

*На правах рукописи*

**Егорова Алевтина Михайловна**

**ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОТЕОМЫ  
ЛИСТЬЕВ И КОРНЕЙ ГОРОХА**

**03.00.12.- физиология и биохимия растений**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Казань - 2009**

Работа выполнена в группе белкового метаболизма Учреждения Российской академии наук Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Научный руководитель: академик РАН  
Игорь Анатольевич Тарчевский

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
Ольга Николаевна Кулаева (г. Москва)

доктор биологических наук  
Фарида Вилевна Минибаева (г. Казань)

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук  
институт биохимии и генетики  
Уфимского научного центра РАН

Защита состоится \_\_\_\_\_ 2009 года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я № 30, тел/факс (843)2927347.

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

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

А.Б. Иванова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Одним из магистральных направлений исследований биологических систем в последнем десятилетии может считаться протеомика, в том числе протеомика растений. Ее задачей является получение информации о протеомах – совокупности белков организма, изменениях в наборе и содержании белков в ходе развития растения и при изменении условий существования, в том числе при действии различных биотических и абиотических стрессоров. В повышении устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессорам ключевую роль играют стрессовые фитогормоны. На сегодняшний день имеются данные о влиянии стрессовых фитогормонов на протеомы целых растений и их органов. Данные о влиянии салициловой кислоты (СК) – ключевого фактора индукции системного иммунитета растений – на протеомы корней практически отсутствуют, поэтому можно сделать вывод, что исследование влияния на протеомы корней СК является актуальным. Работа в этом направлении может внести вклад в познание особенностей функционирования сигнальных систем клеток растений, поскольку изменение протеомов под влиянием СК осуществляется при участии сигнальных систем.

Различные сигнальные системы в нашей стране интенсивно изучаются в институте физиологии растений РАН (О.Н. Кулаева, Вл.В. Кузнецов, В.В. Кузнецов и др.), институте биохимии РАН (О.П. Кораблева, О.Л. Озерецковская, Н.И.Васюкова и др.), в Сибирском институте физиологии и биохимии растений СОРАН (В.К. Войников, Л.А. Ломоватская и др.), институте биохимии и генетики УНЦ РАН (И.В. Максимов, Ф.М. Шакирова и др.), Казанском институте биохимии и биофизики (А.Н. Гречкин, Ф.Г. Каримова, Л.Х. Гордон, Ф.В. Минибаева, И.А.Тарчевский и др.), Санкт-Петербургском госуниверситете (С.С. Медведев, М.Ф.Шишова и др.). Результатом функционирования сигнальных систем является репрограммирование экспрессии генов и синтеза белков, что приводит к изменению протеомов. В то же время, протеомному анализу действия стрессовых фитогормонов, в частности, салициловой кислоты, практически не уделяется внимание.

**Цель и задачи исследования.** Целью исследований было выяснение особенностей влияния одного из ключевых факторов системного фитоиммунитета – салициловой кислоты на протеомы листьев и корней гороха.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Выявление салицилат-индуцируемых белков листьев и корней гороха с помощью двумерного электрофореза.
2. Идентификация выявленных салицилат-индуцируемых белков с помощью масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS (MS/MS)).
3. Анализ роли СК-индуцируемых белков.

**Научная новизна работы.** Впервые идентифицированы в качестве СК-индуцируемых 15 белков: бета-субъединица В трансляционного фактора I элонгации,

10,11-редуктаза 12-оксофитодиеновой кислоты, нуклеотидсвязывающий белок обогащенный лейциновыми повторами (NBS – LRR type RGA), 5-метилтетрагидроптероилтриглутаматгомоцистеин-S-метилтрансфераза, малатдегидрогеназа цитоплазматическая, предшественник шаперонина альфа-срп60, полиубиквитин и полиубиквитинподобный белок, белок 14-3-3, ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA), альфа-амилаза (каталитическая область), гликозидгидролаза семейства 18, глутаминамидотрансфераза, липиддесатуразоподобный белок, белок 33 кДа фотосистемы II. Все эти белки принимают участие в защитных реакциях, в энергетических процессах у растений, в дупликации и репарации ДНК, синтезе, рефолдинге и деградации белков, в сигнальных процессах клеток.

**Научно-практическая значимость работы.** Результаты проведенных нами исследований вносят вклад в познание молекулярных механизмов действия стрессового фитогормона салициловой кислоты, являющейся одним из ключевых факторов системного иммунитета растений. Был обнаружен целый ряд белков, неизвестных ранее в качестве салицилат-индуцируемых, что позволило расширить представления о механизмах регуляции салициловой кислотой реакций формирования фитоиммунитета. Материалы диссертации могут быть использованы при чтении курсов лекций и учитываться при подборе компонентов для создания новых эффективных антипатогенных препаратов.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были доложены на Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2007); школе-конференции молодых ученых «Биомика - наука XXI века» (Уфа, 2007); Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008); Международном симпозиуме «Липиды и оксипирины растений» (Казань, 2008); IV Всероссийском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009), а также на итоговых конференциях Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН (2008 и 2009 гг.).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 12 научных работ, в том числе 5 статей, две из которых - в реферируемом журнале «Доклады РАН».

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа содержит 5 таблиц и 34 рисунка. Список литературы включает 225 источников.

## 1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**1.1. Объекты исследования.** В работе использовали листья и корни проростков гороха *Pisum sativum* L. сорта Труженик. Проростки выращивали на  $\frac{1}{4}$  водной среды Хогленда-Арнона<sup>1</sup> при 25°C, освещенности 10 кЛюкс при 16-часовом световом

периоде. Влияние СК в разных концентрациях на рост корней оценивали, измеряя длину главного корня через 2, 4, 6 сут действия СК. Для проведения протеомных исследований объектом служили 8-ми дневные проростки гороха, которые помещали на растворы СК. Корни фиксировали через 2 и 5 сут воздействия салицилата, листья проростков фиксировали через 5 сут обработки СК.

**1.2. Выделение белков.** Экстракцию растворимых белков листьев проводили 0,025 М Трис-НСl буфером (рН 8.0), содержащим 2 мМ ЭДТА, 100 мМ ДТТ и 1% коктейль ингибиторов протеаз, и 0,025 М натрий ацетатным буфером (рН 5.2) (100 мМ ДТТ, 1% коктейль ингибиторов протеаз) при температуре 4°C. Растворимые белки корней экстрагировали 0,025 М Трис-НСl буфером (рН 8.3) с теми же добавками. Образцы центрифугировали 15 мин (14000 g) при 4°C, затем к надосадочной жидкости, содержащей растворимые белки, приливали равный объем холодного раствора 20%-ной ТХУ в ацетоне с 25 мМ ДТТ. Пробы выдерживали 1 ч при -20°C, после чего образцы центрифугировали 15 мин (14000 g) при 4°C. Осадок промывали охлажденным ацетоном с добавлением 50 мМ ДТТ, этиловым спиртом, эфиром (этоксиэтан), высушивали и растворяли в буфере для изоэлектрического фокусирования (6 М мочевины, 2 М тиомочевина, 2% CHAPS, 2% тритон X-100, 50 мМ ДТТ и 0.5% Bio-Lyte (рН 3-10)). Количество белка определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951), используя в качестве стандарта БСА.

**1.3. Разделение растворимых белков методом двумерного электрофореза.** 2D-электрофорез проводили на приборах Protean IEF Cell, Protean II xi 2-D Cell (Bio-Rad, США) с использованием стрипов 17 см с иммобилизованным линейным градиентом рН 4-7, рН 3-1 и рН 3.9-5.1. На стрипы наносили равное количество белка контрольного и опытного вариантов. Регидратацию стрипов осуществляли при 50 В в течение 12 ч, изофокусирование - 10-12 ч при 20°. Общее количество вольт-часов составляло 60000. Перед началом разделения белков по молекулярным массам стрипы уравнивали 15 мин в 1-ом буфере (0,125 М Трис-НСl, 2% Ds-Na, 30% глицерин, 6 М мочевины, 2% ДТТ и следы бромфенолового синего), затем выдерживали 15 мин во 2-ом уравнивающем буфере, который вместо ДТТ включал 2,5% йодацетамид. Разделение белков по молекулярным массам проводили с помощью 12,5% Ds-Na-ПААГ – электрофореза в Трис-глициновом буфере (40 мА на 1 гель). Пластины геля окрашивали красителем Кумасси G-250 (0,05% Coomassie G-250, 2% ТХУ, 20% этанол). Сканирование гелей проводили на сканере EPSON 4990 Photo (Индонезия).

**1.4. Обработка гелей.** Анализ белковых пятен на 2Д- электрофореграммах проводили с помощью программы Phoretix 2D v 2004 (Nonlinear Dynamics). В дальнейшем идентифицировали белковые пятна, отношение содержания которых в контроле и опыте было больше 1,5.

**1.5. Идентификация белков.** Идентификацию белков проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с помощью программы Mascot

([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Поиск по «пептидному фингерпринту» проводился в базе данных NCBI (подбаза – растения). С использованием программного обеспечения Biotoools 3.0 (Bruker Daltonics, Германия) был также проведен поиск по результатам MS+MS/MS.

## **1.6. Определение признаков программируемой клеточной смерти (ПКС).**

**1.6.1. Окраска корней красителем Эванс голубой.** Для оценки гибели клеток апексов корней использовали краситель Эванс голубой (0,1% раствор). Для этого корни проростков гороха отрезали от стеблей и помещали в краситель на 20 мин при комнатной температуре; затем корни отмывали в дистиллированной воде в течение 20 мин. Корни сканировали на сканере EPSON 4990 Photo.

**1.6.2. Выделение и электрофоретическое разделение ДНК.** Выделение тотальной ДНК из клеток растений проводили методом фенольной экстракции (Гловер, 1988). Для выделения ДНК использовали кончики корней длиной 1-1,5 см. Дальнейшую очистку проводили с обработкой препаратами РНК-азы и протеиназы К. Электрофорез ДНК проводили в 1% агарозном геле.

