у певний момент вона присутня у близько 30% поліпептидів клітини. Також фосфопротеоміка – це ефективний інструмент ідентифікації субстратів кіназ. Геном арабідопсиса кодує орієнтовно 1000 протеїн кіназ, чимало трансмембранних рецептор-подібних кіназ, а модулі MAPK вважаються центральними компонентами сигнальних шляхів. Погано зрозуміло, що визначає сигнальну специфіку MAPK каскадів рослин. У тварин та дріжджів ключовими регуляторними факторами є домени взаємодії із субстратом і молекулярні адаптери, наприклад білки родини 14-3-3. Доведено необхідність роботи деяких ензимів у модифікації стрес стійкості. Зокрема, кілька Ca^{2+} залежних протеїн кіназ рису індукуються низькою температурою, а їх підвищена експресія покращує стійкість. Також було показано, що фосфорилування кальретикуліну рису та рибосомального білку S6 кукурудзи зростає за дії холоду. Інші дослідники ідентифікували повний MAPK каскад за рецепторами патогенів томату та тютюну. Фосфатази (комплементарні ензими), зазвичай виступають негативними регуляторами сигналіngu. Отримано успішні результати збагачення фосфопротеїнів сильною катіонообмінною хроматографією чи комбінованою сильною аніонообмінною та металоафінною. Ці методики дають можливість ідентифікувати сотні сайтів фосфорилування у різних організмів. Іншим популярним способом афінної хроматографії є використання оксиду титану як ліганду. В літературі показано наступний функціональний розподіл фосфопротеїнів кореня арабідопсису: сигналінг – 12, транспорт – 11, убіквітинування – 4, метаболізм РНК – 22, перебудова хроматину – 13 і т. д. Важливу інформацію дає також аналіз розподілу фосфорильованих білків по компартментам (69). На жаль, навіть глибокий аналіз

окремих сигнальних шляхів недостатньо пояснює біологічну роль повної регуляторної мережі.

За останнє десятиліття було досліджено протеом насіння різних рослин. Протеоміка має потенціал мосту між біохімічними, генетичними, фізіологічними та молекулярними стратегіями аналізу біологічних процесів. У сучасності відбувається трансформація від банального опису живих систем до характеристики ПТМ, міжбілкових взаємодій та глибокого аналізу контролю метаболічних мереж. У літературі описано метааналіз даних, для розуміння процесу статевого розмноження покритонасінних від фази цвітіння до стадії проростка. Таким чином, було з'ясовано, що функціональні групи білків насіння сої мають різні тренди змін кількості протягом фази накопичення резервів (15). Дослідження, що дали великі надійні набори даних про численні білки, включають роботу на люцерні. Люцерна є модельною рослиною для аналізу розвитку насіння бобових, саме тому, було проведено вивчення протеому протягом розвитку її насіння. Різну кінетику накопичення мали 120 білків включаючи: легуміни, віцеліни, конвіцеліни та ліпоксигенази. Вчені встановили, що основні запасні білки накопичуються у специфічному закономірному часовому порядку (70).

Інші лабораторії провели важливі експерименти на сої, ріпаку, ячмені та рицині. Порівняння протеомів дозрівання насіння рицини та сої дозволило підкреслити відмінності фотосинтетичного і нефотосинтетичного метаболізмів цих рослин. Схоже, що олійні не використовують енергію фотосинтезу насіння для накопичення запасних резервів. Застосування "DIGE" дозволило розділити 660 білкових груп насіння рицини. Знайдені основні функціональні групи: запасання 34%, енергія 19% і первинний метаболізм 15%. У рицини виявлено багато ізоформ САТ, конкретно – у 6 разів більше ніж у сої, також істотно вищий сумарний вміст цього ензиму. З іншого боку, у рицини в 11 разів менший сумарний вміст ізоформ рибулозо біфосфат карбоксилази оксигенази (РУБІСКО). Отже, наявні чіткі принципові відмінності енергетики запасання вуглецю у порівняних рослин (71). Представлені дані є необхідною прелюдією для порівняння з протеомами насіння інших багатих олією рослин. Крім того, протеоміка візуалізує біохімічні зміни незалежно від їх

транскрипційної, трансляційної або епігенетичної природи. Зміни в ДНК не завжди проявляються на рівні білка, отже, саме протеоміку бажано використовувати для поглибленого вивчення росту і розмноження рослин. Дані по експресії матриць і наявності білків було зібрано на 5 почергових стадіях дозрівання насіння арабідопсису. Дослідники отримали інформацію про 523 білки та більше ніж 22000 генів, а потім скомпонували 319 пар. Після статистичного порівняння закономірностей накопичення пар, було виявлено 56% пар, що узгоджувались, проте було також чимало білок-транскрипт дуплексів котрі не узгоджувалися (72). Кількісна протеоміка застосовується, зокрема, для поглибленої характеристики органел рослин (73). Білки клітини просторово організовані згідно функцій, тож встановлення субклітинної локалізації сприятиме глибшому розумінню фізіологічних і молекулярних функцій.

Протеоміка є корисним методом для аналізу рослин, вирощених на радіаційно забруднених територіях, тому що вона здатна кількісно визначати сотні білків у одному експерименті. Незважаючи на високу ймовірність суттєвих змін ДНК внаслідок росту в середовищі забрудненому радіонуклідами, значні зміни в кількості білків зрілого насіння можуть бути відсутніми. Протеом швидко змінюється та адаптується до сигналів довкілля. Протеоміка дозволяє глибоко оцінити молекулярно-фізіологічний стан організму, тому її все частіше використовують для пояснення радіобіологічних феноменів (16). Актуальним завданням є адекватна інтеграція з сучасними концепціями радіобіології. Можна припустити, що вплив зростання в радіоактивно забрудненому довкіллі на протеом буде помірним, оскільки подібні результати було отримано при дослідженні впливу іонізуючого випромінювання на клітини тварин. Порівняно невелика кількість білків печінки зазнали змін внаслідок опромінення щурів, включаючи маркери окисного стресу (74). Отже було показано, що протеоміка є точним інструментом для вивчення клітинних реакцій на іонізуючу радіацію. Оскільки локальне опромінення людини внаслідок нещасного випадку може спричинити серйозні пошкодження шкіри, прогнозування його наслідків важливе для успішної терапії. Тому команда дослідників використала "DIGE" для вивчення змін на білковому рівні, включаючи ПТМ (75). Деякі білки,

вміст яких змінився за короткий час після опромінення, а також ймовірні ПТМ, було запропоновано на роль прогностичних маркерів перебігу променевої хвороби.

1.3.3. Характеристика об'єктів дослідження

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) є однорічною трав'янистою рослиною, яка широко використовується у сільському господарстві. Основні запасні резерви насіння сої синтезуються протягом 4-5 тижня після запліднення. Запасні білки нагромаджуються у білкових вакуолях і білкових тілах, котрі асоційовані з ендоплазматичним ретикуломом. Цей процес відбувається після закінчення поділу клітин, а близько 20% сухої маси насіння становить олія. Американськими дослідниками було проведено глибокий аналіз протеому насіння сої протягом дозрівання із використанням гелів. Функціональний розподіл 216 унікальних виявлених білків: 28% невідомі, 22% первинний метаболізм, 10% запасання та локалізація білків, 8% ріст і поділ клітини, 7% сигналінг, 7% захист від інфекцій і т.д. Кількість білків задіяних у первинному метаболізмі знижувалась протягом дослідженого періоду дозрівання насіння, навпаки, вміст функціональної групи запасання та локалізації білків зростав. Кількість транспортерів залишалась практично стабільною; стресових білків було багато спочатку, а згодом їх вміст знизився на половину; кількість білків, котрі задіяні в енергетичних процесах, постійно зростала (9). Насіння імпортує цукрозу для забезпечення вуглецем синтезу основних класів запасних продуктів, отже регуляція її транспорту справляє величезний вплив на ріст і продуктивність. В одному з експериментів, проростки сої зазнали дії різних концентрацій натрій хлориду. З допомогою 2-ВЕ було досліджено реакцію протеому гіпокотилу та кореня (76). Дослідники виявили кілька білків кількість яких змінилась під впливом стресу в обох тканинах, що ймовірно відіграють ключову роль у адаптації до засолення. Затоплення викликає затримку росту і загибель більшості рослин, внаслідок обмеження виробництва енергії. Японські дослідники використали пошукову протеоміку для вивчення реакції сім'ядоль сої на затоплення (77). Найбільших змін зазнали білки функціональної групи задіяної у розвитку. Родина купінів знаходилась у центрі теоретичної моделі міжбілкових взаємодій. Також було чітко показано порушення трансляційних процесів. У підсумку, було запропоновано гіпотезу, що

феритин відіграє ключову роль у захисті від РФК при затопленні. У літературі описано експеримент по реакції протеому і фосфопроотеому корінців сої на затоплення, використовуючи кількісну МС (78). Таким чином, було підтверджено роль ПТМ у стрес-стійкості.

Льон (*Linum usitatissimum* L.) – це однорічна самозапильна трав'яниста рослина, що є третьою за об'ємом виробництва натуральних волокон і однією з п'яти основних олійних сільськогосподарських культур світу. Як правило, насіння льону містить 40% олії, 20% білку і 30% дієтичних біополімерів. Волокна рослини використовуються в текстильній, автомобільній і будівельній промисловостях; іншою цінною сировиною є лігнани оболонки насіння. Раніше олія насіння льону використовувалась переважно для різних промислових цілей, таких як виробництво лінолеуму, фарби, лаку, чорнил для принтерів, тощо. У сучасності, льон у першу чергу вирощують як олійну рослину для продуктів харчування, кормів і додатків функціональних продуктів, тому що він має високий вміст ω -3 жирних кислот. Більшість сортів олійного льону багаті α -ліноленовою кислотою (55-57% жирних кислот насіння), яку пов'язують із численними цілющими ефектами. Включення ω -6 поліненасичених жирних кислот (наприклад докозогексаєнової та ейкозопентаєнової) до харчового раціону людини покращує діяльність мозку. Льон має лише ω -3 поліненасичені жирні кислоти, які складно метаболічно трансформувати до ω -6 біологічно активних молекул (79). Нещодавно, льон став одним із ключових об'єктів біотехнології рослин, наприклад були розроблені ефективні протоколи соматичного ембріогенезу, а також методи культивування гаплоїдних тканин (80). Покращення, зберігання, оцінка та використання зародкової плазми льону – є в сучасності найбільш важливими напрямками досліджень. Після секвенування бібліотек комплементарної ДНК дослідники знайшли 851 теоретичну просту повторювану послідовність у геномі льону, найчастіше зустрічались тринуклеотидні мотиви; в цілому було виявлено 83 різних мотиви. Кілька праймерів було використано для оцінки поліморфізму сортів та відповідно їх генетичної спорідненості. Таким чином, дослідники розробили корисну схему маркування

генетичних ресурсів льону за допомогою AFLP (81). У майбутньому, це знайде застосування у картуванні цінних кількісних характеристик насіння.

Основною перешкодою для аналізу протеому льону є обмежені ресурси послідовностей геному. Ця ситуація останнім часом покращилася завдяки появі 59626 послідовностей у видоспецифічній базі даних і реконструкції повного геному з даних отриманих секвенуванням нового покоління, шляхом біоінформатичного опрацювання коротких секвенованих послідовностей. Дослідники також передбачили 43384 гени, які кодують білки, 86% з них мають гомологи в геномі арабідопсису, що свідчить про високу якість анотації на генному рівні. Цікаво, що протеом льону збагачений консервативними функціональними доменами (8). Крім того, глибокий аналіз експресованих послідовностей у різних тканинах льону також дав чимало нової інформації. Дослідники створили 13 бібліотек генів, активних під час різних фаз розвитку зародка. В цілому, секвеновано 261272 EST, включаючи транскрипційні фактори. Більшість виявлених генів вдалося функціонально описати на основі подібності послідовностей, але аж близько 20% ймовірно унікальні для льону. Нова база даних дозволить проводити більш глибокі молекулярні дослідження (82). В іншому проекті, методом AFLP були ідентифіковані численні нові гени задіяні в дозріванні насіння льону. Лише половина з них має істотну подібність послідовності до відомих генів інших рослин. Кількісна ПЛР підтвердила тканиноспецифічну кінетику 13 ключових регуляторів, присутніх під час дозрівання насіння (83). В цій роботі було обговорено еволюційно консервовані та унікальні механізми дозрівання.

На жаль, наразі було проведено лише кілька молекулярних аналізів запасних білків насіння (ЗБН) льону. Важливо відзначити, що аналіз протеому насіння на семи фазах розвитку підтвердив важливість біосинтезу ліпідів під час раннього ембріогенезу та фази заповнення насіння. Також це дослідження виявило, що в насінні льону працюють три шляхи асиміляції вуглецю (84). Якісний аналіз протеому було доповнено кількісним аналізом експресії ключових генів. Льон, як і всі інші багаті олією аграрні культури, містить у насінні велику кількість запасних білків. Використовуючи традиційну схему класифікації ЗБН на основі розчинності,

дослідники описали два основні компоненти – велику (12S) солерозчинну фракцію і малу (2S) водорозчинну фракцію, а також ізолювали 365 кДа глобуліновий комплекс. Для цього спочатку було використано аніонообмінну хроматографію, а потім денатуруючий та нативний гель електрофорез. Цей комплекс містить багато дисульфідів, але мало сульфгідрильних груп (85). В інших попередніх дослідженнях було описано деякі властивості напіно-подібного ЗБН, що ймовірно є частиною великого глобулінового комплексу.

Також було проведено кілька досліджень протеому льону за дії стресових факторів. У одному з них, біологи використали 2-ВЕ для виявлення змін у протеомі проростків внаслідок холодового шоку (86). Деякі сорти льону мають потенціал застосування для фітореMediaції забруднених кадмієм ґрунтів. Тому інша група вчених з'ясувала відмінності між двома сортами льону при порівнянні клітинних культур, отриманих із гіпокотилів, після обробки іонами кадмію. Було виявлено специфічні механізми реакції на дію забрудника у стійкого генотипу. Зроблено підсумок, що феритин і глутамін синтаза можуть слугувати молекулярними маркерами стійкості до кадмію (87). Наша група проаналізувала зріле насіння льону, зібране на очищених від радіонуклідного забруднення ділянках зони відчуження ЧАЕС. Цей експеримент відобразив спектр білків насіння льону, зібраного в регіоні, що зазнав забруднення радіоактивними ізотопами. Було використано 2-ВЕ із наступною УВЕРХ та МС/МС для ідентифікації домінантних білків зрілого насіння льону (10). Зважаючи на недостатню функціональну анотацію генів льону, роль 38% ідентифікованих складових протеому насіння залишилась невідомою. З іншого боку, значна пропорція виявлених білків задіяна у первинному метаболізмі. По-перше, наші дані сприяли глибокій молекулярній характеристиці рослин, зібраних із рекультивованих ділянок зони відчуження. По-друге, вони допоможуть створити теоретичні передумови для майбутнього господарського використання районів, очищених від забруднення радіонуклідами. Згодом, результати було розширено систематичним описом кількості білків протягом розвитку насіння льону (88). Дослідники отримали профілі змін 379 білкових точок, встановивши природу майже половини.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Рослинний матеріал і умови вирощування

Сою (*Glycine max* (L.) Merr., сорт "Сонячна") і льон (*Linum usitatissimum* L., сорт "Київський") вирощували на двох ділянках у безпосередній близькості від ЧАЕС. Координати ділянок було зафіксовано навігатором eTrex 30 (Garmin). Контрольні рослини вирощувались на чистій практично вільній від радіонуклідів ділянці, котру було закладено приблизно в 70 км від ЧАЕС, поблизу села Жукин (N51°16'572" E30°13'160"). Радіоактивно забруднена ділянка була вибрана в зоні відчуження, в районі села Чистогалівка (близько 5 км від ЧАЕС – N51°22'379" E30°01'384") (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Розташування дослідних ділянок.

Суцільна лінія обмежує 10-км зону відчуження Чорнобильської атомної електростанції, пунктирна лінія обмежує 30-км зону відчуження, зелене коло показує розташування відносно чистої контрольної ділянки, червоне коло визначає розташування радіоактивно забрудненої ділянки.

Місця вирощування було ретельно підібрано для забезпечення аналогічних ґрунтових і кліматичних умов. Ґрунт на обох ділянках є дерново-підзолистим, має суглинково-піскову текстуру із піщаних річково-льодовикових відкладень. Ґрунт містить 2,5% органічної речовини, має слабо-кислу реакцію рН 5,5 і середню поверхневу електропровідність 0,2 дСм·м⁻². Вміст основних елементів живлення істотно не відрізнявся. Дані про кліматичні умови протягом вегетаційного сезону отримано з метеорологічної станції міста Чорнобиль (табл. 2.1).

Таблиця 2.1.

Кліматичні дані протягом ростових сезонів від ранньої весни до пізньої осені.

місяць та рік	середня t, °C	максимальна t, °C	мінімальна t, °C	опаді, мм
квітень 2007	7,8	23,1	-5,0	23,6
травень 2007	17,1	32,9	-2,1	52,1
червень 2007	19,3	32,4	8,3	63,3
липень 2007	20,0	34,0	9,9	124,1
серпень 2007	20,2	36,6	6,1	40,4
вересень 2007	13,6	26,6	-0,9	40,3
жовтень 2007	8,5	23,4	-2,2	27,7
квітень 2008	10,1	20,9	-1,6	97,7
травень 2008	13,8	27,8	-0,5	33,5
червень 2008	17,7	30,3	4,0	38,0
липень 2008	20,0	31,4	6,2	96,0
серпень 2008	20,2	36,2	5,9	32,8
вересень 2008	12,8	33,3	4,5	199,2
жовтень 2008	9,9	21,4	-1,7	20,0

2.2. Морфометрія та фізіологічні аналізи сої та льону

Зріле насіння було зібране наприкінці вегетаційного періоду в 2007. Спочатку ми охарактеризували морфометричні властивості зібраного насіння, такі як: довжина, ширина, товщина, суха і сира маса (20 вимірювань). Схожість насіння було оцінено традиційно, шляхом розміщення 100 насінин у трьох пластикових чашках Петрі із фільтрувальним папером. Фільтрувальний папір змочували водою і чашки Петрі інкубували при 25 °C у темряві. Проростання фіксувалось як поява зародкового корінця з оболонки насінини. Динаміку набухання визначали за довжиною зародкового корінця протягом 3 діб. Вміст білку міряли методом Бредфорда (89). Олію було екстраговано за допомогою діетилового ефіру в апараті Сокслета, як описано раніше (90) у трьох незалежних повторях. Один грам насіння гомогенізували у ступці і висушували при 105 °C протягом 3 год. Потім приливали 250 мл діетилового ефіру і екстрагували олію протягом 16 год. Після екстрагування зразок висушували на повітрі до зникнення залишкового ефіру, а вміст олії визначали гравіметрично. Насіння протягом розвитку відбирали під час вегетаційного періоду в 2008.

2.3. Вимірювання активності дозоформуючих радіонуклідів

У зрілому насінні рослин, вирощених на дослідних ділянках, а також у зразках ґрунту, було визначено активність двох антропогенних радіонуклідів, що зазнають β -розпаду з періодом напіврозпаду близько 30 років – цезію-137 і стронцію-90. Питома активність ^{137}Cs у ґрунті була встановлена з використанням низькорівневої сцинтиляційної γ -спектрометрії на приладі СЕГ-001 (Атом Комплекс Прилад). Був використаний напівпровідниковий коаксіальний детектор Роpтор з особливо чистого германію (Ortec), із енергетично розділеним піком 1332,5 кеВ. Відносна ефективність вимірювання становила 20,7% (геометрія 20 мл скляного флакона). Для калібрування приладу використовувався стандарт, еталон ЕМ66 з щільністю 1,1 г·см⁻³, невизначеність становила 7% на 2 секунди. Отримані дані були проаналізовані за допомогою програми Gammavision версія 5.32 (Ortec). Фоновий спектр був записаний відразу до або після аналізу зразка. Специфічну ^{90}Sr радіоактивність визначали методом радіохімії. Протокол для кількісного визначення ^{90}Sr із

використанням β -радіометрії та низькофонового приладу UMF-1500M (Ortec) проводили як описано у літературі (91). Для того щоб охарактеризувати перехід радіонуклідів ^{137}Cs та ^{90}Sr з ґрунту в тканини рослин, були розраховані КН, шляхом ділення радіоактивності рослини на радіоактивність ґрунту. Сумарну еквівалентну дозу розраховували за загальновідомими формулами.

2.4. Аналіз протеому насіння сої та льону

Усі етапи експериментального протоколу схематично представлено на ілюстрації (рис. 2.2). Для вивчення змін кількості білків за хронічного впливу низьких доз радіонуклідного забруднення, використали пошукову протеоміку на основі 2-ВЕ.

2.4.1. Виділення білків

Наважку зрілого насіння 500 мг розтирали до стану дрібного порошку у простерилізованій фарфоровій ступці з рідким азотом у трьох біологічних повторях. Білки екстрагували за допомогою буферу з фенолом, на основі протоколу описаному в літературі (64). Білки виділяли 10 мл буферу для гомогенізації (50% фенол, 450 мМ сахароза, 5 мМ ЕДТА, 0,2% 2-меркаптоетанол, 50 мМ Tris pH 8,8) та перемішували на шейкері протягом 30 хв при 4 °С. Далі, після центрифугування при 5000 g протягом 10 хв при 4 °С, фенольну фазу відбирали у чисту пробірку та осаджували білки додаванням 5 об'ємів охолодженого 0,1 М ацетату амонію в метанолі, з подальшою інкубацією при -20 °С протягом 16 год. Наступного дня, після центрифугування при 5000 g протягом 10 хв при 4 °С, білковий осад інтенсивно промивали: двічі 0,1 М ацетату амонію в метанолі, двічі охолодженим 80% ацетоном і один раз 70% етанолом. Ізольовані білки висушували вакуумним центрифугуванням в апараті SpeedVac (Bachofen) і нарешті 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, при обережному перемішуванні протягом 30 хв при 20 °С, використовуючи Thermomixer Comfort (Eppendorf). Нерозчинні залишки видаляли шляхом центрифугування протягом 20 хв при 14000 g і 20 °С. Вміст білку визначали за інтенсивністю забарвлення, використавши комерційний реагент Бредфорда (Sigma-Aldrich) проти стандартної кривої з бичачого

сироваткового альбуміну в ролі стандарту. Аліквоти білків (700 μ г), котрі були поміщені у пластикові пробірки, зберігалися при -80 °С до початку аналітичного розділення.



Рис. 2.2. Експериментальний протокол виділення, розділення та ідентифікації білків.

Скорочення: двовимірний гель електрофорез (2-BE), додецилсульфат натрію (ДСН), поліакриламід гель електрофорез (ПАГЕ), ультрависокоєфективна рідинна хроматографія (УВЕРХ), мас-спектрометрія (МС), іонізатор типу електроспрей тандемний гібридний мас-аналізатор типу квадрупол часу прольоту (ESI-Q-TOF), ProteinLynx Global Server (PLGS).

2.4.2. Якісне розділення білків

Після цього, для максимального розділення білків, застосували класичний 2-BE. Розділення проводили використовуючи ортогональні властивості білків, а саме pI та M_r . Спочатку, в першому вимірі проводили ІЕФ, використавши стрічки із іммобілізованим градієнтом рН. Причому було використано 2 типи стрічок: а) із

широким градієнтом рН 3-10 для більш повного охоплення протеому; б) із вузьким градієнтом рН 4-7 для максимального розділення найбільш багатой зони. Безпосередньо перед ІЕФ, до зразків додавали 2% відповідних амфолітів носіїв, зокрема ampholine рН 3,5-10,0 (Sigma-Aldrich) для 17 см ReadyStrips рН 3-10 (Bio-Rad) і IPG buffer рН 4-7 (GE Healthcare) для 18 см DryStrips рН 4-7 (GE Healthcare). Об'єм зразка, що містив 700 μ г білка, було доведено буфером для ІЕФ до 315 μ л і 340 μ л для ReadyStrips і DryStrips відповідно. Зразки інтенсивно перемішували і центрифугували при 24000 g протягом 5 хв при 20 °С, щоб позбавитись преципітату. Супернатант обережно переносили у лоток для фокусування і сухі стрічки зверху накладали на зразок. Через 1 год пасивної регідrataції стрічки було вкрито мінеральною олією, а лоток для фокусування поміщено в пристрій Protean IEF Cell (Bio-Rad) (рис. 2.3). Блок був запрограмований для активної регідrataції протягом 10 год при 50 В, а потім три-крокового протоколу фокусування із обмеженою силою струму 50 μ А на лінію і швидким набором напруги на кожному кроці: 1) 100 В·год при 100 В, 2) 500 В·год при 500 В, 3) 70000 В·год при 8000 В. Для ІЕФ білків виділених із зразків другого покоління використовувались лише стрічки із вузьким градієнтом.

Після ІЕФ надлишок мінеральної олії було видалено і стрічки врівноважувались протягом 15 хв у 4 мл відновлюючого розчину (2% ДТТ в еквілібруючому буфері, що містив 1,5 М Tris рН 6,8, 6 М сечовину, 30% гліцерин і 5% ДСН) і протягом 15 хв у 4 мл алкілюючого розчину (2,5% йодацетаміда в еквілібруючому буфері). Потім стрічки промивали у буфері для електрофорезу (25 мМ Tris, 192 мМ гліцину і 0,1% ДСН), розміщували їх на поверхні поліакриламідного геля із ДСН (4% гель для концентрування і 12% гель для розділення) та заливали ущільнюючим розчином (0,5% агарози в буфері для електрофорезу з 0,002% бромоенолом синім для контролю фронту іонів). Другий вимір – поліакриламід гель електрофорез (ПАГЕ) проводився з використанням камери Protean II XI Cell (Bio-Rad) (рис. 2.3) та джерела живлення PowerPac Basic (Bio-Rad) при силі струму 10 мА протягом приблизно 14 год, до моменту зникнення лінії бромоенолу синього.

2.4.3. Фарбування і кількісний аналіз гелів

Після завершення 2-BE, гелі тричі промивали у деіонізованій воді протягом 15 хв, щоб видалити залишки ДСН і протягом ночі фарбували в колоїдному кумасі (20% етанолу, 1,6% фосфорної кислоти, 8% сульфату амонію і 0,08% кумасі діамантовий синій G-250) з допомогою обертової мішалки (Labnet). Двовимірні гелі були оцифровані з використанням денситометру Umax UTA-1100 (GE Healthcare) (рис. 2.3) при графічній роздільній здатності 300 точок на дюйм і 14-бітній глибині відтінків сірих пікселів або на денситометрі GS-800 (Bio-Rad) (рис. 2.3), використовуючи схожі параметри. Цифрові зображення аналізувались комплексним програмним пакетом ImageMaster 2D Platinum версія 4.9 (GE Healthcare), який включає оптимізовані алгоритми для виявлення плям, кількісного обрахунку, фільтрування фону, а головне – співставлення плям. Спочатку було створено віртуальний синтетичний гель, що містив усі виявлені плями як з експериментальних так і контрольних гелів, котрий було використано для співставлення плям. Для забезпечення високої якості даних порівняльного аналізу, бралися до уваги лише 2-BE плями виявлені принаймні в двох біологічних повторях. Інші плями були видалені з набору даних за критерієм невідтворюваності. Кількість білку у 2-BE плямах була виражена як об'єм (V), що є функцією інтенсивності забарвлення плями і площі, яку вона займає. Об'єм плями був нормалізований до загального об'єму усіх плям в аналізі, як відносний об'єм (%V), щоб компенсувати невеликі відмінності в кількості білків у зразках та фарбуванні гелів. Для вибору 2-BE плям, кількість яких змінилась у контрольних зразках порівняно зі зразками, які зазнали впливу радіонуклідного забруднення, застосували чіткий статистичний критерій. А саме, для розрахунку значення t для кожної плями, був використаний інтегрований у пакет ImageMaster 2D Platinum t -тест для двох зразків. Відповідні значення достовірності різниці p визначено для конкретних значень величини t кожної плями при 4 ступенях свободи. Лише плями з p -значенням не більшим 0,05 сприймалися як такі, що мають різне накопичення та вирізалися з гелю для подальшої ідентифікації.

Щоб виразити ступінь змін вмісту конкретного білку між насінням рослин вирощених на контрольних та забруднених радіонуклідами ділянках у зоні

відчуження ЧАЕС, було обраховано співвідношення для кожної 2-ВЕ плями. А саме, середній відносний об'єм отриманий із гелів експериментальних зразків ділили на середній відносний об'єм гелів контрольних зразків або навпаки (більше на менше). Таким чином, позитивне значення пропорції означає, що даного білку є більше в насінні рослин вирощених на забрудненій радіонуклідами ділянці, а відповідно негативне означає, що цього білку є більше в насінні зібраному з контрольної ділянки. Різні фази розвитку насіння другого покоління порівнювали окремо, використовуючи логіку аналізу описану вище. Додатковим критерієм була вимога наявності плями на гелях принаймні трьох фаз розвитку.

