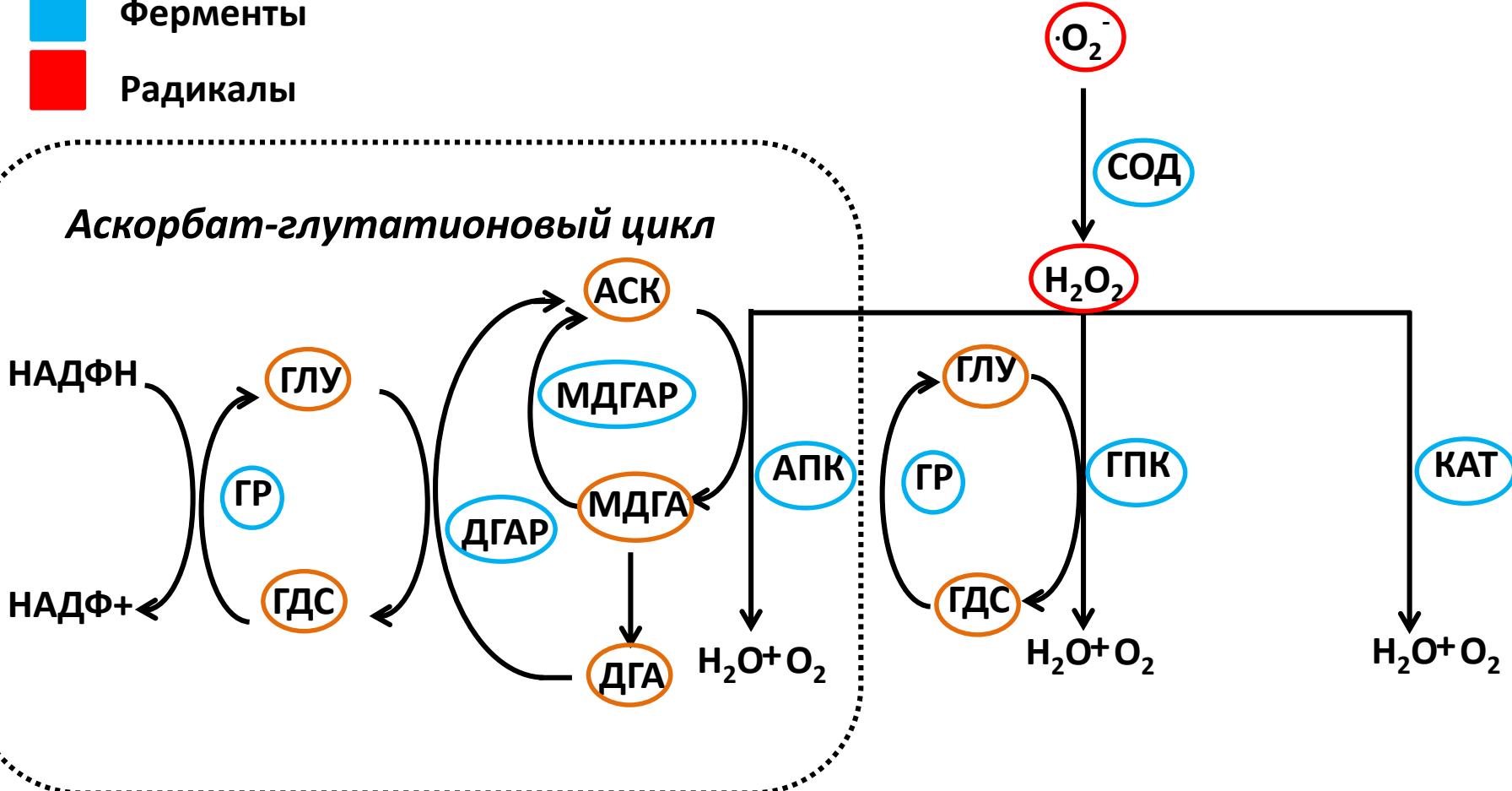


# Изучение структуры и динамики антиоксидантной системы растений методами системной биологии

А.В. Бобровских  
Научный руководитель:  
А.В. Дорошков, к.б.н.

# Биохимия антиоксидантной системы

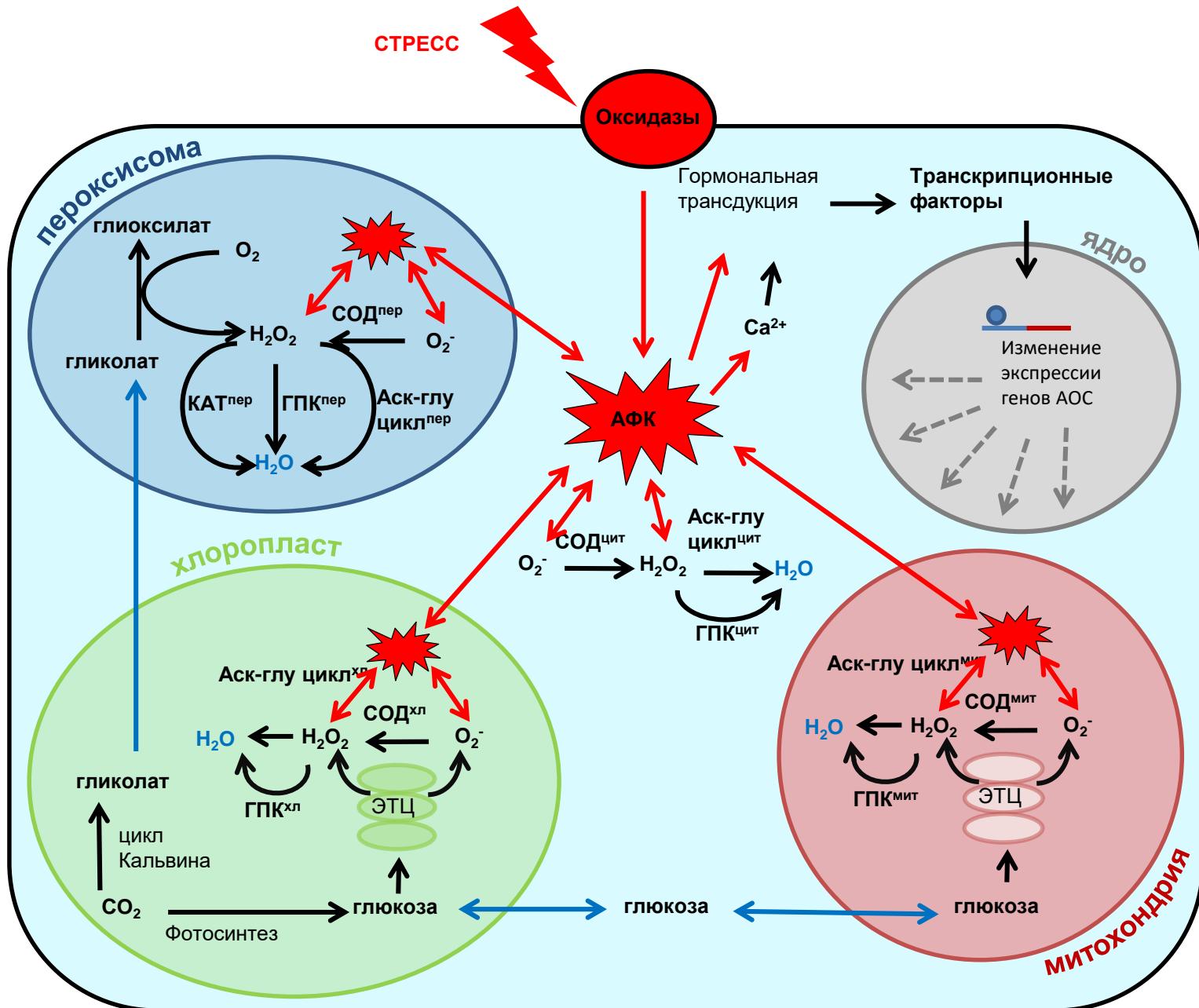
- Антиоксиданты
- Ферменты
- Радикалы



# Генетическая избыточность системы

Сокращенное название	Полное название	Код фермента	Гены арабидопсиса
СОД	супероксиддисмутаза	1.15.1.1	AT1G12520 AT5G23310 AT4G25100 AT5G51100 AT2G28190 AT5G18100 AT1G08830
КАТ	катализ	1.11.1.6, 1.11.1.21	AT4G35090 AT1G20630 AT1G20620
ГПК	глутатионпероксидаза	1.11.1.9	AT2G25080 AT4G31870 AT2G48150 AT3G63080 AT2G31570 AT2G43350 AT4G11600 AT1G63460
АПК	аскорбатпероксидаза	1.11.1.11	AT4G32320 AT4G35000 AT4G35970 AT4G08390 AT1G77490 AT1G07890 AT3G09640
МДГАР	монодегидроаскорбатредуктаза	1.6.5.-	AT3G52880 AT5G03630 AT3G09940 AT3G27820 AT1G63940
ДГАР	дегидроаскорбатредуктаза	1.8.5.1	AT1G19570 AT1G75270 AT5G16710
ГР	глутатионредуктаза	1.8.7.1	AT3G24170 AT3G54660