**1.6.3. Детекция NO.** Для детекции оксида азота (NO) использовали специфический флуоресцентный краситель диаминофлуоресцин диацетат (DAF-FM DA). Кончики корней длиной 2 см помещали на 15 мин в раствор 10 мкМ красителя DAF-FM DA в 5 мМ MES буфере с добавлением 0,25 мМ KCl (pH 6.15). Затем корни отмывались в том же буфере от красителя 20 мин. Флуоресценцию возбуждали светом 500 нм, эмиссию наблюдали при 515 нм с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия).

**1.7. Статистика.** Эксперименты проводили в двух-трех биологических и трех аналитических повторностях. Для электрофореза приведены результаты одного характерного опыта. Статистическая обработка данных проводилась с использованием t - критерия Стьюдента (при уровне достоверности  $P < 0,05$ ).

## **2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

При исследовании влияния СК на протеомы растений гороха мы учитывали, что картина изменений набора и содержания белков зависит от продолжительности действия и концентрации СК. Эти изменения могут сопровождаться изменением других физиолого-биохимических и анатомо-морфологических показателей.

**2.1. Влияние СК на рост корней проростков гороха и общее содержание растворимых белков.** При изучении влияния СК на рост главного корня 3-х дневных проростков гороха использовали концентрации от 10 до 100 мкМ.

СК в концентрациях 10 и 25 мкМ существенно не влияла на рост корней (рис. 1); при концентрации СК 50 мкМ происходило небольшое ингибирование роста корней; отрицательное влияние на рост корней усиливалось при увеличении концентрации и продолжительности действия СК. На 6 сут ингибирование роста корней при СК 100 мкМ составляло 31%, происходила гибель апекса корня, образовывалась перетяжка,

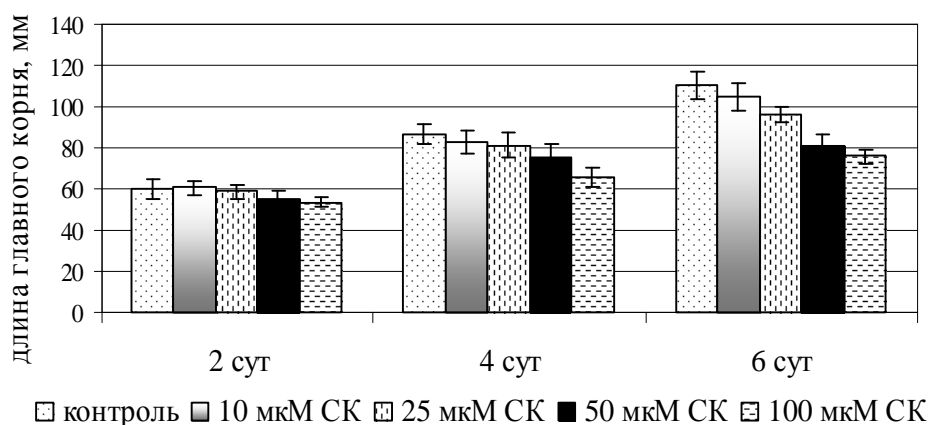


Рис. 1. Влияние СК на рост главного корня проростков гороха.

отделяющая живую часть корня от мертвой (см. главу 2.4.).

Для оценки содержания растворимых белков в проростках гороха использовали 8-ми дневные растения, которые затем помещали на растворы СК (50 мкМ и 100 мкМ) на 1, 3 и 5 сут. Как и ожидалось, общее содержание белков было выше в листьях, по сравнению с корнями. СК в обеих концентрациях не оказывала существенного влияния на общее содержание растворимых белков в корнях и листьях (рис. 2). Однако известно, что СК вызывает изменение содержания отдельных белков, что делает целесообразным изучение ее влияния на протеомы листьев и корней.

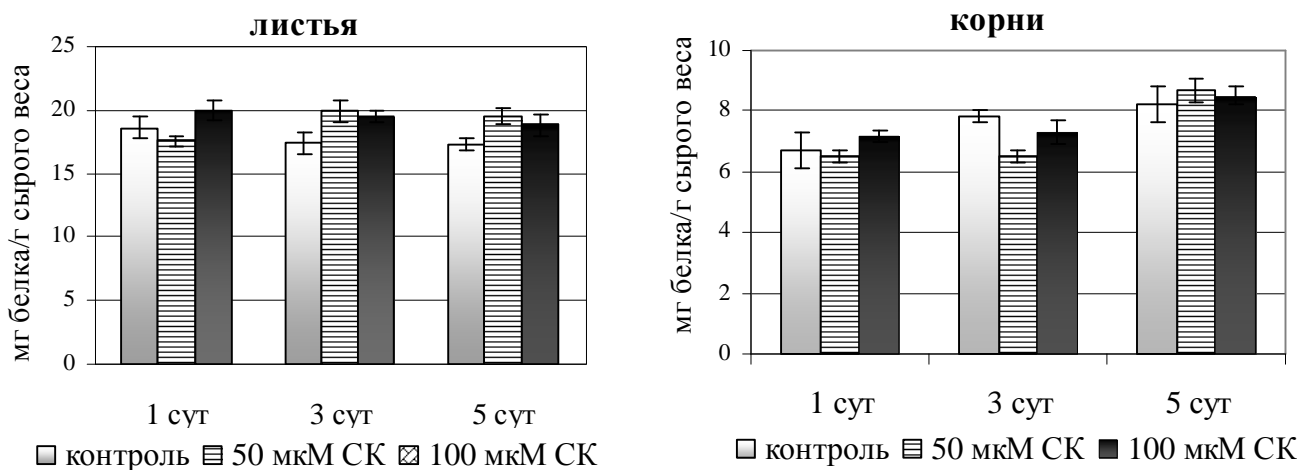


Рис. 2. Влияние СК на общее содержание растворимых белков в листьях и корнях гороха.

**2.2. Влияние СК на протеом листьев гороха.** Для сопоставления СК-индуцируемых изменений протеомов листьев и корней использовали только СК в концентрации 50 мкМ, поскольку в более высокой концентрации СК вызывала морфологические изменения корней, но не листьев, и сопоставление их протеомов было бы некорректным.

В наших опытах при извлечении белков из листьев с помощью 0,025 М Трис-НСI

буфера (рН 8.0) с последующим их разделением на 2-Д электрофореграммах наиболее высоким содержанием отличались белки фотосинтетического аппарата растений. По данным литературы, на долю белков цикла Кальвина приходится от 30% до 50% от общего содержания растворимых белков листьев (Ellis, 1979; Schitzet et al., 2004). Мы обнаружили, что наиболее высоким содержанием отличаются большие и малые субъединицы (СЕ) рибулезо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (РБФК/О)

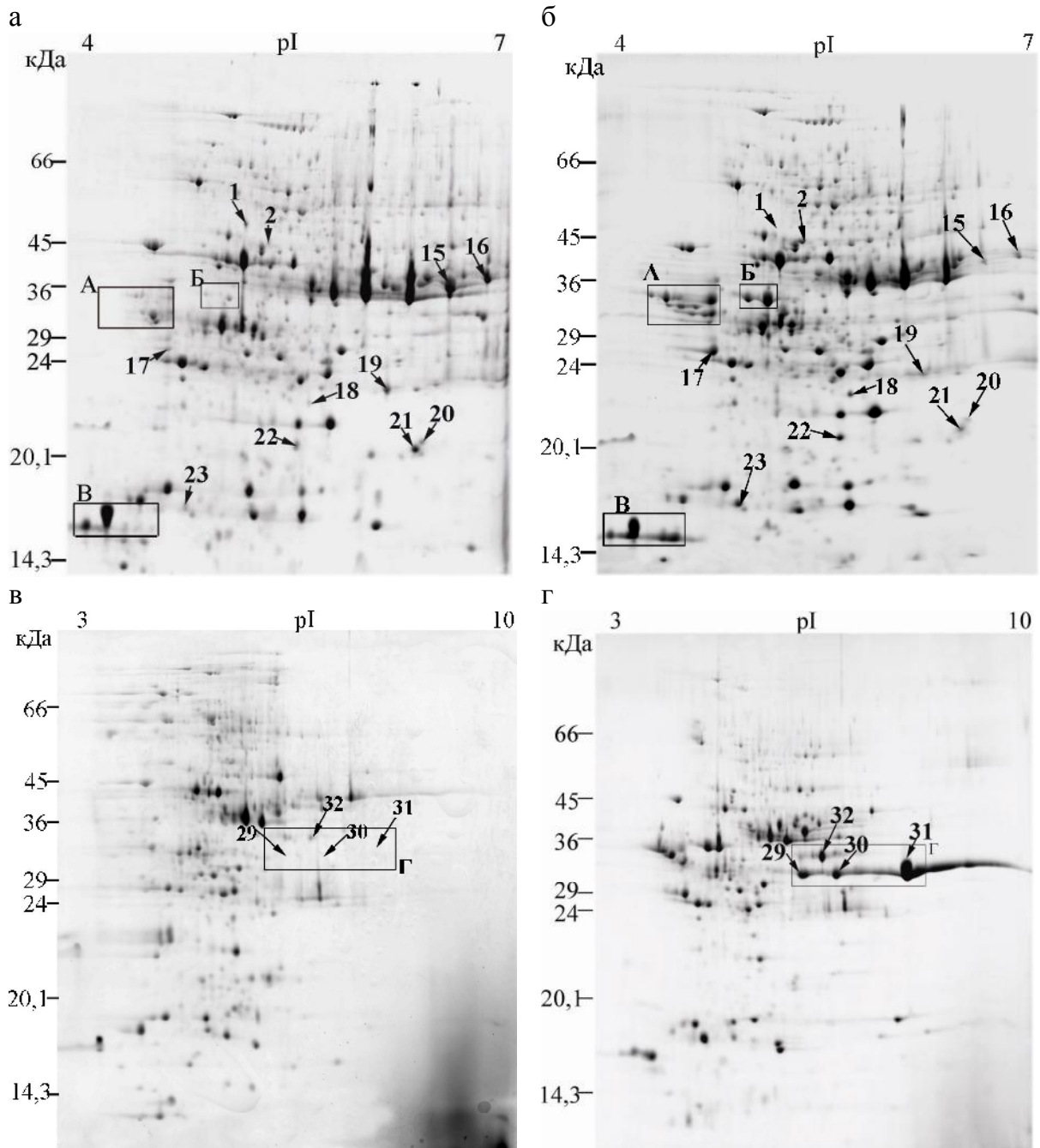


Рис. 3. Электрофореграммы растворимых белков листьев гороха. а – контроль (рН 4-7); б - СК 50 мкМ (рН 4-7); в – контроль (рН 3-10); г - СК 50 мкМ (рН 3-10). Время действия СК 5 сут.