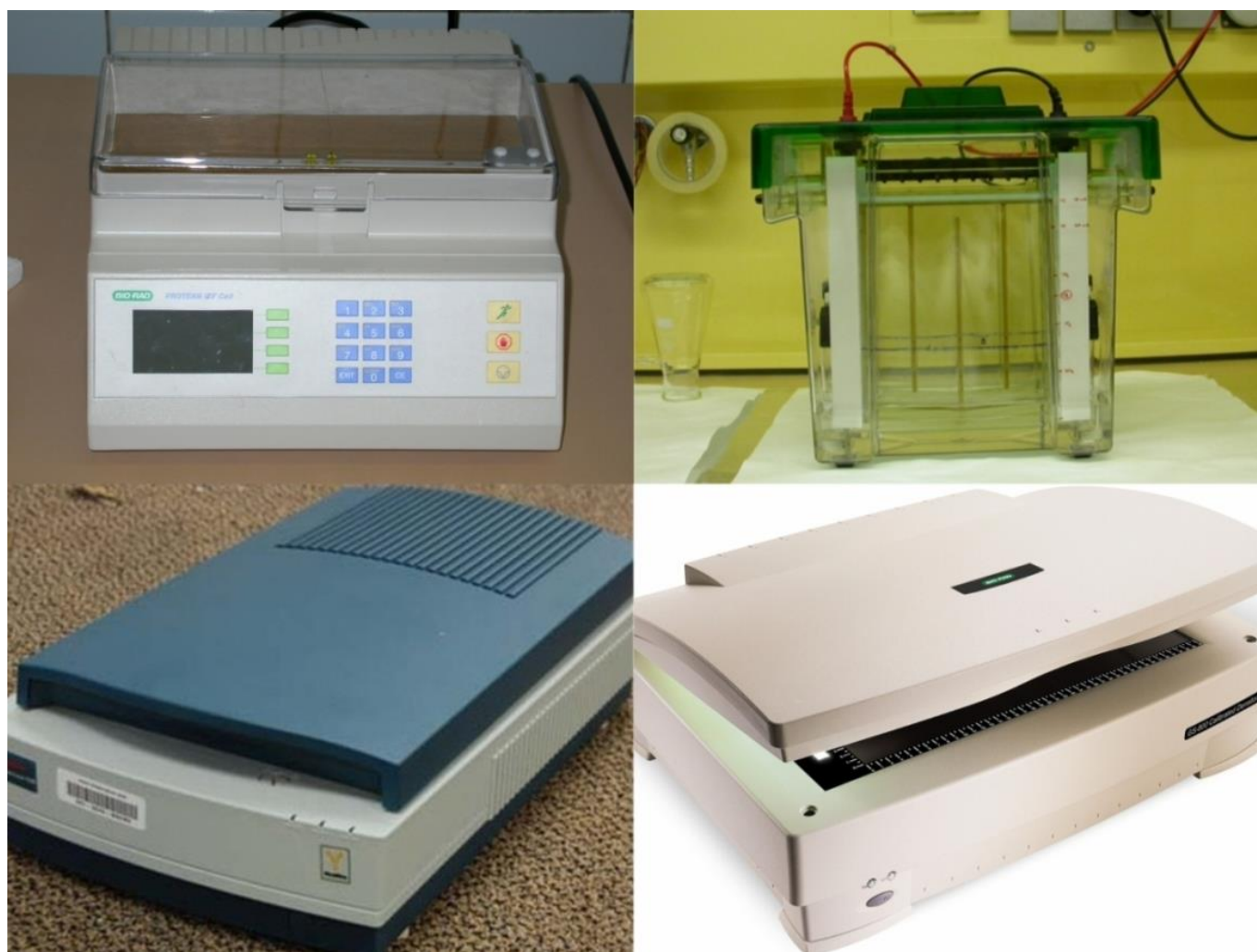


Рис. 2.3. Використане обладнання для розділення білків і сканування гелів.

Прилад для ізоелектричного фокусування Protean IEF Cell, камера для вертикального електрофорезу Protean II XI Cell, денситометри Umax UTA-1100 і GS-800.

2.4.4. Ензиматичне розщеплення білків

Вирізані з гелю шматочки поміщали у пробірки 1,5 мл типу епENDORF і принаймні тричі промивали протягом 15 хв 500 μ л розчину для промивання (50% ацетонітрил, 50 мМ бікарбонат амонію), щоб вилучити ДСН, солі і барвник, до повного візуального видалення синього забарвлення колоїдного кумасі. Особливу увагу приділяли уникненню масового забруднення зразків кератинами; маніпуляції проводили у ламінарному боксі, використовуючи рукавиці без пудри (92). Потім шматочки гелю зневоднювали в 100 μ л 100% ацетонітрилу протягом 5 хв та проводили регідrataцію в 20 μ л робочого розчину трипсину (Promega), що готувався розчиненням 20 μ г ліофілізованого модифікованого ензиму для секвенування у 1 мл 50 мМ бікарбонату амонію. Після цього, зразки інкубували протягом ночі (14-16 год) при 37 °C для розщеплення білків. Далі пептиди двічі екстрагували 50 μ л розчину для екстрагування (60% ацетонітрил, 1% мурашина кислота) при постійному перемішуванні протягом 10 хв. Об'єднані екстракти було перенесено в планшет і висушено шляхом ліофілізації або за допомогою центрифужного вакуумного випарювання. Зразки зберігали при -80 °C до подальших аналізів.

2.4.5. Ультрависокоєфективна рідинна хроматографія поєднана з тандемною мас-спектрометрією

Для ідентифікації білків виділені суміші пептидів, отримані з вирізанних плям, розчиняли у 20 μ л 2% ацетонітрилу та 0,1% мурашиної кислоти і розділяли шляхом УВЕРХ на автоматичній модульній установці nanoAcquity (Waters) (рис. 2.4). З кожного зразка відбирали аліквоту 2 μ л. Концентрування і відсолення зразка відбувалось на колонці-пастці Symmetry C18 діаметр 180 μ м, довжина 20 мм, розмір частинок 5 μ м (Waters), протягом 3 хв потік 2% ацетонітрил в 0,1% мурашиній кислоті 10 μ л·хв⁻¹. Швидке градієнтне елюювання здійснювалось на аналітичній колонці зворотної фази ВЕН 130 C18 діаметр 75 μ м, довжина 150 мм, розмір частинок 1,7 μ м (Waters) при швидкості потоку 350 нл·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 наконечником PicoTip зовнішній діаметр 360 μ м, внутрішній діаметр 20 μ м, діаметр

наконечника 10 μm (New Objective), котрий був встановлений в іонізатор високої напруги типу ESI модифікації для нанопотоку тандемного MS Micromass Q-TOF Premier (гібридний мас-аналізатор типу квадрупол часу прольоту, Waters) (рис. 2.4). Інструмент контролювався програмою MassLynx версія 4.1 (Waters). Важливі налаштування модуля утворення позитивно заряджених частинок: напруга на іонізаторі 3,5 кВ, температура камери іонізації 70 °С, тиск азоту 0,4 бар, потік аргону в камері зіткнення 0,48 $\text{мл}\cdot\text{хв}^{-1}$.

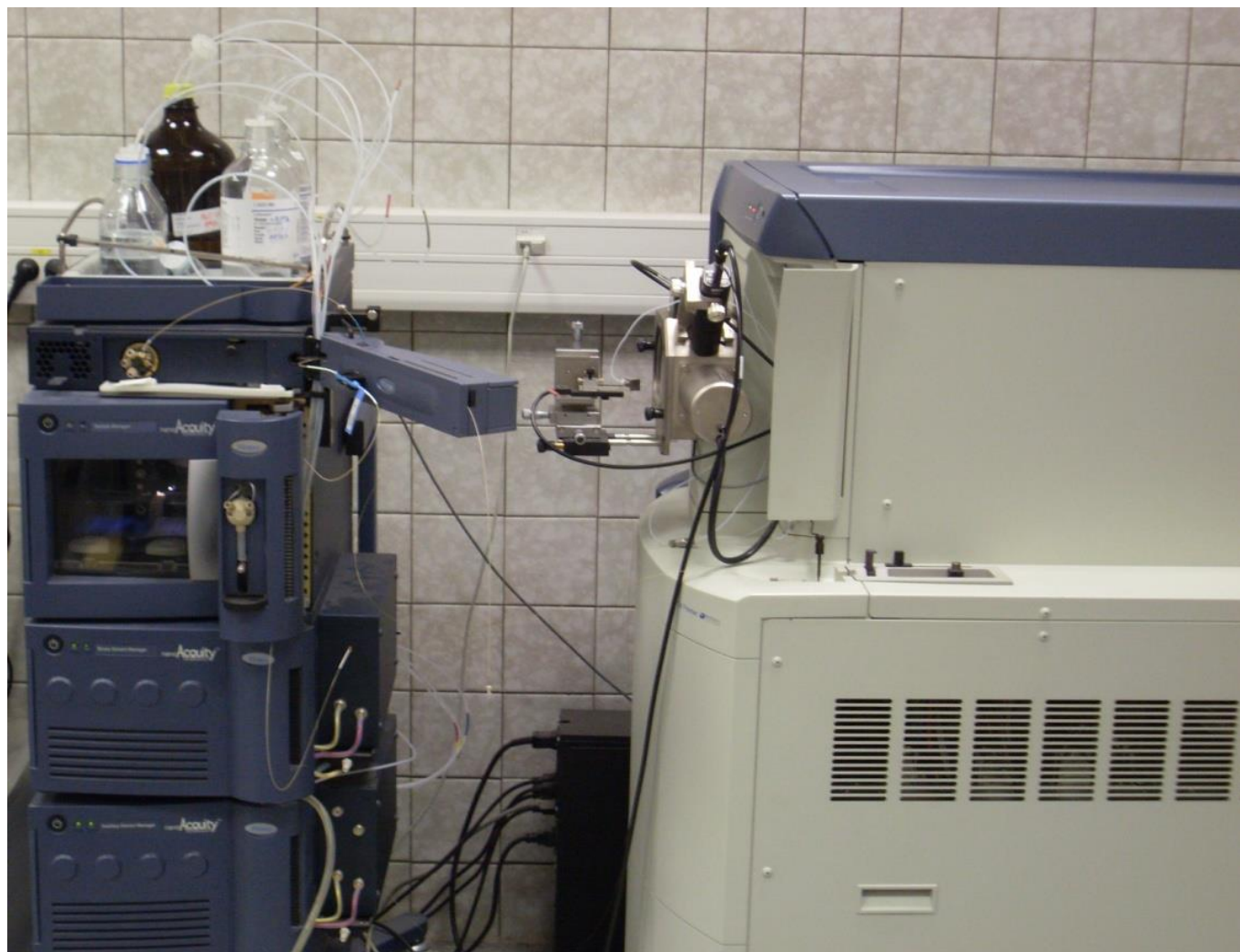


Рис. 2.4. Аналітичне обладнання для ідентифікації білків.

Ультрависокоєфективна рідинно хроматографічна система nanoAcquity, тандемний мас-спектрометр Micromass Q-TOF Premier (гібридний мас-аналізатор типу квадрупол часу прольоту).

У випадку сої збір спектрів проводився способом залежним від даних. У режимі MS прилад реєстрував іони 300-1700 $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$, при енергії зіткнення 4 еВ. У режимі MS/MS для фрагментації вибирали 3 найінтенсивніші іони-попередники на повний

цикл сканування. Записували інформацію $50\text{-}1950\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ при енергії в камері зіткнення в діапазоні 15-52 eV, залежно від маси і заряду іона-попередника. Для фрагментації вибирали іони із зарядом $2^{+}\text{-}5^{+}$, зареєстрована молекула виключалась із аналізу на 3 хв. Для ідентифікації білків льону було використано новий мультиплексний метод MSE. Цей принцип використовує інтегральний підхід, що включає паралельні почергові сканування при низькій енергії в камері зіткнення, щоб отримати інформацію про іони-попередники; та при високій енергії в камері зіткнення, для отримання повних точних мас фрагментів за один цикл (93). Частота сканування спектрів становила 0,7 с із 0,1 с затримки між режимами. Збирали інформацію про іони $300\text{-}1900\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$. У режимі низької енергії дані збирали при постійному потенціалі зіткнення 3 eV. У режимі підвищеної енергії потенціал зіткнення зростав з 20 до 35 eV у кожному циклі. Мас-спектри, отримані при різних енергіях зіткнення, зберігалися окремо. Під час збору даних аналізатор Q був не мас-селективним, а працював лише у частотному режимі. Таким чином, усі іони потрапляли на аналізатор TOF. Це дозволило отримати точні значення мас іонів-фрагментів, які потенційно утворювались для кожного іона-попередника (ймовірно пептида), присутнього в даних зібраних за низької енергії. Всі зразки були проаналізовані у двох технічних повторностях.

2.4.6. Ідентифікація й анотація послідовностей

Отримані дані були оброблені біоінформатичним пакетом ProteinLynx Global Server (PLGS) версія 2.4 (Waters), що проводив фільтрування фону (алгоритм поліному 5 порядку, поріг 35%), згладжування (алгоритм Савицького-Голая, двічі на 3 канали), центрування та пошук вірного ізотопу (при 80% верхньої частини піка, роздільна здатність 10000, автоматичні ліміти). Всі дані були відкалібровані за стандартним пептидом Glu-Fibrinopeptide B, використовуючи маси отримані з калібруючого каналу (локспрей $500\text{ фмоль}\cdot\text{мл}^{-1}$, в 25% ацетонітрилі з 0,1% мурашиною кислотою, потік $500\text{ нл}\cdot\text{хв}^{-1}$, сканування кожні 30 с) протягом вимірювання, для коректування відхилень мас викликаних температурними флуктуаціями. Отримані МС дані сої використовували для пошуку із наступними критеріями: фіксована модифікація карбамідометилювання цистеїну, змінна

модифікація окислення метіоніну, фрагменти від розщеплення трипсином із одним пропущеним сайтом, толерована помилка мас пептидів 100 часток на мільйон і толерована помилка мас фрагментів 0,1 Да проти 7560 видоспецифічних послідовностей сої, отриманих із бази даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> у травні 2008 року. Усі бази даних послідовностей було рандомізовано для контролю псевдо-позитивних співпадінь. Додатково ці ж дані для 2-ВЕ плям, які залишилися неідентифікованими, було ще раз використано для пошуку проти оновленого випуску бази видоспецифічних білків сої, отриманих з UniProt <http://www.uniprot.org/> у березні 2011 року – 15416 послідовностей.

У випадку льону, скоректовані за стандартом дані відцентровані та зведені до вірного ізотопу, було опрацьовано до моно-заряджених іонів, для отримання точних унікальних мас пептидів-попередників і асоційованих фрагментів. 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. Для льону дозволяли фрагменти від розщеплення трипсином із одним пропущеним сайтом, фіксовану модифікацію карбамідометил цистеїн, а також наступні варіабельні модифікації: окислений метіонін, деамідований глютамін та деамідований аспарагін. Також параметри пошуку включали похибку вимірювання мас 50 часток на мільйон. Було проведено 2 пошуки: 1) проти об'єднаної бази *Arabidopsis thaliana* (UniProt квітень 2009 року, 50313 послідовностей) і льону (UniProt квітень 2009 року, 261 послідовностей); 2) неідентифіковані спектри додатково співставляли з базою Viridiplantae (UniProt квітень 2009 року, 586858 послідовностей). Результати пошуку пептидів для обох об'єктів додатково підтверджували шляхом ідентифікації послідовності із трьох або більше почергових іонів-фрагментів однієї серії. Білки, для котрих було виявлено принаймні 2 різні пептиди із співпадаючою послідовністю, вважались позитивно ідентифікованими. Додатковим критерієм був бал PLGS, який є статистичною мірою точності ідентифікації. Він розраховувався з використанням

алгоритму Монте-Карло, беручи до уваги усі дані МС. Надійніше ідентифікований білок отримав вищий бал. Аналізи проводили у двократній технічній повторності. Використовуючи фільтр відтворюваності ідентифікації білків, відсоток помилкових співпадинь було зведено до мінімуму, оскільки хімічний шум є випадковим і не повторюється.

Для того щоб охарактеризувати білки, які були анотовані в базі даних як "невідома функція", їх послідовності були порівняні із усією базою даних NCBI для можливого пошуку гомології. Зокрема був використаний інтернет-додаток BLASTP (NCBI). Коли гомологи білка після запиту мали співпадіння послідовності більше 90% і значення показника очікуваності (E) менше 0,0003, вибирали гомолог із найвищим покриттям і невідома анотація замінювалась префіксом "схожий на" гомологічний білок. Інтегрований аналіз функціональних категорій було здійснено використовуючи біоінформатичний сервер ProteinCenter (Thermo Scientific). Для встановлення прогнозованої на основі амінокислотних мотивів послідовності субклітинної локалізації ідентифікованих білків, було використано алгоритми TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) та iPSORT (<http://ipsort.hgc.jp/>). Також брали до уваги інформацію з оригінальних баз білкових послідовностей. Субклітинна локалізація приймалась, якщо обидва алгоритми давали однаковий результат. Усі експериментальні дані оприлюднено на інтернет-порталі "Seeds in Chernobyl" <http://www.chernobylproteomics.sav.sk/home/>.

2.5. Статистична обробка даних

Статистична обробка даних, окрім випадків описаних окремо, проводилась у програмі Excel пакету Microsoft Office 2010. Перед використанням конкретних статистичних тестів для оцінки достовірності змін, масиви експериментальних даних перевірялись на тип розподілу.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Накопичення радіонуклідів і морфометричні параметри досліджених рослин

3.1.1. Накопичення радіонуклідів зрілим насінням сої та льону

Для безпосереднього дослідження реакції рослин на зростання в середовищі з постійно підвищеним радіаційним фоном, соя та льон вирощувались на забруднених і контрольних ділянках поблизу ЧАЕС. Обидві ділянки були закладені в одному регіоні, для забезпечення подібних ґрунтових і кліматичних умов росту. Забруднена ділянка була розміщена безпосередньо біля ЧАЕС, а контрольна – поблизу села Жукин, приблизно в 100 км від місця катастрофи. Вміст цезію-137 в ґрунті забрудненої ділянки був майже у 15 разів більшим, ніж контрольної (табл. 3.1). Вміст стронцію-90 відрізнявся приблизно у 9 разів. Соя та льон були посіяні на обох ділянках навесні, а зріле насіння було зібране у вересні. Вегетативний експеримент по вивченню змін протеому насіння протягом розвитку було проведено у наступному році.

Таблиця 3.1.

Вміст дозоформуючих радіонуклідів у ґрунті та рослинах, а також розрахований коефіцієнт накопичення (КН).

нуклід	ґрунт, кБк·кг ⁻¹	насіння льону, кБк·кг ⁻¹	КН льон	насіння сої, кБк·кг ⁻¹	КН соя
контрольна ділянка					
¹³⁷ Cs	1,410±0,071	0,01±0,01	0,01	0,01±0,01	0,01
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	2,13±0,21	0,10
⁹⁰ Sr	5,180±0,550	3,55±0,36	0,69	11,84±1,80	2,29

Для визначення вмісту радіонуклідів у зрілому насінні зібраному із забруднених і контрольних ділянок, було проведено відповідні вимірювання. В цілому, поглинання радіонуклідів значно варіює залежно від тканини/органу рослин, а також залежно від виду. Наші результати показують відносно низьке поглинання ^{137}Cs насінням обох вивчених видів, окрім сої на забрудненій ділянці (табл. 3.1), що цілком відповідає попереднім дослідженнями накопичення ^{137}Cs і ^{85}Sr рисом. Дослідники також раніше показали, що поглинання радіонуклідів залежить від фази розвитку насіння, кислотності ґрунту, присутності мікроорганізмів та концентрації мінералів (94,95). Накопичення радіостронцію було значно більшим, зокрема КН цього нукліду в сої був аж 2,29. Цікавим феноменом стало те, що для обох досліджених видів і обох дозоформуючих радіонуклідів КН були значно вищими в умовах забруднення; наприклад у випадку сої акумулювання радіонуклідів зросло в десятки разів. Іншою закономірністю стало більше накопичення ^{90}Sr , незважаючи на його нижчий вміст у ґрунті порівняно із ^{137}Cs . Врешті варто зазначити, що соя в усіх випадках мала вищий вміст радіонуклідів порівняно із льоном. Численними даними доведено, що різні рослини накопичують радіонукліди по-різному (96). Наприклад, поглинання ^{137}Cs як із забруднених внаслідок чорнобильської катастрофи ґрунтів, так і прямо з атмосферного осаду, було значно нижчим у люцерни (особливо при інокуляції азотфіксуючими бактеріями), порівняно з трав'янистим злаком. Проте співвідношення накопичення радіонуклідів прямо не залежало від шляху поглинання. Таким чином, дослідники зробили висновок про ймовірну захисну дію азотфіксуючих симбіонтів бобових і рекомендували безпечний режим використання пасовищ (97). Однак у нашому дослідженні бобова рослина, навпаки накопичувала значно більше радіонуклідів.

Для соняшнику, методом авторадіографії було показано, що багато ^{90}Sr накопичується в листках, стеблі, провідних пучках, прорихах і головному корені, а ^{137}Cs переважно акумулюється в молодих листках, листових прожилках і вузлових сегментах. Найвища концентрація радіоцезію була виявлена при додаванні у розчин іонів амонію та калію, аналогічний ефект спостерігався для радіостронцію при додаванні кальцію (98). Всі ці результати показують, що рослини мають механізм

захисту майбутнього потомства шляхом блокування транспорту радіонуклідів у насіння. Цікаво, що насіння льону накопичувало в 10 разів менше забрудників, порівняно з насінням сої, проаналізованому паралельно (табл. 3.1). Таким чином, наступні дані змін протеому отримані на льоні, доповнюватимуть результати отримані на сої (в тому числі, через різницю в накопиченні радіонуклідів зрілим насінням), як безпосереднє відображення реакції рослин на забруднення ділянок у зоні відчуження ЧАЕС.

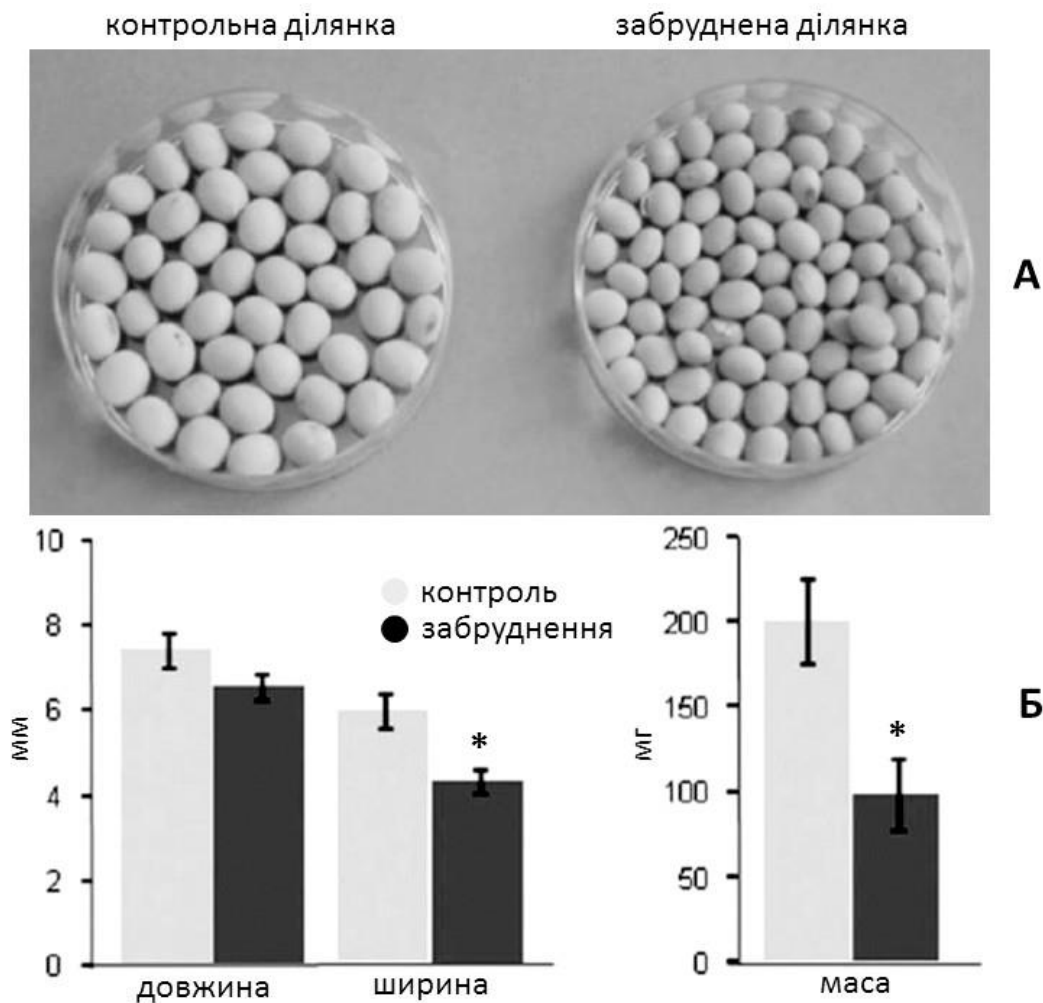


Рис. 3.1. Зріле насіння першого покоління сої *Glycine max* (L.) Merr. сорт "Сонячна". А) Візуальний вигляд зрілого насіння із контрольної та забрудненої ділянки. Б) Морфометричні параметри насіння: довжина, ширина і маса.

* – різниця достовірна при $p \leq 0,05$; на графіках зображено стандартні похибки.

Також раніше було однозначно показано істотну різницю специфічних видів рослин, за властивістю поглинання і накопичення радіонуклідів, зокрема шляхом

оцінки поглинання ізотопів урану і торію, в умовах реалістичного помірного забруднення ґрунту (99). Як наслідок, було сформульовано комплексну біогеохімічну концепцію фітомобільності цих елементів. Більше того відомо, що в насінні накопичується менше радіоактивних речовин, ніж в інших органах рослин. Цю тезу підтвердив модельний експеримент вивчення переходу трансуранових елементів та інших поширених нуклідів у зоні природної радіоактивної аномалії (100). Було показано, що вегетативна частина цукіні та кавуна містить на порядок більше радіоактивного урану порівняно із плодами. Також ми обчислили еквівалентну дозу хронічного опромінення, яку отримали рослини на дослідних ділянках. Протягом повного ростового сезону вивчені рослини отримали наступні дози опромінення: а) забруднена ділянка поблизу Чистогалівки мала радіаційний фон 4 мР/год; льон протягом 111 днів отримав 10 Р експозиційної дози зовнішнього опромінення, 0,6 сГр поглинутої дози внутрішнього (становить лише 5,5%), отже 11,4 сЗв сумарного; соя за 130 днів отримала 12,5 Р експозиційної дози зовнішнього, 0,74 сГр поглинутої дози внутрішнього (приблизно 5,9%), відповідно 13,2 сЗв разом; б) контрольна ділянка поблизу Жукина мала дуже низький радіаційний фон, також експериментальні рослини акумулювали незначну кількість радіонуклідів, таким чином еквівалентна доза не перевищувала 0,4 сЗв. Слід зазначити важливий факт, що практично була відсутня різниця між соєю та льоном по сумарній поглинутій дозі.

3.1.2. Морфометричні параметри змінюються в умовах хронічного опромінення

Оцінка морфометричних характеристик показала, що насіння рослин сої із забрудненої ділянки є меншим (рис. 3.1). Цей ефект можна було помітити навіть візуально; маса окремої насінини сої відрізнялась майже вдвічі. Хоча не було зафіксовано достовірних відмінностей довжини, але приблизно на 30% знизилась ширина насіння при вирощуванні в умовах хронічного опромінення. Більше того, динаміка набухання насіння сої є сповільнена порівняно з контролем (рис. 3.2). Ці результати свідчать про те, що радіонуклідне забруднення впливає на фізіологію насіння. Наприклад, у іншій роботі було показано, що опромінення істотно впливає на набухання насіння арабідопсису (101), а мутації генів репарації ДНК гомологів RAD21, підвищують чутливість зародка до іонізуючої радіації.

Для характеристики зрілого насіння льону зібраного з контрольної та забрудненої ділянок, також були проведені основні морфометричні вимірювання. Ми не виявили жодних істотних відмінностей у зовнішньому вигляді чи сирій вазі насіння з рослин, вирощених на забруднених радіонуклідами ділянках (рис. 3.3). Тим не менше, відсоток проростання був трохи нижчим для насіння льону, котрий зазнав впливу низьких доз, внаслідок розвитку в зоні відчуження ЧАЕС. Після 22 год інкубації насіння на вологих чашках Петрі, відсоток проростання між варіантами відрізнявся майже на 20 одиниць. Підсумовуючи, фенотипові реакції досліджених рослин істотно відрізнялись, безумовно відображаючи виявленні факти різного поглинання дозоформуючих радіонуклідів. Результати описані в параграфі 2.1 оприлюднено в публікаціях (102,103).

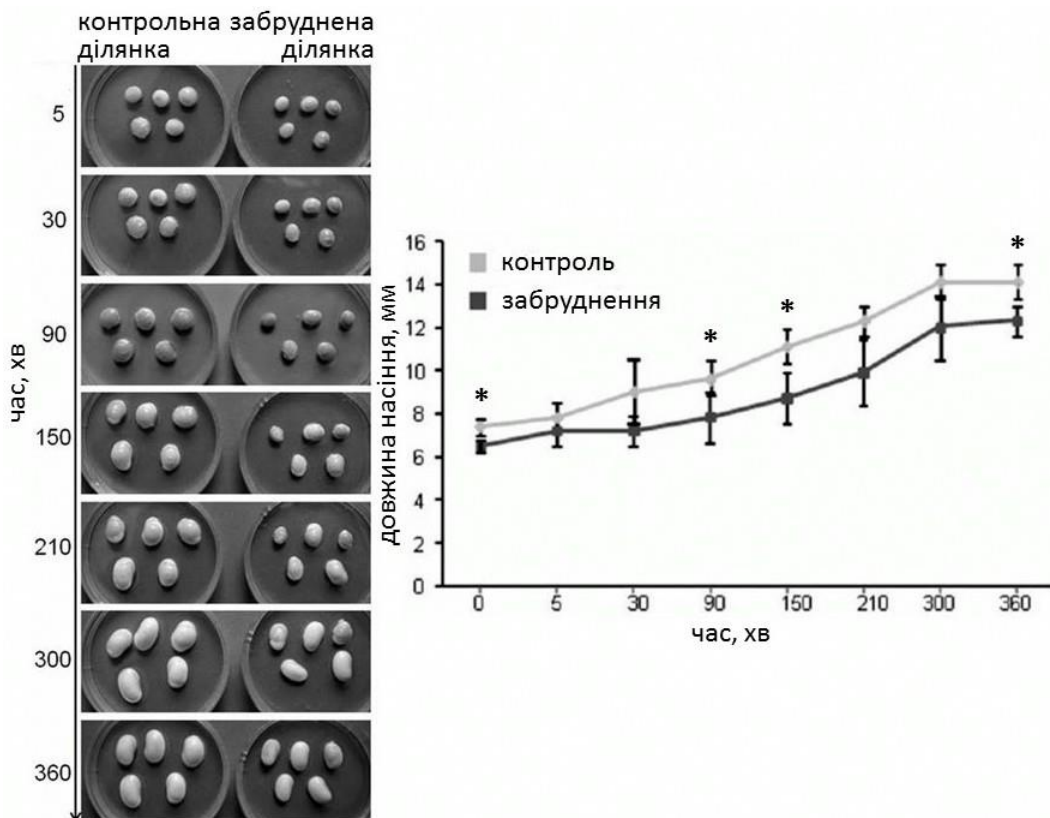


Рис. 3.2. Візуальне та графічне представлення динаміки набухання насіння сої протягом 6 год.