# Клеточная организация системы

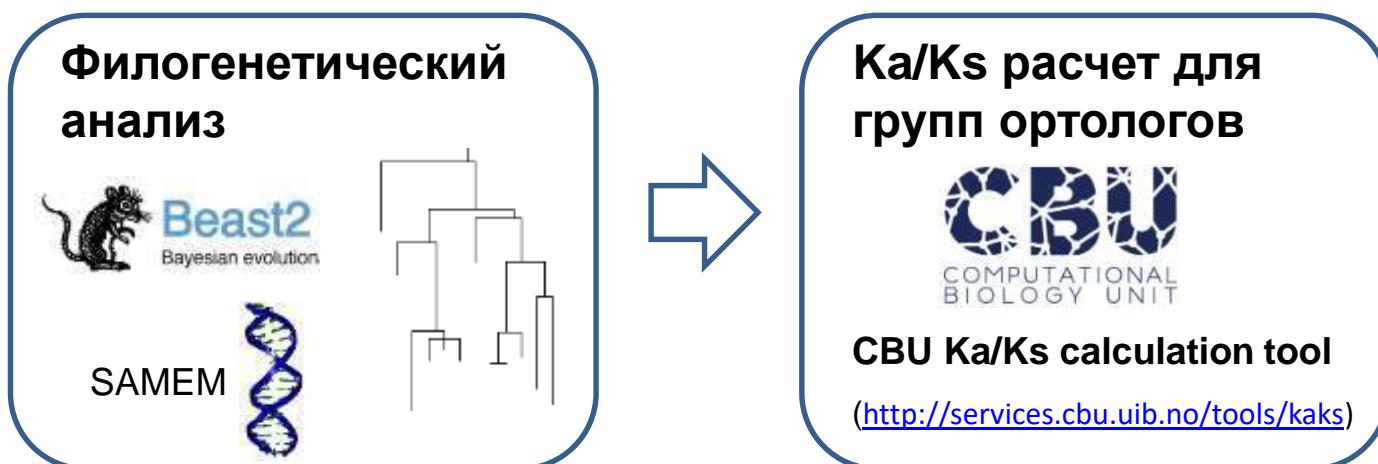


**Цель работы:** изучить особенности структурной организации и регуляции антиоксидантной системы (АОС) растений методами системной биологии

**Цель работы:** изучить особенности структурной организации и регуляции антиоксидантной системы (АОС) растений методами системной биологии

**Задачи:**

1) Изучить особенности молекулярной эволюции генов антиоксидантной защиты растений: идентифицировать ортологические группы генов у цветковых растений и дифференцировать их по характеристикам накопления замен в разных эволюционных линиях



**Цель работы:** изучить особенности структурной организации и регуляции антиоксидантной системы (АОС) растений методами системной биологии

**Задачи:**

2) Сопоставить данные по экспрессии антиоксидантных генов в корне и листе с характеристиками накопления замен

**Анализ относительных уровней экспрессии (GEO NCBI)**

Arabidopsis thaliana, Brassica rapa,  
Glycine max, Medicago truncatula,  
Populus trichocarpa, Solanum lycopersicum,  
Zea mays, Oryza sativa,      Корень / лист  
Hordeum vulgare



(контрольные условия)



**Ka/Ks расчет для групп ортологов**



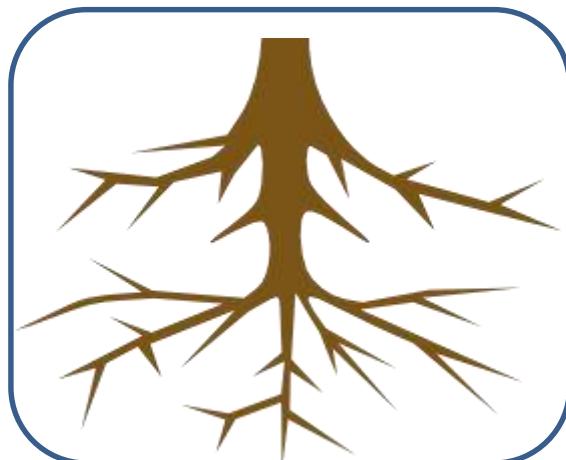
**CBU Ka/Ks calculation tool**

(<http://services.cbu.uib.no/tools/kaks>)

**Цель работы:** изучить особенности структурной организации и регуляции антиоксидантной системы (АОС) растений методами системной биологии

**Задачи:**

3) Протестировать гипотезу о тканеспецифичной регуляции экспрессии антиоксидантных генов



VS



**Цель работы:** изучить особенности структурной организации и регуляции антиоксидантной системы (АОС) растений методами системной биологии

**Задачи:**

- 4) Описать транскрипционную регуляцию антиоксидантных генов в ответ на стресс

### Анализ относительных уровней экспрессии генов АОС в ответ на стресс (GEO NCBI)



Вододефицит и  
холодовой стресс

Кукуруза *Zea mays*

Ячмень *Hordeum vulgare*

Рис *Oryza sativa*

**Цель работы:** изучить особенности структурной организации и регуляции антиоксидантной системы (АОС) растений методами системной биологии

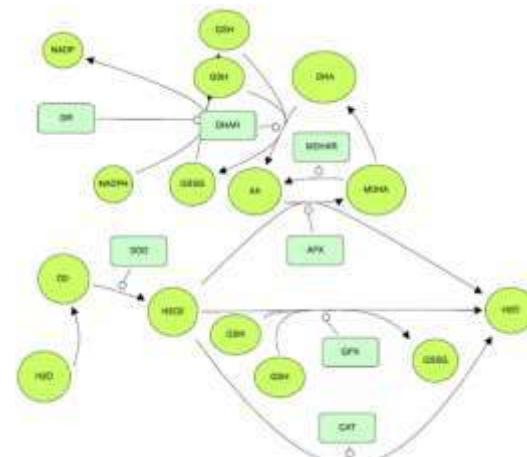
**Задачи:**

5) Разработать модель функционирования АОС, которая описывает динамику компонентов системы

### Построение модели



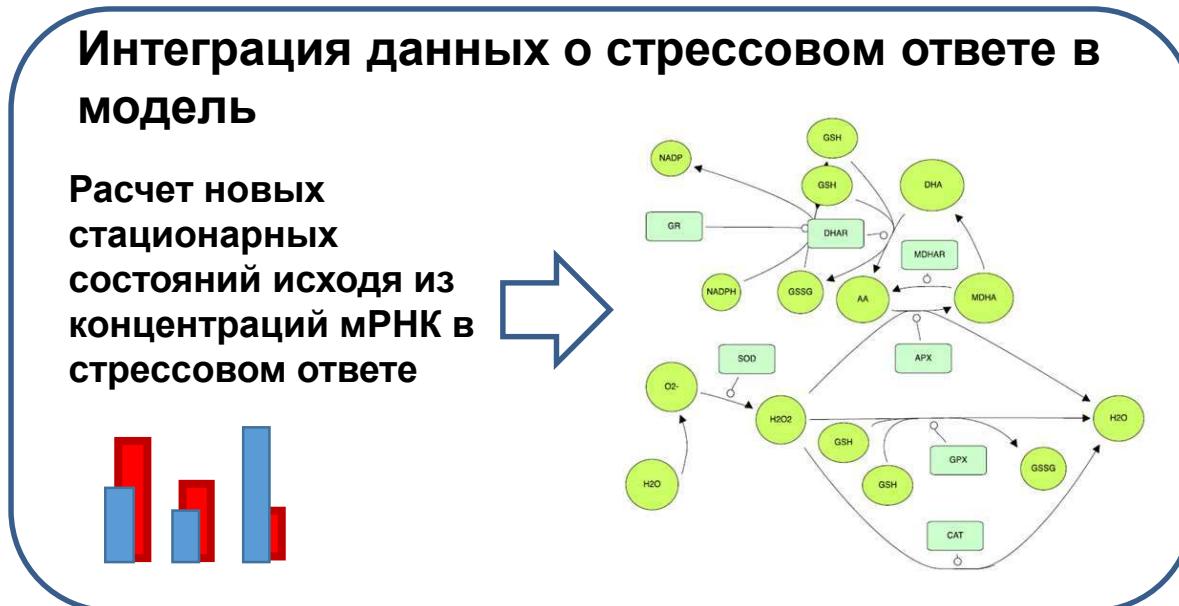
- подбор механизмов и параметров реакций
- интеграция реакций в единую систему ОДУ
- получение стационарного решения



**Цель работы:** изучить особенности структурной организации и регуляции антиоксидантной системы (АОС) растений методами системной биологии

**Задачи:**

- 6) На основе транскрипционных данных оценить изменение концентраций ферментативных компонент системы и провести сравнение стационарных состояний системы в описанной модели с учетом этих данных