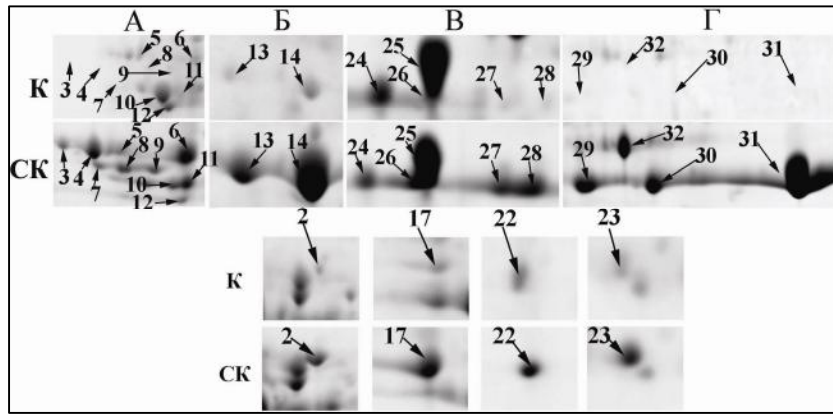


Рис. 4. Фрагменты 2Д - электрофореграмм. К - контроль, СК - 50 мкМ.

(данные представлены в диссертации). При окрашивании белков на двумерных электрофореграммах высокое содержание этих белков с неизбежностью приводит к тому, что минорные белки не визуализируются. Поскольку РБФК/О не извлекается кислым буфером (рН 4.6-5.2) (в отличие от большинства патоген- и элиситор-индуцируемых белков), то в основной серии опытов мы использовали вариант с извлечением белков 0,025 М натрий-ацетатным буфером (рН 5.2) (Jung et al., 2003) (рис. 3).

На рис. 3 представлена общая картина 2Д-электрофореграмм растворимых белков, на которых обнаруживалось около 600 белковых пятен. В увеличенном виде фрагменты гелей А, Б, В, Г приведены на рис. 4. Обнаружено СК-индуцируемое изменение содержания 32 белков листьев, из которых 13 белков были идентифицированы. Нами впервые было обнаружено СК-индуцируемое повышение содержания глутаминамидотрансферазы (пятно 29), гликозидгидролазы семейства 18 (пятно 17), белка устойчивости к болезням (пятно 23), а также белков пластид - альфа-амилазы (пятно 2), липиддесатуразоподобного белка (пятно 9) и белка 33 кДа фотосистемы II (пятно 22) (таб. 1). Ниже приводится краткое описание функций этих белков.

**Глутаминамидотрансфераза** – фермент, потенциально усиливающий возможность использования амидогруппы глутамина на синтез пуриновых и цитозинового нуклеозидов. К **гликозидгидролазам семейства 18** относятся белки, обладающие хитиназной и, что очень важно, лизоцимной активностью. Они способны гидролизовать бета-1,4-связи в муреине – пептидогликане, входящем в состав клеточных стенок бактерий (Brunner et al., 1998). **Альфа-амилаза** может обеспечить образование глюкозы из крахмала, участвующей в процессах биосинтеза различных углеводов и дыхания, интенсивность которого повышается под влиянием экзогенной СК. **Липиддесатуразоподобный белок**, который в листьях локализован, главным образом, в хлоропластах, заслуживает особого внимания в связи с тем, что десатурация высокомолекулярных жирных кислот необходима для синтеза полиеновых жирных кислот, из которых в ходе липоксигеназных сигнальных реакций синтезируются гидропероксипроизводные, участвующие в синтезе оксипинов,

Таблица 1. Идентифицированные СК-индуцируемые белки листьев гороха.

№ пятна <sup>1</sup>	№ белка в NCBI <sup>2</sup>	Идентифицированные белки <sup>3</sup>	Экспер. ММ/рI <sup>4</sup>	Теорет. ММ/рI <sup>5</sup>	Score <sup>6</sup>	Кратность различия <sup>7</sup>
2	gi 92887505	Альфа-амилаза, каталитическая область ( <i>Medicago truncatula</i> )	45.0/5.4	46.7/5.17	73	+5,8
3	gi 2921317	Бета-1,3-глюканаза 3 ( <i>Glycine max</i> )	34.1/4.34	26.1/4.27	159	П
9	gi 1161568	Липиддесатуразаподобный белок ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	33.1/4.66	38.7/8.87	84	П
13	gi 2921317	Бета-1,3-глюканаза 3 ( <i>Glycine max</i> )	33.7/5.01	26.1/4.27	124	П
14	gi 2921317	Бета-1,3-глюканаза 3 ( <i>Glycine max</i> )	33.1/5.13	26.1/4.27	98	+15,3
15	gi 2827080	Предшественник малатдегидрогеназы ( <i>Medicago truncatula</i> )	40.2/6.55	35.8/6.4	84	-24,6
17	gi 92883858	Гликозидгидролаза, сем. 18 ( <i>Medicago truncatula</i> )	26.8/4.8	31.4/4.88	229	+7,3
22	gi 224916	Белок 33 кДа фотосистемы II ( <i>Pisum sativum</i> )	20.8/5.59	26.6/6.3	73	+1,9
23	gi 436313	Белок, ответственный за устойчивость к болезням ( <i>Pisum sativum</i> )	17.0/4.95	16.7/4.94	144	+2,7
29	gi 50252075	Глутаминамидотрансфераза класс-I домен содержащий белок ( <i>Oryza sativa</i> )	33.2/6.5	32.3/6.02	94	П
30	gi 82949446	Бета-1,3-глюканаза ( <i>Sesbania rostrata</i> )	33.2/7.2	36.5/9.03	62	П
31	gi 82949446	Бета-1,3-глюканаза ( <i>Sesbania rostrata</i> )	33.2/8.5	36.5/9.03	112	П
32	gi 20687	Хитиназа ( <i>Pisum sativum</i> )	35.5/7.1	34.5/7.83	167	+62,3

Примечание: 1 - номер пятна на 2Д-электрофореграмме, 2 - идентификационный номер белка в базе NCBI (Национальный центр биотехнологической информации), 3 – идентифицированный белок *Pisum sativum* L. или гомологичный белок других организмов, 4 - ММ/рI – ММ – молекулярная масса белка в кДа и рI определенные в эксперименте, 5 - ММ/рI – ММ – теоретическая молекулярная масса белка в кДа и рI из базы данных, 6 - достоверность поиска белков (Score) в базе данных NCBI (подбаза – растения) с использованием программы Mascot, где предел отсечения составлял 67 ( $p < 0,05$ ), 7 – кратность различия содержания белков соответствует среднему значению величин, измеренных в трех независимых опытах; «+», «-» - повышение и уменьшение содержания белка; П – появление белка, отсутствующего в контроле ( $p < 0,05$ ).

в том числе со свойствами антибиотиков и фитогормонов (Grechkin, 1998). Десатуразаподобный белок может быть также вовлечен в реакции биосинтеза кутина и суберина (Lequeu et al., 2003), которые являются защитными барьерами на пути проникновения патогенных микроорганизмов в растения. **Белок 33 кДа фотосистемы II** представляет собой магнийстабилизирующий белок, играющий важную роль в функционировании  $O_2$ -выделяющего хлорофилл-белкового комплекса (Wyman et al., 2005). Повышение содержания этого белка может обеспечить большую устойчивость фотосистемы II хлоропластов.

Нами также были идентифицированы уже обнаруженные ранее другими авторами (Buchter et al., 1997; Brunner et al., 2003) СК-индуцируемые хитиназы семейства 19, а также изоформы кислых и щелочных бета-1,3-глюканаз (табл. 1).

**Хитиназы** катализируют расщепление  $\beta$ -1,4-глюкозидных связей, главным образом представленных в хитине - полимере клеточных стенок грибов, бактерий, личинок и взрослых форм насекомых (Hamel et al., 1995; Regalado et al., 2000; Kasprzewska, 2003). Кислые и щелочные **бета-1,3-глюканазы** гидролизуют  $\beta$ -1,3-связи в полисахаридах клеточных стенок патогенов (VanLoon et al., 2006). Образующиеся в результате фрагменты полисахаридов обладают элиситорными иммунорегулирующими свойствами. Эти ферменты, так же, как хитиназы, можно считать маркерами защитного ответа растений на действие различных патогенов. Одновременное повышение содержания хитиназ и бета-1,3-глюканаз может быть весьма целесообразным потому, что они вызывают синергическое подавление развития патогенных грибов (Minic, 2008).

Была также подтверждена обнаруженная ранее (Curto et al., 2003) СК - индукция **белка, отвечающего за устойчивость к болезням**, синтез которого значительно усиливался при действии различных патогенов.

