

СВЕРХБЫСТРАЯ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ: ПРОТЕОМНЫЙ ОТВЕТ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ НА ПРЕДПОСЕВНУЮ ОБРАБОТКУ ПРЕПАРАТАМИ ЖЕЛЕЗА

© 2023 Т.Т. Кусаинова^{1,2}, Д.Д. Емекеева^{1,2}, Е.М. Казакова^{1,2}, В.А. Горшков³,
Ф. Кьелдсен³, М.Л. Кусков¹, А.Н. Жигач¹, И.П. Ольховская¹,
О.А. Богословская¹, Н.Н. Глущенко¹, И.А. Тарасова^{1*}

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе,
119334 Москва, Россия; электронный адрес: iatarasova@yandex.ru

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
141700 Долгопрудный, Московская обл., Россия

³ Университет Южной Дании, кафедра биохимии и молекулярной биологии, 5230 Оденсе, Дания

Поступила в редакцию 05.05.2023

После доработки 06.08.2023

Принята к публикации 09.08.2023

В последние годы для биохимических исследований активно разрабатываются методы ультра-быстрого хроматомасс-спектрометрического профилирования протеомов. Данные методы предназначены для экспресс-мониторинга ответа клеток на биотический стимул, соотношения молекулярных изменений с биологическими процессами и изменениями фенотипа. Для повышения рентабельности сельского хозяйства внедряют новые биотехнологии, в том числе с применением наноматериалов. При этом необходимы комплексные испытания новых препаратов и исследование механизмов биотического действия на показатели всхожести, роста и развития растений. Целью данной работы являлась адаптация разработанного нами метода ультрабыстрой хроматомасс-спектрометрии DirectMS1 для быстрого количественного профилирования молекулярных изменений в 7-дневных проростках пшеницы, возникающих в ответ на обработку семян препаратами железа. Экспериментальный метод позволяет анализировать до 200 образцов в сутки, его практическая ценность заключается в возможности осуществлять протеомную экспресс-диагностику биотического действия новых препаратов, в том числе и для нужд сельского хозяйства. При обработке семян препаратами, содержащими полимерный пленкообразователь (ПЭГ-400, Na-КМЦ, Na2-ЭДТА), наночастицы железа (II, III) или сульфат железа (II), показаны изменения в процессах фотосинтеза, биосинтеза хлорофилла, порфиринов- и тетрапиррол-содержащих соединений, расщепления глюкозы в тканях побегов и метаболизма полисахаридов в тканях корней. Наблюдения на уровне протеома согласуются с результатами морфометрии и подтверждены измерениями активности супероксиддисмутазы и микроэлементным анализом проросших семян и тканей побегов и корней 7-дневных проростков. Предложена характеристическая молекулярная сигнатура для определения регуляции процессов фотосинтеза и расщепления глюкозы на уровне белков. Такая сигнатура рассматривается в качестве потенциального маркера биотического эффекта обработки семян препаратами железа и будет подтверждаться дальнейшими исследованиями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: протеомика растений, наночастицы, биоинформатика, масс-спектрометрия.

DOI: 10.31857/S032097252309018X, **EDN:** WUBPDY

ВВЕДЕНИЕ

Последние разработки хроматомасс-спектрометрических методов для протеомных

исследований направлены на решение двух основных проблем: сокращение времени анализа образцов и увеличение покрытия протеома [1–5]. Часовое хроматографическое

Принятые сокращения: ГО – генные онтологии; НЧ – наночастицы; ПП – полимерный пленкообразователь; СОД – супероксиддисмутаза; FC – кратное изменение концентрации белка (англ. Fold Change); FDR – статистическая значимость с коррекцией на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга (англ. false discovery rate); *p*-value – статистическая значимость с коррекцией на множественные значения методом Бонферрони.

* Адресат для корреспонденции.