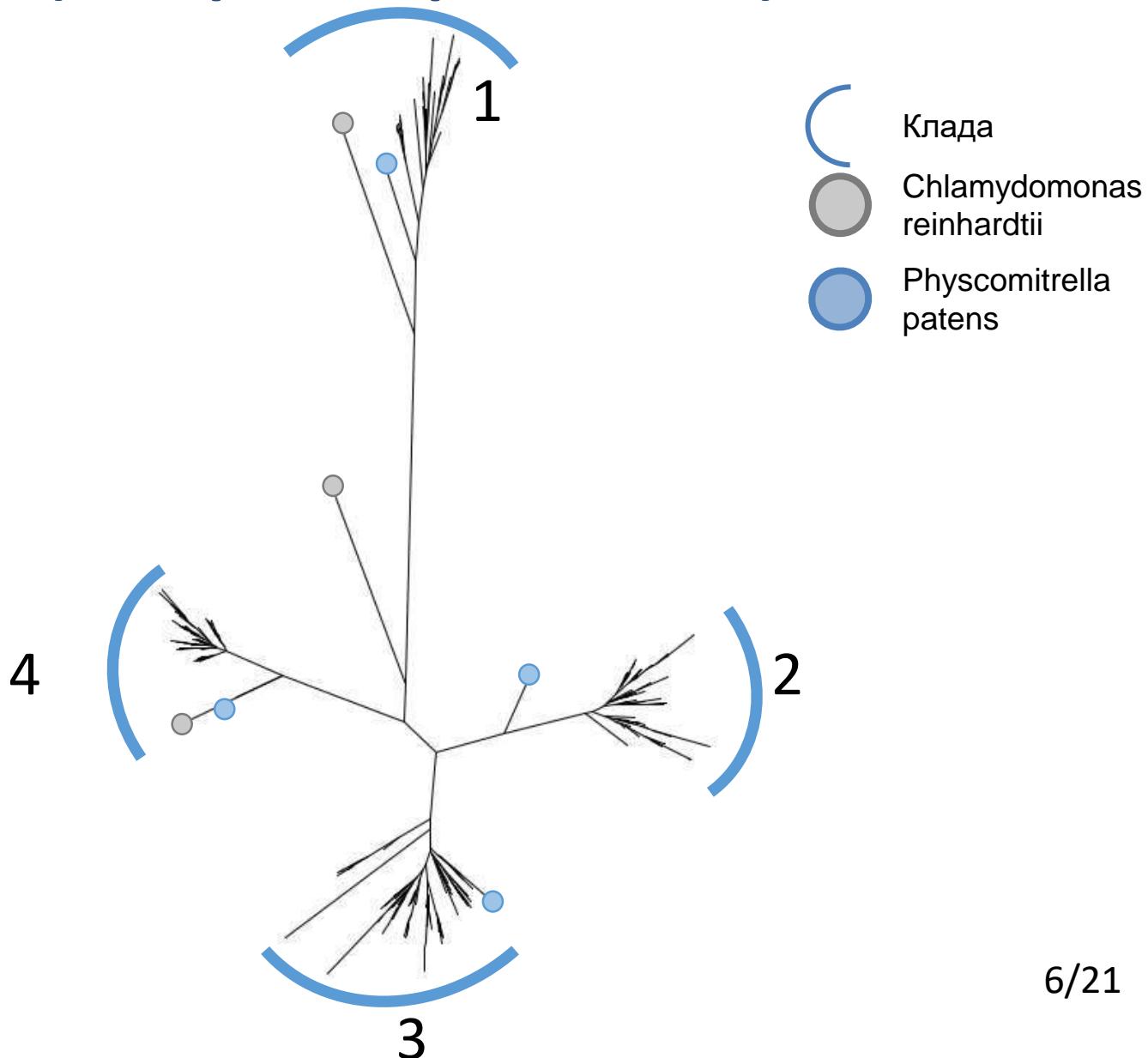


**Цель работы:** изучить особенности структурной организации и регуляции антиоксидантной системы (АОС) растений методами системной биологии

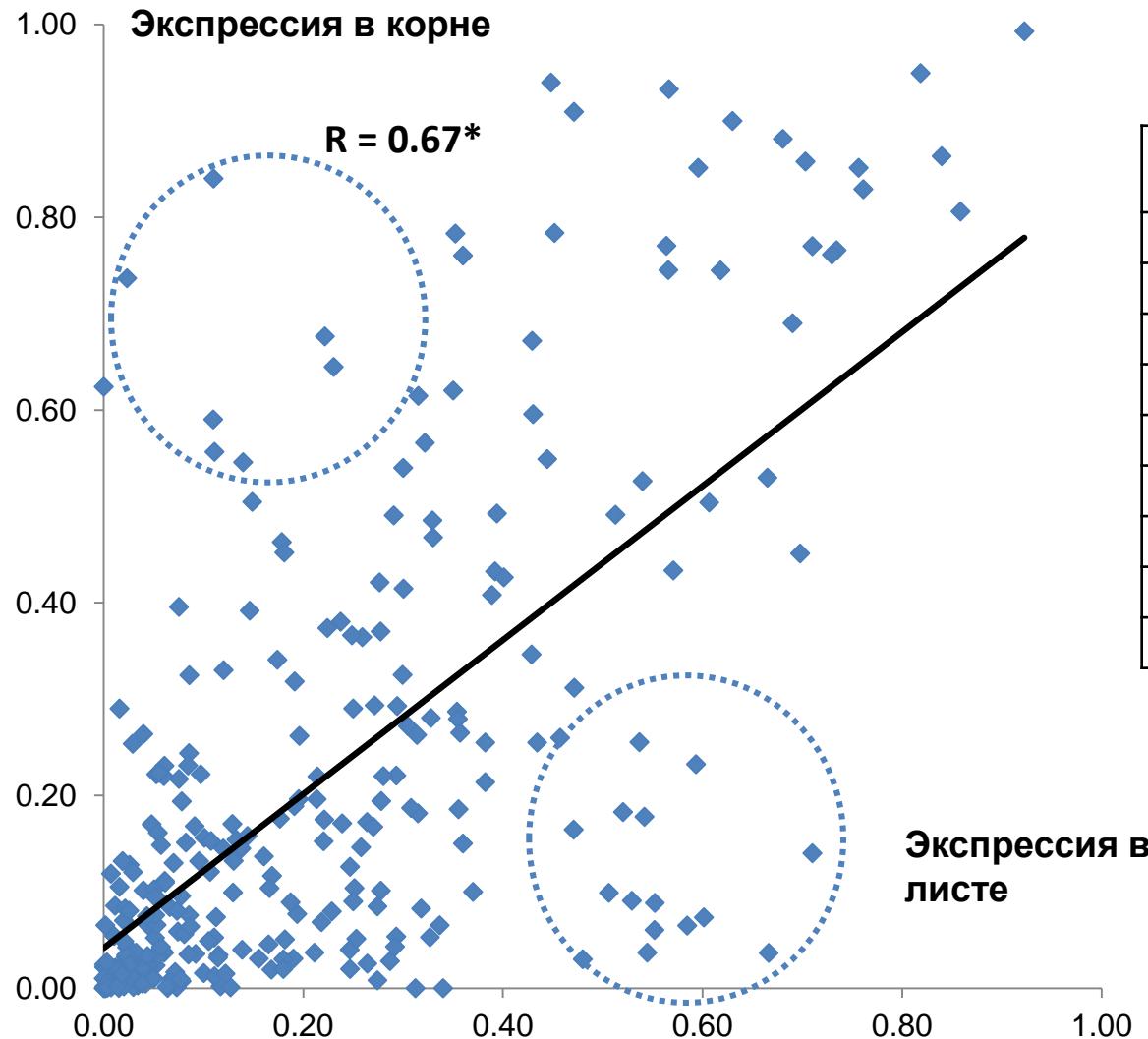
**Задачи:**

- 1) Изучить особенности молекулярной эволюции генов антиоксидантной защиты растений: идентифицировать ортологические группы генов у цветковых растений и дифференцировать их по характеристикам накопления замен в разных эволюционных линиях
- 2) Сопоставить экспрессию антиоксидантных генов в корне и листе с характеристиками накопления замен
- 3) Протестировать гипотезу о тканеспецифичной регуляции экспрессии антиоксидантных генов
- 4) Описать транскрипционную регуляцию антиоксидантных генов в ответ на стресс
- 5) Разработать модель функционирования АОС, которая описывает динамику компонентов системы
- 6) На основе транскрипционных данных оценить изменение концентраций ферментативных компонент системы и провести сравнение стационарных состояний системы в описанной модели с учетом этих данных