СК вызывала уменьшение содержания 9 растворимых белков, в том числе идентифицированного нами предшественника **малатдегидрогеназы**. Физиологическое значение последнего трудно объяснить без знания внутриклеточной локализации фермента.

Большинство из перечисленных СК - индуцируемых белков листьев могут принимать участие в защитных функциях растений. Часть из них может разрушать клеточные стенки патогенных микроорганизмов (хитиназа, гликозидгидролаза семейства 18, бета-1,3-глюканазы), другие – повышать устойчивость клеток (белок устойчивости к болезням, белок 33 кДа фотосистемы II) и способствовать активации липоксигеназного сигнального каскада (липиддесатуразаподобный белок).

**2.3. Влияние СК 50 мкМ на протеом корней гороха.** На 2Д-электрофореграммах растворимых белков корней проростков гороха обнаруживалось более 900 белковых пятен (рис. 5). СК (50 мкМ) приводила к изменению содержания 27 белков, присутствующих в выделенных зонах электрофореграмм А, Б, В, и Г (рис. 5), из них 9 белков были идентифицированы (табл. 2).

Впервые следующие белки были идентифицированы нами в качестве СК-индуцируемых: бета-субъединица В трансляционного фактора I элонгации (пятна 1, 9), 10,11-редуктаза 12-оксофитодиеновой кислоты (пятно 13), малатдегидрогеназа цитоплазматическая (пятно 18), нуклеотидсвязывающий белок обогащенный лейциновыми повторами (NBS-LRR type RGA) (пятно 21). К числу известных до наших опытов и идентифицированных также нами СК-индуцируемых белков относятся аскорбатпероксидаза (пятно 14), глутатион-S-трансфераза (пятно 11)

липоксигеназа (пятно 27), АБК-зависимый белок (пятно 26). Ниже приводится краткое описание функций этих белков.

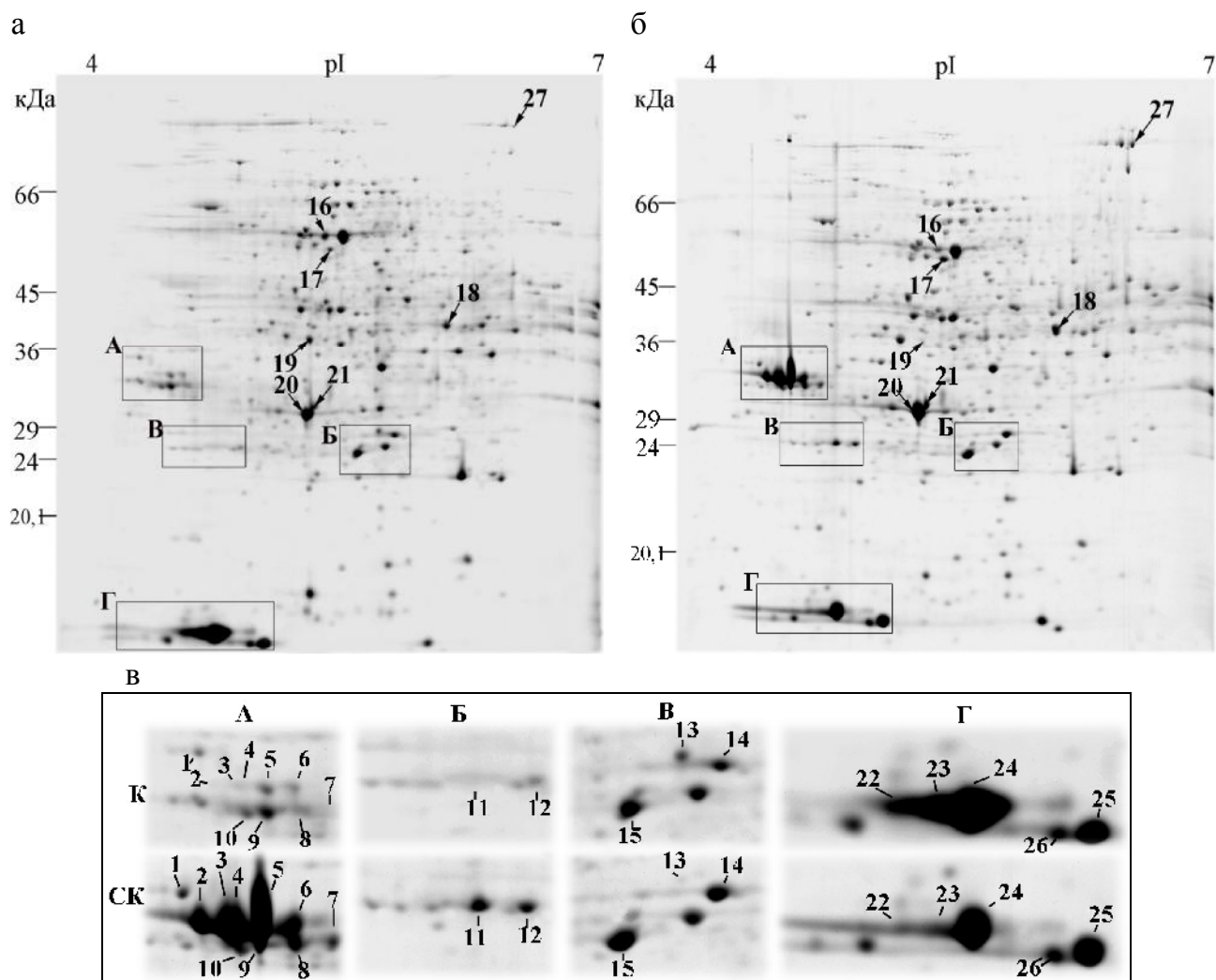


Рис. 5. Электрофореграммы растворимых белков коней гороха. а - контроль; б - СК 50 мкМ (обработка в течение 5 сут); в - фрагменты гелей 2Д-электрофореза.

**Бета-субъединица В трансляционного фактора I элонгации** принимает участие в функционировании рибосом, вместе с факторами инициации и терминации трансляции осуществляя синтез белков на матричных РНК. Повышение его содержания, возможно, отражает тенденцию к усилению синтеза СК-индуцируемых белков. **NBS-LRR белки** содержат нуклеотидсвязывающий домен (NBS) и обогащенные лейцином повторяющиеся домены (LRR). Их относят к числу адапторных комплексообразующих белков, принимающих участие в функционировании сигнальных систем, например, в узнавании рецепторами экскретируемых патогенами эффекторных белков (DeYoung et al., 2006). **Малатдегидрогеназа** цитоплазматическая - участвует в малат/аспаратном челночном переносе атомов водорода через мембраны (Minárik et al., 2002).

Таблица 2. Идентифицированные СК - индуцируемые белки корней гороха.

№ пятна <sup>1</sup>	№ белка в NCBI <sup>2</sup>	Идентифицированные белки <sup>3</sup>	Экспер. ММ/рI <sup>4</sup>	Теорет. ММ/рI <sup>5</sup>	Score <sup>6</sup>	Кратность различия <sup>7</sup>
1	gi 38232568	Бета-субъединица В трансляционного фактора I элонгации ( <i>Pisum sativum</i> )	38/4.50	25.3/4.41	241	+3
9	gi 38232568	Бета-субъединица В трансляционного фактора I элонгации ( <i>Pisum sativum</i> )	31.8/4.75	25.3/4.41	164	II
11	gi 37051105	Глутатион-S-трансфераза ( <i>Pisum sativum</i> )	25.2/5.04	26.7/5.0	146	+4,2
13	gi 44917012	10,11-редуктаза 12-оксофитодиеновой кислоты ( <i>Pisum sativum</i> )	27.1/5.62	41.4/5.80	116	II
14	gi 20648	L-аскорбатпероксидаза ( <i>Pisum sativum</i> )	26.5/5.68	27.2/5.52	102	+1,7
18	gi 18202485	Малатдегидрогеназа цитоплазматическая ( <i>Zea mays</i> )	38.1/5.89	35.6/5.77	118	+3,9
21	gi 74128891	Нуклеотидсвязывающий обогащенный лейциновыми повторами белок ( <i>Triticum aestivum</i> )	30.4/5.37	15.2/7.96	67	+2,8
26	gi 20631	АБК-зависимый белок ( <i>Pisum sativum</i> )	16.8/5.15	16.6/5.07	81	+3,2
27	gi 2459611	Липоксигеназа ( <i>Pisum sativum</i> )	97/6.39	97.4/6.08	71	+2,3

Примечания: II - исчезновение белка в опытном варианте, остальные те же, что и для таблицы 1

**АБК-зависимый белок** является представителем семейства PR10 белков, у которых обнаружена рибонуклеазная антивирусная активность (Srivastava et al., 2006). **Липоксигеназы** являются ключевыми ферментами липоксигеназного сигнального каскада, катализирующими реакции оксигенирования полиеновых жирных кислот, в результате чего образуются гидропероксидные производные, а из них - различные биологически активные, в том числе антипатогенные оксипиены (Гречкин, Тарчевский, 1999). **10,11-редуктаза 12-оксофитодиеновой кислоты** является ферментом липоксигеназного каскада, катализирующим одну из последних реакций в метаболической цепи синтеза жасмоновой кислоты (ЖК). Исчезновение фермента может объяснить обнаруженное ранее (Pena-Cortés et al., 1993) подавление экзогенным салицилатом образования ЖК, участвующей в активации защитных ответов при механическом повреждении (раневой стресс) тканей растений и атаке некротрофных патогенов (Schneider et al., 2005; Wasternak, 2007). СК-индуцируемое подавление образования 10,11-редуктазы 12-оксофитодиеновой кислоты должно привести не только к торможению синтеза ЖК-индуцируемых белков, но и к накоплению предшественника ЖК – оксофитодиеновой кислоты (ОФДК), являющейся важнейшим фактором локального иммунитета растений. **Аскорбатпероксидаза** является одним из ключевых ферментов аскорбат-глутатионового цикла, нейтрализующего образующуюся при «окислительном взрыве» перекись водорода (Mittler, 2002). **Глутатион-S-трансферазы** участвуют в

детоксикации продуктов, появляющихся при инфицировании растений и действии элиситоров (Coleman et al., 1997; Dixon et al., 1998).