разделение и сбор масс-спектрометрических данных, подразумевающий последовательную изоляцию и фрагментацию пептидов, накладывают существенные ограничения на производительность анализа (~10 образцов в сутки) и его чувствительность ($\frac{1}{2}$ или $\frac{1}{4}$ часть белок-кодирующего генома, для которого половина белков идентифицирована по одному аминокислотному фрагменту из 10–15 аминокислот). Одним из возможных подходов к решению обозначенных проблем является использование коротких хроматографических градиентов и измерение масс ионов пептидов без их фрагментации [2]. На основе этих принципов нами был разработан метод DirectMS1, в котором реализуется 5-минутное хроматографическое разделение и регистрация масс-спектров пептидов с высоким разрешением (120 000 при отношении массы к заряду (m/z), равном 200 томсон (Th)), а белки идентифицируются непосредственно в пространстве поиска (m/z ; хроматографическое время удерживания) с использованием алгоритмов машинного обучения [6]. На данный момент метод продемонстрировал возможность идентифицировать более 2000 белков протеома клеток человека в 5-минутных анализах [6] и высокую точность сравнительного количественного анализа, в том числе на примере клеточных моделей злокачественных заболеваний [7]. Важным преимуществом метода DirectMS1 является высокая производительность (~200 образцов в сутки) и высокое покрытие аминокислотных последовательностей идентифицированных белков (~10 фрагментов длиной 10–15 аминокислот на белок), что способствует более точным количественным оценкам по сравнению со стандартными подходами [7]. Метод представляется перспективным для протеомной экспресс-диагностики биоматериалов и может являться молекулярным базисом для контроля биохимических процессов при проведении биологических экспериментов. В данной работе DirectMS1 был впервые применен для протеомного анализа тканей растительного происхождения на примере лабораторного исследования эффектов от применения наночастиц железа (НЧ Fe) в составе биопрепарата для предпосевной обработки семян мягкой озимой пшеницы.

Озимая пшеница широко культивируется как ценный и основной продукт питания [8]. Основными дестабилизирующими факторами в производстве озимой пшеницы являются неблагоприятные погодные условия, потери урожая от вредителей и болезней, отсутствие полноценного питания, обеспечивающего нор-

мальный рост и развитие растений. Для решения этих проблем в сельском хозяйстве активно разрабатываются новые биотехнологии, в том числе на основе наноматериалов [9]. Основные области применения нанотехнологий в растениеводстве включают использование наноматериалов на основе пестицидов для защиты растений, создание наносенсоров для контроля роста растений и разработку удобрений с учетом потребностей растений [10]. Эффект от применения наноматериалов зависит от многих факторов, включая вид элемента, его концентрации, физико-химических параметров наночастиц (НЧ), биологических особенностей растений, фазы роста, почвенных и геофизических характеристик произрастания культур [9]. Многочисленные обзоры по лабораторным и полевым испытаниям наноматериалов в растениеводстве демонстрируют как положительное, так и отрицательное влияние НЧ на рост и развитие различных культур, вплоть до проявления фитотоксичности [9, 11–13]. Однако при тщательном исследовании концентрационных зависимостей, учете особенностей растений, фазы роста, элементного состава почв использование нанотехнологий способно обеспечить прогресс в защите растений [9].

Предпосевная обработка семян озимой пшеницы фунгицидами и стимуляторами роста является важным этапом ее производства [14]. Показано, что введение в препарат для обработки семян НЧ различных микроэлементов (TiO_2 , FeS_2 , CuO , коллоидного Ag , ZnO и др.) также способствует увеличению всхожести и активному росту растений [9, 15–16]. Наблюдаемые эффекты, как правило, коррелируют с особенностями строения НЧ и их физико-химическими характеристиками (размер, фазовый и элементный состав). Применение наноматериалов рассматривается как способ адресной и контролируемой доставки микроэлементов, необходимых для роста растений, соответственно, наиболее заметные эффекты можно ожидать в условиях, когда имеется недостаток макро- и микронутриентов. В связи с этим, разрабатывая состав нанобиопрепарата, необходимо учитывать не только свойства НЧ, но и микроэлементный состав почвы, особенности сорта и потребность в отдельных микроэлементах. Так, например, дефицит в почве железа приводит к развитию хлороза, который проявляется в пожелтении и опадании листьев, ухудшении состояния корневой системы, ослаблении роста растений и, как следствие, снижении урожая. Возникновение дефицита обусловлено тем, что биодоступной формой железа для растений является (Fe^{2+}),