# Филогенетический анализ ферментов (аскорбатпероксидаза)



# Корреляция экспрессии антиоксидантных генов в корне и листе



\* p-value < 0.05

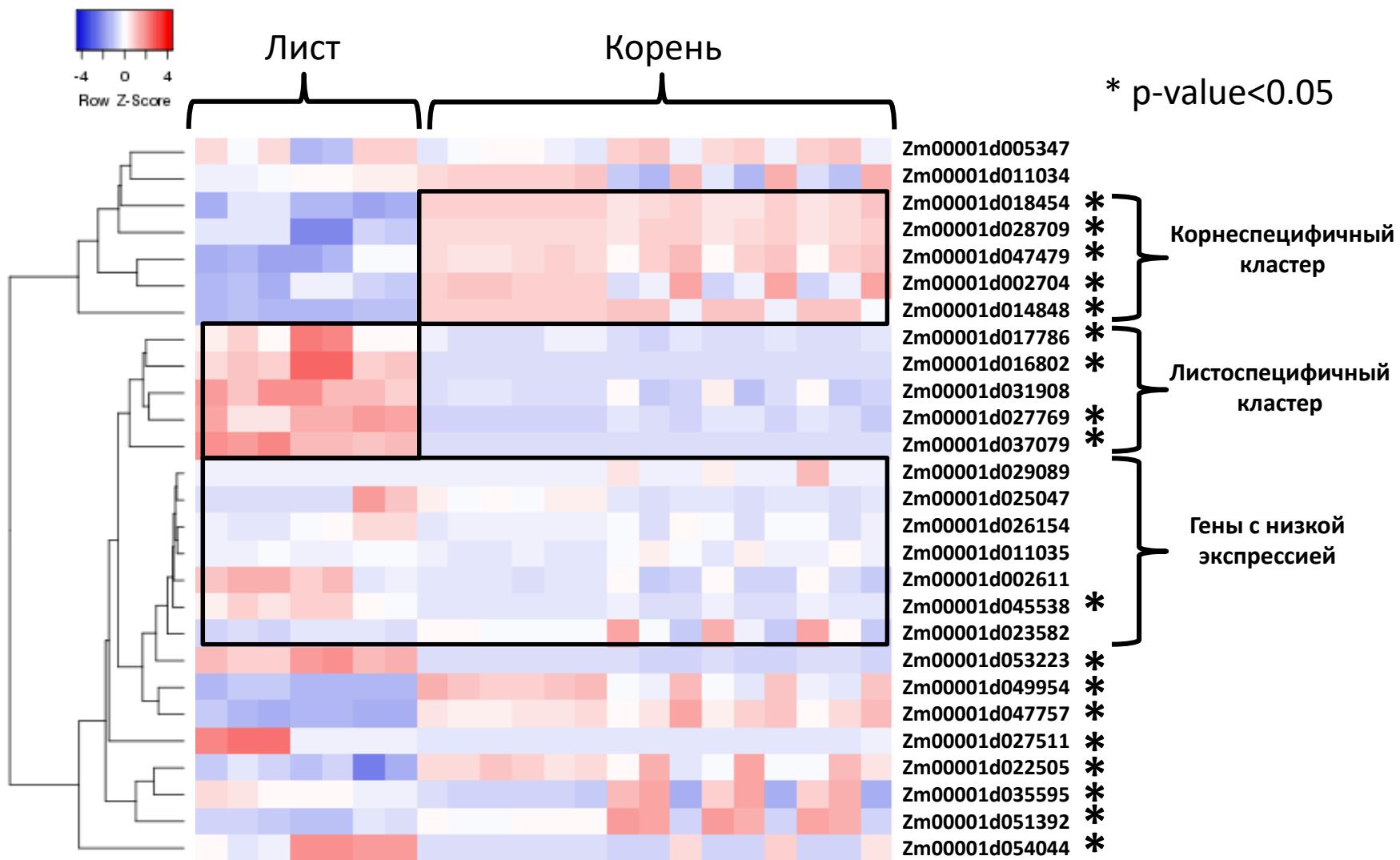
Организм	R
Arabidopsis thaliana	0.84*
Brassica rapa	0.72*
Glycine max	0.77*
Medicago truncatula	0.60*
Populus trichocarpa	0.72*
Solanum lycopersicum	0.68*
Zea mays	0.58*
Oryza sativa	0.62*
Hordeum vulgare	0.53*

# Корреляция уровня экспрессии генов АОС в тканях и характера накопления замен (Ka/Ks)

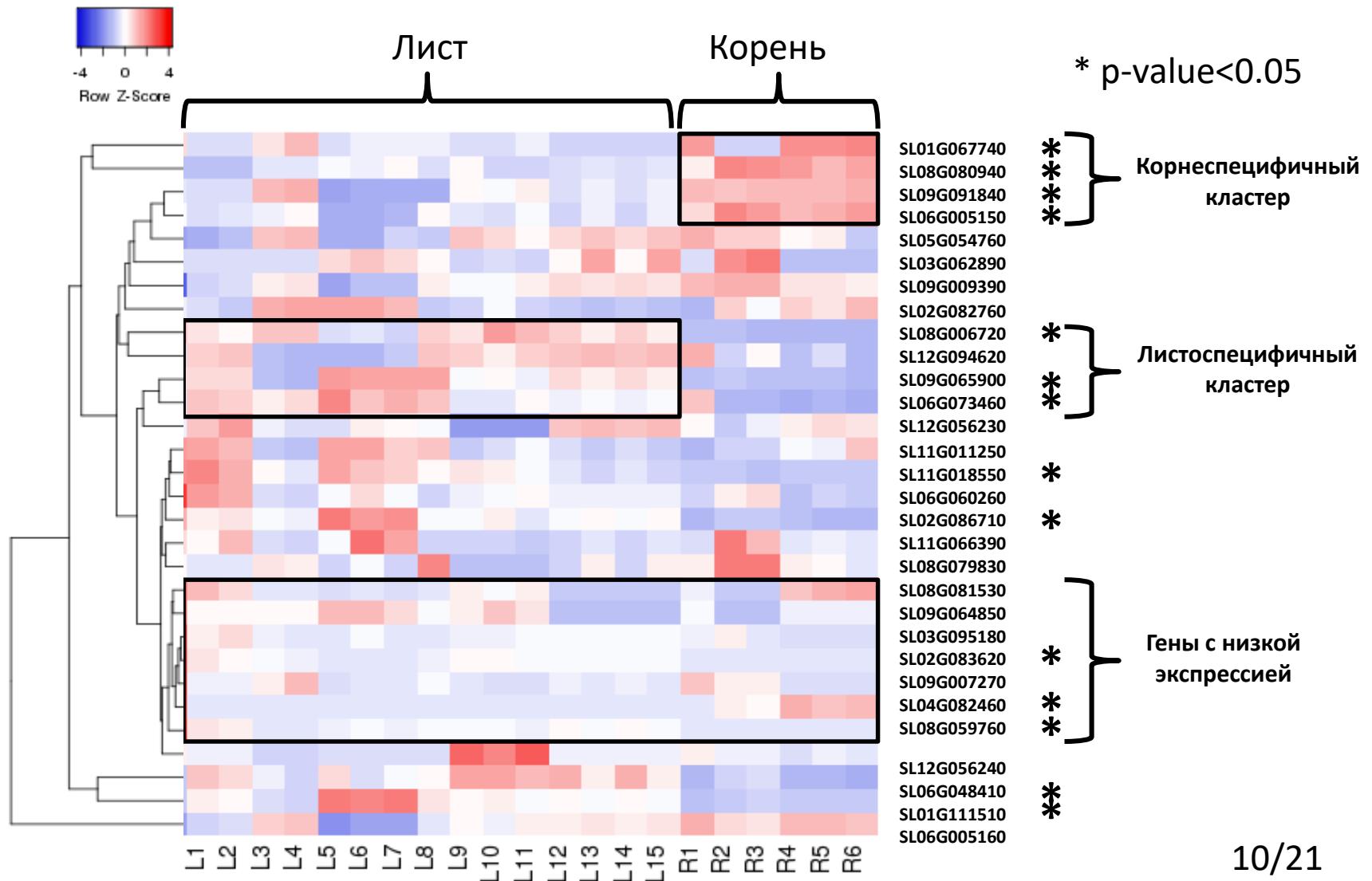
\* p-value<0.05

Организм	R(корень/Ka/Ks)	R(лист/Ka/Ks)
Arabidopsis thaliana	<b>-0.35*</b>	<b>-0.36*</b>
Brassica rapa	<b>-0.29*</b>	-0.21
Glycine max	<b>-0.30*</b>	<b>-0.28*</b>
Medicago truncatula	-0.29	<b>-0.41*</b>
Populus trichocarpa	0.08	0.18
Solanum lycopersicum	0.01	-0.03
Zea mays	0.04	0.09
Oryza sativa	-0.20	-0.11
Hordeum vulgare	-0.20	<b>-0.39*</b>