**2.4. Определение признаков ПКС.** Через сутки после начала воздействия СК (100 мкМ) у корней на расстоянии примерно 4-5 мм от их апекса формировалась перетяжка (рис. 6). Для визуализации погибшей зоны корня использовали краситель - Эванс голубой. Было обнаружено, что зона корня ниже перетяжки мертва, а выше остается живой. Присутствие перетяжки косвенно указывает на то, что участки корня, находящиеся по ее разные стороны находятся в разных функциональных состояниях.

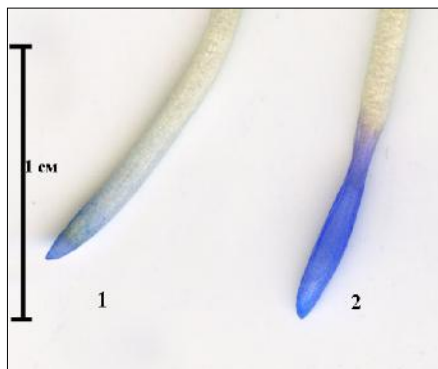


Рис. 6. Окрашивание Эванс голубым апексов корней гороха. 1 - контроль, 2 - СК (100 мкМ).

В то же время используемая концентрация салицилата (100 мкМ) не являлась токсичной для всего растения, оно оставалось живым и продолжало рост в течение всего эксперимента, но, как отмечалось выше, наблюдалась задержка роста по сравнению с контрольным вариантом, а эффект ПКС проявлялся только в апикальной части корня.

Ультраструктурные исследования, проведенные ранее сотрудниками нашего института (Абдрахимов, Яковлева, 2007) показали, что в погибающих клетках апекса корня происходила деградация клеточного содержимого, накопление в вакуолях осмиофильных гомогенных округлых включений. СК индуцировала конденсацию митохондрий, в ядрах происходила конденсация хроматина (рис. 7 В).

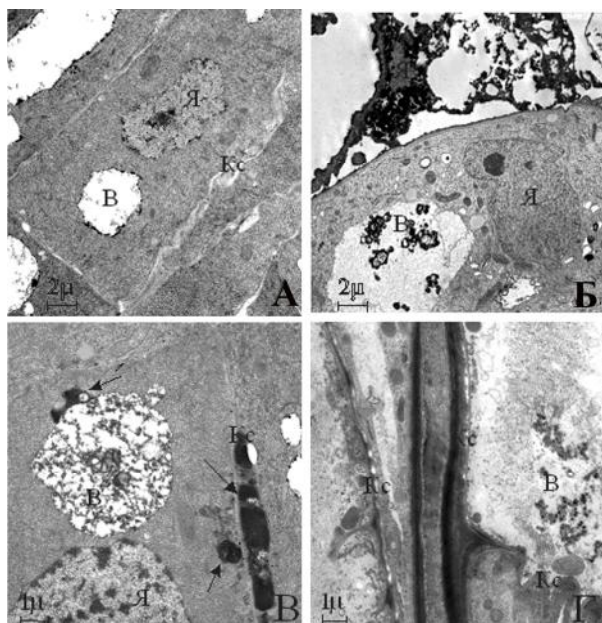


Рис. 7. Ультраструктура клеток корней гороха контрольного (А) и обработанного СК (100 мкМ) (Б - Г) вариантов. Я – ядро, Кс – клеточная стенка, В – вакуоль; стрелками указаны включения, накапливающиеся в цитоплазме и между клеточными стенками (из Абдрахимов, Яковлева, 2007 с изменениями).

Мы предположили, что морфологические изменения, происходящие в апексе корней гороха, являются результатом программируемой клеточной смерти по типу апоптоза.

**Выявление фрагментации ДНК.** Одним из доказательств гибели клеток по типу апоптоза служит появление фрагментации ядерной ДНК. В погибающих клетках ДНК расщепляется эндонуклеазами, в результате чего образуются нуклеосомные единицы размером преимущественно 180 нуклеотидных пар. На электрофоретических гелях продукты нуклеосомной деградации ДНК напоминают лестницу.

Нами было проведено электрофоретическое разделение ДНК, выделенной из корней проростков гороха, обработанных СК (100 мкМ) в течение 6, 12 и 24 ч. Было обнаружено, что фрагментация ДНК и появление характерной для этого процесса картины (фрагментация ДНК в виде лестницы) начинается уже через 6 ч воздействия

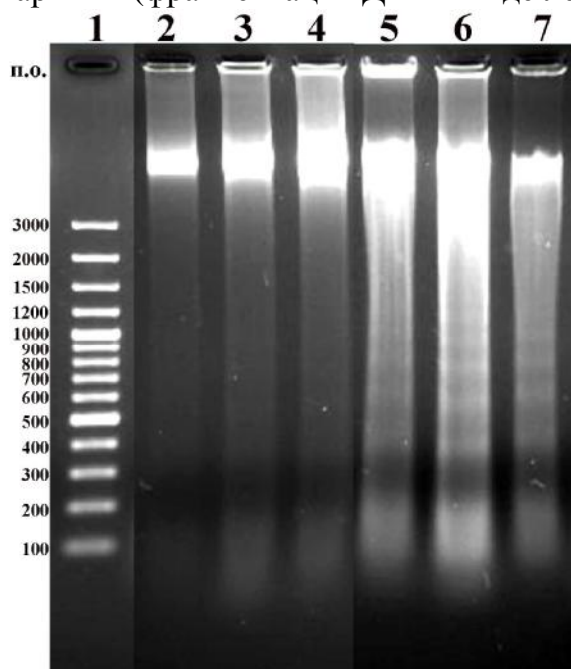


Рис. 8. Электрофоретическое разделение ДНК.

1 - маркеры; 2 - контроль 6 ч; 3 - контроль 12 ч; 4 - контроль 24 ч; 5 - СК 100 мкМ 6 ч; 6 - СК 100 мкМ 12 ч; 7 - СК 100 мкМ 24 ч.

СК (рис. 8). Из данных литературы (Perae, MacCabe, 2008) известно, что нуклеосомная деградация ДНК происходит на первых этапах гибели клеток по типу апоптоза. Этим и объясняется тот факт, что морфологические изменения апекса корня появляются лишь через 1- 2 сут воздействия СК на растения.

**Влияние СК на содержание NO в корнях гороха.** Показано (Delledonne et al., 1998), что при развитии реакции сверхчувствительности, при которой происходит ПКС, накапливается NO; причем предполагается, что NO может вступать в реакцию с перекисью водорода, образуя более токсичный продукт – пероксинитрит, способный вызывать апоптоз клеток (Pedroso et al., 2000; Hong et al., 2007). По всей вероятности, синергизм действия NO и АФК способствует развитию реакции сверхчувствительности.

Мы проанализировали, происходит ли накопление NO в апексах корней гороха при действии СК в концентрации 100 мкМ. Содержание NO оценивали по степени связывания специфического флуоресцентного красителя DAF-FM DA с NO. Он

хорошо проникает в растительные клетки, что для других красителей этого класса осложняется наличием клеточной стенки. Обработка СК приводила к значительному усилению флюоресценции, что свидетельствует о накоплении NO в апексе корня (данные приведены в диссертации).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в апексах корней гороха при действии СК (100 мкМ) происходит ПКС, вероятно, по типу апоптоза.

**2.5. Влияние СК (100 мкМ) на протеом корней гороха.** Для проведения протеомных исследований при действии СК (100 мкМ) растения фиксировали через 2 сут воздействия в связи с тем, что уже при этой продолжительности действия СК происходили морфологические изменения апекса корня. Анализ количества и окраски белковых пятен на 2Д-электрофореграммах показал, что СК в концентрации 100 мкМ вызывает значительное изменение содержания 43 индивидуальных растворимых