в то время как сельскохозяйственные почвы содержат железо в форме (Fe^{3+}), которое требует либо химического восстановления, либо восстановления микробиотой почвы, либо ферментативными системами самого растения. Для предотвращения хлороза сельскохозяйственных растений применяют органические и минеральные удобрения, которые включают жизненно важные элементы, в том числе железо в ионной или хелатной формах. Было показано, что при корневой подкормке *Capsicum annuum* питательной средой с НЧ Fe в концентрации 0,05 мМ, содержащих α -Fe и магнетит $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$, наблюдалось улучшение морфометрических и физиологических показателей по сравнению с применением Fe^{2+} в концентрации 0,1 мМ [17]. В связи с этим имеются экспериментальные основания предполагать, что при дефиците железа такой состав НЧ Fe может являться эффективным источником биодоступных форм железа, однако механизм высвобождения микроэлемента остается предметом дискуссии. Показано, что аккумуляция НЧ в тканях растений возможна и зависит от концентрации [17, 18]. Так, при корневой подкормке *C. annuum* питательной средой с НЧ Fe в концентрации 0,05 мМ единичные НЧ наблюдались в наружных слоях клеток эпидермиса, а высокие концентрации НЧ Fe (2 мМ) приводили к визуализации НЧ в клетках эпидермиса и в эндодерме [17].

Разработка новых комплексных препаратов требует наличия точных методик молекулярной экспресс-диагностики, способных в короткие сроки оценить по совокупности маркеров перспективность состава. Так, например, литературные данные об исследовании морфофизиологических характеристик и протеомного ответа зерновых культур на обработку НЧ металлов в настоящий момент немногочисленны [19, 20]. Имеются работы, в которых исследовали протеомный ответ на обработку НЧ различных металлов в тканях пшеницы (корнях и листьях). Нанопрепарат в лабораторных или тепличных условиях либо вносится в почву после прорастания, либо наносится на зерна перед культивированием, либо на 5-дневные или 6-дневные проростки. Протеомный анализ разных сортов пшеницы, дополненный измерением морфометрических, физиологических показателей и ферментативной активности, показал, что при обработке препаратами НЧ различных металлов, как правило, наблюдается увеличение среднего количества зерен в колосе и массы 1000 зерен, увеличение содержания сахара, активности супероксиддисмутазы (СОД), пероксидазы и

каталазы, в то время как молекулярный ответ и регуляция белков, а также результаты микроэлементного анализа зависят от сорта пшеницы, вида элемента и способа применения. Показано, что в первую очередь на молекулярном уровне использование наночастиц железа при обработке пшеницы влияло на регуляцию белков, вовлеченных в фотосинтез, метаболизм белков [14], гликолиз, разложение крахмала и цикл трикарбоновых кислот [21].

Метод ультрабыстрой хроматомасс-спектрометрической идентификации и количественного анализа протеомов (экспресс-протеомика) [1, 6, 7] дает возможность в короткие сроки оценить по совокупности маркеров результат применения нового препарата для предпосевной обработки семян. В данной работе была продемонстрирована применимость метода для полук количественного профилирования протеомов растений. Также показано, что полученной информации достаточно для того, чтобы составить воспроизводимый молекулярный портрет, характеризующий изменения протеомного отклика в растительных клетках специфично внешнему стимулу, и проанализировать корреляцию этих изменений с внешним воздействием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез наночастиц железа. НЧ Fe получали левитационно-струйным методом [22]. Железная проволока чистотой 99,8% и диаметром 0,5 мм («Advent Research Materials Ltd», Англия) подавалась в кварцевую трубку со скоростью 5,88 г/ч к противоточному высокочастотному (440 кГц) индуктору, где она плавилась и испарялась в потоке инертного газа (аргон высокой чистоты при давлении 0,2 атм и расходе газа 3000 см³/мин). Затем пар охлаждался, конденсировался в наночастицы и при температуре ниже 150 °С обрабатывался кислородом высокой чистоты (расход газа — 118 см³/мин). Затем частицы охлаждали, упаковывали в контейнер и хранили при комнатных условиях до использования. Физико-химические свойства НЧ Fe характеризовали методами рентгенофазового анализа (РФА) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), согласно которым частицы имели сферическую форму со средним диаметром 55 нм, структура представляла собой ядро из металлического железа α -Fe (70,1% вес.) с оболочкой из магнетита $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ (29,9% вес), следовательно, массовые доли Fe^{2+} и Fe^{3+} в магнетите составляли приблизительно 24% и 48% соответственно.