# Уровни экспрессии генов АОС в нормальных условиях в корне и листе (*Zea mays*)

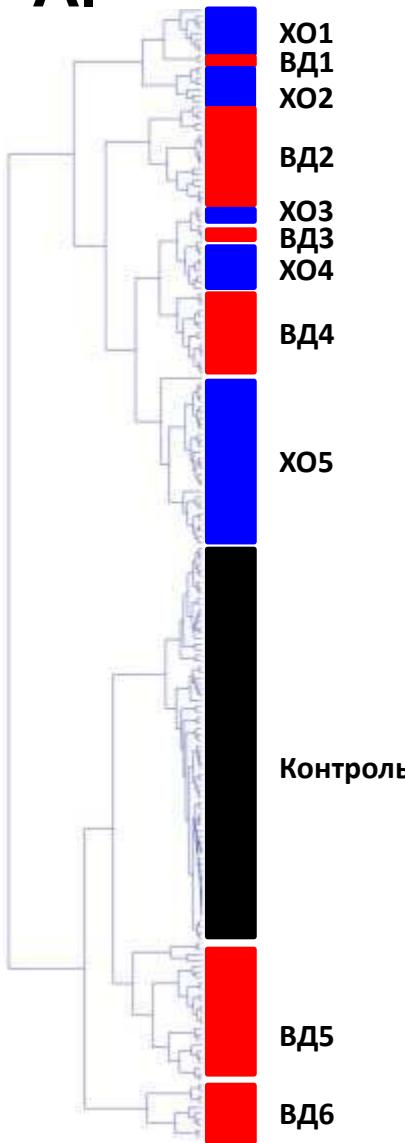


# Уровни экспрессии генов АОС в нормальных условиях в корне и листе (*Solanum lycopersicum*)

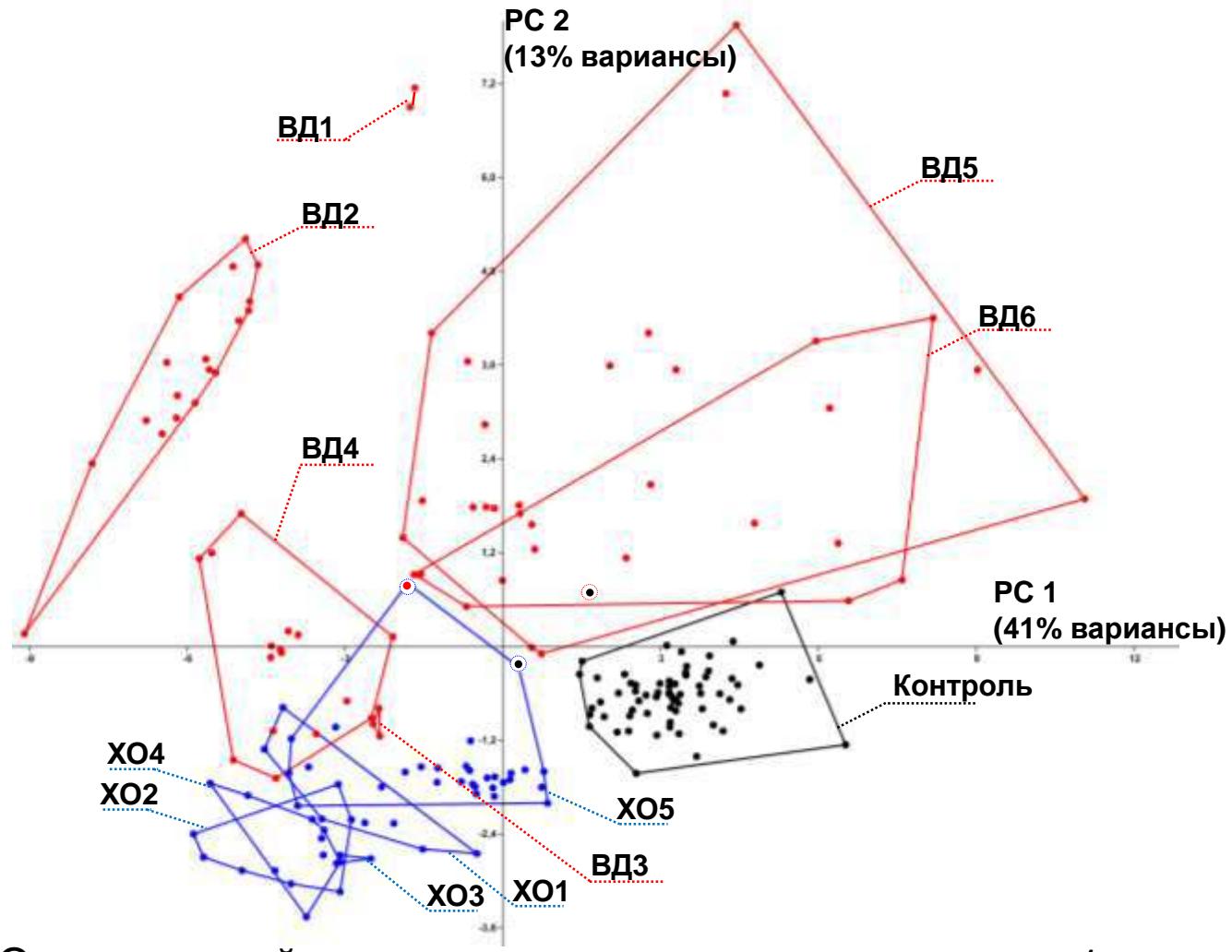


# Метаанализ экспрессии антиоксидантных генов в ответ на стресс (*Oryza sativa*)

А.



Б.

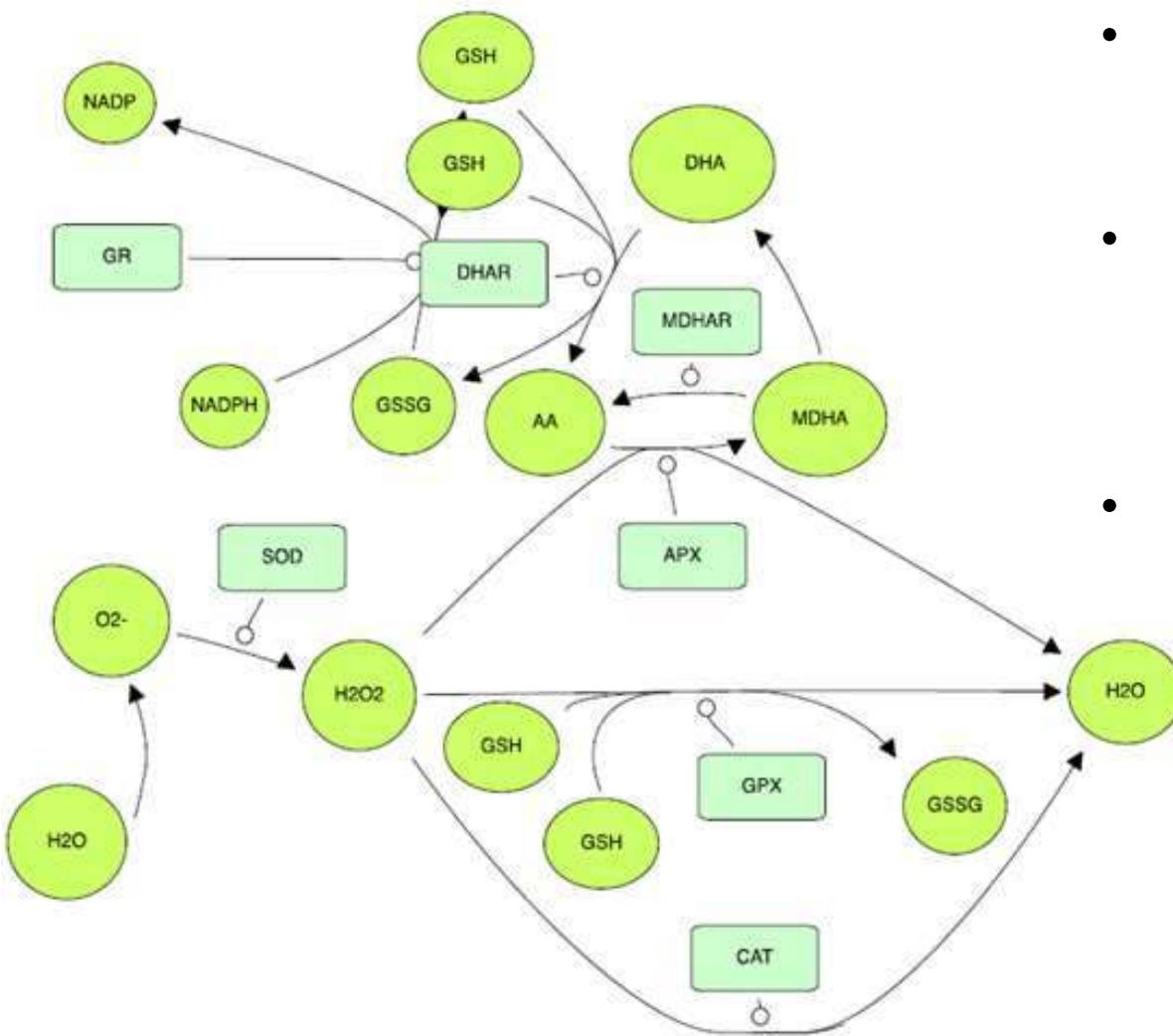


ХО – холодовой стресс  
ВД - вододефицит

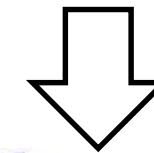




# Описываемая модель антиоксидантной системы



- 7 антиоксидантных ферментов (SOD, CAT, APX, GPX, MDHAR, DHAR, GR)
- Окисленные и восстановленные формы аскорбата (AA, DHA, MDHA), глутатиона (GSH, GSSG)
- Генерация радикалов –  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$