* – різниця достовірна при $p \leq 0,05$; на графіках зображено стандартні похибки.

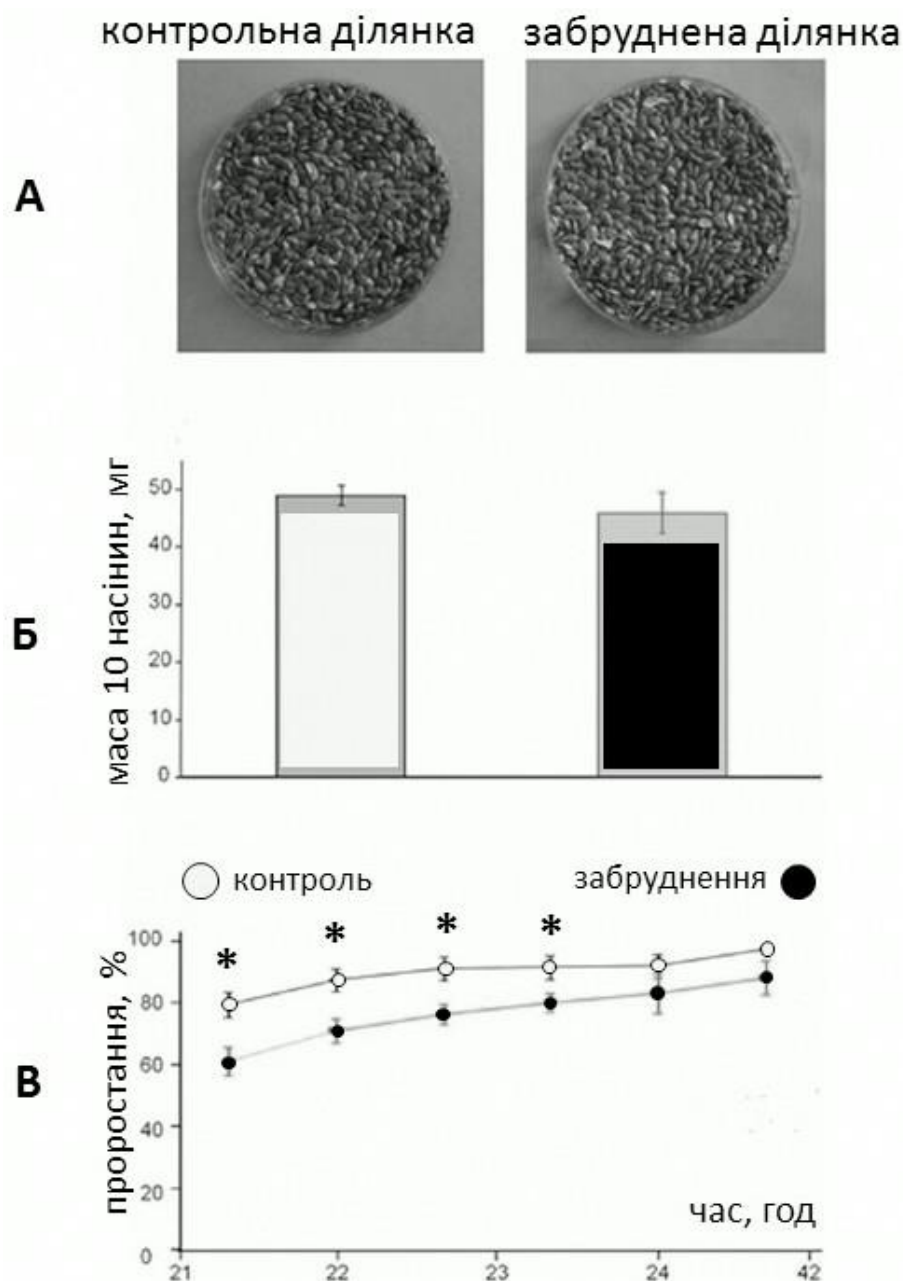


Рис. 3.3. Морфометрія зрілого насіння першого покоління льону *Linum usitatissimum* L. сорт "Київський". А) Візуальний вигляд зрілого насіння із контрольної та забрудненої ділянки. Б) Маса 10 насінин обох експериментальних варіантів. В) Відсоток проростання обрахований на основі трикратного аналізу 100 насінин льону. Графік показує час у годинах після розміщення насіння на вологих чашках Петрі.

* – різниця достовірна при $p \leq 0,05$; на графіках зображено стандартні похибки.

3.2. Пошукова протеоміка на основі двовимірного гелю електрофорезу забезпечує глибокий молекулярний аналіз рослин

3.2.1. Стрічки з іммобілізованим рН градієнтом вузького діапазону необхідні для зменшення ефекту перекриття білкових плям

Для дослідження протеому сої та льону, спочатку виділили сумарну білкову фракцію зі зрілого насіння рослин, вирощених як на контрольних так і забруднених ділянках, використовуючи екстрагування основним фенолом. Для встановлення молекулярних змін на білковому рівні, внаслідок хронічного опромінення, ми застосовали 2-ВЕ. Таким чином, було отримано білкові карти-гелі з високою аналітичною роздільною здатністю. Виділені білки спочатку було проаналізовано із використанням стрічок з іммобілізованим рН градієнтом широкого діапазону, для фокусування білків з рІ 3-10. Отже було виявлено, що більшість білків зрілого насіння сої знаходилися в діапазоні рН 4-7 на гелях широкого діапазону (рис. 3.4). Аналогічні результати було отримано на ріпаку, де більшість із 794 плям, знайдених протягом розвитку насіння, мали слабо-кислі або нейтральні рІ (104). Більшість цих плям ріпаку вдалося ідентифікувати, проте половина білків виявилась лише посттрансляційними варіантами. Цікавим методологічним підходом підвищення точності оцінки відносного вмісту білків насіння, є віртуальне видалення домінуючих запасних білків із повного аналітичного набору даних. У схожому за дизайном дослідженні рицини більшість із 660 білкових груп знаходилась у слабо-кислій зоні (71). В цьому проекті, дослідники вивчили процес розвитку насіння рицини, використавши "DIGE". Дослідження дозволило розділити багато специфічних ізоформ домінантних метаболічних ензимів, наприклад енолаз.

Поглиблений аналіз наших результатів показав, що центральна зона гелю широкого діапазону містить значні скупчення плям, що свідчить про високу ймовірність їх перекриття. Раніше автори повідомляли, що приблизно 25% плям містять більше ніж один білок, навіть при використанні малої кількості матеріалу (105). Використавши кількісне фарбування гелів колоїдним кумасі, дослідники знайшли 85 білків кількість яких змінилась у мишей, котрі мали пухлину. Це дослідження показало важливе джерело застережень для однозначної інтерпретації

результатів ідентифікації білків розділених на 2-ВЕ гелях. Автори вважають, що при максимальному завантаженні гелів, менше половини розділених плям міститимуть лише один білок. Цей висновок підтримується представленою статистичною теорією перекриття плям. Очевидно, такий факт може призводити до помилкової інтерпретації кількісних змін білків. Тому ми вирішили провести поглиблений аналіз, для досягнення належного розділення протеому сої, включаючи багаті різними білками зони гелю. Для цього були використані стрічки з іммобілізованим рН градієнтом вузького діапазону рІ 4-7. Результати показали хороше розділення білків на гелях, а отже мінімізацію проблеми перекриття плям (рис. 3.4). Остаточні дані у нашому аналізі містять результати обох наборів гелів: а) усю інформацію гелів рН 4-7, б) рН 7-10 зони відокремлені з гелів широкого діапазону.

Більшість білків льону розділених із використанням стрічок з іммобілізованим рН градієнтом 3-10 мали показники рІ 5-8 (рис. 3.5). Проте для полегшення наступного порівняння даних обох досліджених рослин, використовували однаковий аналітичний підхід, також застосували стрічки рН 4-7 в уточнюючому експерименті (рис. 3.5). Якість розділених білкових плям істотно зросла, аналогічно експерименту на сої. Для порівняння відносних об'ємів плям із обох типів гелів, було використано корекційний коефіцієнт, як описано в літературі (9). Автори застосували нормалізацію даних по відносному об'єму, для порівняння п'яти почергових фаз розвитку насіння сої. Для сотень ідентифікованих плям було отримано кількісні профілі, що відображали динаміку вмісту окремих білків під час дозрівання насіння. Важливою перевагою використання 2-ВЕ у пошуковій протеоміці, є можливість візуалізації різних білкових ізоформ та посттрансляційних варіантів. Вони проявляються у вигляді скупчень плям, які трохи відрізняються за рІ або Mr. Такі модифікації поліпептидних ланцюгів часто мають функціональне значення. Логіку використання пошукової протеоміки для вивчення стрес-реакцій рослин (пункт дисертації 3.2.1) інтегровано в розділ книги (106).

3.2.2. Розвиток у радіоактивно забрудненому середовищі чорнобильської зони спричинив зміни протеому насіння

Щоб визначити білки, які накопичувались по-різному, в насінні зібраному зі забруднених ділянок порівняно з контролем, оцифровані гелі були проаналізовані за допомогою програмного пакету "ImageMaster". У результаті було знайдено відносні об'єми для кожної плями. У випадку сої ми побачили 698 чітко розділених білкових плям, зокрема 75 у гелях широкого діапазону рН 3-10 (зона рІ 7-10) і 623 в гелях вузького діапазону рН 4-7, принаймні в двох гелях із трикратного біологічного повтору (рис. 3.6). Для кожної плями було розраховане значення t-тесту, використовуючи інтегрований алгоритм програми "ImageMaster". Незважаючи на істотні відмінності фенотипу (морфометричних параметрів) зрілого насіння сої, зібраного зі забруднених радіонуклідами та контрольних ділянок, тільки 9,2% білкових плям (відповідно 7 і 57 із широких та уточнюючих 2-ВЕ гелів) мали різний відносний об'єм, який відображає кількість конкретного білку, при статистичній достовірності різниці $p \leq 0,05$. Ці дані в цілому узгоджуються із попередніми дослідженнями описаними в літературі, про вплив низької концентрації важливого антропогенного забрудника ^{134}Cs на коріння *Arabidopsis thaliana*. Використавши метод аналізу інгібування гібридизації, автори повідомили, що змінилась експресія відносно невеликої кількості генів (53). Причому, це були переважно гени росту та поділу клітин, а також процесів розвитку рослини. Тим не менше, дослідники підтвердили, що навіть низькодозове опромінення впливає на важливі клітинні процеси. З іншого боку, слід зазначити, що опромінення арабідопсису перед цвітінням високою дозою γ -променів (200 Гр), викликало дуже помітну відповідь (107). Зокрема, на 9 день після опромінення, було виявлено тисячі індукованих і репресованих генів. Найбільше індукованих генів належали функціональній групі стресової відповіді, паралельно репресовані послідовності контролювали ростові реакції. Ми вирізали усі 64 плями, накопичення яких змінилось, із 2-ВЕ гелів та застосували традиційну тандемну МС (вибір іона-попередника зі спектром фрагментів) для їх ідентифікації, після розділення пептидів на рідинному

хроматографі (рис. 3.6). Таким чином, вдалося встановити природу 26 послідовностей, що відповідає 42% ефективності ідентифікації білків.

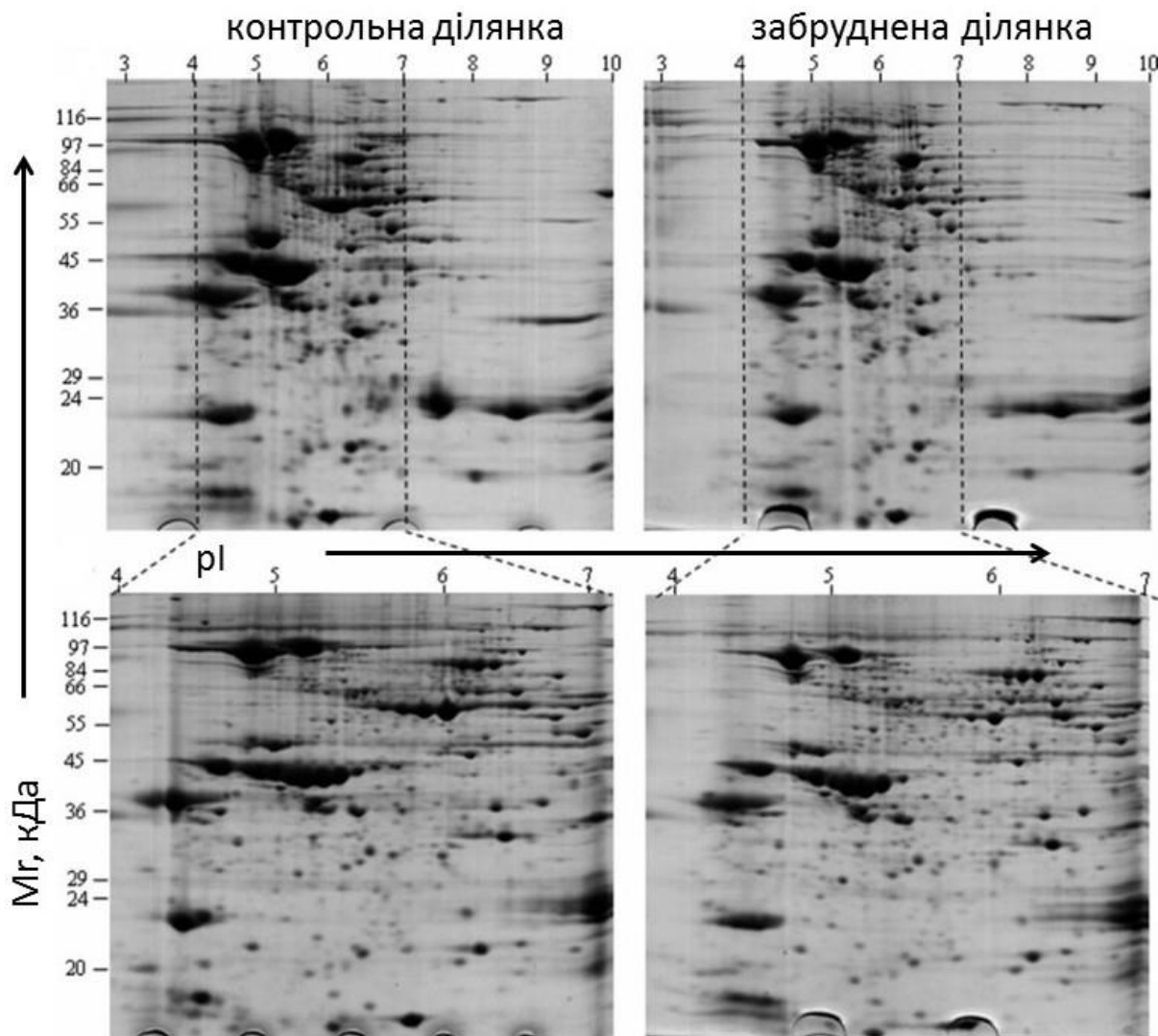


Рис. 3.4. Репрезентативні білкові мапи 700 $\mu\text{г}$ білків сої з матеріалу першого покоління, зібраного на експериментальних ділянках. Розділення білків було здійснено за молекулярними масами (M_r) й ізоелектричними точками (pI).

У випадку льону було розділено 267 2-ВЕ плям, внаслідок використанням стрічок широкого діапазону pH 3-10 (зона pI 7-10) і 453 плями, з використанням стрічок вузького діапазону pH 4-7 (рис. 3.6). Білкові плями кількісно проаналізували шляхом фарбування колоїдним кумасі із наступним скануванням при високій роздільній здатності та 16-бітовій глибині відтінків сірого кольору. Із 720 2-ВЕ плям, відносний об'єм 35 (становить 4,9%, а саме 17 у гелі широкого діапазону і 18 в уточнюючому 2-ВЕ гелі) достовірно відрізнявся у контрольних зразках, порівняно із матеріалом зібраним на ділянці забрудненій антропогенними радіонуклідами при

$p \leq 0,05$. Пропорція білків, вміст яких змінився в насінні льону, вирощеному на ділянках зони відчуження ЧАЕС, є майже вдвічі нижчою від результатів дослідження сої. Ця різниця віддзеркалює істотні відмінності накопичення радіонуклідів дослідженими видами. Необхідно застерегти, що окремо взяті результати досліджень змін протеому зрілого насіння сої та льону не дають достатньо глибокий і переконливий набір даних, на основі якого можна сформулювати однозначні висновки. Скоріше, пошукова протеоміка є інструментом створення гіпотез пояснення реакції на радіонуклідне забруднення довкілля. У майбутньому необхідно буде провести функціональні експерименти. Тим не менше, слід зазначити, що вплив іонізуючого випромінювання має помітний ефект на протеом насіння. Це припущення підтверджується результатами досліджень протеому ссавців при експериментальному опроміненні, що в цілому свідчить про адекватність проведеного нами аналізу. Серед кількох змінених білків, дослідники виявили маркери окисного стресу (74). В іншому експерименті, маючи на меті пошук біомаркерів радіаційного ураження мишей та використавши високу дозу, вчені виявили 60 білків, накопичення яких змінилось (75). Цікаво, що це були 20 унікальних поліпептидів, відповідно решту плям утворювали ізоформи або ПТМ, які можуть слугувати чутливими індикаторами радіаційного ураження.

Для того, щоб розраховувати на успішну ідентифікацію значної пропорції 35 плям льону вміст яких змінився, було необхідно застосувати аналітично ефективний протокол (рис. 3.6). Високий тиск мобільної фази, частинки стаціонарної фази розміром менше 2 мкм, вузькі капіляри для забезпечення малого об'єму розчинів у системі – це характеристичні риси УВЕРХ (108). Ця аналітична модифікація дозволяє істотно покращити ефективність розділення аналітів, а також підвищити чутливість методу. Для розділення пептидів найчастіше застосовується колонка зворотної фази із матеріалом C18, синтезованим на модифікованих хімічно стійких полімерних матеріалах. Використання УВЕРХ дає перевагу підвищення концентрації аналіту в хроматографічному піку. Також для льону ми використали новітній метод збору даних МС без вибору іону-попередника. Цей протокол включає паралельне почергове сканування при низьких і високих енергіях зіткнення, для отримання

точної інформації про іони-попередники і маси фрагментів. Це потенційно дозволяє підвищити чутливість аналізу, за рахунок наявності інформації навіть дуже слабкого сигналу, але вимагає складних алгоритмів для адекватного розшифрування зібраних спектрів. Поєднання УВЕРХ та новітнього протоколу МС, дозволили однозначно ідентифікувати 28 із 35 білків насіння льону, кількість яких змінилась внаслідок хронічного опромінення; незважаючи на те, що база даних "UniProt" для роду *Linum* на момент пошуку містила лише 261 послідовність. Результати кількісного аналізу гелів, пункт 3.2.2, підсумовано в частині збірника (109).

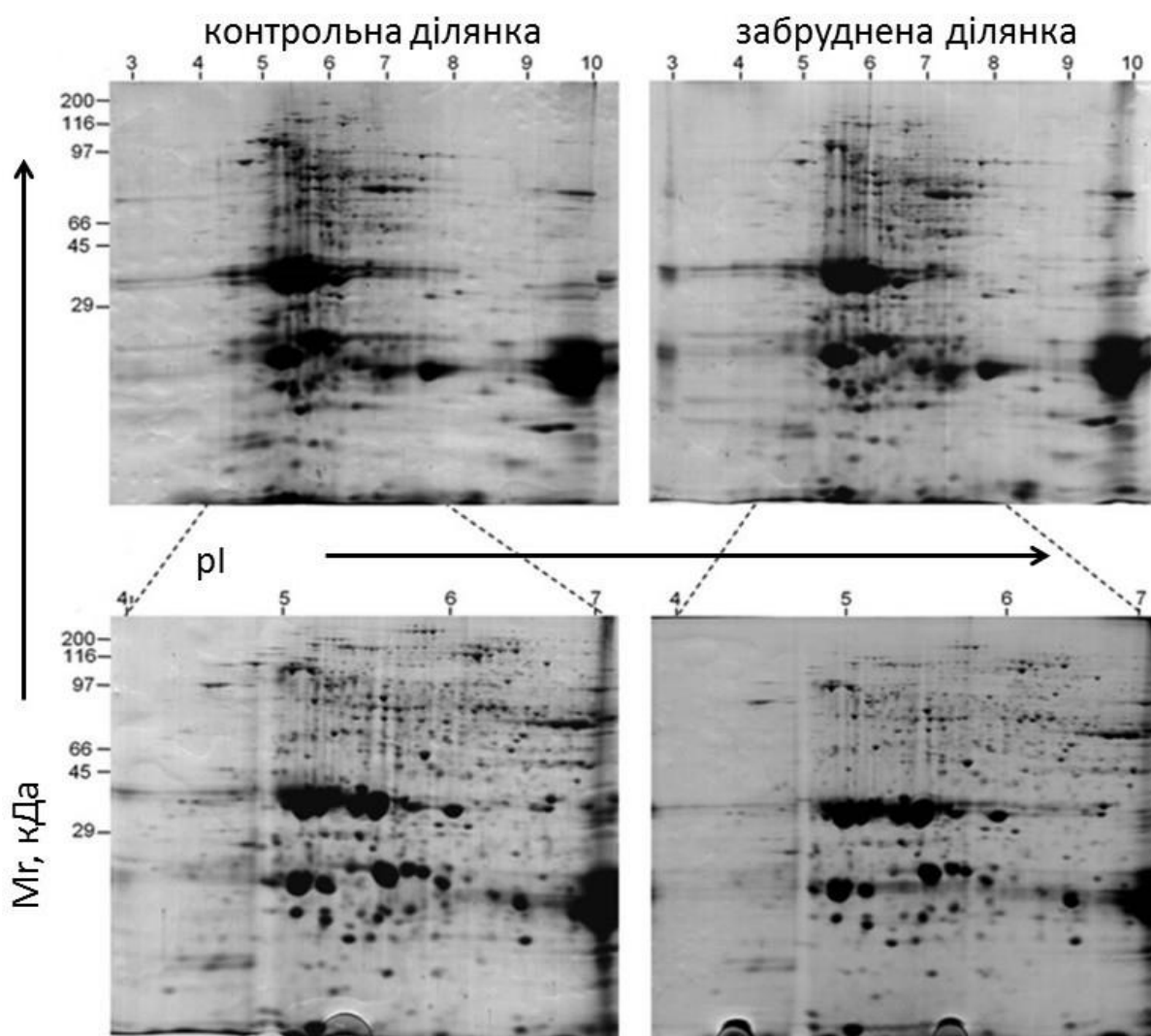


Рис. 3.5. Репрезентативні білкові мапи 700 $\mu\text{г}$ білків льону з матеріалу першого покоління, зібраного на експериментальних ділянках. Розділення білків було здійснено за молекулярними масами (M_r) й ізоелектричними точками (pI).

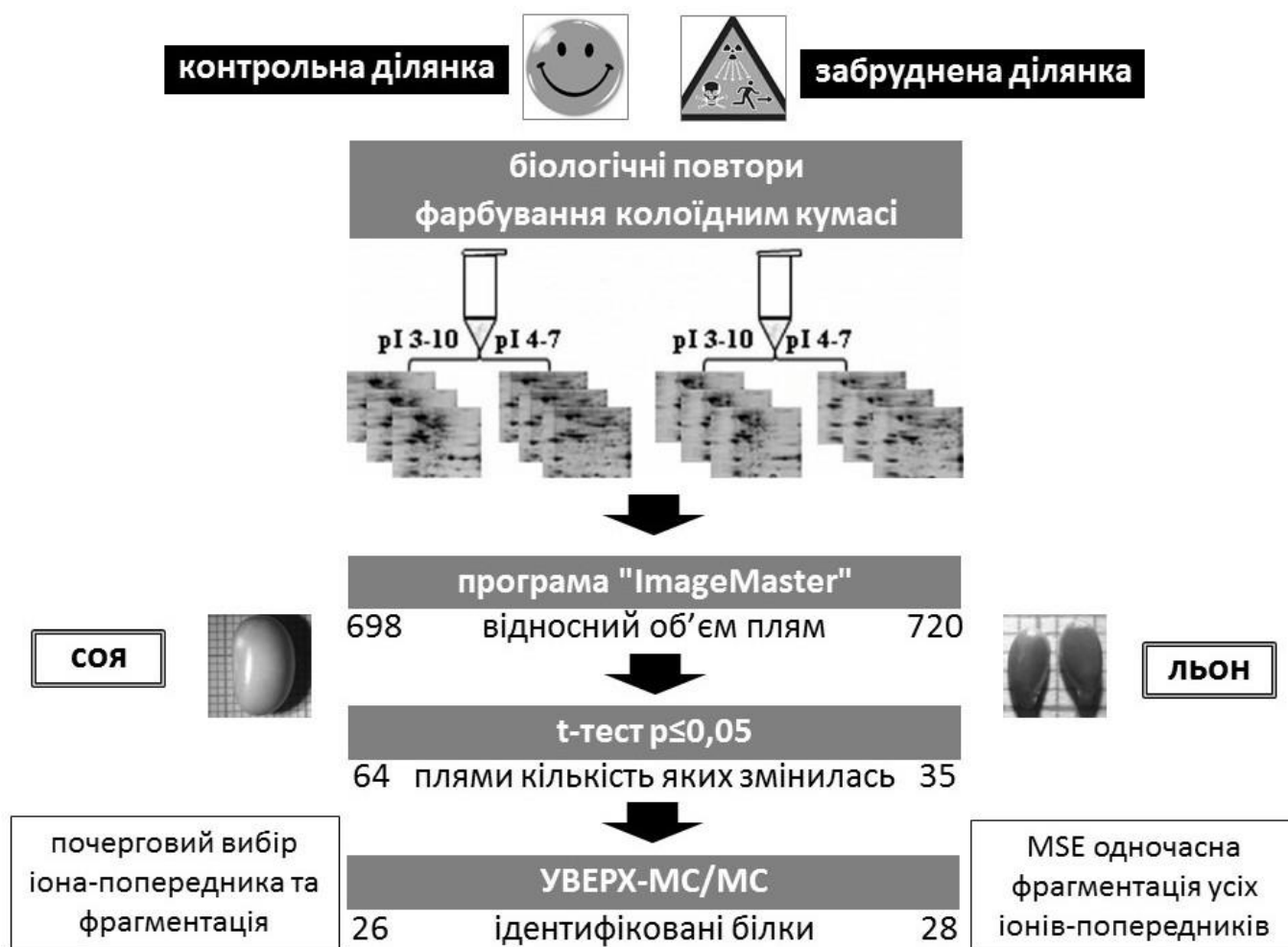


Рис. 3.6. Візуалізація експериментальної стратегії вивчення протеому насіння та кількісних результатів.

Скорочення: ізоелектрична точка (pI), ультрависокооефективна рідинна хроматографія (УВЕРХ), мас-спектрометрія (МС).

3.2.3. Білкові гелі-мапи насіння сої та льону зібраного протягом дозрівання після двох років вирощування на дослідних ділянках

У дисертації охарактеризовано вміст 211 білків протягом дозрівання другого покоління насіння сої на забрудненій радіонуклідами та контрольній ділянках. Перед виділенням білків методом екстрагування основним фенолом, насіння було вибрано із стручків на наступних фазах розвитку: 4, 5 і 6 тижнів після цвітіння, а також зріле. Після виділення білкової фракції зі зібраного матеріалу, було використано 2-ВЕ та аналіз за допомогою програми "ImageMaster", аналогічно першому сезону (рис. 3.7). Усі кількісні дані, а також результати ідентифікації за допомогою УВЕРХ-МС/МС,

депоновано на відкритій інтернет сторінці "Seeds in Chernobyl" (<http://www.chernobylproteomics.sav.sk>), яку було спеціально розроблено для оприлюднення даних цього проекту. Усі без винятку зацікавлені можуть ознайомитись із детальними кількісними та якісними даними, використовуючи відповідні вкладки.

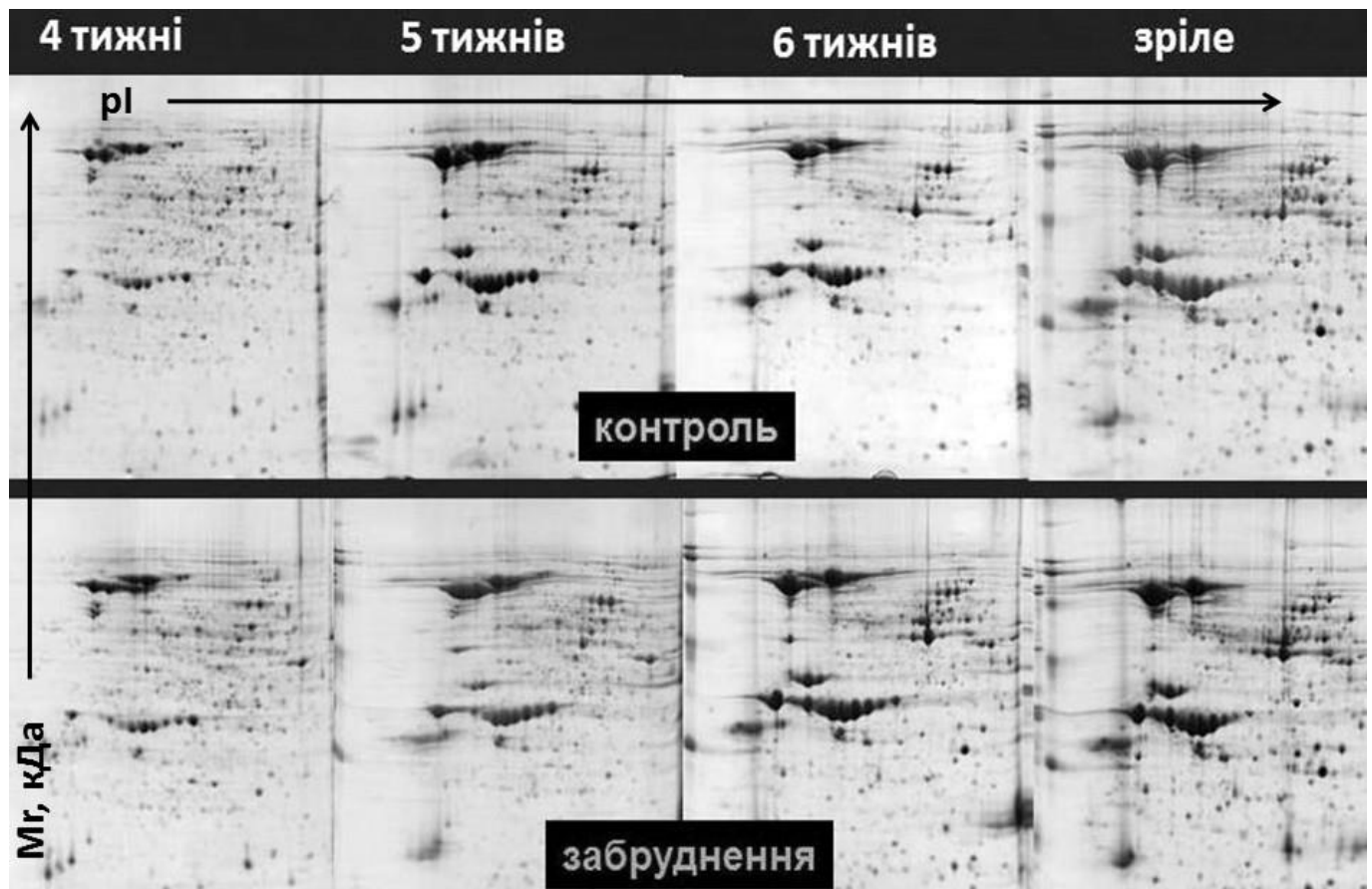


Рис. 3.7. Репрезентативні мапи 700 $\mu\text{г}$ білків сої з матеріалу другого сезону, зібраного на експериментальних ділянках, протягом різних фаз розвитку (4, 5 і 6 тижнів після цвітіння, а також зріле насіння). Розділення білків було здійснено за молекулярними масами (M_r) й ізоелектричними точками (pI).