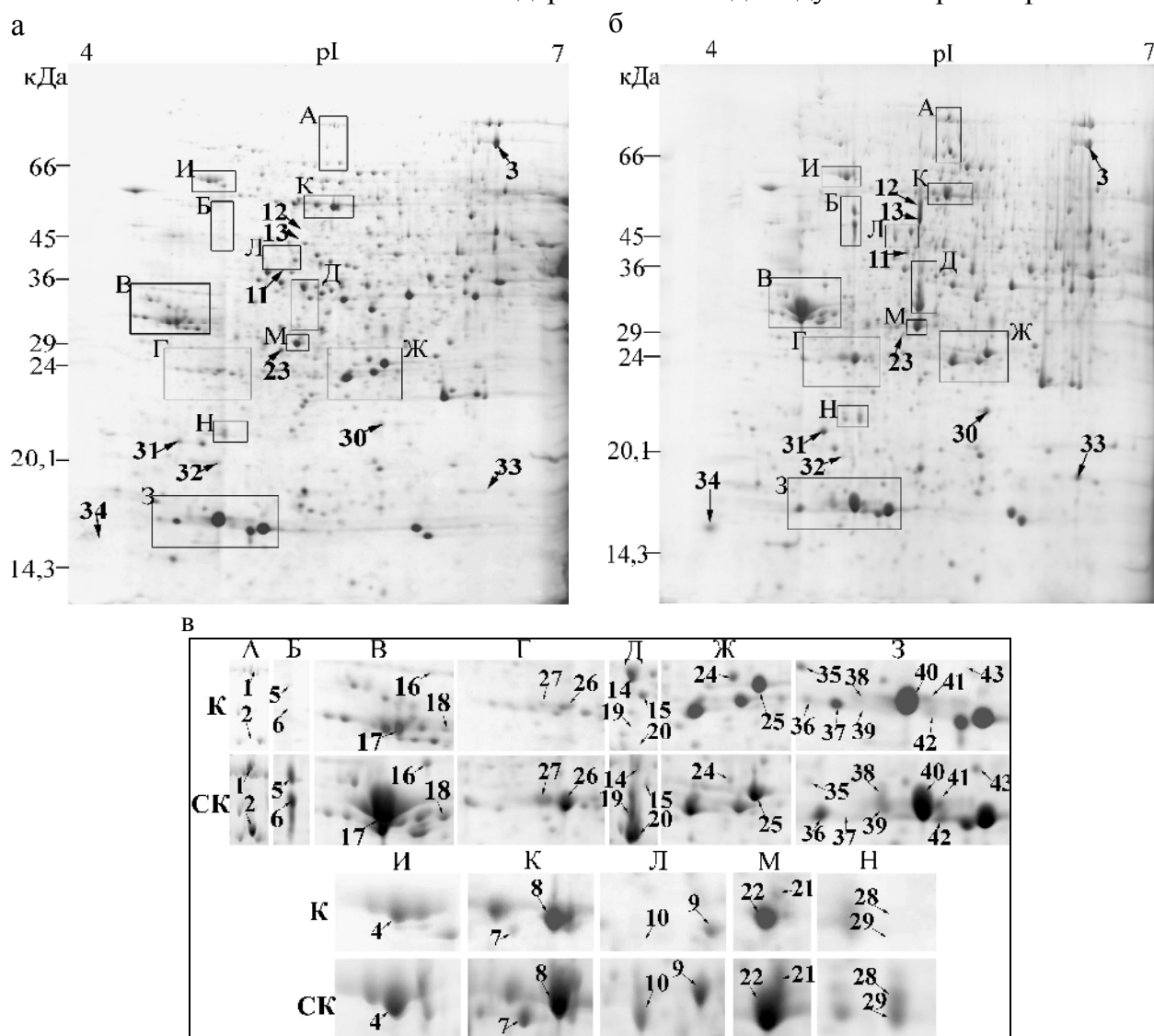


Рис. 9. 2Д-электрофореграммы растворимых белков корней гороха: а - контроль, б - СК (100 мкМ) (обработка в течение 2 сут), в - фрагменты 2Д - электрофореграмм.



белков (рис. 9). Как и в случае обработки растений СК меньшей концентрации (50 мкМ), было обнаружено повышение содержания АБК-зависимого белка (пятно 40), изоформ глутатион-S-трансферазы (пятна 26 и 27), нуклеотидсвязывающего белка обогащенного лейциновыми повторами (пятно 21), и существенное снижение содержания 10,11-редуктазы 12- ОФДК (пятно 24) (рис. 9).

Впервые обнаружено СК-индуцируемое повышение содержания 5-метилтетрагидроптероилтриглутаматгомоцистеин-S-метилтрансферазы (пятно 3), енолазы (пятно 8), ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) (пятно 16), белка 14-3-3 (пятно 18), предшественника шаперонина альфа-срп 60 (пятно 4), полиубиквитинподобного белка (пятно 7) и полиубиквитина (пятно 9) (рис.9, табл. 3).

Таблица 3. Идентификация растворимых белков корней гороха, индуцируемых СК (100 мкМ).

№ пятна <sup>1</sup>	№ белка в NCBI <sup>2</sup>	Идентифицированные белки <sup>3</sup>	Экспер. ММ/pI <sup>4</sup>	Теорет. ММ/pI <sup>5</sup>	Score <sup>6</sup>	Кратность различия <sup>7</sup>
3	gi 92876874	5 метилтетрагидроптероил триглутаматгомоцистеин-S-метилтрансфераза ( <i>Medicago truncatula</i> )	84.0/6.5	84.2/5.97	99	+1,9
4	gi 1185390	Предшественник шаперонина альфа-срп60 ( <i>Pisum sativum</i> )	59.5/4.97	61.9/5.15	56	+13,7
5	gi 436313	Белок, ответственный за устойчивость к болезни ( <i>Pisum sativum</i> )	55.9/5.01	16.7/4.94	111	П
7	gi 81073957	Полиубиквитинподобный белок ( <i>Solanum tuberosum</i> )	55.0/5.55	8.8/5.73	100	+18
8	gi 42521309	Енолаза ( <i>Glycine max</i> )	55.0/5.6	47.7/5.31	134	+10.8
9	gi 899115	Полиубиквитин ( <i>Solanum tuberosum</i> )	46.0/5.4	11.0/5.78	93	+42
16	gi 3821259	Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	35.6/4.8	29.4/4.69	196	+35
18	gi 695767	белок 14-3-3 ( <i>Vicia faba</i> )	32.0/4.87	29.5/4.82	179	+21
21	gi 74128891	NBS-LRR type RGA ( <i>Triticum aestivum</i> )	30.4/5.37	15.2/7.96	67	+19
24	gi 44917012	10,11-редуктаза 12-оксофитодиеновой кислоты ( <i>Pisum sativum</i> )	27.1/5.62	41.4/5.80	116	-2
25	gi 20648	L-аскорбатпероксидаза ( <i>Pisum sativum</i> )	26.5/5.68	27.2/5.52	102	+3,7
26, 27	gi 37051105	Глутатион -S-трансфераза ( <i>Pisum sativum</i> )	24.0/5.02	26.7/5.0	146	+30 +32
40	gi 20631	АБК-зависимый белок ( <i>Pisum sativum</i> )	16.9/5.01	16.6/5.07	97	+3,4

Примечания те же, что и для таблицы 1

### **5-метилтетрагидроптероилтриглутаматгомоцистеин-S-метилтрансфераза**

катализирует важную для аминокислотного метаболизма реакцию переноса метильной группы на серу гомоцистеина с образованием метионина. **Енолаза** принимает участие в гликолизе, и повышение ее содержания может в определенной степени объяснять вызванное СК усиление дыхания корней растений (Гордон и др, 2002). Это необходимо в связи со значительным потреблением АТФ при репрограммировании экспрессии генов и синтеза белков, а также реорганизации метаболизма и структур клеток. **Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA)** принимает участие в репликации ДНК и во всех видах репарации поврежденной ДНК (Raynaud et al., 2006). Этот белок образует подобие кольца вокруг молекулы ДНК, на котором закрепляется сложный полимерный гетеробелковый комплекс. **Белок 14-3-3** интересен тем, что он принимает участие в регуляции активности многих белков. Например, в активации белковых факторов регуляции транскрипции, ряда ферментов сигнальных систем клеток, а также в деградации белков вместе с убиквитином (Huber et al., 2002) и в апоптозе. **Шаперонин альфа-срп60** – в комплексе с шаперонином 10 принимает участие в АТР-зависимом рефолдинге (восстановление нарушенной конформации) белков - важной защитной функции клеток (Macario et al., 2001), так как при начинающемся апоптозе может нарушаться нативная структура многих белков. **Полиубиквитин и полиубиквитинподобный белок** участвуют в протеолизе белков-мишеней в составе 26S протеосомного комплекса (Dong et al., 2006). Особую роль убиквитинирование белков может играть при начинающемся апоптозе, «распознавая» белки с нарушенной структурой, становящиеся мишенями для убиквитина. В связи с этим, следует заметить, что СК - индуцируемое снижение содержания или исчезновение белков может объясняться не только ингибированием синтеза, но и усилением их деградации, в том числе с помощью убиквитинирования.

Для лучшего разделения белков в области В, для которой характерно одно из самых существенных СК - индуцируемых изменений, мы провели их дополнительное электрофоретическое разделение с использованием стрипов с иммобилизованным узким градиентом рН (3.9 до 5.1), используя различное время воздействия СК на корни. Это позволило установить, что через 2 сут воздействия СК значительно повышалось содержание белка 17 (34 кДа, рI 4.5) (рис. 10). На 5 сут повышалось содержание и другого белка, который обозначен нами как 17а (34 кДа, рI 4.75). Масс-спектры белков 17 и 17а оказались практически одинаковыми, что свидетельствует о том что, возможно, эти белки являются изомерами одного и того же белка.

На рис. 11 приведен масс-спектр белка 17 и установленные аминокислотные последовательности фрагментов. Поиск белка 17 проводили по MS и MS/MS результатам с использованием базы данных NCBI. Оказалось, что в базах данных отсутствует белок с подобной структурой. По всей вероятности, белок 17 является

неизвестным ранее салицилат-индуцируемым белком, роль которого в ответе растений на действие СК должна быть достаточно большой, судя по относительно быстрому и сильному изменению его содержания.

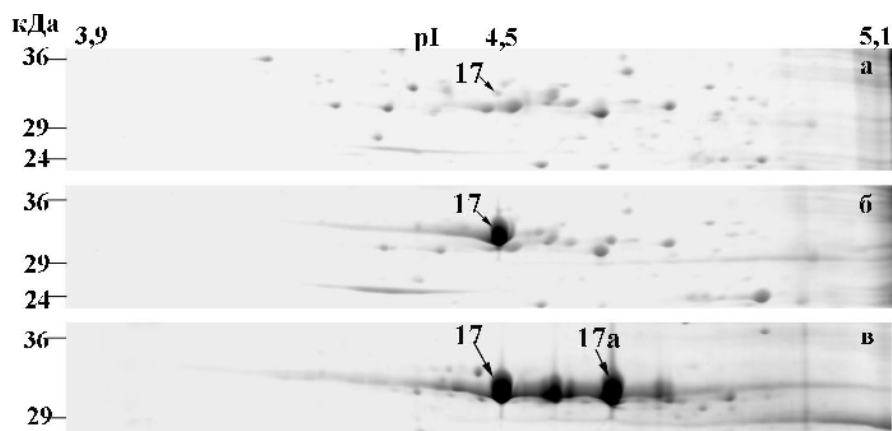


Рис. 10. Фрагменты 2Д-электрофореграмм растворимых белков корней гороха, разделенных в узком диапазоне рН (3.9-5.1). а - контроль, б - обработка СК (100 мкМ) в течение 2 сут, в - обработка СК (100 мкМ) в течение 5 сут.