 **COPASI**  
Complex Pathway Simulator

# Уравнения скорости реакций

$$V_{APX} = k_2^{APX}[Col][ASC] + k_3^{APX}[ColII][ASC]$$



Антиоксиданты

$$V_{GPX} = k_2^{GPX}[Col][GSH] + k_3^{GPX}[ColII][GSH]$$



Ферменты

$$V_{SOD} = K^{SOD}[SOD]_0[\text{O}_2^-]$$



Радикалы

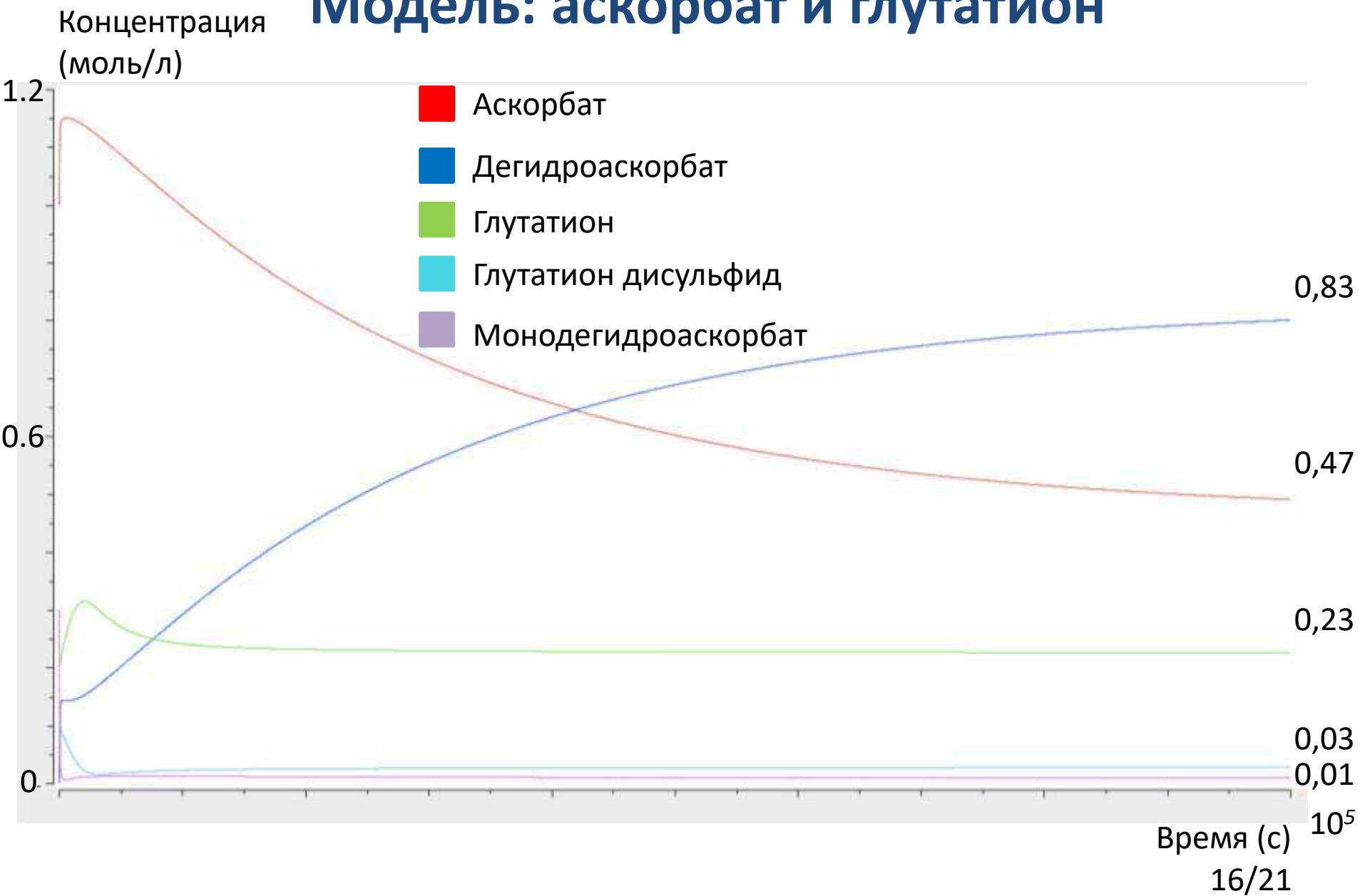
$$V_{CAT} = K^{CAT}[CAT]_0[\text{H}_2\text{O}_2]$$

$$V_{GR} = \frac{k_{cat}^{GR}[GR]_0[\text{NADPH}][\text{GSSG}]}{K_{m, GR}^{\text{NADPH}}[\text{GSSG}] + K_{m, GR}^{\text{GSSG}}[\text{NADPH}] + [\text{NADPH}][\text{GSSG}]}$$

$$V_{MDHAR} = \frac{k_{cat}^{MDAR}[\text{MDHAR}]_0[\text{NADPH}][\text{MDA}]}{K_{m, MDAR}^{\text{NADPH}}[\text{MDA}] + K_{m, MDAR}^{\text{MDA}}[\text{NADPH}] + [\text{NADPH}][\text{MDA}]}$$

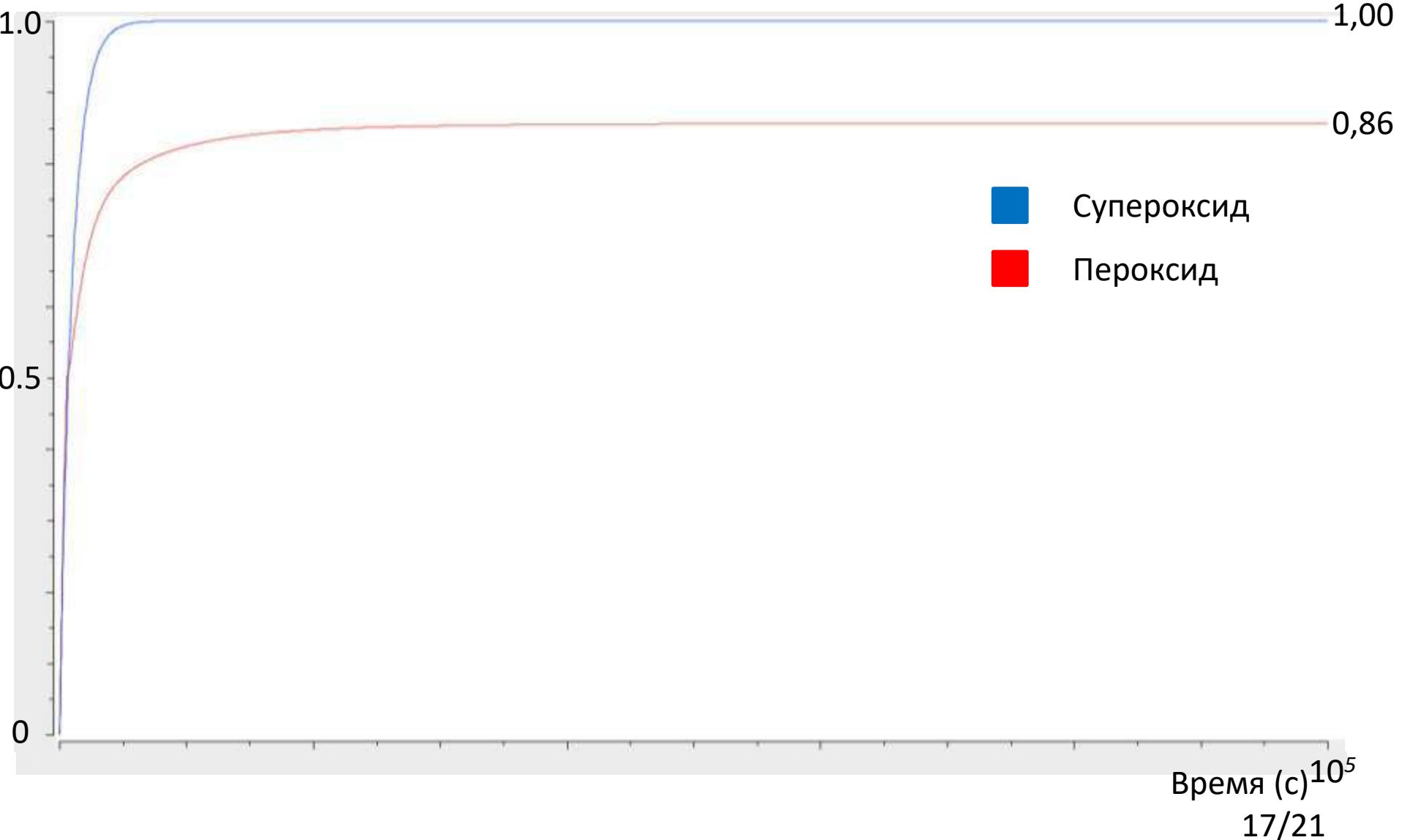
$$V_{DHAR} = \frac{k_{cat}^{MDAR}[\text{DHAR}]_0[\text{DHA}][\text{GSH}]}{K_i^{\text{DHA}}K_{m, DHAR}^{\text{GSH1}} + K_{m, DHAR}^{\text{DHA}}[\text{GSH}] + (K_{m, DHAR}^{\text{GSH1}} + K_{m, DHAR}^{\text{GSH2}})[\text{DHA}] + [\text{DHA}][\text{GSH}]}$$