У випадку льону ми охарактеризували 199 розділених білкових плям протягом різних фаз дозрівання насіння (2, 4 та 6 тижнів після цвітіння, а також зріле), але в кінцевому проаналізованому наборі даних присутній вміст 79 ідентифікованих білків (з них 49 унікальних послідовностей) (рис. 3.8). Істотно менша кількість експериментальних точок порівняно із соєю пояснюється у першу чергу незначною кількістю анотованих білкових послідовностей льону в доступних базах даних. Тим не менше, нам вдалося прослідкувати динаміку вмісту домінантних білків насіння під

впливом хронічного опромінення, у забрудненому радіонуклідами середовищі чорнобильської зони. Для забезпечення прямого порівняння експериментів, точно відтворювався аналітичний протокол, використаний для дослідження розвитку насіння сої. Накопичення результатів аналізів протягом двох вегетаційних сезонів, дозволило виявити зміни протеому, стабільні протягом поколінь, які можливо мають епігенетичну природу.

3.3. Функціональна класифікація для об'єктивного аналізу протеому та концептуальні моделі реакції рослин на зростання в умовах хронічного опромінення

3.3.1. Функціональна систематизація ідентифікованих білків сої на сім основних категорій

Наслідком пошуку в базах даних для сої, стали 26 ідентифікованих білків, що представляють 19 унікальних послідовностей поліпептидів. Вони були класифіковані, використовуючи модифіковану функціональну схему, запропоновану в літературі на основі загальноновизнаної моделі *Arabidopsis thaliana* (110). Цю функціональну класифікацію було розроблено після секвенування четвертої хромосоми рослини. Майже половина з ідентифікованих плям сої належала групі запасних білків (рис. 3.9), першочерговою функцією яких є постачання азоту при проростанні насіння. Зазвичай вони накопичуються у спеціалізованих органелах – білкових вакуолях. 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, порівняно з насінням із контрольних ділянок (табл. 3.2). Цей білок формує гексамер, що містить кислі та основні ланцюги з'єднані дисульфідними містками; він належить до родини 11S глобулінів (купінів) і також є відомим алергеном. Іншими представниками основних запасних білків стали дві плями гліциніну G1 (GY1, P04776), однієї з яких було в 2 рази більше, а другої в п'ять із половиною разів менше в насінні з чорнобильської зони. Нативний поліпептидний ланцюг цього білка зазнає ПТМ, формуючи ковалентно з'єднаний комплекс двох субодиниць. Деталі структурної організації гліциніну G1 було встановлено за допомогою X-кристалографії з високою роздільною здатністю (111). Асиметричний

тример двох субодиниць схоже є типовою кристалічною структурою класу 11S глобулінів. Більше того, структура нагадує пакування молекул родини 7S, що свідчить про їх спільне еволюційне походження. Цікаво, що розміщення на гелі усіх ідентифікованих плям G1/G2 гліцинінів вказувало на часткову фрагментацію поліпептидних ланцюгів. У літературі вже було описано подібний феномен (112).

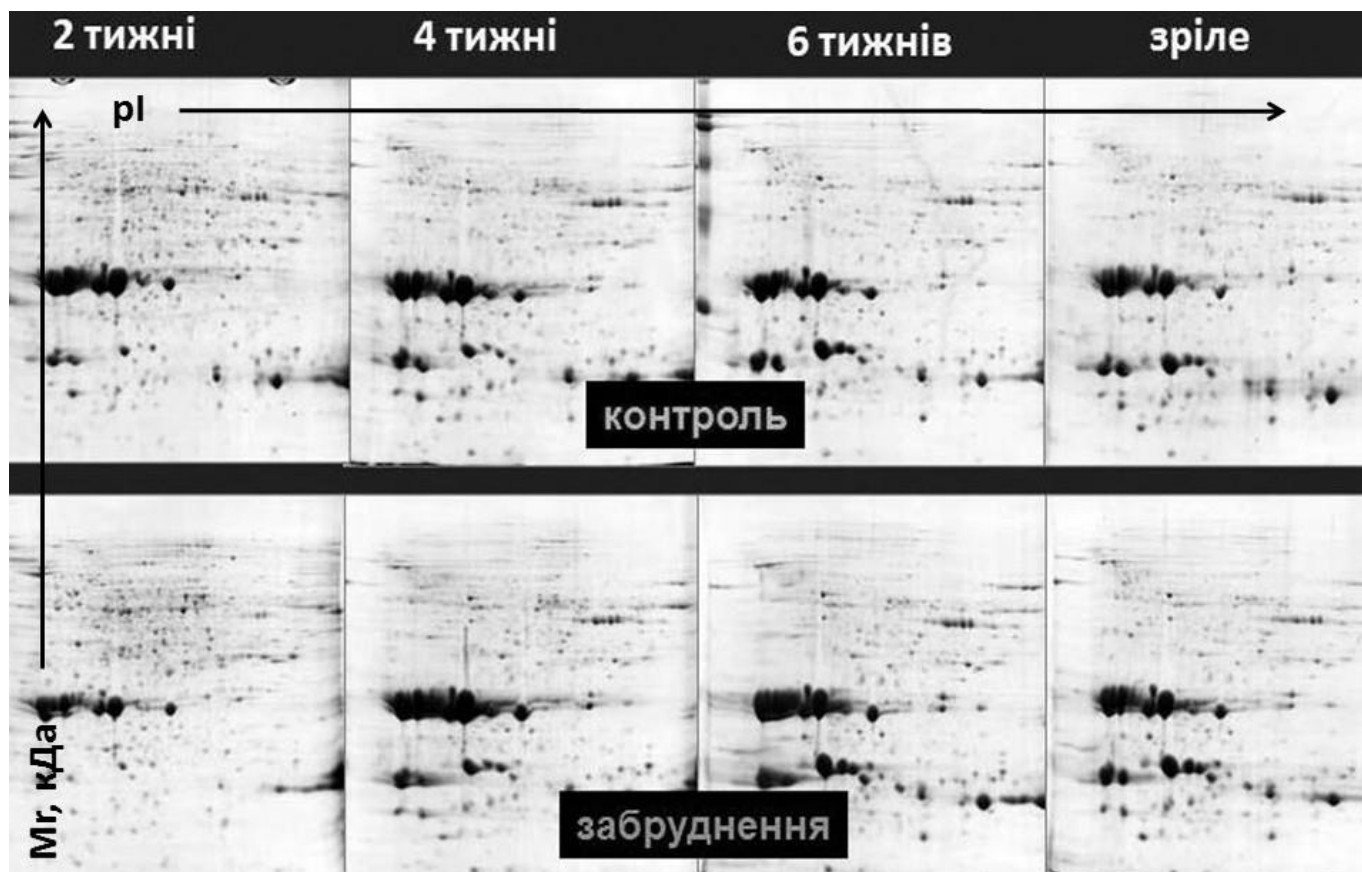


Рис. 3.8. Репрезентативні мапи 700 $\mu\text{г}$ білків льону з матеріалу другого сезону, зібраного на експериментальних ділянках, протягом різних фаз розвитку (2, 4 і 6 тижнів після цвітіння, а також зріле насіння). Розділення білків було здійснено за молекулярними масами (M_r) й ізоелектричними точками (pI).

Три β -субодиниці β -конгліциніну (дві ізоформи Q50JD8 та одна O22121) виявилися у меншій кількості в насінні сої із забруднених ділянок. У випадку α -субодиниці β -конгліциніну (O22120), дві 2-ВЕ плями були виявлені у більшій кількості і одна меншій (O22120) у насінні зі забрудненої ділянки, також під впливом радіонуклідів зріс вміст α' -субодиниці β -конгліциніну (Q948Y0). Теоретичні M_r субодиниць конгліцинінів були близькі експериментально встановленим. Тобто вплив радіонуклідного забруднення не викликав фрагментацію конгліцинінів. Два

ідентифіковані білки сої було віднесено до категорії росту клітин. Білок дозрівання pPM32 (Q9SPJ6) і 35 кДа білок дозрівання pPM18 (Q9ZTY1) накопичувались у насінні з ділянок зони відчуження ЧАЕС. Обидва мають домени характеристичні для білків, які накопичуються в пізньому ембріогенезі (LEA) та знаходяться у цитоплазмі. Їх конкретна біологічна функція наразі загадкова. Проте відомо, що різні типи LEA білків з'являються на специфічних фазах ембріонального розвитку рослин, а також при нестачі води (засолення або посуха). Наприклад, білок OsLEA3 накопичувався в корінні солестійких сортів рису, внаслідок дії абсцизової кислоти. Сольовий стрес індукований натрій хлоридом призвів до швидкої *de novo* експресії цього гену, проте дія жасмонової кислоти не викликала жодних змін (113). Вміст транскрипту поступово знижувався при хронічному засоленні.

Білки, пов'язані з стресом, представлені чотирма дегідринами, цистеїн синтазою і бетаїн альдегід дегідрогеназою (BADH2, B0M1A5), яка накопичувалась у насінні сої вирощеному на забруднених ґрунтах (табл. 3.2, рис. 3.9). Цей ензим каталізує перетворення бетаїн альдегіду в гліцин бетаїн, використовуючи НАДФ⁺ у ролі акцептору електронів. Даний процес є складовою метаболізму гліцину, серину та треоніну. Для дегідринів, дві плями (lea8, Q5K3Q9; LEA-D-11, Q70EL8) й одна (lea8, Q5K3Q9) пляма виявились у більшій і меншій кількості у зразках насіння, що зазнало впливу токсичних радіонуклідів відповідно. Усі дегідрини мають домени LEA-D-11. Члени цієї родини індукуються при водному дефіциті, схоже, що їх активність модулює фітогормон абсцизова кислота. Літературні дані показують, що дегідрини захищають мембрани рослин. З іншого боку, локалізація цих поліпептидів у ядрі, дозволяє припустити роль у роботі біохімічних комплексів задіяних у реалізації спадкової інформації. Вони мають консервативні структурні елементи, зокрема у центральній зоні присутні 5-9 серинів, які оточені кластером полярних амінокислот. Також дегідрини мають 2 копії збагачених лізином октапептидів (К-сегментів EKKGIMDKIKEKLPG), перша розміщена поблизу зони полісерину, а друга – біля С-кінця молекули. Залишки серинів можуть підлягати зворотному фосфорилуванню, хоча невідомо чи цей процес має помітний вплив на регуляцію функцій цих молекул. Число та порядок амінокислотних мотивів дозволяє розрізняти підкласи дегідринів.

У літературі описано експеримент по вивченню індукції дегідринів групи LEA-D-11 арбускулярною мікоризою в контексті здатності захищати рослини в умовах посухи. Для цього дослідники клонували ген *lea8*. При нормальному поливі експресію гену не було виявлено, соя без мікоризи індукувала високу експресію цього гену, але з мікоризою рівень експресії був незначним. Таким чином, було чітко показано, що арбускулярна мікориза використовує незалежні від дегідрину *lea8* шляхи захисту рослин від посухи (114). 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. Також цистеїн синтаза (CSY, Q8W1A0) накопичувалась за умов хронічного опромінення. Цей ензим каталізує біосинтез цистеїну, з О-ацетил серину та сульфіді гідрогену, з вивільненням ацетату, кофактором реакції виступає піридоксаль 5'-P. Підсумовуючи, вміст більшості білків, задіяних у стрес реакціях, був більшим у зрілому насінні сої зібраному на ділянці поблизу ЧАЕС.

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 (табл. 3.2). Цей фермент гліколізу/глюконеогенезу зворотно каталізує окислення та фосфорилування гліцеральдегід-3-Р до 1,3-дифосфогліцерату. Ензим складається з 4 ідентичних субодиниць, кожна з яких має два консервативні функціональні домени. В літературі повідомлялось, що цитоскелет ймовірно створює решітку для просторового впорядкування гліколітичних ензимів – це забезпечує ефективний потік метаболітів. Цікаво, що GAPDH може мати деякі додаткові функції в стресових реакціях. Сигнальні каскади, які використовують перенос фосфогрупи, широко поширені в рослинах. Наприклад, при дослідженні стресу викликаного пероксидом водню у дріжджів, науковці виявили колокалізацію GAPDH із стрес-асоційованою MAPKKK (115). Також було показано, що окислення цистеїну цього гліколітичного ензиму сприяє фізичному контакту з компонентом сигнального шляху. Більше того, така взаємодія абсолютно необхідна для функціонування специфічного сигнального каскаду (115). Інші функції можуть проявлятися при зміні субклітинної локалізації, наприклад переміщення GAPDH в

ядро запускає апоптоз. Для малат дегідрогенази (MDH, Q6RIB6) також виявлено збільшене на 40% накопичення в насінні із забрудненої зони. Цей ензим цитозолу працює в циклі трикарбонових кислот, каталізує перетворення малату до оксалоацетату та тісно взаємодіє з цитрат синтазою.

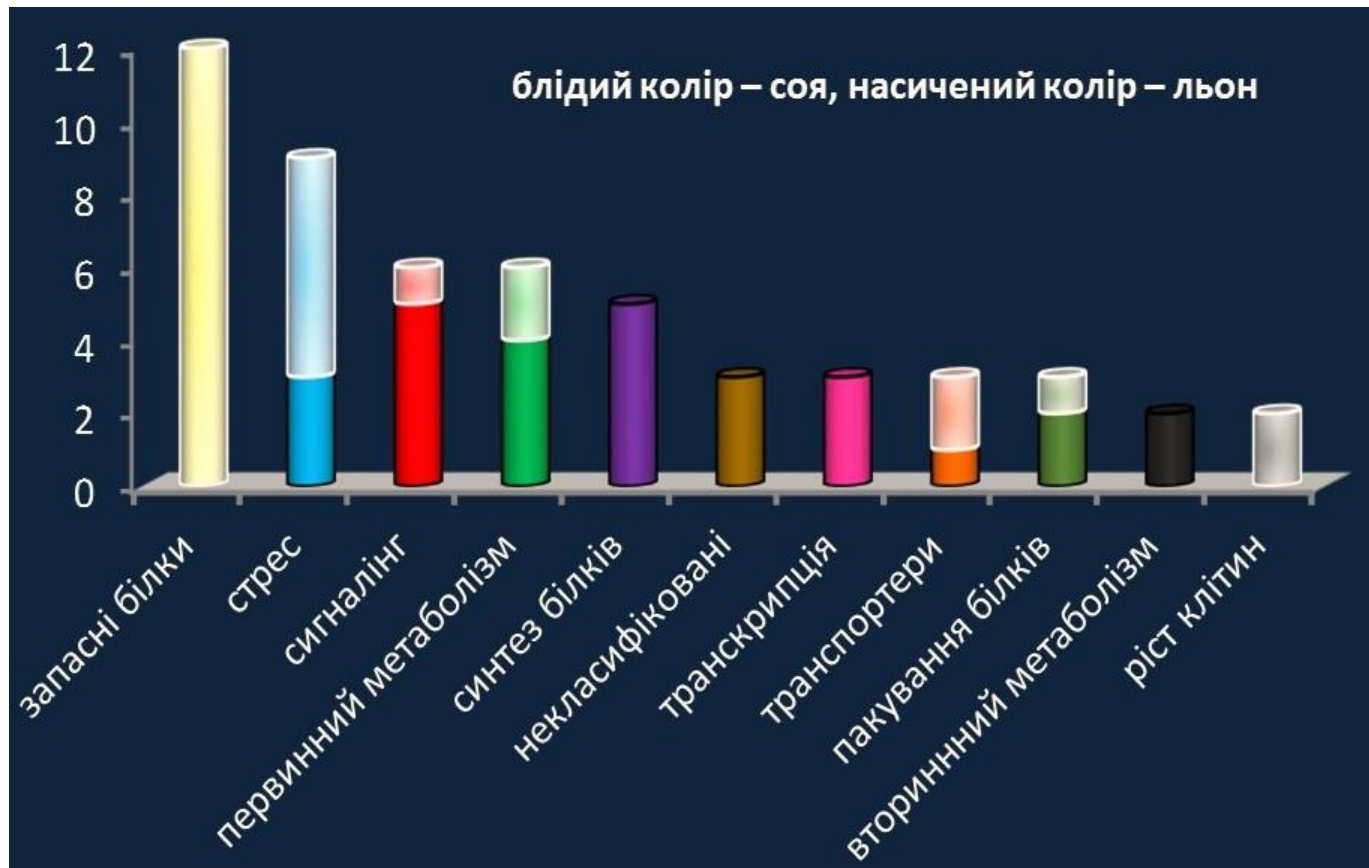


Рис. 3.9. Сумарна функціональна класифікація ідентифікованих білків насіння сої та льону, кількість яких змінилась при хронічному опроміненні.

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 має купінові домени та бере участь у накопиченні запасних резервів, а в літературі була показана безпосередня взаємодія з білком дозрівання MAT1. В цьому контексті доволі несподівано, що ми виявили різнонаправлені зміни білку дозрівання MAT1 та цукрозо-зв'язуючого білку 2. Другий локалізується в плазмалемі клітин, які активно транспортують глюкозу, включаючи клітини мезофілу молодого листя, допоміжні клітини флоєми, а також сім'ядолі. В сім'ядолях, висока експресія білку, спостерігається протягом друго-третього тижня після запліднення.

Профіль експресії гену цукрозо-зв'язуючого білку тісно корелює зі швидкістю транспорту цукрози. Зважаючи на те, що дана пляма була відсутньою на гелі білків виділених із матеріалу чорнобильського походження, доречно припустити, що в умовах хронічного опромінення, насіння сої отримує меншу кількість енергетичного матеріалу – цукрози. Для однозначного висновку, це міркування варто підтвердити прямим вимірюванням швидкості транспорту метаболіта.

Проведене дослідження також виявило вдвічі знижений вміст кальретикуліну (CRT1, A0A762) в насінні зі забрудненої радіонуклідами ділянки. Цей білок локалізований у люмені ендоплазматичного ретикулу та працює як багатофункціональна молекула в тваринних клітинах, зокрема зв'язуючи кальцій (116). Таким чином, він задіяний у регуляції клітинного гомеостазу цього іону. Під час ембріогенезу кальретикулін впливає на Ca^{2+} залежні шляхи транскрипції. Також кальретикулін виконує функції шаперону, особливо для глікопротеїнів і разом із кальнексином (схожий до кальретикуліну шаперон мембран ендоплазматичного ретикулу) забезпечує функціонування циклу, який контролює якість новосинтезованих глікозилізованих білків, за рахунок наявності численних сайтів зв'язування вуглеводів. Незважаючи на те, що кальретикулін ще не було систематично охарактеризовано в рослинах, літературні дані свідчать, що він відіграє важливу роль у стресі опосередкованому ендоплазматичним ретикулом (117). Інтеграція гену кальретикуліну рослин у мутантну культуру ембріональних фібробластів миші, які характеризувались порушенням пакування білків, забезпечила відновлення фенотипу дикого типу. Таким чином, дослідники підтвердили гіпотезу універсальності функцій цього шаперону в різних доменах живих організмів (117). Аналіз тканинної експресії кальретикуліну в рослинах показав високий вміст транскрипту в зоні поділу кореня та флоральній меристемі. Відомі взаємодії цього білку з тіоредоксином, а також шаперонами родини Hsp70.

Таблиця 3.2.

**Список ідентифікованих білків насіння сої, кількість яких змінилась, внаслідок відповіді рослин на вплив
радіонуклідів зони відчуження.**

Назва білка, скорочення або ген	Ідентифікаційний номер "UniProt"	Пропорція	Бал PLGS	Покриття /Пептиди	T Mr/pI	E Mr/pI	Субклітинна локалізація
Запасні білки							
гліцинін G2, GY2	P04405	1,79	8,10	19,6/3	25/5,4	22/8,4	вакуоля
гліцинін G2, GY2	P04405	1,39	7,70	19,2/2	25/5,4	21/6,7	вакуоля
гліцинін G2, GY2	P04405	-2,88	8,10	29,5/3	25/5,4	20/6,5	вакуоля
α -субодиниця β -конгліциніну	O22120	-2,41	7,39	24,7/8	63/4,7	55/6,1	вакуоля
α -субодиниця β -конгліциніну	O22120	1,73	7,14	17,1/6	63/4,7	62/5,3	вакуоля
α -субодиниця β -конгліциніну	O22120	1,63	7,74	27,4/12	63/4,7	63/5,0	вакуоля
α' -субодиниця β -конгліциніну	Q948Y0	1,88	8,12	27,4/13	72/5,5	58/5,9	вакуоля
β -субодиниця β -конгліциніну	Q50JD8	-1,85	7,42	47,6/18	48/5,6	54/5,8	вакуоля
β -субодиниця β -конгліциніну	Q50JD8	-3,89	7,42	49,0/16	48/5,6	55/5,7	вакуоля
β -субодиниця β -конгліциніну	O22121	-4,46	6,40	50,5/18	48/5,6	55/5,6	вакуоля
гліцинін G1, GY1	P04776	2,11	5,42	13,7/4	53/5,7	19/6,6	вакуоля
гліцинін G1, GY1	P04776	-5,59	8,12	22,4/6	55/6,1	21/6,7	вакуоля

		Стрес					
дегідрин, lea8	Q5K3Q9	2,33	7,42	31,5/4	20/6,1	33/6,1	ядро
дегідрин, lea8	Q5K3Q9	-3,98	7,42	31,5/4	20/6,1	30/6,4	ядро
дегідрин, LEA-D-11	Q70EL8	2,80	7,02	21,2/3	24/5,9	31/6,1	ядро
білок дозрівання MAT1 (родина дегідринів)	Q42447	3,09	7,42	23,0/3	26/6,0	37/6,1	цитоплазма
цистеїн синтаза, CSY	Q8W1A0	2,98	8,12	17,5/3	34/5,6	39/5,7	цитоплазма
бетаїн альдегід дегідрогеназа, BADH2	B0M1A5	1,29	8,12	25,6/7	55/5,2	63/5,4	пероксисома
		Ріст клітин					
білок дозрівання rPM32	Q9SPJ6	1,62	8,12	8,7/2	19/5,3	25/5,1	цитоплазма
35 кДа білок дозрівання rPM18	Q9ZTY1	1,46	8,12	14,6/5	35/5,9	44/6,1	цитоплазма
		Транспортери					
цукрозо-зв'язуючий білок, SBP	Q04672	↓	7,42	6,7/3	60/6,4	60/9,8	плазмалема
цукрозо-зв'язуючий білок 2, SBP2	Q84V19	-1,45	8,12	16,2/6	56/6,1	63/5,9	плазмалема
		Первинний метаболізм					
гліцеральдегід-3-Р дегідрогеназа, GAPDH	Q2I0H4	-4,80	8,12	18,9/4	37/6,8	45/6,8	цитоплазма
малат дегідрогеназа, MDH	Q6RIB6	1,37	8,12	8,4/2	36/6,3	44/6,2	цитоплазма
		Сигналінг					
лінолеат 9S-ліпоксигеназа-3 насіння, LOX1.3	P09186	-2,87	6,73	6,4/4	97/6,3	120/6,7	цитоплазма

Пакування білків

кальретикулін 1, CRT1	A0A762	-2,03	8,12	4,5/2	48/4,2	61/4,0	ендоплазматич ний ретикулум
-----------------------	--------	-------	------	-------	--------	--------	--------------------------------

Таблиця містить повну та коротку назву білка; ідентифікаційний номер; пропорцію, позитивне значення – більший вміст в умовах хронічного опромінення, негативне – навпаки; бал програми ProteinLynx Global Server (PLGS); відсоток покриття послідовності, кількість надійно ідентифікованих пептидів; теоретичну (T) та експериментальну (E) молекулярну масу (Mr) та ізоелектричну точку (pI); субклітинну локалізацію білку.

Іонізуюче випромінювання опосередковано впливає на експресію генів рослин. При вивченні молекулярних змін за дії γ -променів на проростки рису, показано драматичне пригнічення росту пагонів, що супроводжувалось появою вільних радикалів, зниженням вмісту фотосинтетичних пігментів і зростанням активності антиоксидантних ензимів (118). Аналіз експресії генів на мікрочіпах показав зміни численних транскриптів задіяних у сигнальних шляхах за експериментального опромінення. Ліпоксигенази (LOX1.3, P09186) було майже втричі менше в насінні сої з ділянки в зоні відчуження ЧАЕС, в порівнянні з насінням із контрольної ділянки (табл. 3.2). Відомо, що ліпоксигенази рослин задіяні в багатьох фізіологічних аспектах, включаючи ріст і розвиток, стійкість до шкідників, старіння чи відповідь на механічне пошкодження. Ліпоксигенази зв'язують один катіон заліза, який комплексується чотирма лігіндами, з них три гістидини. Білок працює в шляху біосинтезу оксиліпінів – групи біологічно активних сполук, які утворюються внаслідок окислення поліненасичених жирних кислот. До класу оксиліпінів належить, зокрема, фітогормон жасмонова кислота та її похідні, які контролюють сигнальні шляхи відповіді на механічне пошкодження. Також жасмонат ініціює старіння тканин. Раніше було показано, що ліпоксигенази реагують на стресові чинники (119) та можуть розпочинати ланцюгові реакції окислення ліпідів. Дослідники вивчили активність ензиму в сім'ядолях огірка, інфікованого різними видами псевдомонад, які відрізнялись за вірулентністю. Зростання активності ензиму виявили при інфекції несумісним патогеном. Пошкодження мембран внаслідок інфекції істотно знизилось при додаванні SOD (119). Ймовірно, підвищена активність ліпоксигенази є відповіддю на появу вільних жирних кислот, внаслідок вільнорадикальної атаки мембранних ліпідів. Також було встановлено, що ліпоксигеназ є достатньо багато протягом розвитку насіння сої, їх вміст зростав на пізніх етапах дозрівання насіння (9). Власне було використано 2-ВЕ, що дозволив прослідкувати профілі змін численних білкових плям. Кумулятивні профілі кількості різних функціональних класів, показали регуляцію білкових функцій протягом розвитку насіння – це дозволило глибше зрозуміти фізіологію онтогенезу бобових (9).

Цікаво, що раніше припускали можливість спільної роботи кальретикуліну та ліпоксигеназ, наприклад у випадку набуття гравікомпетентності (120). Було встановлено, що проростки рису позбавлені колеоптиля, не реагують на вектор гравітації, а екзогенне нанесення етилену знімає цей ефект. Набуття здатності сприймати вектор гравітації супроводжувалось накопиченням плям кальретикуліну і ліпоксигенази на 2-ВЕ гелях. Це вказує на взаємодію цих білків в процесі сприйняття стимулу. Також подібний феномен спостерігали при відповіді на біотичний стрес і гербіцид паракват (тригер перекисного окислення ліпідів) (119). Ймовірно, ініціюючою подією ураження, при застосуванні параквату, є накопичення супероксиду. Наше дослідження показало, що обидва білки присутні в меншій кількості в насінні зі забрудненої радіонуклідами ділянки. Дані представлені в пункті 3.3.1 оприлюднено в кількох публікаціях (121–123).

3.3.2. Складові моделі молекулярних реакцій сої на хронічне опромінення

На основі ідентифікації білків, вміст яких змінився, ми запропонували робочу модель реакції сої на умови радіонуклідного забруднення (рис. 3.10). Домінуючу відповідь на хронічне опромінення показали ЗБН сої. Цікаво, що раніше дослідники припустили додаткові функції ЗБН, окрім власне резервної (124). Було показано, що багато біохімічних сполук насіння мають токсичні властивості. Вони є факультативними для проростання, відповідно розвитку нової генерації рослин та відіграють істотну роль у захисті від шкідників. З іншого боку, патогенні мікроорганізми також мають механізми нейтралізації хімічної лінії захисту рослин, для споживання багатих резервів білків, вуглеводів та ліпідів. У іншому експерименті, було встановлено, що 2S альбуміни працюють як захисні білки (125). Ці молекули широко поширені серед квіткових рослин, вони синтезуються на специфічних фазах розвитку насіння та накопичуються у вакуолі. Традиційно 2S альбуміни вважались метаболічно нейтральними, проте недавно було доведено антимікробні властивості деяких представників цієї групи. Також відомо, що ЗБН реагують на різні стреси та етапи онтогенезу шляхом зміни їх складу. Наприклад, застосування саліцилової кислоти викликало мобілізацію ЗБН під час проростання *Arabidopsis thaliana* (126). Дослідники виявили зміни протеому та карбонілованих

(окислених) білків у насінні та проростках, після застосування саліцилової кислоти. Схоже, що фітогормон реактивує онтогенетичну програму дозрівання при проростанні, дозволяючи проросткам більш ефективно реагувати на нестачу води. Також було встановлено, що саліцилат істотно вплинув на мобілізацію ЗБН.