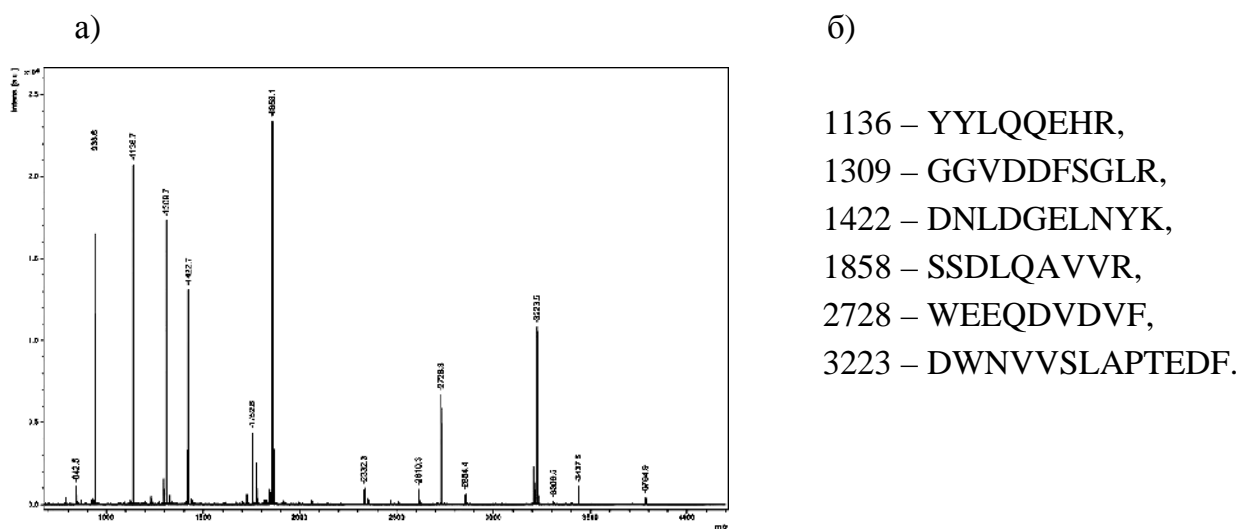


Рис. 11. а - MALDI масс-спектр белка 17, б - аминокислотные последовательности фрагментов белка 17.

Обращают на себя внимание принципиальные различия в индукции белков СК между корнями и листьями. Это объясняется как отсутствием в корнях хлоропластов и белков, обслуживающих процесс фотосинтеза, так и отличиями в наборе конститутивных и индуктивных антипатогенных белков корней и надземных органов.

**2.6. Возможные причины и последствия СК-индуцируемого исчезновения 10,11-редуктазы 12-ОФДК.** Исчезновение при действии СК (50 мкМ) 10,11-

редуктазы 12-ОФДК может привести к значительным изменениям в направленности сигнальных потоков липоксигеназного каскада (рис. 12). Наряду с известными ранее и обнаруженными нами фактами СК-активации и СК-повышения содержания ферментов ранних стадий липоксигеназного сигнального каскада (липиддесатуразы, фосфолипазы А2, липоксигеназы), ингибирование образования 10,11-редуктазы 12-ОФДК, а следовательно, синтеза жасмонатов, должно, во-первых, вызвать накопление их предшественницы – ОФДК, являющейся сильнейшим фактором локального иммунитета и, во-вторых, привести к перераспределению потоков сигнальных метаболитов в сторону усиления синтеза нециклических летучих и нелетучих оксипинов, многие из которых обладают свойствами антибиотиков и гормонов. К первым относятся продукты гидропероксидлиазных реакций (летучие соединения семейств гексеналей и ноненалей), пероксигеназных реакций (эпоксидные и гидроксипроизводные гидроперекисей полиеновых жирных кислот), алленоксидсинтазных реакций (кетолы – продукты превращения гидропероксилиноленовой кислоты), продукты реакций синтеза дивиниловых эфиров. Ко вторым – раневые гормоны - травминовая кислота и травматин, способствующие заживлению раневых поверхностей.

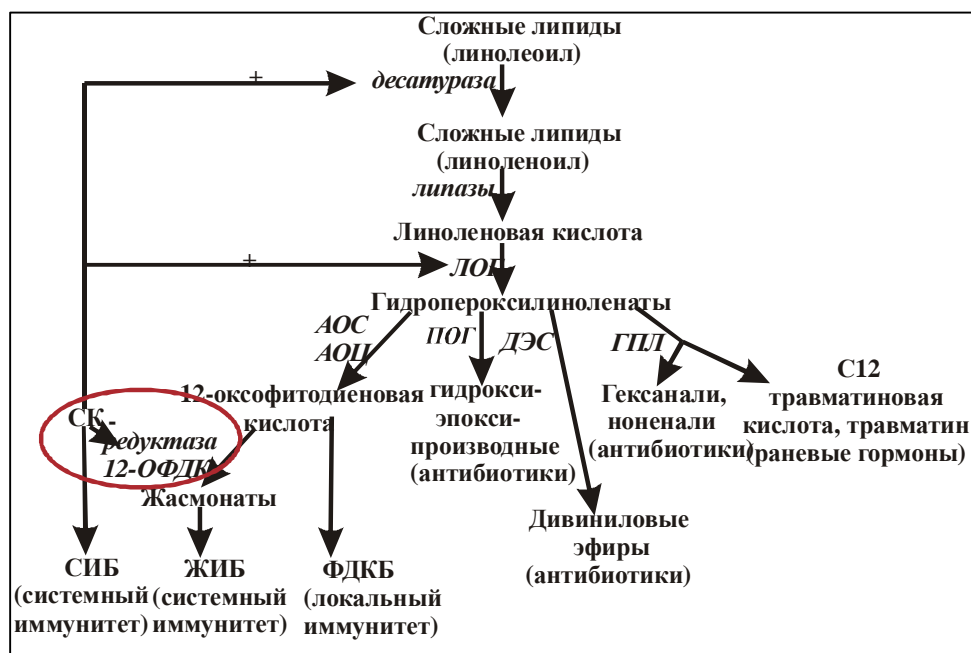


Рис. 12. Упрощенная схема липоксигеназного сигнального каскада и участия СК в синтезе ЖК. АОС - алленоксидсинтаза; АОЦ - алленоксидциклаза; ПОГ - пероксидгидролаза; ДЭС - дивинилэстераза; ГПЛ - гидропероксидлиаза; СИБ – салицилат-индуцируемые белки; ЖИБ – жасмонат-индуцируемые белки; ФДКБ - белки, индуцируемые 12-оксофитодиеновой кислотой.

Можно сделать вывод, что ингибирование образования 10,11-редуктазы 12-ОФДК салициловой кислотой не только затрудняет образование одного из ключевых факторов системного иммунитета – жасмоновой кислоты (это становится

нецелесообразным в случае высокого содержания СК- другого ключевого фактора системного иммунитета), но и усиливает локальный иммунитет за счет накопления ОФДК и антипатогенную направленность липоксигеназного метаболизма.

Было обнаружено несколько изоформ 10,11-редуктазы 12-ОФДК; причем большая часть из них не способна катализировать реакцию восстановления ОФДК (Ishiga, 2002). По неопубликованным данным А.Н. Гречкина с сотрудниками, эти изоформы редуктазы способны восстанавливать другие оксипиноны -  $\alpha$ -,  $\beta$ - ненасыщенные альдегиды- производные полиеновых жирных кислот.

Использованные нами методы исследования не позволяют распознать, какую именно реакцию катализирует выявленная нами 10,11-редуктаза 12-ОФДК, но в любом случае ее исчезновение или снижение содержания должно привести к драматическим последствиям в осуществлении липоксигеназного сигнального каскада, в соотношении различных оксипинов.

**2.7. Возможная роль СК – индуцируемого образования комплексообразующих белков.** Одним из важнейших впервые установленных нами фактов является вызываемое СК в концентрации 100 мкМ усиление синтеза совокупности комплексообразующих белков, участвующих в репарации нарушенных структур ДНК (ядерный антиген пролиферирующих клеток), рефолдинге белков (шаперонин 60) и в деградации белков (полиубиквитин и полиубиквитинподобный белок), а также в функционировании сигнальных систем клеток (белок 14-3-3) (рис. 13).

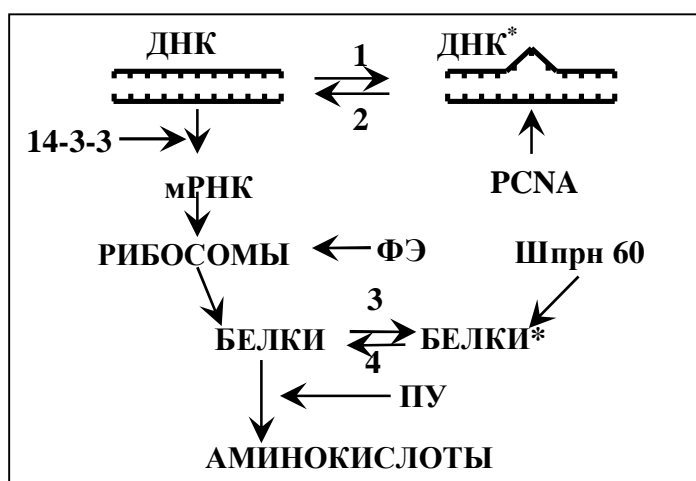


Рис. 13. Схема участия комплексообразующих белков в репарации ДНК (PCNA- ядерный антиген пролиферирующих клеток); в рефолдинге белков (Шпрн 60- шаперонин 60); в деградации белков (ПУ - полиубиквитин); в сигналинге (белок 14-3-3). ФЭТ – фактор элонгации трансляции; ДНК\* - поврежденная ДНК; белки\* - деформированные белки; 1 – нарушение структуры ДНК; 2 – репарация ДНК\*; 3 – нарушение конформации белков; 4 – рефолдинг белков\*.