Обработка семян. Семена пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Таня, Национальный зерновой центр им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия) обрабатывали раствором химически чистого сульфата железа (II) («Химмед», Россия) или суспензиями НЧ Fe. Пленкообразующий раствор А (0,56% натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ); 1,4% полиэтиленгликоля 400 (ПЭГ-400); 0,0037% динатриевой соли ЭДТА (Na₂-ЭДТА) и раствор Б (водная суспензия НЧ Fe или раствор FeSO₄) смешивали в соотношении 9/1 (v/v). Семена замачивали в смеси растворов А и Б (5 мл раствора на 10 г семян) на 10 мин, откидывали на сито, давая стечь избытку раствора в течение 10 мин, затем отправляли на проращивание. Контрольную группу семян обрабатывали раствором А и водой, смешанными в соотношении 9/1 (v/v) без добавления железа. Вторым контролем были необработанные семена. Всего для проращивания было подготовлено 5 групп (G1–G5) по 150 семян в каждой группе: G1 – необработанные семена; G2 – семена, обработанные раствором А с водой; G3 – семена, обработанные суспензией НЧ Fe 10⁻⁵% в растворе А; G4 – семена, обработанные суспензией НЧ Fe 10⁻⁷% в растворе А; G5 – семена, обработанные FeSO₄ 10⁻⁷% в растворе А.

Проращивание семян. Семена проращивали рулонным способом (ГОСТ 12038-84, РФ) в течение 7 дней. Пятьдесят семян располагали в линию на полоске стерилизованной фильтровальной бумаги размером 10 × 100 см на расстоянии 2–3 см от верхнего длинного края, накрывали влажной бумагой такого же размера, свободно скручивали и помещали вертикально в стерильные стаканы емкостью 0,5 литра. В стаканы наливали 70 мл дистиллированной воды и помещали в термостат ТС-1/80 ЦП («Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре 20 ° ± 1 °С на 7 суток.

Микроэлементный анализ. Концентрации химических элементов были проанализированы в проросших семенах на третьи сутки (по 100 штук в каждой группе); в корнях (от 500 проростков в каждой группе) – на 7-е сутки прорастания; в зеленых ростках (от 500 проростков в каждой группе) – на 7-е сутки прорастания. Всего для микроэлементного анализа было подготовлено 4 группы (G1, G2, G4 и G6) по 50 семян в каждой группе: G1 – необработанные семена; G2 – семена, обработанные раствором А с водой; G4 – семена, обработанные суспензией НЧ Fe 10⁻⁷% в растворе А; G6 – семена, обработанные пленкообразователем с НЧ Fe 10⁻⁶%. Измерения были выполнены ООО «Микронутриенты» (Россия) методом

масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на квадрупольном масс-спектрометре Nexion 300D («Perkin Elmer», США), образцы проанализированы в двух повторах.