Інший експеримент по вивченню змін протеому, показав зростання вмісту α -субодиниці β -конгліцініну при відповіді на засолення (76). Використавши різні концентрації натрій хлориду вчені встановили, що висока доза солі пригнічує ріст кореня та індукує накопичення проліну. Також накопичувався білок LEA, споріднений дегідринам, навпаки, вміст інгібітору протеази і лектину істотно знижувався. У нашому дослідженні, близько 50% білків, кількість яких змінилась за дії хронічного опромінення, виявились ЗБН, серед яких 6 було у більшій кількості і також 6 у меншій кількості в зрілому насінні сої з забруднених ділянок (табл. 3.2). Літературні дані свідчать, що ЗБН утворюють багато плям на 2-ВЕ гелях білків сої та ріпаку протягом розвитку насіння (127). Група американських дослідників провела глибокий аналіз білків насіння, використавши комплементарні методи розділення на гелях та хроматографію. Цікаво, що лише 20% білків було виявлено обома методами, а функціональні групи запасних та енергетичних білків домінували. Порівняння багатьох білків насіння рослини (соя) із багатою олією (ріпак), показало важливі принципові відмінності, зокрема втричі більшу масу білків задіяних у синтезі жирних кислот у ріпаку (127). Динамічні профілі накопичення ЗБН сої протягом ембріогенезу мають складний характер. Цей факт було з'ясовано після розділення протеому рослини на 5 фазах розвитку із тижневим інтервалом, використовуючи 2-ВЕ (9). Дослідники ідентифікували сотні унікальних білків, які належали 14 основним функціональним категоріям. Кумулятивні графіки кількості функціональних груп дозволили прояснити часову специфічність фізіологічних процесів у насінні бобових. Цікавим класом, сумарний вміст якого зростав протягом дослідженого періоду, стали некласифіковані білки, для яких наразі незрозуміла чітка фізіологічна роль чи молекулярна активність (9). Комплексна неоднозначна поведінка ЗБН в забруднених умовах чорнобильської зони, додає аргументів для підтримки гіпотези про їх додаткові функції, окрім забезпечення метаболічних резервів. Напевно саме

перерозподіл складу окремих молекул чи їх ПТМ цієї функціональної групи, є критичним фактором для забезпечення функціонування рослин за умов хронічного впливу радіонуклідного забруднення.

Отримані дані також показують, що рослини, вирощені на забруднених ділянках чорнобильської зони, проявляють реакцію, подібну на дію важких металів (рис. 3.10). Встановлено, що стресового білку цистеїн синтази, було втричі більше в насінні із забрудненої ділянки, отже логічно припустити зростання синтезу цистеїну. 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 (128). Вважається, що цистеїн синтаза лімітує синтез фітохелатинів, які знешкоджують важкі метали шляхом формування комплексів. Захисну роль цистеїн синтази в адаптації рослин до важких металів було раніше доведено у трансгенному тютюні з підвищеною експресією гену (129). Трансгени тютюну зі збільшеною активністю ензиму, показали очевидну стійкість до підвищеної концентрації іонів кадмію, це супроводжувалось підвищеним вмістом фітохелатинів. Відносна концентрація іонів кадмію в трансгенних рослинах була нижчою, вказуючи на активне видалення металу або розведення внаслідок більш швидкого вегетативного росту (129). Також було показано підвищену стійкість до кадмію, селену, нікелю, свинцю і міді трансгенів з індукованою цитоплазматичною цистеїн синтазою, незалежно від її цільової локалізації в цитоплазмі або хлоропластах (130). Трансформовані рослини в умовах *in vitro* істотно краще витримували дію важких металів, порівняно із диким типом. При локалізації цистеїн синтази в обох органелах, феномен стрес адаптації був найпомітніший і спостерігалось накопичення кадмію в пагонах. Отже, варто перевірити ці трансгенні лінії при фіторемедіації забруднених ґрунтів.

В іншому експерименті було показано, що підвищена експресія цистеїн синтази в класичному модельному об'єкті тютюні, дозволила рослинам витримувати підвищені концентрації сірковмісних забрудників довкілля (131). Дослідники отримали лінії трансгенів експресуючих цистеїн синтазу в цитоплазмі і хлоропластах,

використовуючи комбінацію сучасних молекулярних і традиційних селекційних методів. Гібриди першого покоління росли при високих концентраціях токсичних диоксиду сірки та сульфїт аніону. Вміст цистеїну та глутатіону ефективно індукувався при застосуванні діоксиду сірки (131). Також гібриди проявляли підвищену стійкість до гербіциду параквату, який спричиняє окисне ураження генеруючи вільні радикали.

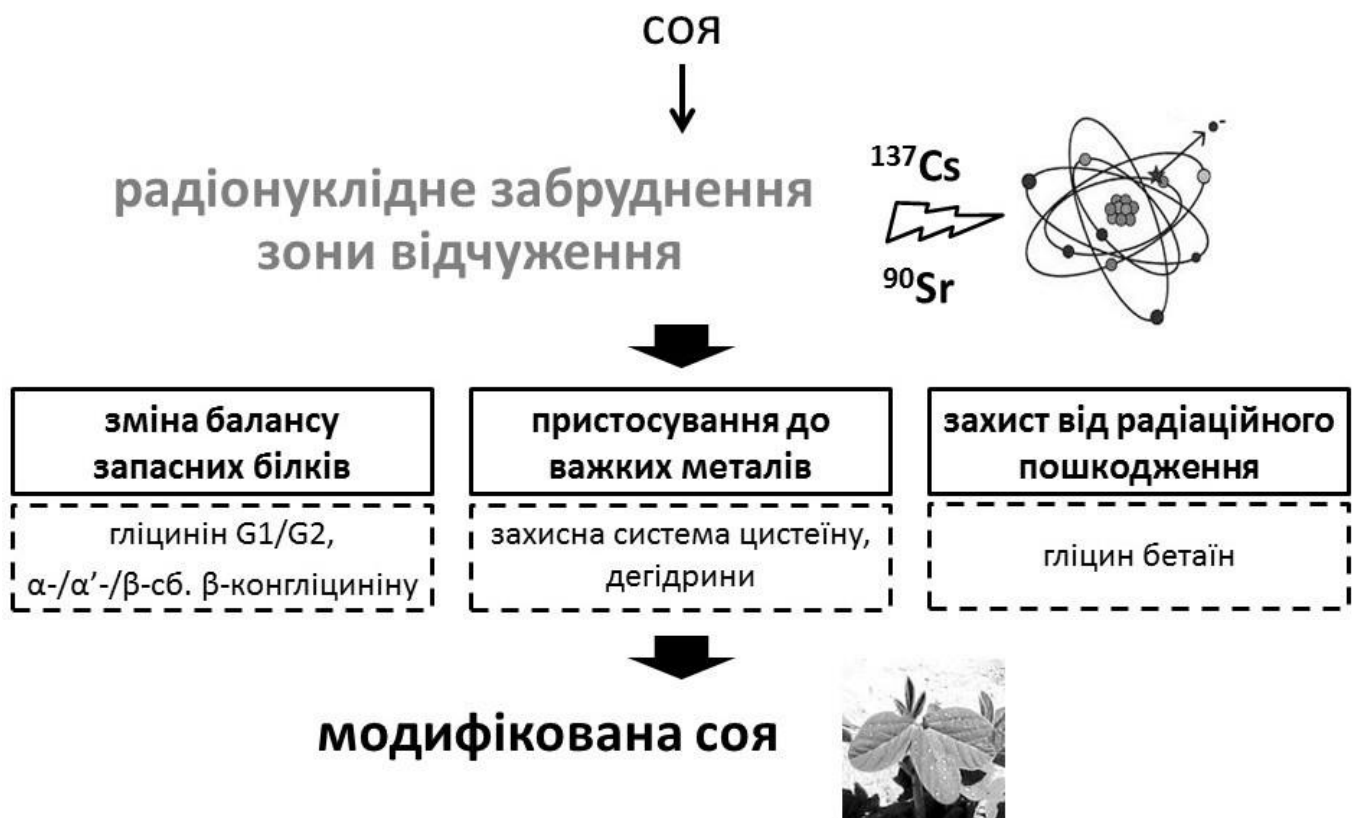


Рис. 3.10. Робоча модель реакції рослин на умови середовища зони відчуження на основі даних порівняльної протеоміки зрілого насіння сої, зібраного після одного року вирощування на забрудненій радіонуклідами та контрольній ділянках.

Іншими компонентами системи адаптації рослин до стресу викликаного важкими металами є дегідрини, які належать до класу білків, що з'являються наприкінці ембріогенезу (132). Дегідрини – це стрес індуковані білки, що накопичуються у вегетативних тканинах рослин. Вони проявляють сильні гідрофільні властивості та належать до групи LEA-D-11. Ці білки не утворюють чіткої вторинної структури, таким чином, маючи зони локальної неупорядкованості. Розмір молекул дегідринів варіює від 100 до 600 амінокислотних залишків. Досліди

по субклітинному фракціонуванню, підтвердили їх переважну локалізацію в цитоплазмі та ядрі (133). Більше того схоже, що ці білки асоціюються з макромолекулами клітини, наприклад нуклеопротейновими комплексами ядра або структур оточуючих мембрани в цитоплазмі. Чітка фізіологічна чи молекулярна функція дегідринів наразі не встановлена. Сучасні дані підтверджують гіпотезу, що дегідрини є сурфактантами, які пригнічують коагуляцію багатьох біополімерів, таким чином забезпечуючи їх структурну цілісність. Дослідження показали, що окремі підкласи цієї білкової родини зв'язують везикули з кислими фосфоліпідами, а інші – комплексують метали та здатні нейтралізувати гідроксид радикал. Наприклад, аналіз транскриптому виявив кілька генів дегідринів, які індукувались в умовах посухи (134). Проте варто зазначити, що описове дослідження експресії матриць потребує наступного функціонального підтвердження ролі виявлених змін. Врешті, активна участь дегідринів у захисті від зневоднення тканин має бути використана біотехнологією для покращення властивостей аграрних сортів.

Для встановлення біохімічної функції дегідринів дослідники використовують, зокрема, імунолокалізацію та біохімічні реакції *in vitro*, а також сучасні біоінформатичні алгоритми анотації за подібністю послідовностей (135). Роль цієї групи білків у захисті рослин від важких металів, була підтверджена на *Phaseolus vulgaris* (136). Вчені встановили, що ген PvSR3, кодуючий кислий дегідрин довжиною 202 амінокислоти, має два К-сегменти, розташовані за кластером 8 серинів. Експресія цього гену індукується важкими металами, саліциловою кислотою та пероксидом водню, але не змінюється при вірусній інфекції чи додаванні абсцизової кислоти. Ці дані довели, що PvSR3 задіяний у відповіді на токсичний вплив важких металів. Деякі дегідрини проявляють властивості прямого зв'язування важких металів. Наприклад, 2 гени дегідринів SK2 типу, було клоновано та вивчено на предмет підвищення стійкості трансгенів до дії важких металів (137). Кількісна ПЛР показала низький рівень експресії BjDHN2 та BjDHN3 за нормальних умов і швидко індукцію при появі в середовищі важких металів. Блокування експресії BjDHN3 спричинило накопичення малонового діальдегіду (індикатор окисного стресу) та зниження вмісту забрудників. Навпаки, трансгенний тютюн з індукованою

експресією, мав знижений вміст малонового діальдегіду за дії солей кадмію та цинку. Таким чином, вчені показали, що досліджені дегідрини підвищують стійкість рослин до важких металів, допомагаючи забезпечити стабільність мембран рослин (137). Із чотирьох ідентифікованих у нашому дослідженні дегідринів, трьох виявилось більше, а одного менше в насінні з ділянки в зоні відчуження ЧАЕС. Це суперечливе накопичення різних ізоформ дегідринів, внаслідок впливу радіонуклідного забруднення, можна пояснити специфічними метаболічними функціями конкретних поліпептидів, які також включають захист клітин рослин під час втрати води насінням.

Врешті, наші дані показали, що вміст пероксисомальної бетаїн альдегід дегідрогенази зріс на 30% у насінні із забруднених ділянок. Цей ензим каталізує останній крок у синтезі гліцин бетаїну. Дослідники клонували дві бетаїн альдегід дегідрогенази з ячменю (138). Обидва гени мали різний профіль експресії: перший транскрипт проявлявся переважно в коренях й індукувався засоленням, посухою та абсцизовою кислотою; другий – був присутній у листках і також реагував на стресові фактори середовища. Для бетаїн альдегід дегідрогенази було продемонстровано захисний ефект проти радіаційних пошкоджень у крові людини *in vitro* (139). У присутності гліцин бетаїну знизилась частота хромосомних аберацій, викликаних дозою 4 Гр. Результати було перевірено в *in vivo* експерименті на мишах. Ін'єкція гліцин бетаїну перед опроміненням ^{137}Cs підвищила відсоток виживання тварин. Отже цілком ймовірно, що схожа захисна активність гліцин бетаїну проти радіації, може проявлятися у насінні сої. Описані міркування було інтегровано у модель реакції сої на хронічний вплив радіонуклідного забруднення (рис. 3.10). Ми виділили блоки умовних фізіологічних реакцій, що включають конкретні білки, кількість яких змінилась у насінні сої, зібраному на ділянці поблизу ЧАЕС.

3.3.3. Функціональна класифікація білків льону на дев'ять груп

Ідентифіковані білки льону було розділено на 9 функціональних кластерів (рис. 3.9), відповідно загальноприйнятої схеми з незначними змінами аналогічно сої (110). Ця функціональна класифікація була розроблена на основі біоінформатичної інтерпретації частини секвенованого геному модельного об'єкту *Arabidopsis thaliana*.

Цікаво, що 54% генів арабідопсису мали істотну схожість до відомих генів інших організмів, а функціональні родини генів знаходились у кластерах. Необхідно зазначити, що в багатьох випадках теоретичні й встановлені нами експериментальні M_r та pI відрізняються, через ідентифікацію гомологічних білків, які належать іншим видам рослин.

Спочатку екологічні сигнали повинні сприйнятись рослинним організмом. Наступним кроком є передачі інформації (тобто внутріклітинний сигналінг), як результат організм ініціює відповідні зміни. У відповідь на стрес, може бути задіяно кілька сигнальних шляхів (140). Пошкодження ДНК, викликане радіацією, здатне індукувати апоптоз, запустивши належні сигнальні шляхи, наприклад керамідний. У свою чергу, цей шлях інгібується каскадом протеїнкінази C. Вважається, що пошкодження ДНК активує керамід синтазу, таким чином підвищуючи вміст кінцевого продукту. Обидва згадані сигнальні білки є потенційними кандидатами для регуляції процесів апоптозу при опроміненні клітинних популяцій.

Серед білків насіння льону, кількість яких змінилась у насінні, вирощеному під впливом хронічного опромінення, є складові декількох сигнальних шляхів (табл. 3.3). Вміст ліпоксигенази (LOX1, B9IJA0) знижується в протеомі льону, вирощеному на ґрунтах забруднених радіонуклідами. Ліпоксигенази рослин можуть бути задіяні в різних аспектах фізіології та відповіді на стрес. Цей ензим каталізує перший крок у біосинтетичному шляху, що веде до утворення оксиліпінових алармонів (141). Оксиліпіни можуть утворюватись внаслідок хімічного окислення, або в реакціях, каталізованих ліпоксигеназами. До групи оксиліпінів належать різні антимікробні сполуки, наприклад дивінілові етери. Специфічні ліпоксигенази можуть запускати накопичення конкретних кінцевих продуктів, включаючи жасмонову кислоту (142). Фітогормон жасмонова кислота регулює широкий спектр реакцій росту, розвитку і стресу рослин. Нещодавно було охарактеризовано родину білків JAZ, які гальмують відповіді, викликані цим гормоном оксиліпінової групи. Білки JAZ забезпечують гнучкість регуляції генів жасмоновою кислотою. Зниження вмісту ліпоксигенази в умовах радіонуклідного забруднення може означати, що пригнічується сигнальний шлях, який включає оксиліпіни, а це може призвести до зниження стійкості до

фітопатогенів. Подібний феномен внаслідок дії хронічного опромінення описано в літературі (143). Очевидно, така закономірність накопичення ліпоксигенази є інтегральною частиною відповіді на зростання в середовищі забрудненому радіонуклідами. Слід зазначити, що паралельне дослідження білків сої, також виявило зниження вмісту цього ензиму в насінні, вирощеному на забрудненій території.

Мережа міжбілкових і білок-метаболіт взаємодій є типовою рисою складних біологічних систем, що вимагають передачі сигналу від рецепторів плазмалемі до транскрипційних факторів ядра. Ріст і розвиток рослин, потребує специфічних міжбілкових взаємодій, для протікання конкретних біохімічних і молекулярних реакцій у клітинах. Регуляція мережі, зазвичай, досягається зворотною модифікацією задіяних білкових складових. Домінуючою ПТМ є фосфорилювання, хоча також задіяні убіквітінування лізінів та палмітоїлування цистеїнів. Ключовим компонентом всіх сигнальних шляхів є зворотне фосфорилювання білків. Зокрема, сигнали більшості подразників середовища, опосередковані MAPK каскадами. Найбільш інформативними для розуміння роботи сигнальної мережі є дослідження на рослинах генетичних моделях (144). Існують експериментальні докази, що сучасна фосфопротеоміка здатна вирішувати комплексні біологічні питання (145). Серед інших молекулярних подразників, каскади фосфорилювання задіяні у передачі сигналу окисного стресу викликаного пероксидом водню. Пероксид водню може опосередковано інгібувати активність протеїн кіназ, хімічно окислюючи залишки метіоніну поблизу місць фосфорилювання (146). Це прямо пов'язує окисний стрес із сигнальними механізмами, які використовують каскади фосфорилювання.

Таблиця 3.3.

Список ідентифікованих білків насіння льону, кількість яких змінилась, внаслідок відповіді рослин на вплив радіонуклідів зони відчуження.

Назва білка, скорочення або ген	Ідентифікаційний номер "UniProt"	Пропорція	Бал PLGS	Покриття /Пептиди	T Mr/pI	E Mr/pI	Субклітинна локалізація
Синтез білків							
фактор елонгації 1 α , EF1 α	A8MSE8	2,65	668	17,0/8	44/8,4	46/6,9	цитоплазма
фактор елонгації 1 α , EF1 α	Q58I24	4,86	790	26,1/11	49/9,4	48/7,0	цитоплазма
метіоніл tРНК синтаза	B9RWD7	2,09	68	4,1/2	76/5,8	16/7,5	цитоплазма
гомолог пуміліо 5 РНК-зв'язуючий білок, APUM5	Q9LJX4	-23,63	132	5,1/2	71/5,7	16/7,1	цитоплазма
гомолог пуміліо 5 РНК-зв'язуючий білок, APUM5	Q9LJX4	-5,85	114	5,1/2	71/5,7	38/7,1	цитоплазма
Сигналінг							
схожий на ліпоксигеназу, LOX1	B9IJA0	-2,13	197	3,5/4	97/5,5	75/6,2	цитоплазма
убіквітин С-кінцева гідролаза	D7T3A6	-5,80	66	4,7/3	130/5,5	39/5,1	протеасома
α -субодиниця протеасоми типу 6A, PAA1	O81146	-1,52	261	16,7/5	27/5,5	25/7,1	протеасома
білок інгібування транспорту	Q2R3K5	-1,29	81	6,5/2	49/8,0	27/5,3	протеасома
білок родини 14-3-3, GF14 ω	Q9AT81	-2,35	177	16,5/4	29/4,5	29/7,4	цитоплазма

Первинний метаболізм							
фруктозобіфосфат альдолаза, FAB6	Q9SJQ9	1,50	386	11,2/4	38/7,2	35/6,9	цитоплазма
3-Р-гліцерат кіназа, PGK	B9RHY3	1,53	315	13,2/6	42/5,5	43/7,5	цитоплазма
мітохондріальна аспартат амінотрансфераза, ASP1	P46643	1,91	139	6,0/2	48/8,2	40/7,5	мітохондрія
гліцерол-3-Р О-ацилтрансфераза, GPAT	A9SY86	-4,59	77	5,2/2	55/6,2	20/8,0	хлоропласт
Некласифіковані							
неохарактеризований білок	A9NUZ8	5,00	74	14,0/3	42/6,0	64/7,0	невідома
експресований білок	Q2R9Q1	-2,05	63	15,1/3	20/6,7	19/7,8	невідома
неохарактеризований білок	Q84W28	1,53	59	5,3/3	78/9,1	70/8,5	невідома
Транскрипція							
транскрипційний фактор, bHLH90	Q0WNR2	2,69	49	5,7/3	50/6,7	15/5,0	ядро
схожий на транскрипційний фактор цинкових пальців	A2WUV8	-1,92	67	14,2/4	25/6,1	18/4,7	ядро
білок родини інтрон матураз II	Q94JV3	-1,56	86	7,0/2	33/9,7	15/8,2	ядро
Стрес							
холін монооксигеназа, СМО	Q9LKN0	-2,00	107	8,0/3	48/6,1	29/5,7	хлоропласт
гомолог гену C7 (родина глутатіон трансфераз)	Q42269	-1,74	192	6,7/3	16/5,9	26/6,4	цитоплазма

білок патогенезу 10, PR-10	Q2VT55	-4,91	60	26,4/2	17/4,9	56/5,7	цитоплазма
Пакування білків							
α -субодиниця білку 1 безхвостого комплексу, TCP1 α	P28769	-3,78	224	9,0/5	59/5,9	67/7,1	цитоплазма
білок зв'язування люмену 2, VIP2	F4K007	-1,50	295	12,7/7	67/4,9	44/7,2	ендоплазматичний ретикулум
Вторинний метаболізм							
ензим берберинового мосту 8, BBE8	Q9SA85	-1,40	76	8,9/3	59/9,6	48/9,3	клітинна стінка
путресцин N-метилтрансфераза, PMT	Q70EW6	-1,59	96	9,6/3	38/6,0	33/6,0	цитоплазма
Транспортери							
мітохондріальний АДФ/АТФ транспортер 1, AAC1	P31167	-3,85	134	9,4/4	41/10,1	27/9,7	мітохондрія

Таблиця містить повну та коротку назву білка; ідентифікаційний номер; пропорцію, позитивне значення більший вміст в умовах хронічного опромінення, негативне – навпаки; бал програми ProteinLynx Global Server (PLGS); відсоток покриття послідовності, кількість надійно ідентифікованих пептидів; субклітинну локалізацію білку. Скорочення: транспортна рибонуклеїнова кислота (тРНК), теоретична (T), експериментальна (E), молекулярна маса (Mr), ізоелектрична точка (pI), аденозин дифосфат (АДФ), аденозин трифосфат (АТФ).

Протеом насіння льону, вирощеного в умовах радіоактивного забруднення, має знижений вміст GF14ω, що входить до родини 14-3-3 молекулярних адаптерів (Q9AT81) (табл. 3.3). Велика родина 14-3-3 включає кислі поліпептиди масою приблизно 30 кДа, які зазвичай утворюють гомо- або гетеродимери. В центрі послідовності знаходиться консервативна зона, що формує основний функціональний домен, відповідальний за взаємодію з білками-клієнтами. Молекулярні адаптери зазвичай взаємодіють із білками, які мають фосфосеринові чи фосфотреонінові мотиви. Фосфорилювання конкретних амінокислотних залишків створює активні сайти впізнавання і зв'язування 14-3-3 білків. Білки 14-3-3 проявляють наступні механізми дії: 1) пряма регуляція каталітичної активності зв'язаного партнера, 2) опосередкування взаємодії з іншими молекулами клітини, 3) контроль субклітинної локалізації ліганда. Димер, утворений ланцюгами 14-3-3, здатний змінити конформацію зв'язаного білку, зберігаючи власну просторову структуру. Внаслідок приєднання білків-адаптерів родини 14-3-3 регулюються міжбілкові взаємодії та контролюються ключові клітинні функції (147). Тобто, представники родини 14-3-3, що мають домени зв'язування фосфорилюваних амінокислотних залишків, є одними із важливих посередників міжбілкових взаємодій. Наприклад, була доведена участь 14-3-3 в регуляції метаболізму цукрів, протонного градієнту плазмалемі та локалізації транскрипційних факторів. Важливо зазначити, що міжбілкові взаємодії опосередковані молекулярними адаптерами, залежать від фосфорилювання конкретних позицій поліпептидних ланцюгів (148). У попередніх дослідженнях було встановлено біохімічні деталі впливу 14-3-3 на метаболічні процеси рослин, наприклад активність нітрат редуктази.

Нещодавно було проведено детальні дослідження інтерактому 14-3-3 білків, який чітко показав участь цієї групи у молекулярних шляхах внутріклітинної передачі сигналу. Також було доведено участь молекулярних адаптерів у регуляції фізіологічних процесів рослин опосередкованих фітогормонами, зокрема брасиностероїдами (148). Білки 14-3-3 є продуктами кількох мультигенних родин. Їх конкретні представники, зазвичай, відіграють специфічну роль залежно від білка-партнера. Раніше дослідники повідомили, що GF14ω *Arabidopsis thaliana* може

утворювати димери принаймні із 10 іншими гомологами 14-3-3 родини; а нові результати отримані внаслідок проведення досліджень міжбілкової взаємодії, використовуючи подвійну афінну очистку, вказали на можливість взаємодії аж із 121 ймовірним партнером, включаючи молекули задіяні в іонному транспорті (наприклад калієві, хлоридні та кальцієві канали), гормональному сигналінгу (зокрема ензими задіяні у біосинтезі етилену та рецептори брасинолідів), сигналінгу за участю ліпідів (фосфоліпаза D) і транскрипції (149). Більшість цих виявлених партнерів була попередньо невідомою. Таким чином, зниження вмісту GF14 ω у насінні льону може мати глобальні наслідки на молекулярну фізіологію рослин.

Білку інгібування транспорту (Q2R3K5) було на 30% менше в насінні льону зібраному на забрудненій ділянці. Цей білок зв'язує фітогормон ауксин, а також 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 модифікації та подальшого розщеплення в протеасомах. Функціональний комплекс SCF убіквітин лігази додатково містить Skp1 білок (медіатор взаємодії компонентів), кулін та Rbx1 (взаємодія із E2 лігазою). Припускається ключова роль F-домен вмісних поліпептидів у деградації білків клітинного циклу. 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 евкаріотичних протеасом, яке оточене регуляторними структурами. Протеасома є функціональним комплексом різноманітних протеаз, що працюють із використанням енергії аденозин трифосфату (АТФ). Ядро протеасоми має 28 каталітичних субодиниць, просторово організованих кільцями, які формують структуру типу бочки, а каталітична камера знаходиться всередині цієї структури. Виявлена нами змінена субодиниця проявляє активність ендопептидази треонінового типу. Відомі факти взаємодії α -субодиниці протеасоми із 14-3-3 білками. Оскільки усі білки льону задіяні в сигналінгу мали знижений вміст у насінні, вирощеному за дії радіонуклідів, доречно припустити, що вони є ланками одного ланцюгу, що починається взаємодією фосфорильованих білків і закінчується їх деградацією на протеасомах. У наступних експериментах варто дослідити

конкретну участь ізольованих клонованих продуктів генів у радіаційно-індукованих процесах, для однозначного підтвердження їх функціональної ролі. Убіквітин C-кінцевої гідролази (D7T3A6) було майже в 6 разів менше в зрілому насінні з ділянки, забрудненої радіонуклідами. Цей ензим здійснює деубіквітування білків, а також задіяний у дозріванні попередника поліубіквітину. Він належить родині пептидаз C19 та регулює сортування цільових білків на протеоліз за участю спеціалізованих субклітинних структур. У літературі описано прямий експеримент по дослідженню активності 26S протеасом після дії різних доз іонізуючої радіації. Було зроблено висновок, що ця субклітинна структура є безпосередньою мішенню стресового чинника. Ймовірно, саме інгібування активності спеціалізованого протеолізу пояснює антизапальну дію малих доз у тварин (150). Також було доведено, що зниження активності протеасом опосередковане вільними радикалами, причому внаслідок опромінення у клітинах накопичуються поліубіквітиновані білки (151).

Метаболічні зміни часто спостерігаються в умовах стресу. Добре відомо, що вплив несприятливих умов довкілля призводить до збільшення швидкості дихання і гліколізу (152). Експерименти показали, що дріжджі зі зниженою активністю гліколітичного ензиму тріозофосфат ізомерази проявляють підвищену стійкість до токсичного радикалу окисника тіолів. Це відбувається завдяки зміні потоку метаболічного шляху з гліколізу на пентозо-фосфатний шлях, що в свою чергу впливає на баланс цитоплазматичного НАДФ⁺. Відомо, що інший ключовий ензим гліколізу GAPDH інактивується внаслідок окисного стресу, викликаючи схожі біохімічні наслідки. Наше дослідження протеому показало, що цього ензиму було значно менше в насінні сої, котре зазнало хронічного опромінення. Припускається, що GAPDH є метаболічним реле перенаправлення потоку вуглеводів для нейтралізації окисного стресу. Наслідком є зміна гомеостазу цитоплазматичних метаболітів – це фундаментальний механізм реакції еукаріотичних клітин за стресових умов (153). Тобто суттю є забезпечення ключових антиоксидантних систем клітини додатковими відновними еквівалентами, для швидкого та ефективного знешкодження вільних радикалів. Такий механізм є універсальним для різних систематичних груп вищих організмів. Для глибшого розуміння феномену

метаболических змін, окисний стрес було індуковано в культурі клітин арабідопсису. Потім дослідники вивчили транскриптом, метаболізм і ключові метаболічні потоки рослин (154). Швидкі реакції проявлялись у зниженні вмісту метаболітів циклу трикарбонових кислот і проміжних продуктів синтезу амінокислот. Паралельно транскриптом реагував змінами регуляторних елементів ДНК. Проте вже після 6 годин впливу, вміст ключових метаболітів, наприклад пірувату, повернувся до норми. Дослідження метаболічних потоків не виявило принципових змін в умовах окисного стресу. Більше того, транскрипти генів первинного метаболізму не корелювали з концентраціями метаболітів продуктів реакцій. Тобто чітка регуляція метаболічних процесів за стресових умов залишається погано зрозумілою.