# Модель: аскорбат и глутатион



# Модель: радикалы

Концентрация  
(моль/л)



# Интеграция данных в модель: компоненты в контроле и стрессе

Отношение к экспрессии соответствующего гена в контроле:

Кластер	АПК								
	OS08G41090	OS04G14680	OS04G35520	OS02G34810	OS12G07820	OS12G07830	OS07G49400	OS08G43560	OS03G17690
XO1	0,44	3,41	0,53	0,75	0,53	0,57	0,44	0,76	1,15

Экспрессия генов в контроле

Кластер	АПК								
	OS08G41090	OS04G14680	OS04G35520	OS02G34810	OS12G07820	OS12G07830	OS07G49400	OS08G43560	OS03G17690
XO1	100	400	600	500	200	300	700	10	5

Экспрессионные доли ферментов относительно контрольных значений =  $\sum (\text{экспрессия в контроле} * \text{изменение в стрессе}) / \sum (\text{экспрессия в контроле})$

## Экспрессионные доли ферментов относительно контрольных значений

Кластер	Фермент						
	АПК	КАТ	ДГАР	ГПК	ГР	МДГАР	СОД
CR1	0,71	0,64	0,46	1,17	0,55	1,02	0,71
CR2	0,71	0,69	0,23	1,17	0,68	1,05	0,51
CR3	0,62	0,76	0,30	0,82	0,42	0,59	0,58
CR4	0,60	0,69	0,22	0,93	0,47	0,70	0,54
CR5	0,71	0,70	0,63	0,91	0,76	0,79	0,79
WDR1	0,77	0,78	0,66	1,09	1,67	1,40	1,15
WDR2	0,38	0,45	0,42	0,65	1,06	0,50	0,67
WDR3	0,64	0,72	0,67	0,66	0,67	0,61	0,76
WDR4	0,55	0,49	0,57	0,85	0,75	0,72	0,55
WDR5	0,85	0,77	0,97	0,86	1,09	0,95	1,28
WDR6	1,10	0,87	1,35	0,80	1,00	0,88	1,54

Стационарные решения: доли антиоксидантов и радикалов относительно контрольных

Кластер	Вещество							
	пероксид	супероксид	вода	аскорбат	монодегидро аскорбат	дегидро аскорбат	глутатион	глутатион дисульфид
CR1	1,02	1,41	0,96	0,43	0,61	1,33	0,78	1,73
CR2	1,02	1,96	0,96	0,26	0,48	1,42	0,93	1,13
CR3	1,05	1,72	0,92	0,28	0,49	1,41	0,76	2,11
CR4	1,05	1,85	0,93	0,22	0,44	1,44	0,81	1,79
CR5	1,04	1,27	0,95	0,69	0,79	1,17	0,97	1,21
WDR1	1,02	0,87	0,97	0,86	0,87	1,08	1,14	0,38
WDR2	1,09	1,49	0,87	0,64	0,72	1,21	1,18	0,58
WDR3	1,06	1,32	0,91	0,75	0,81	1,14	0,96	1,44
WDR4	1,06	1,82	0,91	0,69	0,76	1,18	0,99	1,17
WDR5	1,03	0,78	0,96	1,1	1,01	0,95	1,07	0,84
WDR6	1,00	0,65	0,99	1,27	1,14	0,84	1,00	1,17

# Выводы

- 1) Антиоксидантная система растений претерпела ряд дупликаций в ходе эволюции (как ранних, так и поздних (150-100 млн лет)), о чем свидетельствует множествоное количество выявленных ортологичных групп последовательностей, как у цветковых растений, так и у водорослей и мхов. Каталазы являются наиболее консервативными, а супероксиддисмутазы характеризуются большей вариабельностью структур. Внутри классов ферментов также присутствует неодинаковый характер накопления замен в разных ортологических группах.
- 2) Существует достоверная корреляция между уровнем экспрессии антиоксидантных генов в корне и листе. Однако, для ряда генов обнаружены тканеспецифичные особенности экспрессии.
- 3) При соотнесении данных экспрессии и Ka/Ks для 4 видов (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica rapa*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*) установлена достоверная обратная корреляция между уровнем экспрессии гена и его эволюционной консервативностью: чем ниже Ka/Ks, тем выше уровень экспрессии.

# Выводы

- 4) При анализе транскрипционных данных ответа на стресс у ячменя *Hordeum vulgare*, кукурузы *Zea mays* и риса *Oryza sativa* установлено, что **устойчивые паттерны усиления и понижения уровня экспрессии генов АОС в стрессовом ответе наблюдаются при анализе большого количества экспериментальных данных для риса.** Ответ на вододефицит является более гетерогенным, чем на холодовой стресс. Большинство антиоксидантных генов характеризовались понижением экспрессии в ответ на стрессы.
- 5) Разработана модель функционирования АОС, которая описывает динамику антиоксидантных веществ и имеет стационарное решение.
- 6) Интеграция данных о стрессовом ответе всех описанных вариантов паттернов усиления и понижения экспрессии генов риса, показала **устойчивую тенденцию увеличения соотношения окисленных форм антиоксидантов к восстановленным.** Поэтому, скорости биосинтеза и восстановления антиоксидантов, согласно нашей модели, являются ключевыми факторами эффективной работы АОС в условиях стресса.



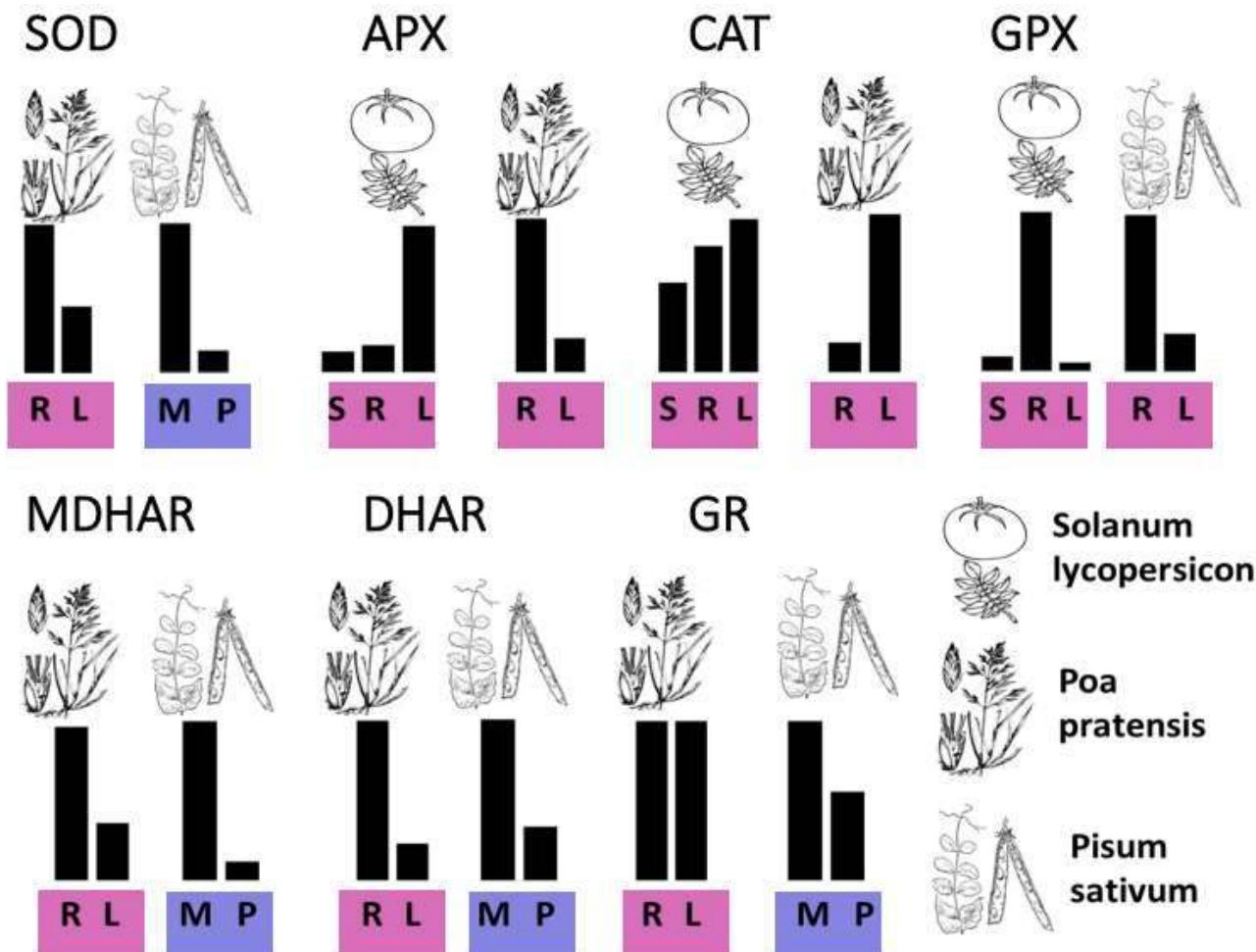
TABLE 4

Linear regression analyses of the relationship among antioxidant enzyme gene and protein expression and enzyme activity