Это позволяет считать, что вызванная салицилом ПКС клеток корней сопровождается особым типом неизвестного ранее изменения протеома.

В литературе очень мало информации о том, как изменяются протеомы растений при ПКС (Zwidzinsky et al., 2004), поэтому мы не можем в настоящее время судить о том, является ли этот тип изменения неспецифическим, независимым от причины, вызвавшей ПКС, или характерным только для «салицилат – индуцированной ПКС». Для решения этой интереснейшей задачи требуется проведение дополнительных исследований, но уже сейчас можно сделать вывод, что образование белковых структур комплексообразующими белками при «салицилат-индуцированной ПКС», вызванной атакой патогенов или воздействием абиогенных стрессоров, является одной из характерных черт изменений протеомов.

Содержание и активность этих комплексообразующих белков определяют скорость и направленность важнейших метаболических процессов, от которых зависит судьба клеток при ПКС – их гибель или «выздоровление».

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши исследования показали, что СК вызывает изменения протеомов листьев и корней, проявляющиеся, главным образом, в увеличении содержания защитных белков прямого антипатогенного действия и белков, повышающих устойчивость самих клеток растений. К первым в листьях относятся хитиназы,  $\beta$ -1,3-глюканызы, глюкозидгидролаза сем.18; ко вторым - АБК-зависимый белок, белок устойчивости к болезням, глутатион-S-трансферазы, аскорбатпероксидаза.

Кроме того, обращает на себя внимание повышение содержания некоторых ферментов (енолаза, малатдегидрогеназа), принимающих участие в энергетических процессах, например, в дыхании, которое, как известно, усиливается при действии патогенов, элиситоров и СК.

Были обнаружены принципиальные различия в ответе протеомов листьев и корней растений гороха на действие СК, что может свидетельствовать и о различиях в механизмах защиты клеток этих органов от патогенов. Из всех идентифицированных СК-индуцируемых белков лишь один белок был характерен и для листьев и для корней (белок устойчивости к болезням).

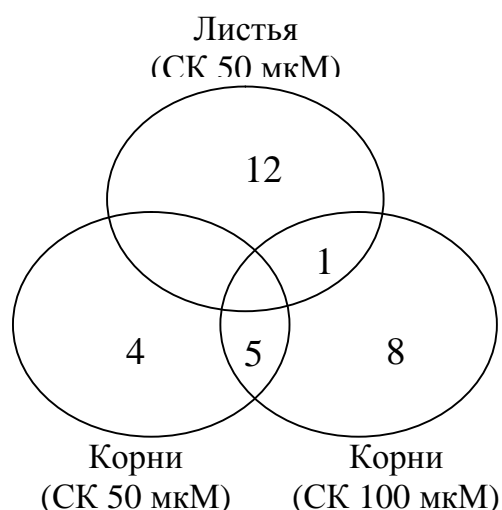


Рис. 14. Общие и специфические СК-индуцируемые белки в листьях и корнях.

Среди идентифицированных белков корней, подвергнутых действию СК в низкой (50 мкМ) и высокой (100 мкМ) концентрациях, было обнаружено пять общих белков (рис. 14). Естественно, что эти числовые значения будут гораздо больше, если иметь в виду совокупность всех белков, а не только идентифицированных.

На наш взгляд, к числу наиболее важных СК-индуцируемых изменений в протеомах, имеющих особенно важное значение для сигнального метаболизма клеток корней гороха, являются снижение содержания и даже исчезновение 10,11-редуктазы 12-оксофитодиеновой кислоты, а также повышение содержания комплексообразующих белков при действии на корни СК в «апоптозной» (100 мкМ) концентрации.

## ВЫВОДЫ

1. Выявлено в среднем 600 белков в листьях и 900 белков в корнях проростков гороха при разделении растворимых белков с помощью двумерного электрофореза. Салициловая кислота (50 мкМ) индуцировала изменение содержания 32 белков в листьях и 27 белков в корнях, а при концентрации 100 мкМ – 43 белков в корнях.
2. Идентифицировано 13 салицилат-индуцируемых белков в листьях, и 23 белка в корнях, из которых 9 белков индуцировалось при действии низкой (50 мкМ) и 14 при действии высокой (100 мкМ) концентраций СК. Среди этих белков были обнаружены как защитные белки прямого антипатогенного действия (хитиназы, бета-1,3-глюканы, гликозидгидролаза семейства 18), так и белки, повышающие устойчивость к патогенам клеток растения (аскорбатпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, белок 33 кДа фотосистемы II и др.).
3. Впервые в качестве салицилат-индуцируемых были идентифицированы 15 белков листьев и корней гороха. Эти белки принимают участие в защитных (гликозидгидролаза семейства 18), сигнальных (нуклеотидсвязывающий обогащенный лейциновыми повторами белок, белок 14-3-3, 10,11-редуктаза 12-оксофитодиеновой кислоты), энергетических (альфа-амилаза, малатдегидрогеназа цитоплазматическая) и других физиолого-биохимических процессах.
4. Впервые обнаружено салицилат-индуцируемое исчезновение 10,11-редуктазы 12-оксофитодиеновой кислоты – фермента синтеза жасмоновой кислоты.
5. Показано, что салициловая кислота в концентрации 100 мкМ вызывает программируемую клеточную смерть клеток апексов корней проростков гороха.
6. Впервые показано, что салициловая кислота в «апоптозной» концентрации вызывает усиление синтеза комплексообразующих белков, участвующих в репарации нарушенных структур ДНК (ядерный антиген пролиферирующих клеток), рефолдинге (шаперонин *cpr* 60) и деградации (полиубиквитин) белков, а также в функционировании белковых медиаторов сигнальных систем клеток (белок 14-3-3).

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Яковлева, В.Г. Салицилат-индуцированное изменение набора и содержания белков в корнях гороха / В.Г. Яковлева, И.А. Тарчевский, **А.М. Егорова** // Докл. РАН. – 2007. – Т. 415, № 6. – С.832-836.
2. **Егорова, А.М.** Механизм подавления салициловой кислотой синтеза жасмоната у растений / А.М. Егорова, В.Г. Яковлева, И.А. Тарчевский // Сб. мат-в / Объед. научно-тех. изд-во ПНЦ РАН. – Пущино, 2007. – С. 255-258.
3. Яковлева, В.Г. Салицилат- и жасмонат- индуцированное репрограммирование синтеза белков в корнях гороха / В.Г. Яковлева, И.А. Тарчевский, **А.М. Егорова** // Сб. мат-в / РИО НЦРВХ СО РАМН. – Иркутск, 2007. – С. 338-342.
4. Tarchevsky, I.A. The mechanism of inhibition effect of salicylic acid on jasmonates synthesis / I.A. Tarchevsky, V.G. Yakovleva, **А.М. Egorova** // Abstracts / НТУУ КПІ ВПІ ВПК Політехніка. – Kiev, 2007. – P. 63.
5. Яковлева, В.Г. Сравнительный анализ салицилат-индуцированного изменения набора и содержания белков в листьях и корнях гороха / В.Г. Яковлева, И.А. Тарчевский, **А.М. Егорова** // Тезисы докл. / Коми НЦ УрО РАН. – Сыктывкар, 2007. –С. 402-403.
6. **Егорова, А.М.** Салицилат-индуцированные изменения в протеоме корней гороха. Исчезновение 10,11-редуктазы 12-оксофитодиеновой кислоты как причина подавления синтеза стрессового фитогормона - жасмоновой кислоты / А.М. Егорова, В.Г. Яковлева, И.А. Тарчевский // Тезисы докл. / Изд-во Башкирского института развития образования. – Уфа, 2007. –С. 42-43.
7. Тарчевский И.А. Протеомный анализ изменений в корнях гороха, вызванных апопоз-индуцирующей концентрацией салициловой кислоты / И.А. Тарчевский, В.Г. Яковлева, **А.М. Егорова** // Докл. РАН. – 2008. – Т. 422, № 3. – С. 410-414.
8. Тарчевский, И.А. Молекулярные механизмы подавления салициловой кислотой образования жасмонатов / И.А. Тарчевский, В.Г. Яковлева, **А.М. Егорова** // Тезисы докл. / Изд-во ФизтехПресс. – Казань, 2008. – С. 43.
9. Яковлева, В.Г. Салицилат - индуцированное образование компонентов супрамолекулярных белковых комплексов / В.Г. Яковлева, **А.М. Егорова**, И.А. Тарчевский // Тезисы докл. / Изд-во Уральского университета. – Екатеринбург, 2008. С. 451.
10. Яковлева, В.Г. Влияние салициловой кислоты на протеом корней гороха / В.Г. Яковлева, И.А. Тарчевский, **А.М. Егорова** // Тезисы докл. / Изд-во Арта. Новосибирск, 2008. – С. 196.
11. **Егорова, А.М.** Протеомный анализ салицилат-индуцированных белков листьев гороха / А.М. Егорова, В.Г. Яковлева, И.А. Тарчевский // Тезисы докл. / Изд-во ФизтехПресс. – Казань, 2009. – С. 292
12. Протеомный анализ салицилат-индуцированных белков из корней проростков гороха / В.Г. Яковлева, И.А. Тарчевский, **А.М. Егорова**, Н.Е. Мухаметшина // Сб. мат-ов / РИО НЦРВХ СО РАМН. – Иркутск, 2009. – С. 538-541.