Ми виявили, що вміст двох ферментів гліколізу – фруктозо-1,6-біфосфат альдолази (FAB6, Q9SJQ9) і 3-Р-гліцерат кінази (PGK, B9RHY3), зріс на 50% у насінні льону, зібраному зі забрудненої ділянки, порівняно з насінням, що зростало на контрольній ділянці (табл. 3.3). Відкритим питанням залишається чи ці зміни здатні спричинити істотний вплив на метаболізм. Відома ключова роль FAB у гліколізі і глюконеогенезі цитоплазми, але також вона працює в циклі Кальвіна пластид. Цей фермент каталізує зворотне розщеплення фруктозо-1,6-біфосфату до дигідроксиацетон-Р та гліцеральдегід-3-Р. При окисному стресі, гліколітичний ензим може зв'язувати актин і сприяти його асоціації в пучки, цей процес є зворотним. Інгібується FAB окисленням глутатіоном, таким чином ймовірно є частиною сигнальної системи чутливої до редокс статусу клітини. Було показано, що різні гени FAB індукуються абіотичними стресорами (засоленням, забрудненням іонами кадмію, посухою чи високою температурою) (155). Детальніше, дослідники поставили за мету з'ясувати молекулярні функції цього ензиму в арабідопсису. В геномі було виявлено 8 генів даної родини, три з них ймовірно мають пластидну локалізацію, а п'ять – цитоплазматичну, що було підтверджено конфокальною мікроскопією. Інший змінений ензим 3-Р-гліцерат кіназа каталізує зворотне перетворення 1,3-дифосфогліцерату до 3-Р-гліцерату із утворенням АТФ на другому етапі гліколізу.

Класично було прийнято вважати, що контроль швидкості потоку гліколізу відбувається за рахунок регулювання активності гексокінази, фосфофруктокінази і піруват кінрази. Схоже, що у рослин гліколіз відбувається як у цитоплазмі так і в пластидах, а регуляція метаболічного шляху має складніший характер порівняно з іншими організмами. Альтернативні реакції гліколізу цитоплазми забезпечують метаболічну гнучкість, необхідну для розвитку рослин та адаптації до стресових факторів середовища (156). Зокрема припускається, що деякі гліколітичні ензими проявляють альтернативні функції. Нещодавно було запропоновано концепцію, що насправді гліколітичний потік може визначатись комплексною взаємодією між усіма ферментами метаболічного шляху (157). Оскільки електростатичний потенціал ензиму є ключовою детермінантою взаємодії з субстратом, то саме цей показник визначає каталітичні властивості. Аналіз гліколітичного шляху різних організмів показав наявність двох паралельних шляхів гліколізу в рослинах, перший аналогічно тваринам забезпечує енергією, а другий дає можливість адекватно реагувати на стрес. Для FAB було знайдено велику різницю електростатичного потенціалу для різних досліджених таксономічних категорій. Зростання вмісту двох ферментів біохімічного шляху, знайдених у нашому дослідженні змін протеому льону при хронічному опроміненні, може мати істотні метаболічні наслідки. Навпаки, у сої спостерігалось зниження вмісту GAPDH. Хоча ми не вважаємо, що має місце пришвидшення потоку гліколізу в цілому, проте виявлені зміни можуть посунути баланс різних сегментів шляху, таким чином призвівши до накопичення багатofункціональних проміжних продуктів.

Наприклад, вивчивши молекулярні механізми впливу гіпоксії, для оцінки балансу метаболічних потоків у стресових умовах, дослідники запропонували цікаву концепцію адаптації (158). Адаптовані дрозофіли характеризувались здатністю виробити більше АТФ на молекулу глюкози, тобто використовувати субстрат ефективніше, бо ймовірно менше проміжних продуктів ішло на поновлення метаболічного пулу. Вміст мітохондріальної аспартат амінотрансферази (трансамінази, ASP1, P46643), важливого ензиму метаболізму амінокислот (азоту) та органічних кислот циклу Кребса (виробництва енергії), був більшим при хронічному

опроміненні. Трансаміназа каталізує перенесення аміногрупи з аспартату на глутамат, використовуючи піридоксаль-Р як кофактор. Вміст гліцерол-3-Р О-ацилтрансферази (GPAT, A9SY86), котра локалізується в стромі хлоропластів, знизився майже в 5 разів за дії радіонуклідів. Цей ензим відповідає за специфічне додавання насичених та ненасичених ланцюгів жирних кислот у гліцероліпиди мембрани хлоропластів. Цей процес відіграє важливу роль у адаптації рослин до дії низьких температур. Підсумовуючи, виявлено, що кілька ензимів первинного метаболізму льону різної субклітинної локалізації, зазнали суттєвих змін в умовах радіонуклідного забруднення.

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. Показано, що бетаїн альдегід дегідрогенази, ферменту, який каталізує останній крок синтезу гліцин бетаїну, більше в насінні сої, вирощеному на забруднених радіонуклідами ділянках. В ячменю було виявлено 2 гени бетаїн альдегід дегідрогенази з пероксисомальною та хлоропластною локалізацією (138). Пероксисомальна бетаїн альдегід дегідрогеназа домінувала в коренях, а хлоропластна – в листках. Секвенування N-кінця обох ізольованих білків, показало відсутність сигнальних послідовностей. Навпаки, в льону вміст холін монооксигенази (СМО, Q9LKN0), яка каталізує перший етап шляху біосинтезу гліцин бетаїну в рослинах, падає вдвічі у зрілому насінні, вирощеному на забрудненому радіонуклідами ґрунті, порівняно з контролем (табл. 3.3). Відомо, що експресія гену холін монооксигенази індукується засоленням. Використовуючи як кофактор 2 молекули відновленого феродоксину, ензим перетворює холін на бетаїн альдегід гідрат. У шпинату процес синтезу гліцин бетаїну, котрий є малостабільним метаболітом, проходить у 2 стадії. В літературі було описано ефективний протокол очистки холін монооксигенази з рослинних тканин після осмотичного стресу (159) Було встановлено, що холін монооксигеназа є гомодимером. Цікаво, що інші дослідники показали участь гліцин бетаїну в захисті клітин крові від пошкодження індукованого опроміненням (139). Кількість хромосомних аберацій, викликаних опроміненням лімфоцитів ¹³⁷Cs

знизилась майже на 40%, більше того, зріс відсоток виживання мишей, котрі отримали ін'єкцію гліцин бетаїну перед опроміненням. Інша група дослідників розробила стратегію, яка б мала дозволити створення рослин із зміненим вмістом гліцин бетаїну. Додавання гліцину та серину у середовище культивування солестійкої бактерії підвищувало вміст гліцин бетаїну. Тому вчені ізолювали ген 3-Р-гліцерат дегідрогенази, що каталізує перший крок біосинтезу серину та показали, що гетерологічна експресія в арабідопсисі, викликає накопичення гліцин бетаїну та покращує стрес стійкість трансгенів (160). Отже, 3-Р-гліцерат дегідрогеназа постачає попередник серин для біосинтезу кінцевого продукту. Такі трансгени дозволять пряму перевірку гіпотези, що підвищений вміст гліцин бетаїну здатний захистити рослини від підвищеного радіаційного фону. Обернене накопичення ензимів короткого біосинтетичного шляху гліцин бетаїну в тканинах насіння сої та льону, можна пояснити різною фенотиповою реакцією цих рослин, що також відображалась істотно більшим накопиченням радіонуклідів соєю.

Також ми виявили, що в насінні льону зібраному на забрудненій ділянці знижується вміст стресового білку глутатіон трансферази (Q42269). Відомо, що цей білок знешкоджує забрудники середовища шляхом приєднання глутатіону. Внаслідок впливу хронічного опромінення в п'ять разів знизився вміст білку патогенезу 10 (PR-10, Q2VT55). Родина PR-10 включає малі цитоплазматичні білки, які наприклад є домінантними алергенами вітрозапильних дерев. Ці білки індукуються внаслідок атаки рослинних тканин патогенами, але також при дії абіотичних стресових факторів. До групи вторинного метаболізму належали 2 білки вміст яких знизився в тканинах льону зі забрудненої ділянки (табл. 3.3, рис. 3.9). Ензим берберинового мосту (BBE8, Q9SA85) має численні глікозилювання та зв'язує флавін аденін динуклеотид. Геном рослин містить чимало послідовностей, кодуючих ферменти берберинового мосту, проте біохімічні функції цієї безумовно цікавої групи залишаються недостатньо охарактеризованими. Саме тому, в літературі було описано гетерологічну експресію двох клонованих BBE (161). Після очистки було охарактеризовано каталітичні властивості цих білків. Виявилось, що вони окислюють ароматичні спирти, наприклад кумариловий, синапіловий та

коніфериловий до альдегідів і локалізуються у клітинній стінці. Таким чином доречно припустити участь ВВЕ у біосинтезі лігніну. Біоінформатичний аналіз мотивів послідовностей показав, що більшість членів родини ензимів берберинового мосту арабідопсису мають подібні функції. Іншим білком категорії вторинного метаболізму є путресцин метилтрансфераза (PMT, Q70EW6), задіяна у біосинтезі поліамінів. Конкретніше, цей ензим каталізує S-аденозилметіонін залежне метилування путресцину, кінцевими продуктами біосинтетичного шляху можуть бути алкалоїди. Поліаміни є відомими посередниками регуляції поділу і диференціювання клітин; вважається, що їх функції реалізуються іонною взаємодією з нуклеїновими кислотами.

Ще однією функціональною групою, вміст якої змінився в зрілому насінні льону за експериментальних умов, стали неохарактеризовані білки (рис. 3.9). Вміст першого неохарактеризованого білку (A9NUZ8) зріс у 5 разів. Пошук гомологій послідовностей показав наявність доменів цинкових пальців. Припускається, що білки такого типу взаємодіють із різними класами макромолекул клітини, включаючи ДНК та білки. Більше того, даний білок має так званий "RING" домен довжиною 40-60 амінокислот, що опосередковує міжбілкові взаємодії. Домен "RING" є характеристичним для E3 убіквітин лігаз. Убіквітин лігази E3 визначають субстратну специфічність убіквітинування. Експресований білок (Q2R9Q1), якого менше в 2 рази в насінні, що зазнало опромінення, містить анкіринові повтори. Ці мотиви білкових послідовностей довжиною приблизно 33 амінокислоти є також доменами міжбілкових взаємодій. Охарактеризовані білки, котрі містять ці домени, приймають участь у різноманітних фізіологічних/молекулярних процесах, наприклад ініціація транскрипції, підтримка структури цитоскелету або транспорт іонів. Вміст неохарактеризованого білку (Q84W28) зріс в умовах радіонуклідного забруднення. Пошук подібності послідовностей виявив, що цей білок має домен розвитку та апоптозу, який сформований консервативним амінокислотним мотивом довжиною близько 130 залишків. Білки цієї групи задіяні у реалізації ефекту фітогормонів, розвитку зародка чи апоптозу, викликаного атакою патогенів. Підтвердження

функціональної ролі неklasифікованих білків у контексті реакції рослин на хронічне опромінення, вимагатиме глибших молекулярних і біохімічних експериментів.

В цілому 9 білків льону, вміст яких змінився внаслідок впливу радіонуклідного забруднення зони відчуження ЧАЕС, пов'язані з транскрипцією, синтезом і транспортом білків (табл. 3.3). У цю групу входять два транскрипційні фактори, інтрон матураза типу II, метіоніл транспортна рибонуклеїнова кислота (тРНК) синтаза, дві плями РНК-зв'язуючого білку, два члени родини фактора елонгації 1 α і мітохондріальний АТФ / аденозин дифосфат (АДФ) транспортер. Один із транскрипційних факторів, білок bHLH90 (Q0WNR2), мав підвищений вміст у насінні рослин, вирощених на ділянці забрудненій радіонуклідами. Транскрипційні фактори групи основний домен плюс спіраль-петля-спіраль регулюють широкий спектр реакцій розвитку. Вони мають консервативний домен 40-50 амінокислот, який формує типову просторову структуру за основною зоною із приблизно 15 амінокислотних залишків, що відповідає за специфічне зв'язування послідовності ДНК. Навпаки, інший транскрипційний фактор, білок із доменами цинкових пальців (A2WUV8), був присутнім у меншій кількості в насінні, що зазнало впливу радіонуклідного забруднення. Домени цинкових пальців є відносно невеликими та утворюють тандемні контакти з цільовими молекулами. Ймовірно цинкові пальці є стабільними структурами, що протягом тривалої еволюції набули специфічних функцій, наприклад у регуляції експресії генів, транспорту матричної РНК чи синтезу та пакування білків. Найчастіше цинкові пальці взаємодіють із ДНК, а окремі послідовності можуть бути блоками для більш специфічних білкових доменів. У літературі було сформульовано та експериментально підтверджено синтетичними конструкціями специфічні правила взаємодії амінокислотних мотивів типу цинкових пальців із цільовими послідовностями нуклеїнових кислот (162). Вміст білку родини інтрон матураз типу II (Q94JV3), задіяного в дозріванні матричної РНК, знизився на 60% в умовах зростання в ґрунтах зони відчуження ЧАЕС.

Посттранскрипційна регуляція експресії генів, опосередкована різними РНК-зв'язуючими білками, відіграє важливу роль у захисних реакціях. Дві плями, ідентифіковані як гомолог пуміліо 5 РНК-зв'язуючий білок (APUM5, Q9LJX4), мали

значно менший вміст у тканинах насіння, зібраного на забрудненій радіонуклідами ділянці. Цей білок специфічно регулює трансляцію і стабільність матричної РНК, приєднуючись до 3'-кінця. Він має 8 пуміліо повторів довжиною приблизно 36 амінокислот, які опосередковують взаємодію з РНК, формуючи суперспіраль; саме ці домени визначають специфічність РНК-партнера. Було показано репресорну функцію кількох білків пуміліо родини та їх участь у процесах розвитку (163). Оскільки арабідопсис має 25 APUM білків, дослідники знайшли консенсусні послідовності зв'язування та показали їх присутність у кількох транскриптах критичних для процесів росту і розвитку, використовуючи три-гібридний скринінг бібліотеки РНК. Отже, пуміліо білки є негативними регуляторами активності трансляції цільових матриць. В іншому дослідженні, було показано участь APUM5 у захисті від вірусної атаки, зокрема з'ясовано факт, що мутант APUM5 арабідопсису має вищу стійкість до вірусу мозаїки огірка. Цікаво, що цей РНК вірус має домен зв'язування пуміліо послідовностей, а специфічну взаємодію було підтверджено експериментами *in vivo*. Було доведено, що APUM5 працює як репресор трансляції вірусу; таким чином, вчені знайшли нову унікальну захисну систему проти інфекції (164). В інших експериментах, дослідники показали підвищену експресію цього білку при бактеріальній та грибній інфекціях, хоча без чіткої асоціації зі стійкістю до патогенів. Подальший функціональний аналіз, довів участь APUM5 у відповіді на абіотичний осмотичний стрес (165). Вчені з'ясували, що мутанти з підвищеною експресією гену, мають гіперчутливість до засолення на ювенільних фазах розвитку. Це супроводжувалось зниженою експресією кількох генів, відомих участю в стрес-стійкості, внаслідок приєднання APUM5 до 3'-зони цільових транскриптів. Таким чином, дослідники довели роль APUM5 у специфічній відповіді на абіотичний стрес. 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). Аміноацил тРНК синтази/лігази каталізують специфічне приєднання амінокислоти до спорідненої молекули тРНК. Зв'язування РНК опосередковане консервативною α -спіраллю, а ензим працює як мономер. Вміст двох

членів родини фактора елонгації 1α (EF1 α , A8MSE8 і Q58I24) зріс за дії радіації. Ці білки опосередковують гуанозин трифосфат-залежне зв'язування аміноацил тРНК в акцепторному сайті рибосом під час біосинтезу білків. У цілому, виявлені зміни узгоджуються з нашою концепцією часткової кількісної перебудови апарату синтезу білків. Мітохондріального АДФ/АТФ транспортеру 1 (AAC1, P31167) було менше у матеріалі із забрудненої радіонуклідами ділянки. Цей білок локалізований у внутрішній мембрані мітохондрій, має численні трансмембранні домени та використовує мідь як кофактор. Він каталізує обмін АДФ на АТФ, таким чином беручи участь у енергетичних процесах клітин.

Всі відомості, необхідні для пакування білків у термодинамічно стабільну й активну просторову форму, присутні в первинній амінокислотній послідовності. Молекулярні шаперони можуть розпізнавати і зв'язувати проміжні стани, які мають порушену конформацію, а потім через повторювану послідовність зв'язування і звільнення, дозволяють правильну реалізацію просторової інформації. Молекулярні шаперони працюють на мінімізацію відхилень на непродуктивні побічні реакції (166). Шаперони запобігають агрегації білків у тісному середовищі клітини, взаємодіючи з поліпептидними ланцюгами вже під час їх синтезу на рибосомах. Іноді, після шаперонів новосинтезовані білки взаємодіють із шаперонами, які формуючи великі циліндричні комплекси, забезпечують мікросередовище в цитоплазмі для правильного просторового пакування. Було підраховано, що 10-80% всіх білків клітини вимагають втручання молекулярних шаперонів (167). Шапероніни еукаріотичних клітин мають гетерогенні поверхні зв'язування білків. Детальне розуміння процесу того, як тисячі синтезованих білків використовують модулі шаперонів, безумовно матиме важливі наслідки для біотехнології та сільського господарства.

Два білки, кількість яких знизилась у насінні льону, вирощеного на радіоактивно забруднених ділянках, є молекулярними шаперонами (табл. 3.3). Зокрема α -субодиниця білку 1 безхвостого комплексу (TCP1 α , P28769) є складовою цитоплазматичного шапероніну. Білок 1 безхвостого комплексу є еволюційно консервативним та має масу приблизно 60 кДа. У літературі є повідомлення про

участь цього цитоплазматичного шаперону в пакуванні білків цитоскелету. Комплекс TSP має структуру подвійного кільця, складається із 6-8 різних субодиниць із центральною порожниною для пакування білків та вимагає додаткової енергії АТФ (166). Білок зв'язування люмену 2 (VIP2, F4K007) локалізується в люмені ендоплазматичного ретикулуму та відноситься до надродини Hsp70. Білки родини Hsp70, зазвичай, індуються в стресових умовах та допомагають забезпечити вірну функціонально активну конформацію багатьом білкам-партнерам. Молекули VIP2 задіяні у реакції на важкі метали, зокрема, токсичні солі кадмію. Іони кадмію індують апоптоз опосередкований сигнальними шляхами ендоплазматичного ретикулуму. Дослідження на культурі клітин тютюну, показало підвищену експресію стресових маркерів внаслідок впливу іонів кадмію. Цікаво, що додавання так званих хімічних шаперонів ендоплазматичного ретикулуму зупиняло індукування апоптозу, аналогічний ефект забезпечив VIP2 (168). Гетерологічна експресія VIP2 практично блокувала індукцію сигнальних шляхів апоптозу за дії важкого металу. Стрессова реакція на наявність невірних просторових конформацій білків у ендоплазматичному ретикулумі є еволюційно консервативним механізмом підтримки гомеостазу цієї органели. Рослини мають принаймні 2 специфічних сигнальних шляхи такої відповіді, які також задіяні, наприклад у реакції на біотичний стрес (169). Ген, кодуєVIP2, є ефектором стресу ендоплазматичного ретикулуму.

Підсумовуючи, ми виявили, що вміст 2 шаперонів нижчий у насінні льону, вирощеному на ділянці в зоні відчуження ЧАЕС. Це може свідчити про те, що внаслідок впливу забрудненого радіонуклідами довкілля, відсутні істотні проблеми з пакуванням білків у цитоплазмі чи ендоплазматичному ретикулумі. В паралельному дослідженні протеому насіння сої, вміст іншого молекулярного шаперону люмена ендоплазматичного ретикулума кальретикуліна, також знизився в насінні рослин, вирощених на забруднених радіонуклідами ділянках. Цей шаперон відомий тим, що зв'язує іони кальцію, таким чином регулюючи їх баланс у цитоплазмі й ендоплазматичному ретикулумі. Додатково, кальретикулін бере участь у пакуванні глікопротеїнів та є складовим комплексу контролю конформації новосинтезованих глікопротеїнів (116). В цілому, наші результати дають можливість припустити, що

реакція рослин на хронічне опромінення включає в себе зменшення потоку білків через секреторний шлях (виявлені шаперони задіяні, зокрема, в пакуванні глікопротеїнів клітинної стінки). Хоча варто підкреслити, що наявні лише чіткі докази ролі пакування білків. Результати, які утворюють пункт 3.3.3 всебічно представлено в літературних джерелах (170–172).

3.3.4. Комплексна відповідь льону на забруднення радіонуклідами

Виходячи з ідентифікації білків, вміст яких змінився у насінні льону, зібраному зі забрудненої радіонуклідами ділянки в зоні відчуження ЧАЕС, ми запропонували робочу модель механізму, який дозволяє відтворення рослин в умовах хронічного опромінення (рис. 3.11). Вона включає потенційні взаємодії між сигналінгом, фосфорилюванням білків, алармонами та керованим протеолізом; транскрипцією, синтезом білків і пакуванням глікопротеїнів; а також стресом, гліколізмом і метаболізмом гліцин бетаїну. Модель представлена у вигляді мережі теоретичних взаємодій, що широко застосовуються у системній біології (173). Ця галузь науки ґрунтується на інтеграції інформації кількісного моніторингу клітинних процесів. У нашій мережі взаємодій, сигналінг, реакція на метаболічний стрес і транскрипція вважаються первинними подіями. Безпосередні наслідки змін у передачі сигналу, перетворюються за допомогою фосфорилювання білків і утворення активних комплексів фосфорилюваних білків (GF14ω), які потім призводять до синтезу алармонів за участю LOX1, а паралельно інгібується протеоліз (PAA1). Схожим чином, активація відповіді на метаболічний стрес (рис. 3.11) може безпосередньо призвести до змін у синтезі гліцин бетаїну (СМО) і в гліколізі (FAB6). У разі інтенсифікації транскрипції, ймовірно мережа є лінійною, а не розгалуженою. Це твердження базується на припущенні, що зростання інтенсивності транскрипції безпосередньо призводить до аналогічного ефекту при синтезі білків (EF1α і APUM5). У цьому випадку, кінцевий ефект проявляється у пакуванні білків (BIP2) і змінах у глікопротеїнах клітинної стінки.

необхідними і мережа може бути більш або менш розгалуженою. Наприклад, сигналінг може бути безпосередньо пов'язаним із компонентами комплексу убіквітин / 26S протеасома без попередньої або подальшої участі фосфорилювання білків чи алармонів. Крім того, доречно припустити, що інтенсифікація гліколізу може передувати змінам у транскрипції / синтезі білків / пакуванні глікопротеїнів. Запропонована гіпотетична мережа взаємодій ґрунтується переважно на кількості змінених білків окремих функціональних кластерів і на концепції розглядати найбільші кластери як первинні вузли. Необхідно зазначити, що лише абсолютна кількість змінених білків певного функціонального класу, дещо спотворює цілісну картину адекватної інтерпретації даних системної біології. Власне найбільш коректно враховувати також відносну пропорцію певної функціональної групи в цілому протеомі рослини, або навіть краще – в білковій сукупності цільового органу. Проте відсутність даних анотованого протеому сої та льону не дозволили нам використати найкращу стратегію аналізу.



Рис. 3.12. Субклітинна локалізація білків досліджених рослин, які мали більшу/меншу кількість внаслідок хронічного опромінення.

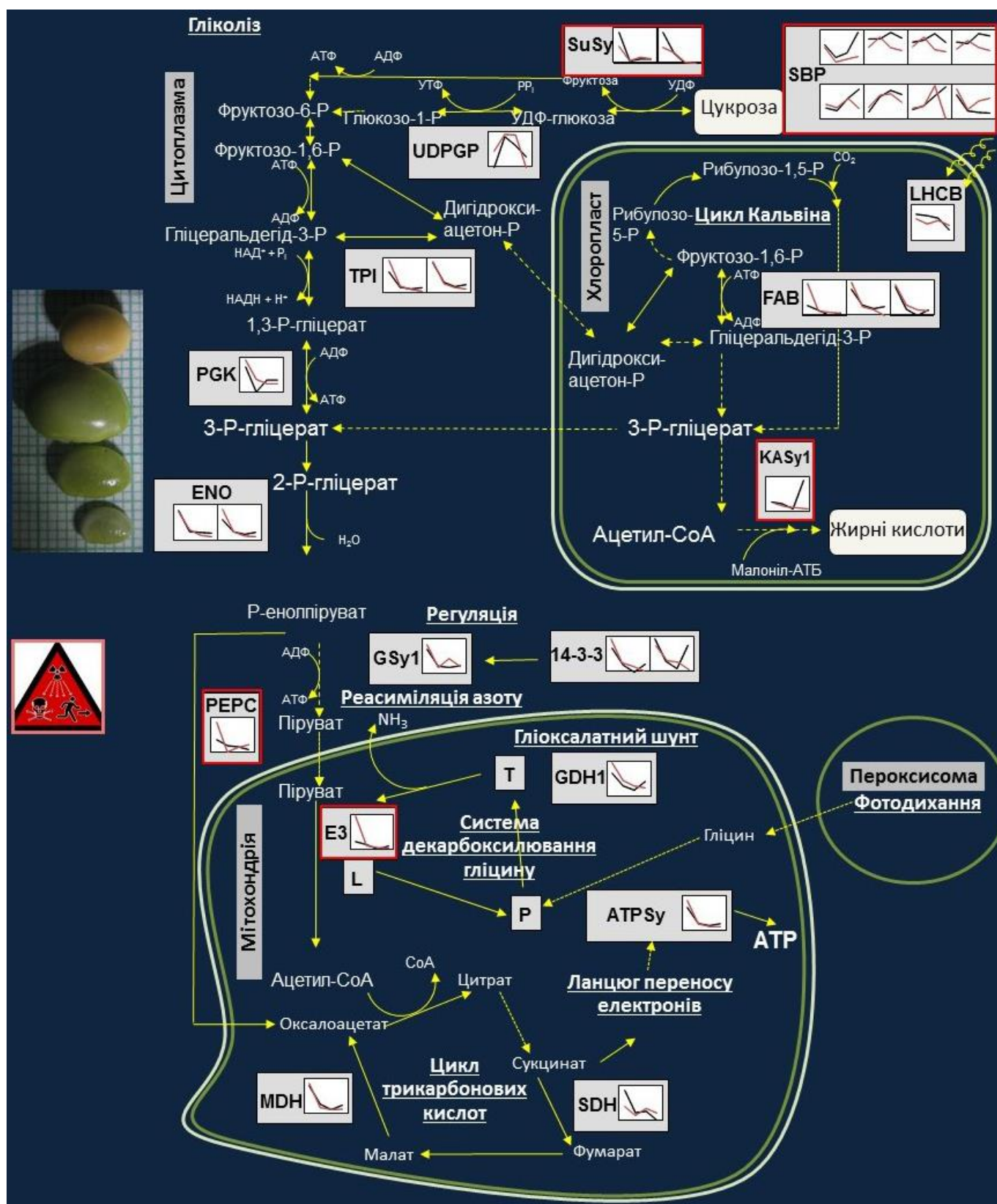


Рис. 3.13. Змінені біохімічні шляхи другого покоління сої, вирощеної на забрудненій радіонуклідами ділянці пов'язані з дефіцитом вуглецевого скелету для біосинтезу запасних продуктів, а також активацією циклу трикарбонових кислот у мітохондріях.

Чорні графіки показують відносний об'єм білкових плям контролю, червоні – забруднених зразків. Виділені білки показали статистично достовірні зміни принаймні на одній фазі розвитку. Скорочення: кетонацил синтаза ацилтранспортного білку (KASy1), світло-збиральний хлорофіл зв'язуючий комплекс (LHCB), фруктозобіфосфат альдолаза (FAB), уридилдифосфатглюкозо фосфорилаза (UDPGP), фосфоенолпіруват карбоксилаза (PEPC), молекулярний адаптер (14-3-3), енолаза (ENO), фосфогліцерат кіназа (PGK), тріозофосфат ізомераза (TPI), цукрозо синтаза (SuSy), цукрозо-зв'язуючий білок (SBP), малат дегідрогеназа (MDH), сукцинат дегідрогеназа (SDH), синтаза аденозин трифосфату (ATPSy), складові комплексу декарбоксилювання гліцину (E3-L/T/P), глутамат дегідрогеназа (GDH1), глутамін синтаза (GSy1).

3.3.5. Субклітинна локалізація білків вивчених рослин

Аналіз локалізації ідентифікованих білків дозволив виявити цікаві закономірності. В цілому білки насіння, вміст яких змінився за дії хронічного опромінення належали 11 субклітинним структурам (рис. 3.12). Зміни білків вакуолі, плазмалемі і пероксисом були унікальними для сої, а протеасом, хлоропластів, мітохондрій, клітинної стінки та невстановленої локалізації – для льону. Варто відзначити, що найбільших змін зазнали білки цитоплазми, кількість ідентифікованих поліпептидів цієї функціональної структури майже вдвічі перевищила показники інших органел. Схоже, що істотні відмінності субклітинної локалізації для досліджених рослин відображають особливості специфічних молекулярних змін за дії радіонуклідного забруднення.

3.4. Дослідження молекулярних змін у наступному поколінні протягом розвитку

3.4.1. Функціональна класифікація змін другого покоління насіння

Всі 221 розділених та ідентифікованих білків сої було розсортовано в 12 функціональних категорій за загальноприйнятою схемою. Найбільшою групою є запасні білки (70), далі йде первинний метаболізм (54), третьою за розміром групою

стали некласифіковані (21), далі стрес (18) і сигналінг (13). Також ми ідентифікували 11 транспортерів та 7 білків групи ріст клітин, решта функціональних груп були представлені лише кількома білками. Для встановлення субклітинної локалізації були використані як спеціалізовані біоінформатичні алгоритми, так і дані білкових порталів та літератури. Відповідно було встановлено, що 124 білки розміщені в цитоплазмі, 53 – належать ендоплазматичному ретикулуму та похідним органелам, 20 – локалізуються в хлоропластах, а 14 – є мітохондріальними; для 10 інформація про локалізацію була відсутня або неоднозначна. Аналогічно 79 ідентифікованих білків льону було розділено на 8 класів, згідно вдосконаленої схеми. Для цієї рослини також домінували запасні білки (35), другою за кількістю функціональною групою стали білки первинного метаболізму (21), далі стресові білки (8), стільки ж залишилось некласифікованими, а 4 – відомі участю в ростових процесах клітин. Представництво решти функціональних класів було незначним. Пропорція внутріклітинної локалізації була подібною до сої.

Таблиця 3.4.

Вміст олії в зрілому насінні другого покоління вирощеному на експериментальних ділянках.