Измерение активности супероксиддисмутазы. Активность СОД была измерена при использовании гидроксиламинового метода (Hydroxylamine Method) с помощью коммерческого набора Total Superoxide Dismutase (T-SOD) Activity Assay Kit («Elabsience Biotechnology», США) в свежих тканях корней и побегов 7-дневных проростков пшеницы в не менее двух и не более четырех повторах. Всего для анализа активности СОД было подготовлено 5 групп (G1–G4 и G6) по 50 семян в каждой группе: G1 – необработанные семена; G2 – семена, обработанные раствором А с водой; G3 – семена, обработанные суспензией НЧ Fe 10⁻⁵% в растворе А; G4 – семена, обработанные суспензией НЧ Fe 10⁻⁷% в растворе А; G6 – семена, обработанные пленкообразователем с НЧ Fe 10⁻⁶%. Побеги и корни проростков замораживали в жидком азоте и измельчали в криомельнице CryoMill M-400, («Retsch», Германия) (3 криоцикла: 30 с – 30 Гц/30 с – 5 Гц). К навеске 200 мг размолотой ткани добавляли 1 мл натрий-фосфатного буфера (pH 7,4) и инкубировали при 30 °С в течение 30 мин. Затем смесь центрифугировали и отбирали супернатант, содержащий белки в нативной форме. Концентрации белков измеряли с помощью коммерческого набора Pierce BCA Protein Assay Kit («Thermo Scientific», Германия) и спектрофотометрии на SPECTROStar Omega microplate reader («BMG LABTECH», Германия).

Морфометрия. Семидневные проростки извлекали из рулонов и вручную измеряли длину побега, длину максимального корня и суммарную длину всех корней у 50 растений, выбранных случайным образом из каждой группы G1–G5. Статистический анализ выполнялся с помощью библиотеки функций SciPy языка программирования Python [23]. Для определения статистически значимых различий в средних значениях морфометрических параметров использовался критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони, порог отбора: p -value < 0,05. Нормальность распределения данных определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка.

Экстракция и ферментативный гидролиз белков для протеомного анализа. На 7-е сутки проростки были заморожены в жидком азоте и подвержены диссекции на корни и побеги. Для масс-спектрометрического анализа было подготовлено по 6 проб для каждой группы G1–G5 (2 технических повтора подготовки

проб $\times$ 3 биологических повтора). Биологическим повтором называем число бумажных рулонов с семенами для проращивания. В нашем случае в каждой группе было 3 рулона по 50 растений. Бумажный рулон с семенами рассматривается как сильно упрощенная лабораторная модель поля. Для экстракции белков отдельно корни и отдельно побеги каждого биоповтора измельчили в криомельнице. Из полученных гомогенатов приготовили навески по 200 мг. Аликвоты измельченной ткани лизировали в растворе 50 мМ аммония бикарбоната (pH 7,8), содержащем 8 М мочевины и 2% натрия додецилсульфата, с использованием ультразвуковой гомогенизации (40% амплитуда; 20 с ВКЛ. $\times$ 10 с ВЫКЛ.; 2 мин рабочего времени) («QSonica Q125», США). Осаждение белков выполняли с использованием хлороформ-метанольной экстракции [21]. Концентрации белков измеряли колориметрическим методом, основанным на Биуретовой реакции, используя набор Pierce («Thermo Scientific», Германия). Белковый осадок растворяли в 50 мМ растворе аммония бикарбоната (pH 7,8); дисульфидные связи восстанавливали с помощью 10 мМ дитиотреитола и алкилировали с помощью 10 мМ йодацетамида, затем обрабатывали в течение 18 ч трипсином («Promega», США; для ВЭЖХ-МС), добавленным в соотношении 1/50 (w/v).

ВЭЖХ-МС1-анализ. Данные ВЭЖХ-МС1 были получены с использованием масс-спектрометра Orbitrap Fusion Lumos, оснащенного интерфейсом FAIMS Pro («Thermo Scientific», США), в сочетании с нанопоточной системой ВЭЖХ UltiMate 3000 («Thermo Fisher Scientific», Германия). Короткие хроматографические градиенты были реализованы, как описано ранее [6]. Для хроматографического разделения использовали предколонку μ -Precolumn C18 RepMap100 (неподвижная фаза диаметром 5 мкм и размером поры 100 Å, внутренний диаметр — 300 мкм, длина — 5 мм («Thermo Fisher Scientific»)) и самодельную аналитическую колонку (неподвижная фаза Reprosil-Pur диаметром 3 мкм, внутренний диаметр — 75 мкм, длина — 5 см). Подвижные фазы имели следующий состав: (А) — 0,1% муравьиной кислоты (МК) в воде; (В) — 80% ацетонитрила и 0,1% МК в воде. Для элюции пептидов использовали градиент В (5–35%) за 4,8 мин при скорости потока 1,5 мкл/мин. Общее время эксперимента, включая промывку колонки и уравнивание, составляло 7,5 мин. Сбор данных выполнялся в режиме сбора только MS1-спектров в диапазоне 375–1500 m/z при разрешении 120 000 (m/z = 200 Th), максималь-