	Cu/Zn SOD	Mn SOD	Catalase	Gpx
mRNA–enzyme protein	0.81*	0.58‡	0.92*	0.91*
Protein–enzyme activity	0.79†	0.82*	0.95*	0.89*

“The correlation between mRNA and protein levels as well as between protein levels and enzyme activities of the antioxidant enzymes revealed a significant association for Cu/Zn SOD, catalase, and Gpx, with correlation coefficients in the 0.8-0.9 range (Table 4). Only the association between Mn SOD mRNA and protein levels was weaker, with a correlation coefficient of 0.72, probably because of differences in the content of mitochondria in the examined tissues. **Thus the level of gene expression of the antioxidant enzymes seems to determine the enzyme activity level in the various tissues.** “

# Antioxidant enzymes kinetic activity



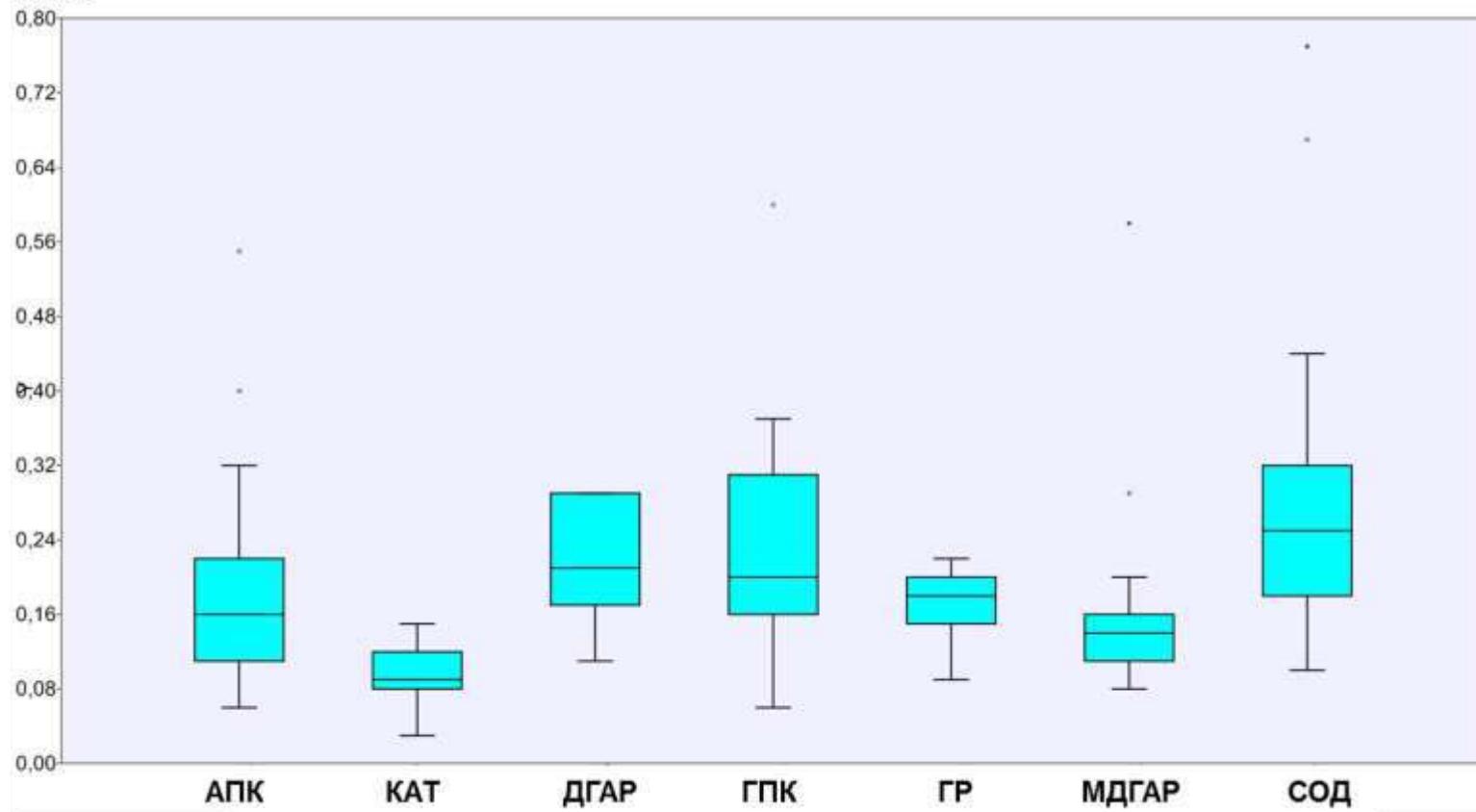
Classes of enzymes:

APX – ascorbate peroxidase, SOD – superoxide dismutase, CAT – catalase,  
GPX – glutathione peroxidase, MDHAR – monodehydroascorbate reductase,  
DHAR – dehydroascorbate reductase, GR – glutathione reductase

Plant tissues: S – stem, R – root, L – leaf

Organelles : M – mitochondria, P - peroxisome

$Ka/Ks$



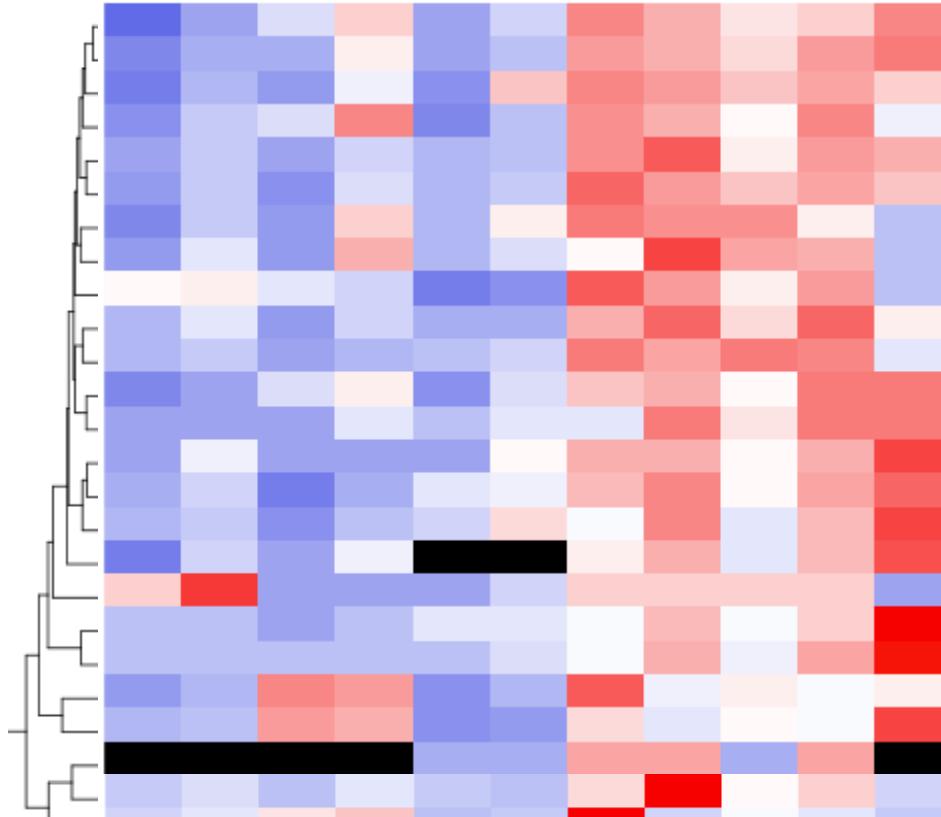
# Профили экспрессии антиоксидантных генов для *Oryza sativa* (вододефицит)



-2 0 2

Row Z-Score

\* p-value<0.05



GSE48507

GSE48507

GSE48507

GSE48507

GSE40070

GSE71046

GSE71046

GSE71046

GSE71046

GSE71377

Zm00001d035595  
Zm00001d053223  
Zm00001d022505 \*  
Zm00001d005347  
Zm00001d037079  
Zm00001d011034  
Zm00001d028709  
Zm00001d047757 \*  
Zm00001d002704 \*  
Zm00001d017786 \*  
Zm00001d054044 \*  
Zm00001d051392  
Zm00001d023582 \*  
Zm00001d002611  
Zm00001d016802  
Zm00001d031908  
Zm00001d047479  
Zm00001d026154  
Zm00001d045538  
Zm00001d027769  
Zm00001d018454  
Zm00001d014848  
Zm00001d011035  
Zm00001d027511  
Zm00001d049954

# Профили экспрессии антиоксидантных генов для *Hordeum vulgare* (вододефицит, холод)