рослина	контрольна ділянка, % сухої маси	забруднена ділянка, % сухої маси
соя	24,9±2,4	21,3±3,1
льон	39,7±1,5	44,8±1,4*

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

3.4.2. Радіаційний стрес істотно модифікує біохімічні шляхи первинного метаболізму насіння

У другому поколінні в основному помітних змін зазнали метаболічні ензими, причому знову реакції льону та сої дещо відрізнялись між собою. Для сої були характерними дефіцит вуглецевого скелету для біосинтезу запасних продуктів, а також підвищена активність циклу трикарбонових кислот у мітохондріях (рис. 3.13).

З іншого боку, для льону домінантні зміни протеому були пов'язані з перегрупуванням біохімічних процесів для накопичення олії (рис. 3.14). Для обох видів ми візуалізували знайдені білки на схемах метаболічних шляхів. Вміст кількох ізоформ цукрозо-зв'язуючого білку, який забезпечує транспорт попередників вуглецевих скелетів запасних продуктів насіння, знижувався в умовах радіоактивного забруднення. Особливо помітним цей ефект був на пізніших фазах ембріогенезу сої. Цікаво, що схожий ефект виявлено у першому поколінні. З іншого боку, вміст двох ізоформ цукрозо синтази був нижчим на фазі 4 тижнів після цвітіння. Цей ензим розщеплює імпортовану цукрозу на потреби фізіологічних процесів насіння (175). Тобто, логічно припустити, що насіння сої на забруднених радіонуклідами територіях, отримує менше енергії. Кумулятивні профілі вмісту показали дуже велику статистично 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.

Ензими гліколізу цитоплазми показали схожі тренди вмісту під час дозрівання в експериментальних умовах. Варто зазначити, що 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 тижні після цвітіння і найнижчим у зрілому насінні. Ще однією цікавою знахідкою стала дуже істотна різниця вмісту кетоацил синтази, яка працює в шляху біосинтезу жирних кислот. Її вміст у зрілому насінні був у кілька разів меншим за дії радіонуклідного забруднення. Проте ми не виявили кількісного ефекту на вміст запасних ліпідів (табл. 3.4). Навпаки, на першій вивченій фазі росту в насінні сої, зібраному на забрудненій радіонуклідами ділянці, був високий вміст фосфоенолпіруват карбоксилази та Е3 складової комплексу гліцин декарбоксилази (гомолог піруват дегідрогенази). Ймовірно, ці зміни призводять до інтенсифікації потоку метаболітів у циклі трикарбонових кислот мітохондрій. Аналогічний ефект було задокументовано за дії осмотичного стресу на тютюн (176). Зміни протеому другого покоління насіння сої,

викликані хронічним опроміненням глибоко проаналізовані в опублікованих статтях (177,178).

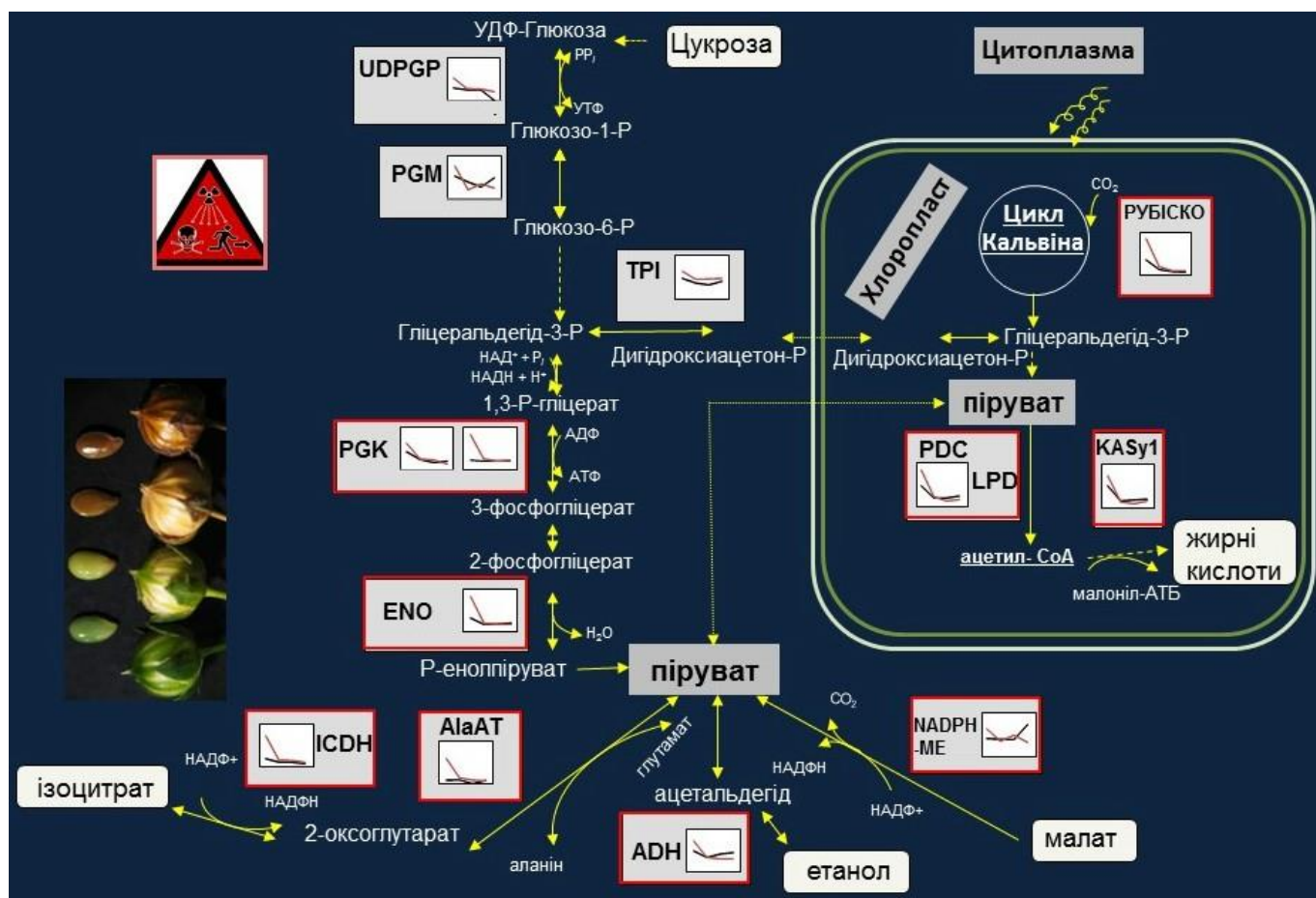


Рис. 3.14. Змінені біохімічні шляхи другого покоління льону внаслідок хронічного опромінення.

Чорні графіки показують відносний об'єм білкових плям контролю, червоні – забруднених зразків. Виділені білки показали статистично достовірні зміни принаймні на одній фазі розвитку. Скорочення: кетоацил синтаза ацилтранспортного білку (KASy1), уридилдифосфатглюкозо фосфорилаза (UDPGP), енолаза (ENO), фосфогліцерат кіназа (PGK), тріозофосфат ізомераза (TPI), фосфоглюко мутаза (PGM), аланін амінотрансфераза (AlaAT), ізоцитрат дегідрогеназа (ICDH), алкоголь дегідрогеназа (ADH), нікотинамід динуклеотид фосфат залежна малат синтаза (NADPH-ME), рибулозо біфосфат карбоксилаза оксигеназа (РУБІСКО), піруват декарбоксилаза / ліпід дегідрогеназа (PDC/LPD).

У льону виявлено підвищений вміст гліколітичних ензимів фосфогліцерат кінази і енолази на фазі 2 тижні після цвітіння. Логічним кінцевим наслідком є накопичення

цитрату. Такий тренд добре узгоджується зі збільшеним вмістом кількох гліколітичних ензимів у першому поколінні. Цікаво, що також накопичувалась аланін амінотрансфераза, а у першому поколінні – аспартат амінотрансфераза. Ізоцитрат дегідрогеназа синтезує важливий проміжний метаболіт, її було більше при хронічному радіаційному стресі на початку ембріогенезу льону. В літературі показано ключову роль цього ензиму у захисті від окисного стресу (179). Малат синтаза (НАДФН залежна) і алкоголь дегідрогеназа показали схожі тренди змін, на початкових фазах розвитку більше у хронічно опромінених тканинах, а на пізніших – навпаки.

Проте напевно ключові зміни відбувались у хлоропластах насіння льону. Вміст РУБІСКО був більшим у насінні вирощеному на забруднених радіонуклідами ґрунтах на початку ембріогенезу. Цей ензим є відомим маркером стресу рослин (180). 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 (табл. 3.4). Варто зазначити, що у сої ми також зафіксували динаміку кетоацил синтази, але на відміну від льону, зміна вмісту білку внаслідок хронічного опромінення не відобразилась на пропорції запасних сполук. Наступним питанням яке потребуватиме глибокого дослідження є механізми, що обумовлюють фенотипові прояви на рівні білків: генетичні мутації, епігенетичні мітки або ПТМ. Вплив радіонуклідного забруднення на динаміки кількості конкретних білків насіння льону проаналізовано в літературі (181,182).

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ

В дисертації показана різна акумуляція радіонуклідів і радіочутливість досліджених видів, які належать віддаленим таксономічним категоріям. Вміст цезію-137 в ґрунті ділянки у зоні відчуження Чорнобильської атомної електростанції був майже у 15 разів більшим, ніж контрольної; вміст стронцію-90 відрізнявся приблизно у 9 разів. Цікавим феноменом стало те, що для обох досліджених видів і обох дозоформуючих радіонуклідів коефіцієнти накопичення були значно вищими в умовах забруднення. Варто зазначити, що зріле насіння сої в усіх випадках мало вищий вміст радіонуклідів порівняно з льоном. Протягом повного ростового сезону вивчені рослини отримали наступні дози опромінення: а) забруднена ділянка поблизу Чистогалівки – льон 11,4 сЗв сумарного, соя 13,2 сЗв разом; б) контрольна ділянка поблизу Жукина – еквівалентна доза не перевищувала 0,4 сЗв. Оцінка морфометричних характеристик показала, що насіння рослин сої зі забрудненої ділянки є меншим. Маса окремої насінини сої відрізнялась майже вдвічі. Більше того, динаміка набухання насіння сої є сповільнена порівняно з контролем. Ми не виявили жодних істотних відмінностей у зовнішньому вигляді чи сирій вазі насіння льону, вирощеного на забруднених радіонуклідами ділянках. Тим не менше, відсоток проростання був трохи нижчим, внаслідок впливу низьких доз хронічного опромінення. Підсумовуючи, фенотипові реакції досліджених рослин істотно відрізнялись, безумовно відображаючи виявленні факти різного поглинання дозоформуючих радіонуклідів.

Для встановлення молекулярних змін на білковому рівні ми застосовали пошукову протеоміку на основі дво-вимірного гелю електрофорезу. Таким чином, було отримано білкові карти-гелі з високою аналітичною роздільною здатністю. Стрічки з іммобілізованим рН градієнтом вузького діапазону забезпечили практичну відсутність перекриття білкових плям. У випадку сої ми побачили 698 чітко розділених білкових плям зрілого насіння, 9,2% з них мали різний відносний об'єм, який відображає кількість конкретного білку, внаслідок розвитку у забрудненому середовищі чорнобильської зони. Використання ультрависокооефективної рідинної хроматографії в поєднанні з тандемною мас-спектрометрією дозволило встановити

природу 26 послідовностей. Із 720 плям льону, відносний об'єм 4,9% достовірно відрізнявся у контрольних зразках. Ми однозначно ідентифікували 28 білків насіння льону, кількість яких змінилась внаслідок хронічного опромінення. Пропорція білків, вміст яких змінився в насінні льону, вирощеному на ділянках зони відчуження Чорнобильської атомної електростанції є майже вдвічі нижчою від результатів дослідження сої. 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. Із них 2 (запасні білки та ріст клітин) унікальні для першого об'єкту, а 4 (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.

Домінуючу відповідь на хронічне опромінення показали запасні білки насіння сої. Комплексна неоднозначна поведінка запасних білків насіння в забруднених умовах чорнобильської зони, додає аргументів для підтримки гіпотези про їх додаткові функції, наприклад захист від шкідників. Напевно саме перерозподіл складу окремих молекул чи їх посттрансляційних модифікацій цієї функціональної групи, є критичним фактором для забезпечення функціонування рослин за умов хронічного впливу радіонуклідного забруднення. Цікаво, що розміщення на гелі усіх ідентифікованих плям G1/G2 гліцинінів вказувало на часткову фрагментацію поліпептидних ланцюгів. Навпаки вплив радіонуклідного забруднення не викликав фрагментацію конгліцинінів. Іншою принциповою складовою реакції на хронічне опромінення стала неспецифічна відповідь схожа на стрес викликаний важкими металами. Стресового білку цистеїн синтази, який лімітує синтез фітохелатинів, було втричі більше в насінні зі забрудненої ділянки. Додатково ми ідентифікували 4 дегідрини, з них трьох виявилось більше, а одного – менше в насінні з ділянки в зоні відчуження Чорнобильської атомної електростанції. Дегідрини належать до класу білків, що з'являються наприкінці ембріогенезу й асоціюються з нуклеопротейновими комплексами ядра. Врешті, наші дані показали, що вміст пероксисомальної бетаїн

альдегід дегідрогенази зріс на 30% у насінні зі забруднених ділянки. Цей ензим каталізує останній крок у синтезі гліцин бетаїну. Ін'єкція гліцин бетаїну перед опроміненням ^{137}Cs , підвищила відсоток виживання тварин. Отже, цілком ймовірно, що схожа специфічна захисна активність гліцин бетаїну проти радіації проявляється у зрілому насінні сої.

Серед білків насіння льону, кількість яких змінилась у насінні, вирощеному під впливом хронічного опромінення, є складові декількох сигнальних шляхів. Вміст ліпоксигенази знижується в протеомі льону, вирощеному на ґрунтах забруднених радіонуклідами. Це може означати, що пригнічується сигнальний шлях, який включає оксиліпіни, ймовірним наслідком чого є зниження стійкості до фітопатогенів. Протеом насіння льону, вирощеного в умовах радіоактивного забруднення, має знижений вміст GF14ω, що входить до родини 14-3-3 молекулярних адаптерів. Внаслідок приєднання білків-адаптерів родини 14-3-3 регулюються міжбілкові взаємодії та контролюються ключові клітинні функції, може мати глобальні наслідки на молекулярну фізіологію рослин. Вміст α -субодиниці протеасоми типу 6A (ендопептидаза треонінового типу) знизився на 50% в умовах хронічного опромінення. Прямий експеримент по дослідженню активності 26S протеасом після дії різних доз іонізуючої радіації показав, що ця субклітинна структура є безпосередньою мішенню стресового чинника. Оскільки усі білки льону задіяні в сигналінгу мали знижений вміст у насінні, вирощеному за дії радіонуклідів, доречно припустити, що вони є ланками одного ланцюга. Ми виявили, що вміст двох ферментів гліколізу – фруктозо-1,6-біфосфат альдолази і 3-P-гліцерат кінази, зріс на 50% у насінні льону, зібраному зі забрудненої ділянки. Альтернативні реакції гліколізу цитоплазми забезпечують метаболічну гнучкість, необхідну для розвитку рослин та адаптації до стресових факторів середовища. В льону, вміст холін монооксигенази, яка каталізує перший етап шляху біосинтезу гліцин бетаїну, 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, що також відображалась істотно більшим накопиченням радіонуклідів соєю.

Гомолог пуміліо 5 РНК-зв'язуючий білок (APUM5), є специфічним репресором трансляції. Доведена участь APUM5 у захисті від вірусної атаки. Зниження вмісту ізоформ цього білку внаслідок хронічного опромінення, може означати що імунітет льону пригнічений. Вміст двох членів родини фактора елонгації 1α зріс за дії радіації, що вказує на загальну активацію синтезу білків.

Для подальшого вдосконалення концепції реакції на хронічне опромінення досліджено зміни протеому другого покоління рослин, вирощених на експериментальних ділянках, у насінні протягом дозрівання. Це дозволило доповнити та підвищити точність інтегрованої схеми. Охарактеризовано вміст 211 білків на забрудненій радіонуклідами та контрольній ділянках. Найбільшою функціональною групою були запасні білки (70), а домінантним субклітинним компартментом стала цитоплазма (124). Хронічне опромінення викликало дефіцит вуглецевого скелету для біосинтезу запасних продуктів, а також підвищену активність циклу трикарбонових кислот у мітохондріях. Вміст кількох ізоформ цукрозо-зв'язуючого білку, який забезпечує транспорт енергетичних попередників запасних продуктів насіння, знижувався в умовах радіоактивного забруднення. Комлементарних змін зазнали 2 ізоформи цукрозо синтази, яка розщеплює імпортований цукор. Отже, насіння сої на забруднених радіонуклідами територіях отримує менше енергії, що супроводжувалось зниженим накопиченням β -конгліцинінів. Домінантний вплив на цикл трикарбонових кислот здійснили фосфоенолпіруват карбоксилаза та гомолог піруват дегідрогенази.

У випадку льону ми охарактеризували 79 ідентифікованих білків на різних фазах дозрівання насіння. Домінували зміни запасних білків (35), а пропорція внутріклітинної локалізації була подібною до сої. Показано підвищений вміст гліколітичних ензимів фосфогліцерат кінази і енолази на ранніх фазах розвитку насіння, внаслідок впливу радіонуклідного забруднення. Такий тренд добре узгоджується зі збільшеним вмістом кількох гліколітичних ензимів у першому поколінні. Проте ключові зміни відбувались у хлоропластах насіння льону. Піруват декарбоксилаза / ліпід дегідрогеназа і кетоацил синтаза мали схожі тренди змін – їх було більше на ранніх етапах розвитку, але менше у зрілому насінні. Ці білки задіяні

у шляху біосинтезу жирних кислот, а фенотиповим проявом стало накопичення ліпідів у зрілому насінні льону, вирощеному на ділянці в зоні відчуження Чорнобильської атомної електростанції.

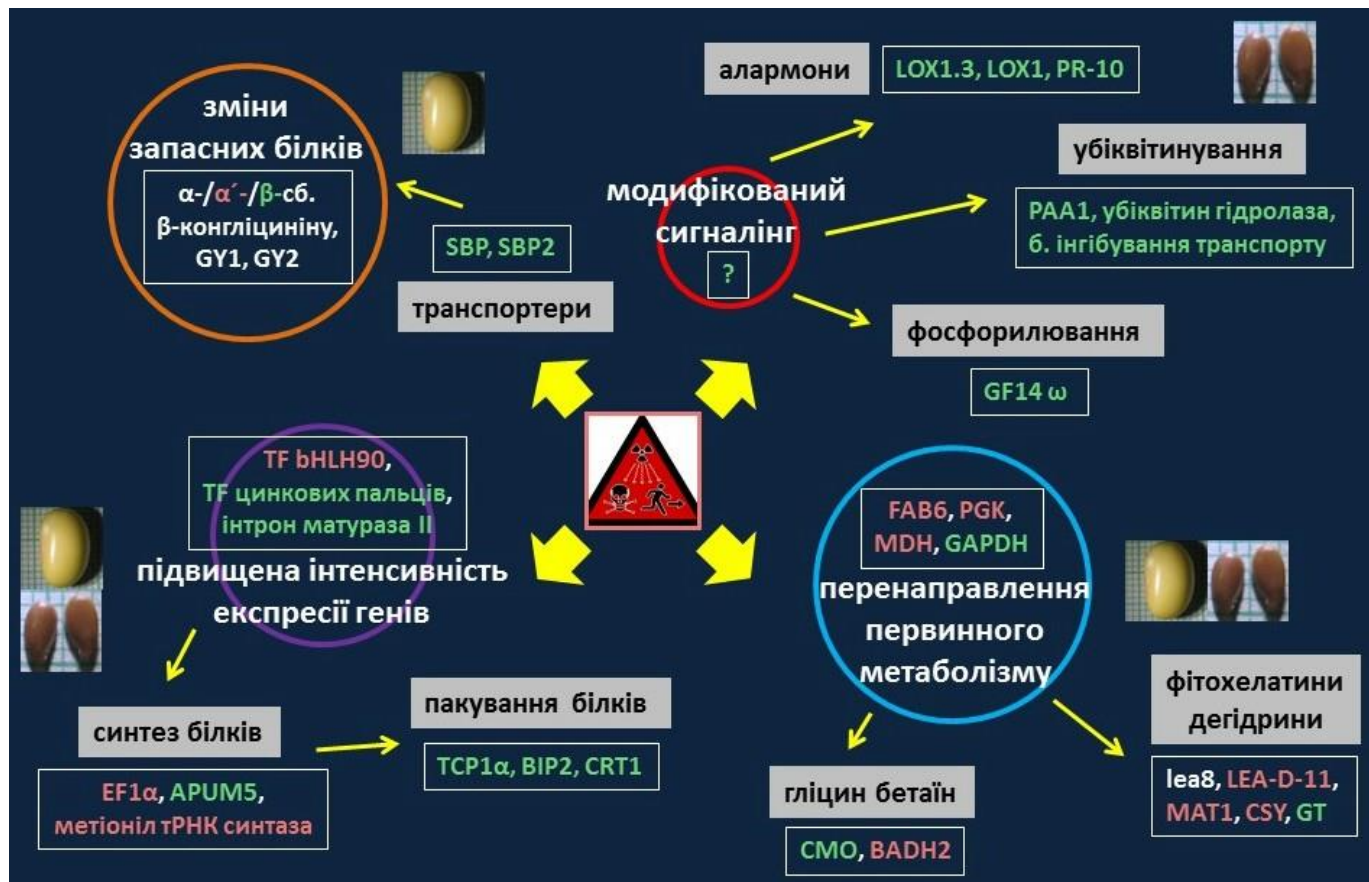


Рис. 4.1. Інтегрована схема змін протеому досліджених рослин внаслідок хронічного опромінення у формі мережі взаємодії біохімічних шляхів.

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.

Скорочення: цукрозо-зв'язуючий білок (SBP/SBP2), гліцинін G1/G2 (GY1/GY2), ліпоксигеназа (LOX1.3/LOX1), білок патогенезу 10 (PR-10), молекулярний адаптер 14-3-3 (GF14ω), α-субодиниця протеасом типу 6A (PAA1), фактор елонгації 1α (EF1α), пуміліо 5 білок зв'язуючий рибонуклеїнову кислоту (APUM5), транскрипційний фактор (TF), білок безхвостого комплексу 1α (TCP1α), білок зв'язування люмену 2 (BIP2), кальретикулін (CRT1), фруктозобіфосфат альдолаза (FAB6), 3-Р-гліцерат кіназа (PGK), малат дегідрогеназа (MDH), гліцеральдегід-3-Р дегідрогеназа (GAPDH), холін монооксигеназа (CMO), бетаїн альдегід дегідрогеназа

(BADH2), дегідрин (*lea8/LEA-D-11/MAT1*), глутатіон трансфераза (GT), цистеїн синтаза (CSY).

Врешті ми інтегрували реакції обох рослин, виділивши чотири блоки фізіологічних реакцій (рис. 4.1). 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 характеризувались активацією апарату транскрипції, що через трансляційні процеси впливало на пакування білків; також спостерігалось перенаправлення первинного метаболізму, ймовірно на накопичення фітохелатинів, дегідринів і радіопротектора гліцин бетаїну. Аргументація логіки побудови інтегрованої схеми представлена в опублікованих статтях (183,184).

Зведення результатів аналізів протягом двох вегетаційних сезонів, дозволило виявити зміни протеому, стабільні протягом поколінь, які можливо мають епігенетичну природу. Для того, щоб поширювати дані поточних експериментів по вивченню змін протеому насіння рослин, вирощених на забрудненій радіонуклідами ділянці зони відчуження, було створено інтернет-сторінку "Seeds in Chernobyl" (<http://www.chernobylproteomics.sav.sk>). Дані комплексного проекту інтегровано в літературі (185,188).

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 некласифіковані.
- ✓ Концептуальна модель реакції сої на хронічне опромінення включає: а) коригування балансу запасних білків (гліциніни G1/G2; α -, α' - і β -субодиниці β -

конгліцініну), б) неспецифічну реакцію-приспособлення 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 ЛІТЕРАТУРИ

1. Mimura T, Mimura M, Kobayashi D, Komiyama C, Sekimoto H, Miyamoto M, et al. Radioactive pollution and accumulation of radionuclides in wild plants in Fukushima. *J Plant Res.* 2014;127(1):5–10.
2. Møller AP, Mousseau TA. Biological consequences of Chernobyl: 20 years on. *Trends Ecol Evol.* 2006;21(4):200–7.
3. Møller AP, Mousseau TA. Strong effects of ionizing radiation from Chernobyl on mutation rates. *Sci Rep.* 2015;5.
4. Vornam B, Arkhipov A, Finkeldey R. Nucleotide diversity and gene expression of Catalase and Glutathione peroxidase in irradiated Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Chernobyl exclusion zone. *J Environ Radioact.* 2012;106:20–6.
5. Hinton TG, Bedford JS, Congdon JC, Whicker FW. Effects of radiation on the environment: A need to question old paradigms and enhance collaboration among radiation biologists and radiation ecologists. *Radiat Res.* 2004;162(3):332–8.
6. Kovalchuk I, Abramov V, Pogribny I, Kovalchuk O. Molecular aspects of plant adaptation to life in the Chernobyl zone. *Plant Physiol.* 2004;135(1):357–63.
7. Hayashi G, Shibato J, Imanaka T, Cho K, Kubo A, Kikuchi S, et al. Unraveling low-level gamma radiation-responsive changes in expression of early and late genes in leaves of rice seedlings at litate Village, Fukushima. *J Hered.* 2014;105(5):723–38.
8. Wang Z, Hobson N, Galindo L, Zhu S, Shi D, McDill J, et al. The genome of flax (*Linum usitatissimum*) assembled de novo from short shotgun sequence reads. *Plant J.* 2012;72(3):461–73.
9. Hajdуч M, Ganapathy A, Stein JW, Thelen JJ. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. *Plant Physiol.* 2005;137(4):1397–419.
10. Klubicová K, Berčák M, Danchenko M, Skultety L, Rashydov NM, Berezhna VV, et al. Agricultural recovery of a formerly radioactive area: I. Establishment of high-resolution quantitative protein map of mature flax seeds harvested from the remediated Chernobyl area. *Phytochemistry.* 2011;72(10):1308–15.

11. Shevtsova NL, Gudkov DI. Cytogenetic damages in the common reed *Phragmites australis* in the water bodies of the Chernobyl exclusion zone. *Hydrobiol J*. 2013;49(2):85–98.
12. Rabilloud T, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *J Proteomics*. 2011;74(10):1829–41.
13. Zhang X, Fang A, Riley CP, Wang M, Regnier FE, Buck C. Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics-A review. *Anal Chim Acta*. 2010;664(2):101–13.
14. Laukens K, Naulaerts S, Berghe WV. Bioinformatics approaches for the functional interpretation of protein lists: From ontology term enrichment to network analysis. *Proteomics*. 2015;15(5–6):981–96.
15. Miernyk JA, Preťová A, Olmedilla A, Klubicová K, Obert B, Hajduch M. Using proteomics to study sexual reproduction in angiosperms. *Sex Plant Reprod*. 2011;24(1):9–22.
16. Azimzadeh O, Atkinson MJ, Tapio S. Proteomics in radiation research: Present status and future perspectives. *Radiat Environ Biophys*. 2014;53(1):31–8.
17. Steinhauser G, Brandl A, Johnson TE. Comparison of the Chernobyl and Fukushima nuclear accidents: A review of the environmental impacts. *Sci Total Environ*. 2014;470–471:800–17.
18. Anspaugh LR, Catlin RJ, Goldman M. The global impact of the Chernobyl reactor accident. *Science*. 1988;242(4885):1513–9.
19. Geraskin SA, Dikarev VG, Zyablitskaya YY, Oudalova AA, Spirin YV, Alexakhin RM. Genetic consequences of radioactive contamination by the Chernobyl fallout to agricultural crops. *J Environ Radioact*. 2003;66(1–2):155–69.
20. Jacob P, Fesenko S, Bogdevitch I, Kashparov V, Sanzharova N, Grebenshikova N, et al. Rural areas affected by the Chernobyl accident: Radiation exposure and remediation strategies. *Sci Total Environ*. 2009;408(1):14–25.
21. Fesenko SV, Alexakhin RM, Balonov MI, Bogdevitch IM, Howard BJ, Kashparov VA, et al. An extended critical review of twenty years of countermeasures used in agriculture after the Chernobyl accident. *Sci Total Environ*. 2007;383(1–3):1–24.
22. Fesenko S, Jacob P, Ulanovsky A, Chupov A, Bogdevich I, Sanzharova N, et al. Justification of remediation strategies in the long term after the Chernobyl accident. *J Environ Radioact*. 2013;119:39–47.

23. Balonov M. Third annual Warren K. Sinclair keynote address: Retrospective analysis of impacts of the chernobyl accident. *Health Phys.* 2007;93(5):383–409.
24. Tagami K, Uchida S, Ishii N, Kagiya S. Translocation of radiocesium from stems and leaves of plants and the effect on radiocesium concentrations in newly emerged plant tissues. *J Environ Radioact.* 2012;111:65–9.
25. Zhu Y-G, Smolders E. Plant uptake of radiocaesium: A review of mechanisms, regulation and application. *J Exp Bot.* 2000;51(351):1635–45.
26. Paasikallio A, Rantavaara A, Sippola J. The transfer of cesium-137 and strontium-90 from soil to food crops after the Chernobyl accident. *Sci Total Environ.* 1994;155(2):109–24.
27. Zheng G, Pemberton R, Li P. Bioindicating potential of strontium contamination with Spanish moss *Tillandsia usneoides*. *J Environ Radioact.* 2016;152:23–7.
28. Иванов Ю, Левчук С, Хомутигин Ю, Кадыгроб А, Йощенко Л, Павлюченко В. Подвижность ^{90}Sr и ^{137}Cs в контрастных по свойствам почвах. *Ядерна Фізика Та Енергетика.* 2013;(14, № 3):288–94.
29. Bell JNB, Shaw G. Ecological lessons from the Chernobyl accident. *Environ Int.* 2005;31(6):771–7.
30. Esnault M-A, Legue F, Chenal C. Ionizing radiation: Advances in plant response. *Environ Exp Bot.* 2010;68(3):231–7.
31. De Micco V, Arena C, Pignalosa D, Durante M. Effects of sparsely and densely ionizing radiation on plants. *Radiat Environ Biophys.* 2011;50(1):1–19.
32. Biermans G, Horemans N, Vanhoudt N, Vandenhove H, Saenen E, Van Hees M, et al. An organ-based approach to dose calculation in the assessment of dose-dependent biological effects of ionising radiation in *Arabidopsis thaliana*. *J Environ Radioact.* 2014;133:24–30.
33. Georgieva M, Rashidov NM, Hajdich M. DNA damage, repair monitoring and epigenetic DNA methylation changes in seedlings of Chernobyl soybeans. *DNA Repair.* 2017;50:14–21.
34. Geras'kin S, Evseeva T, Oudalova A. Effects of long-term chronic exposure to radionuclides in plant populations. *J Environ Radioact.* 2013;121:22–32.
35. Cooper B, Clarke JD, Budworth P, Kreps J, Hutchison D, Park S, et al. A network of rice genes associated with stress response and seed development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(8):4945–50.

36. Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci.* 2005;10(7):339–46.
37. Tikunov AB, Kale RK. Adaptive response and split-dose effect of radiation on the survival of mice. *J Biosci.* 2004;29(1):111–7.
38. Boubriak II, Grodzinsky DM, Polischuk VP, Naumenko VD, Gushcha NP, Micheev AN, et al. Adaptation and impairment of DNA repair function in pollen of *Betula verrucosa* and seeds of *Oenothera biennis* from differently radionuclide- contaminated sites of Chernobyl. *Ann Bot.* 2008;101(2):267–76.
39. Бубряк И, Акимкина Т ПВ, Дмитриев А МК. Долгосрочные последствия чернобыльских радионуклидных загрязнений на репарацию ДНК и устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессовым факторам. *Цитология И Генетика.* 2016;50(6):34–59.
40. Дмитриева С. Изучение адаптации природных популяций растений к хроническому облучению, вызванному аварией на Чернобыльской АЭС. *Цитол И Генет.* 1996;30(4):3–14.
41. Syomov AB, Ptitsyna SN, Sergeeva SA. Analysis of DNA strand break induction and repair in plants from the vicinity of Chernobyl. *Sci Total Environ.* 1992;112(1):1–8.
42. Гродзинский Д, Гудков И. Радиационное поражение растений в зоне влияния аварии на Чернобыльской АЭС. *Радиационная Биология Радиоэкология.* 2006;46(2):189–99.
43. Meeks HN, Chessier RK, Rodgers BE, Gaschak S, Baker RJ. Understanding the genetic consequences of environmental toxicant exposure: Chernobyl as a model system. *Environ Toxicol Chem.* 2009;28(9):1982–94.
44. Hinton TG, Alexakhin R, Balonov M, Gentner N, Hendry J, Prister B, et al. Radiation-induced effects on plants and animals: Findings of the United Nations chernobyl forum. *Health Phys.* 2007;93(5):427–40.
45. Vij S, Tyagi AK. Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants: Review article. *Plant Biotechnol J.* 2007;5(3):361–80.
46. Lucht JM, Mauch-Mani B, Steiner H-Y, Metraux J-P, Ryals J, Hohn B. Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis*. *Nat Genet.* 2002;30(3):311–4.

47. Madlung A, Comai L. The effect of stress on genome regulation and structure. *Ann Bot.* 2004;94(4):481–95.
48. Geras'kin SA, Fesenko SV, Alexakhin RM. Effects of non-human species irradiation after the Chernobyl NPP accident. *Environ Int.* 2008;34(6):880–97.
49. Yoschenko VI, Kashparov VA, Melnychuk MD, Levchuk SE, Bondar YO, Lazarev M, et al. Chronic irradiation of Scots pine trees (*Pinus Sylvestris*) in the chernobyl exclusion zone: Dosimetry and radiobiological effects. *Health Phys.* 2011;101(4):393–408.
50. Абрамов В, Рубанович А, Шевченко В, Шевченко В, Гриних Л. Генетические эффекты в популяциях растений, произрастающих в зоне Чернобыльской аварии. *Радиационная Биология Радиоэкология.* 2006;46(3):259–67.
51. Morozova VS, Kashparov VA, Levchuk SY, Umanska AO, Bishchuk YV, Otreshko LM. The functional state of cellular antioxidant defence system of shoots of *Arabidopsis thaliana* exposed to the chronic ionizing radiation in the Chornobyl exclusion zone. *Nucl Phys At Energy.* 2016;17(3):302–7.
52. Zaka R, Vandecasteele CM, Misset MT. Effects of low chronic doses of ionizing radiation on antioxidant enzymes and G6PDH activities in *Stipa capillata* (Poaceae). *J Exp Bot.* 2002;53(376):1979–87.
53. Sahr T, Voigt G, Schimmack W, Paretzke HG, Ernst D. Low-level radiocaesium exposure alters gene expression in roots of *Arabidopsis*. *New Phytol.* 2005;168(1):141–8.
54. Kuchma O, Vornam B, Finkeldey R. Mutation rates in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Chernobyl exclusion zone evaluated with amplified fragment-length polymorphisms (AFLPs) and microsatellite markers. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2011;725(1–2):29–35.
55. Kovalchuk O, Kovalchuk I, Arkhipov A, Hohn B, Dubrova YE. Extremely complex pattern of microsatellite mutation in the germline of wheat exposed to the post-Chernobyl radioactive contamination. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2003;525(1–2):93–101.
56. Kovalchuk I, Molinier J, Yao Y, Arkhipov A, Kovalchuk O. Transcriptome analysis reveals fundamental differences in plant response to acute and chronic exposure to ionizing radiation. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2007;624(1–2):101–13.

57. Prasad KN, Cole WC, Hasse GM. Health Risks of Low Dose Ionizing Radiation in Humans: A Review. *Exp Biol Med*. 2004;229(5):378–82.
58. Kadhim M, Salomaa S, Wright E, Hildebrandt G, Belyakov OV, Prise KM, et al. Non-targeted effects of ionising radiation-Implications for low dose risk. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2013;752(2):84–98.
59. Fernie AR, Stitt M. On the discordance of metabolomics with proteomics and transcriptomics: Coping with increasing complexity in logic, chemistry, and network interactions. *Plant Physiol*. 2012;158(3):1139–45.
60. Holtorf H, Guitton M-C, Reski R. Plant functional genomics. *Naturwissenschaften*. 2002;89(6):235–49.
61. Dani V, Simon WJ, Duranti M, Croy RRD. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics*. 2005;5(3):737–45.
62. Toya Y, Kono N, Arakawa K, Tomita M. Metabolic flux analysis and visualization. *J Proteome Res*. 2011;10(8):3313–23.
63. Klie S, Nikoloski Z. The choice between MapMan and Gene ontology for automated gene function prediction in plant science. *Front Genet*. 2012;3(JUN).
64. Isaacson T, Damasceno CMB, Saravanan RS, He Y, Catalá C, Saladié M, et al. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nat Protoc*. 2006;1(2):769–74.
65. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009;6(5):359–62.
66. Cottrell JS. Protein identification using MS/MS data. *J Proteomics*. 2011;74(10):1842–51.
67. Alam I, Lee D-G, Kim K-H, Park C-H, Sharmin SA, Lee H, et al. Proteome analysis of soybean roots under waterlogging stress at an early vegetative stage. *J Biosci*. 2010;35(1):49–62.
68. Van Wijk KJ. Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiol*. 2001;126(2):501–8.
69. De La Fuente Van Bentem S, Roitinger E, Anrather D, Csaszar E, Hirt H. Phosphoproteomics as a tool to unravel plant regulatory mechanisms. *Physiol Plant*. 2006;126(1):110–9.

70. Gallardo K, Le Signor C, Vandekerckhove J, Thompson RD, Burstin J. Proteomics of *Medicago truncatula* Seed Development Establishes the Time Frame of Diverse Metabolic Processes Related to Reserve Accumulation. *Plant Physiol.* 2003;133(2):664–82.
71. Houston NL, Hajduch M, Thelen JJ. Quantitative proteomics of seed filling in castor: Comparison with soybean and rapeseed reveals differences between photosynthetic and nonphotosynthetic seed metabolism. *Plant Physiol.* 2009;151(2):857–68.
72. Hajduch M, Hearne LB, Miernyk JA, Casteel JE, Joshi T, Agrawal GK, et al. Systems analysis of seed filling in *Arabidopsis*: Using general linear modeling to assess concordance of transcript and protein expression. *Plant Physiol.* 2010;152(4):2078–87.
73. Lilley KS, Dupree P. Methods of quantitative proteomics and their application to plant organelle characterization. *J Exp Bot.* 2006;57(7):1493–9.
74. Park E-C, Yoon J-B, Seong J-S, Choi K-S, Kong E-S, Kim Y-J, et al. Effect of ionizing radiation on rat tissue: Proteomic and biochemical analysis. *Prep Biochem Biotechnol.* 2006;36(1):19–35.
75. Guipaud O, Holler V, Buard V, Tarlet G, Royer N, Vinh J, et al. Time-course analysis of mouse serum proteome changes following exposure of the skin to ionizing radiation. *Proteomics.* 2007;7(21):3992–4002.
76. Aghaei K, Ehsanpour AA, Shah AH, Komatsu S. Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. *Amino Acids.* 2009;36(1):91–8.
77. Kamal AHM, Rashid H, Sakata K, Komatsu S. Gel-free quantitative proteomic approach to identify cotyledon proteins in soybean under flooding stress. *J Proteomics.* 2015;112:1–13.
78. Nanjo Y, Skultety L, Uváčková L, Klubicová K, Hajduch M, Komatsu S. Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings. *J Proteome Res.* 2012;11(1):372–85.
79. Damude HG, Kinney AJ. Engineering oilseed plants for a sustainable, land-based source of long chain polyunsaturated fatty acids. *Lipids.* 2007;42(3):179–85.
80. Millam S, Obert B, Pret'ová A. Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* - A review. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2005;82(1):93–103.
81. Cloutier S, Niu Z, Datla R, Duguid S. Development and analysis of EST-SSRs for flax (*Linum usitatissimum* L.). *Theor Appl Genet.* 2009;119(1):53–63.

82. Venglat P, Xiang D, Qiu S, Stone SL, Tibiche C, Cram D, et al. Gene expression analysis of flax seed development. *BMC Plant Biol.* 2011;11.
83. Gutierrez L, Conejero G, Castelain M, Guénin S, Verdeil J-L, Thomasset B, et al. Identification of new gene expression regulators specifically expressed during plant seed maturation. *J Exp Bot.* 2006;57(9):1919–32.
84. Barvkar VT, Pardeshi VC, Kale SM, Kadoo NY, Giri AP, Gupta VS. Proteome profiling of flax (*Linum usitatissimum*) seed: Characterization of functional metabolic pathways operating during seed development. *J Proteome Res.* 2012;11(12):6264–76.
85. Chung MWY, Lei B, Li-Chan ECY. Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food Chem.* 2005;90(1–2):271–9.
86. Tafforeau M, Verduis MC, Charlionet R, Cabin-Flaman A, Ripoll C. Two-dimensional electrophoresis investigation of short-term response of flax seedlings to a cold shock. *Electrophoresis.* 2002;23(15):2534–40.
87. Hradilová J, Řehulka P, Řehulková H, Vrbová M, Griga M, Brzobohatý B. Comparative analysis of proteomic changes in contrasting flax cultivars upon cadmium exposure. *Electrophoresis.* 2010;31(2):421–31.
88. Klubíková K, Danchenko M, Skultety L, Berezhna VV, Hricová A, Rashydov NM, et al. Agricultural recovery of a formerly radioactive area: II. Systematic proteomic characterization of flax seed development in the remediated Chernobyl area. *J Proteomics.* 2011;74(8):1378–84.
89. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1–2):248–54.
90. Akbar E, Yaakob Z, Kamarudin SK, Ismail M, Salimon J. Characteristic and composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potential as biodiesel feedstock feedstock. *Eur J Sci Res.* 2009;29(3):396–403.
91. Berlizov AN, Sajeniouk AD, Tryshyn VV. A technique for the determination of ⁹⁰Sr, plutonium and americium isotopes in environmental samples. *J Radioanal Nucl Chem.* 2005;263(2):307–10.

92. Shevchenko A, Tomas H, Havliš J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc.* 2007;1(6):2856–60.
93. Plumb RS, Johnson KA, Rainville P, Smith BW, Wilson ID, Castro-Perez JM, et al. UPLC/MSE; a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006;20(13):1989–94.
94. Pareniuk O, Shavanova K, Laceby JP, Illienko V, Tytova L, Levchuk S, et al. Modification of ¹³⁷Cs transfer to rape (*Brassica napus* L.) phytomass under the influence of soil microorganisms. *J Environ Radioact.* 2015;149:73–80.
95. Choi YH, Lim KM, Choi HJ, Choi GS, Lee HS, Lee CW. Plant uptake and downward migration of ⁸⁵Sr and ¹³⁷Cs after their deposition on to flooded rice fields: Lysimeter experiments with and without the addition of KCl and lime. *J Environ Radioact.* 2004;78(1):35–49.
96. Kozhakhanov TE, Lukashenko SN, Larionova NV. Accumulation of artificial radionuclides in agricultural plants in the area used for surface nuclear tests. *J Environ Radioact.* 2014;137:217–26.
97. Douka CE, Xenoulis AC. Radioactive isotope uptake in a grass-legume association. *Environ Pollut.* 1991;73(1):11–23.
98. Soudek P, Valenová S, Vavříková Z, Vaněk T. ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr uptake by sunflower cultivated under hydroponic conditions. *J Environ Radioact.* 2006;88(3):236–50.
99. Shtangeeva I. Uptake of uranium and thorium by native and cultivated plants. *J Environ Radioact.* 2010;101(6):458–63.
100. Al-Kharouf SJ, Al-Hamarneh IF, Dababneh M. Natural radioactivity, dose assessment and uranium uptake by agricultural crops at Khan Al-Zabeeb, Jordan. *J Environ Radioact.* 2008;99(7):1192–9.
101. Da Costa-Nunes JA, Bhatt AM, O'Shea S, West CE, Bray CM, Grossniklaus U, et al. Characterization of the three *Arabidopsis thaliana* RAD21 cohesins reveals differential responses to ionizing radiation. *J Exp Bot.* 2006;57(4):971–83.
102. Danchenko M, Rashydov N, Hajduch M. Comparative quantitative proteomics – The elucidation of adaptation mechanisms in Chernobyl grown plants. *Physiol Plant.* 2008;133:S197.

103. 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.
104. Hajduch M, Casteel JE, Hurrelmeyer KE, Song Z, Agrawal GK, Thelen JJ. Proteomic analysis of seed filling in *Brassica napus*. Developmental characterization of metabolic isozymes using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* 2006;141(1):32–46.
105. Campostrini N, Areces LB, Rappsilber J, Pietrogrande MC, Dondi F, Pastorino F, et al. Spot overlapping in two-dimensional maps: A serious problem ignored for much too long. *Proteomics.* 2005;5(9):2385–95.
106. Škultéty L, Danchenko M, Pret’Ová A, Hajduch M. Techniques in plant proteomics. In: *Molecular Techniques in Crop Improvement: 2nd Edition.* 2009. p. 469–91.
107. Kim J-H, Yu RM, Kim J-S, Oh M-H, Lee J-W, Byung YC. Transcriptomic profile of *Arabidopsis* Rosette leaves during the reproductive stage after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res.* 2007;168(3):267–80.
108. Mazzeo JR, Neue UD, Kele M, Plumb RS. Advancing LC performance with smaller particles and higher pressure. *Anal Chem.* 2005;77(23).
109. 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.
110. Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C, et al. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 1998;391(6666):485–8.
111. Adachi M, Takenaka Y, Gidamis AB, Mikami B, Utsumi S. Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *J Mol Biol.* 2001;305(2):291–305.
112. Gábrišová D, Klubicová K, Danchenko M, Gömöry D, Berezhna VV, Skultety L, et al. Do cupins have a function beyond being seed storage proteins? *Front Plant Sci.* 2016;6(JAN2016).

113. Moons A, De Keyser A, Van Montagu M. A group 3 LEA cDNA of rice, responsive to abscisic acid, but not to jasmonic acid, shows variety-specific differences in salt stress response. *Gene*. 1997;191(2):197–204.
114. Porcel R, Azcón R, Ruiz-Lozano JM. Evaluation of the role of genes encoding for dehydrin proteins (LEA D-11) during drought stress in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants. *J Exp Bot*. 2005;56(417):1933–42.
115. Morigasaki S, Shimada K, Ikner A, Yanagida M, Shiozaki K. Glycolytic Enzyme GAPDH Promotes Peroxide Stress Signaling through Multistep Phosphorelay to a MAPK Cascade. *Mol Cell*. 2008;30(1):108–13.
116. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J*. 2009;417(3):651–66.
117. Christensen A, Svensson K, Persson S, Jung J, Michalak M, Widell S, et al. Functional characterization of *Arabidopsis* calreticulin1a: A key alleviator of endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell Physiol*. 2008;49(6):912–24.
118. Kim SH, Song M, Lee KJ, Hwang SG, Jang CS, Kim JB, et al. Genome-wide transcriptome profiling of ROS scavenging and signal transduction pathways in rice (*Oryza sativa* L.) in response to different types of ionizing radiation. *Mol Biol Rep*. 2012;39(12):11231–48.
119. Keppler LD, Novacky A. The initiation of membrane lipid peroxidation during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Physiol Mol Plant Pathol*. 1987;30(2):233–45.
120. Kramer S, Piotrowski M, Kühnemann F, Edelmann HG. Physiological and biochemical characterization of ethylene-generated gravicompetence in primary shoots of coleoptile-less gravi-incompetent rye seedlings. *J Exp Bot*. 2003;54(393):2723–32.
121. Danchenko M, Skultety L, Rashydov NM, Berezhna VV, Mátel L, Salaj T, et al. 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.
122. 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.

123. 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.
124. Sales MP, Gerhardt IR, Grossi-de-Sa MF, Xavier-Filho J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against Bruchids? *Plant Physiol.* 2000;124(2):515–22.
125. Regente M, De La Canal L. Are storage 2S albumins also defensive proteins? *Physiol Mol Plant Pathol.* 2001;59(6):275–6.
126. Rajjou L, Belghazi M, Huguet R, Robin C, Moreau A, Job C, et al. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiol.* 2006;141(3):910–23.
127. Agrawal GK, Hajduch M, Graham K, Thelen JJ. In-depth investigation of the soybean seed-filling proteome and comparison with a parallel study of rapeseed. *Plant Physiol.* 2008;148(1):504–18.
128. Steffens JC. The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1990;41(1):553–75.
129. Harada E, Choi Y-E, Tsuchisaka A, Obata H, Sano H. Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. *J Plant Physiol.* 2001;158(5):655–61.
130. Kawashima CG, Noji M, Nakamura M, Ogra Y, Suzuki KT, Saito K. Heavy metal tolerance of transgenic tobacco plants over-expressing cysteine synthase. *Biotechnol Lett.* 2004;26(2):153–7.
131. Noji M, Saito M, Nakamura M, Aono M, Saji H, Saito K. Cysteine synthase overexpression in tobacco confers tolerance to sulfur-containing environmental pollutants. *Plant Physiol.* 2001;126(3):973–80.
132. Rorat T. Plant dehydrins - Tissue location, structure and function. *Cell Mol Biol Lett.* 2006;11(4):536–56.
133. Close TJ. Dehydrins: A commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant.* 1997;100(2):291–6.

134. Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1996;47(1):377–403.
135. Close TJ. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant.* 1996;97(4):795–803.
136. Zhang Y, Li J, Yu F, Cong L, Wang L, Burkard G, et al. Cloning and expression analysis of SKn-type dehydrin gene from bean in response to heavy metals. *Mol Biotechnol.* 2006;32(3):205–17.
137. Xu J, Zhang YX, Wei W, Han L, Guan ZQ, Wang Z, et al. BjDHNs confer heavy-metal tolerance in plants. *Mol Biotechnol.* 2008;38(2):91–8.
138. Nakamura T, Nomura M, Mori H, Jagendorf AT, Ueda A, Takabe T. An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol.* 2001;42(10):1088–92.
139. Monobe M, Uzawa A, Hino M, Ando K, Kojima S. Glycine betaine, a beer component, protects radiation-induced injury. *J Radiat Res (Tokyo).* 2005;46(1):117–21.
140. Haimovitz-Friedman A. Radiation-induced signal transduction and stress response. *Radiat Res.* 1998;150(5 SUPPL.).
141. Liavonchanka A, Feussner I. Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol.* 2006;163(3):348–57.
142. Chung HS, Niu Y, Browse J, Howe GA. Top hits in contemporary JAZ: An update on jasmonate signaling. *Phytochemistry.* 2009;70(13–14):1547–59.
143. Дмитриев А, Гродзинский Д, Гуца И, Крыжановская М. Влияние хронического облучения на устойчивость растений к биотическому стрессу в 30-километровой зоне отчуждения Чернобыльской АЭС. *Физиология Растений.* 2011;58(6):922–9.
144. Colcombet J, Hirt H. Arabidopsis MAPKs: A complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J.* 2008;413(2):217–26.
145. Rogers LD, Foster LJ. Phosphoproteomics - Finally fulfilling the promise? *Mol Biosyst.* 2009;5(10):1122–9.
146. Emes MJ. Oxidation of methionine residues: The missing link between stress and signalling responses in plants. *Biochem J.* 2009;422(2).
147. Chevalier D, Morris ER, Walker JC. 14-3-3 and FHA domains mediate phosphoprotein interactions. 2009. 67 p. (Annual Review of Plant Biology; vol. 60).

148. Oecking C, Jaspert N. Plant 14-3-3 proteins catch up with their mammalian orthologs. *Curr Opin Plant Biol.* 2009;12(6):760–5.
149. Chang I-F, Curran A, Woolsey R, Quilici D, Cushman JC, Mittler R, et al. Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics.* 2009;9(11):2967–85.
150. Pajonk F, McBride WH. Ionizing radiation affects 26s proteasome function and associated molecular responses, even at low doses. *Radiother Oncol.* 2001;59(2):203–12.
151. Pervan M, Iwamoto KS, McBride WH. Proteasome structures affected by ionizing radiation. *Mol Cancer Res.* 2005;3(7):381–90.
152. Ralser M, Wamelink MM, Kowald A, Gerisch B, Heeren G, Struys EA, et al. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J Biol.* 2007;6(4).
153. Grant CM. Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *J Biol.* 2008;7(1).
154. Lehmann M, Schwarzländer M, Obata T, Sirikantaramas S, Burow M, Olsen CE, et al. The metabolic response of *Arabidopsis* roots to oxidative stress is distinct from that of heterotrophic cells in culture and highlights a complex relationship between the levels of transcripts, metabolites, and flux. *Mol Plant.* 2009;2(3):390–406.
155. Lu W, Tang X, Huo Y, Xu R, Qi S, Huang J, et al. Identification and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase genes in *Arabidopsis* reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses. *Gene.* 2012;503(1):65–74.
156. Plaxton WC. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1996;47(1):185–214.
157. Stein M, Gabdoulline RR, Wade RC. Cross-species analysis of the glycolytic pathway by comparison of molecular interaction fields. *Mol Biosyst.* 2009;6(1):162–74.
158. Feala JD, Coquin L, Zhou D, Haddad GG, Paternostro G, McCulloch AD. Metabolism as means for hypoxia adaptation: Metabolic profiling and flux balance analysis. *BMC Syst Biol.* 2009;3:91.
159. Burnet M, Lafontaine PJ, Hanson AD. Assay, purification, and partial characterization of choline monooxygenase from spinach. *Plant Physiol.* 1995;108(2):581–8.

160. Waditee R, Bhuiyan NH, Hirata E, Hibino T, Tanaka Y, Shikata M, et al. Metabolic engineering for betaine accumulation in microbes and plants. *J Biol Chem.* 2007;282(47):34185–93.
161. Daniel B, Pavkov-Keller T, Steiner B, Dordic A, Gutmann A, Nidetzky B, et al. Oxidation of monolignols by members of the berberine bridge enzyme family suggests a role in plant cell wall metabolism. *J Biol Chem.* 2015;290(30):18770–81.
162. Klug A. Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *J Mol Biol.* 1999;293(2):215–8.
163. Francischini CW, Quaggio RB. Molecular characterization of *Arabidopsis thaliana* PUF proteins - Binding specificity and target candidates. *FEBS J.* 2009;276(19):5456–70.
164. Huh SU, Kim MJ, Paek K-H. *Arabidopsis* Pumilio protein APUM5 suppresses Cucumber mosaic virus infection via direct binding of viral RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(2):779–84.
165. Huh SU, Paek K-H. APUM5, encoding a Pumilio RNA binding protein, negatively regulates abiotic stress responsive gene expression. *BMC Plant Biol.* 2014;14(1).
166. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Protein folding. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science.* 2002;295(5561):1852–8.
167. Clarke AR. Cytosolic Chaperonins: a Question of Promiscuity. *Mol Cell.* 2006;24(2):165–7.
168. Xu H, Xu W, Xi H, Ma W, He Z, Ma M. The ER luminal binding protein (BiP) alleviates Cd²⁺-induced programmed cell death through endoplasmic reticulum stress-cell death signaling pathway in tobacco cells. *J Plant Physiol.* 2013;170(16):1434–41.
169. Urade R. The endoplasmic reticulum stress signaling pathways in plants. *BioFactors.* 2009;35(4):326–31.
170. Danchenko M, Klubicova K, Rashydov N, Hajduch M. Proteome changes in mature seeds suggest adaptation toward chernobyl environment. *Febs J.* 2010 Jun;277:278–278.
171. 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.

172. Klubicová K, Danchenko M, Skultety L, Miernyk JA, Rashydov NM, Berezhna VV, et al. 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.
173. Armengaud J. Proteogenomics and systems biology: Quest for the ultimate missing parts. *Expert Rev Proteomics*. 2010;7(1):65–77.
174. Guimerà R, Amaral LAN. Functional cartography of complex metabolic networks. *Nature*. 2005;433(7028):895–900.
175. Williams LE, Lemoine R, Sauer N. Sugar transporters in higher plants - A diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci*. 2000;5(7):283–90.
176. Zhang J, Zhang Y, Du Y, Chen S, Tang H. Dynamic metabonomic responses of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants to salt stress. *J Proteome Res*. 2011;10(4):1904–14.
177. 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.
178. Klubicová K, Danchenko M, Skultety L, Berezhna VV, Uvackova L, Rashydov NM, et al. Soybeans Grown in the Chernobyl Area Produce Fertile Seeds that Have Increased Heavy Metal Resistance and Modified Carbon Metabolism. *PLoS ONE*. 2012;7(10).
179. Lee SM, Koh H-J, Park D-C, Song BJ, Huh T-L, Park J-W. Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(11):1185–96.
180. Nagy Z, Németh E, Guóth A, Bona L, Wodala B, Pécsváradi A. Metabolic indicators of drought stress tolerance in wheat: Glutamine synthetase isoenzymes and Rubisco. *Plant Physiol Biochem*. 2013;67:48–54.
181. 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.

182. 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.
183. 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.
184. Данченко М, Клубицова К, Шкультэты Л, Бережна В, Рашидов Н, Хайдух М. Концепция адаптации аграрных культур к условиям Чернобыля на основе данных протеомики семян. In: Радиобиологические и радиозэкологические аспекты чернобыльской катастрофы Тезисы. Славутич, Украина: Украинский фитосоциологический центр; 2011. p. 74.
185. Данченко ММ, Клубісова К, Кривохижа МВ, Бережна ВВ, Сакада ВІ, Хайдук М, et al. Системна біологія як ефективний інструмент дослідження впливу малих доз хронічного опромінення на рослини в чорнобильській зоні. Цитологія І Генетика. 2016;50(6):60–79.
186. Мамедли С, Гродзинский Д. Роль типа опыления в проявлении радиационно-индуцированной нестабильности генома у растений. Доп НАН України. 2007;(7):165–70.
187. Кравец А, Мюссе Т, Литвинчук А, Остермиллер Ш, Венгжен Г, Гродзинский Д. Изменения профиля метилирования днк растений пшеницы при хроническом γ -облучении семян. Цитология И Генетика. 2010;44(5):18–22.
188. Danchenko M, Klubicova K, Berezhna V, Sakada V, Skultety L, Hajduch M, et al. 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.

ДОДАТОК. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ТА ВІДОМОСТІ ПРО
АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Список публікацій:

1. Danchenko M, Skultety L, Rashydov NM, Berezhna VV, Mátel L, Salaj T, et al. 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.
2. Škultéty L, Danchenko M, Pret’Ová A, Hajduch M. Techniques in plant proteomics. In: *Molecular Techniques in Crop Improvement: 2nd Edition.* 2009. p. 469–91.
3. Klubicová K, Danchenko M, Skultety L, Miernyk JA, Rashydov NM, Berezhna VV, et al. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Klubicová K, Danchenko M, Skultety L, Berezhna VV, Uvackova L, Rashydov NM, et al. Soybeans Grown in the Chernobyl Area Produce Fertile Seeds that Have Increased Heavy Metal Resistance and Modified Carbon Metabolism. *PLoS ONE.* 2012;7(10).
7. 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.
8. Данченко ММ, Клубісова К, Кривохижа МВ, Бережна ВВ, Сакада ВІ, Хайдук М, et al. Системна біологія як ефективний інструмент дослідження впливу малих доз хронічного опромінення на рослини в чорнобильській зоні. *Цитологія І Генетика.* 2016;50(6):60–79.

9. Danchenko M, Rashydov N, Hajduch M. Comparative quantitative proteomics – The elucidation of adaptation mechanisms in Chernobyl grown plants. *Physiol Plant*. 2008;133:S197.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Danchenko M, Klubicova K, Rashydov N, Hajduch M. Proteome changes in mature seeds suggest adaptation toward chernobyl environment. *Febs J*. 2010 Jun;277:278–278.
14. 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.
15. Данченко М, Клубицова К, Шкультэты Л, Бережна В, Рашидов Н, Хайдух М. Концепция адаптации аграрных культур к условиям Чернобыля на основе данных протеомики семян. In: Радиобиологические и радиозэкологические аспекты чернобыльской катастрофы Тезисы. Славутич, Украина: Украинский фитосоциологический центр; 2011. p. 74.
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.

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.
18. Danchenko M, Klubicova K, Berezhna V, Sakada V, Skultety L, Hajduch M, et al. 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.

Апробація матеріалів

Основні положення дисертації були представлені та доповідались 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). Також окремі результати дисертації доповідались на наукових семінарах Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України і Інституту генетики і біотехнології рослин Словацької академії наук.