ном значении накопленного заряда (Automatic Gain Control, AGC) $4 \cdot 10^5$ и максимальном времени накопления заряда 50 мс. Гидролизаты, растворенные в фазе А, вводили в хроматограф в количестве 1 мкл.

Обработка протеомных данных. Для обработки данных ВЭЖХ-МС1 использовали программу ms1searchpy [1] для идентификации и постпоисковой валидации белков. Поиск был выполнен с использованием канонической базы белков UniProt TrEMBL (организм *T. aestivum*, идентификатор 4565), соединенной с базой заведомо ложных белков, созданной путем случайной перестановки аминокислот в последовательностях белков из базы UniProt TrEMBL. Точность измерения массы иона в МС1 составляла ± 8 ppm, пропущенные сайты гидролиза не допускались, все цистеины предполагались карбоксиамидометилированными. Список идентифицированных белков был отфильтрован до 5% ложноположительных идентификаций методом «target-decoy» [24]. Программы Diffacto [25] и DirectMS1Quant [7] использовали для статистического анализа белков на основе интенсивностей ионов пептидов в масс-спектрах. Для результатов, полученных с помощью программы Diffacto, дифференциально регулированные белки отбирали согласно следующим критериям: $FDR < 10^{-10}$ и $|\log_2 FC| \geq 3,0$ (сравнение побеги/корни); $FDR < 5 \cdot 10^{-3}$ и $|\log_2 FC| \geq 1,32$ (сравнение побеги/побеги и корни/корни), где FDR — значение *p*-value с корректировкой на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга [26], FC — кратное изменение концентрации белка. Для результатов, полученных с помощью DirectMS1Quant, дифференциально-регулируемыми считались белки, удовлетворяющие $|\log_2 FC| \geq 3,0$ и $FDR \leq 0,05$ (сравнение побеги/корни); $|\log_2 FC| \geq 0,6$ и $FDR \leq 0,05$ (сравнение побеги/побеги и корни/корни). Визуализацию результатов количественного анализа выполняли с помощью программы QRePS [27], расчет метрики активности биологических процессов, GO Score, на основе протеомных данных выполняли, как описано ранее [27]. Аннотация функций белков была выполнена с использованием DeepGOPlus [28]. Для анализа генных онтологий (ГО) с пользовательской базой аннотаций использовали программу GOATOOLS [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проростки из семян, обработанных НЧ Fe $10^{-5}\%$ в полимерном пленкообразователе, характеризовались уменьшением средней длины

стеблей и корней. На рис. 1, а, в и д показаны результаты измерения длины стебля, длины максимального корня и суммарной длины корней в контрольных группах (G1 — необработанное зерно, G2 — зерно, обработанное раствором А) и опытных группах растений (G3 — НЧ Fe в концентрации $10^{-5}\%$ в растворе А; G4 — НЧ Fe в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А; G5 — FeSO_4 в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А). Для начальной оценки статистически значимых различий между группами был применен многомерный ранговый тест Краскела—Уоллиса без поправки на множественные сравнения. Тест показал, что медианы выборок отличаются (статистическая значимость: побеги — $p_{KW} = 3,22 \cdot 10^{-5}$; максимальный корень — $p_{KW} = 2,95 \cdot 10^{-19}$; сумма корней — $p_{KW} = 1,39 \cdot 10^{-20}$). Далее было выполнено попарное сравнение выборок с помощью рангового теста Манна—Уитни с поправкой на множественные сравнения методом Бонферрони (рис. 1, б, г и е). Результаты попарного сравнения показали, что обработка зерна полимерным пленкообразователем (ПП) в составе ПЭГ-400, Na-КМЦ и Na2-ЭДТА привела к статистически значимому увеличению средней длины стебля, максимального корня и суммарной длины корней по сравнению с необработанным зерном (G1). Добавление FeSO_4 в ПП для обработки зерна не сказалось на изменении длин стеблей и корней 7-дневных проростков (G5 по сравнению с контролем G2). При этом обработка зерна суспензией НЧ Fe в составе ПП показала статистически значимое уменьшение средней длины стебля, максимального корня и суммарной длины корней (G3 и G4 по сравнению с контролем G2).

Молекулярная диагностика задержки роста проростков, по данным ультрабыстрой хроматомасс-спектрометрии DirectMS1. Определение маркерных процессов биотического действия препаратов железа. Маркерными будем называть обогащения воспроизводимо регистрируемых биологических процессов, для которых, по возможности, наблюдается зависимость от концентрации железа в препарате и обогащение которого не зависит от метода анализа данных. В данной работе количественный анализ был выполнен двумя вычислительными алгоритмами: DirectMS1Quant [7] и Diffacto [25], чтобы убедиться в воспроизводимости результатов. DirectMS1Quant разработан специально для работы с данными ультрабыстрой хроматомасс-спектрометрии DirectMS1 и зарекомендовал себя как точный метод оценки кратных изменений концентраций белков. Алгоритм Diffacto отличается высокой чувствительностью к изменениям в протеомах, но за

счет более высокой доли ложноположительных результатов [30].

DirectMS1Quant: сравнение протеомов побегов относительно корней. На рис. 2 показаны результаты сравнения протеомов побегов относительно корней 7-дневных проростков пшеницы из одной и той же опытной группы. Данное сравнение выявило существенные отличия в регуляции белков, что является закономерным при сравнении тканей разных органов. Протеомные отличия между двумя типами тканей описывались дифференциальной регуляцией примерно 700 белков. Среди белков с повышенной регуляцией были найдены шаперонины, рибосомальные белки и АТР-синтазы хлоропластов, субъединицы митохондриальных АТР-синтаз, АТР-зависимые цинк-металлопротеазы, хлорофилл-связывающие белки, факторы элонгации митохондрий и хлоропластов, ферредоксины и многие другие. Белки с пониженной регуляцией были представлены альфа- и бета-амилазами, ингибиторами амилаз, различными белками защитного ответа на патогены, пероксидазами и др.

Анализ ГО для белков с повышенной регуляцией ($\log_2\text{FC} \geq 3$ и $\text{FDR} < 0,05$) не выявил зависимости обогащений биологических процессов от состава препарата для обработки семян, в том числе от концентрации железа (рис. 3, а). Рис. 3, а показывает, что в побегах обогащены процессы, связанные с фотосинтезом, регуляцией активности СОД, биосинтезом хлорофила, образованием соединений железа в комплексе с порфириновым (тетрапиррольным) кольцом из менее сложных предшественников, а также гликолиз и процессы из цикла трикарбоновых кислот. Обработка семян препаратом с FeSO_4 (G5) соответствует наибольшим значениям GO Score для процессов, связанных с фотосинтезом и регуляцией активности СОД, образованием хлорофила и соединений с порфириновым/тетрапиррольным кольцом, однако примерно на том же уровне это обогащение видно и в контрольных группах (G1 и G2). Для процессов, связанных с поглощением света фотосистемами I и II, наибольшими значениями GO Score характеризуется обработка НЧ Fe $10^{-5}\%$ (G3) и необработанный контроль (G1).

На рис. 3, б показаны биологические процессы, обогащенные на белках, чья регуляция в корнях выше, чем в побегах ($\log_2\text{FC} \leq -3,0$ и $\text{FDR} < 0,05$ на рис. 2). Среди них можно выделить группы процессов, связанные с ответом на токсичные вещества и метаболизм дисахаридов и полисахаридов (сахароза, крахмал и др.).

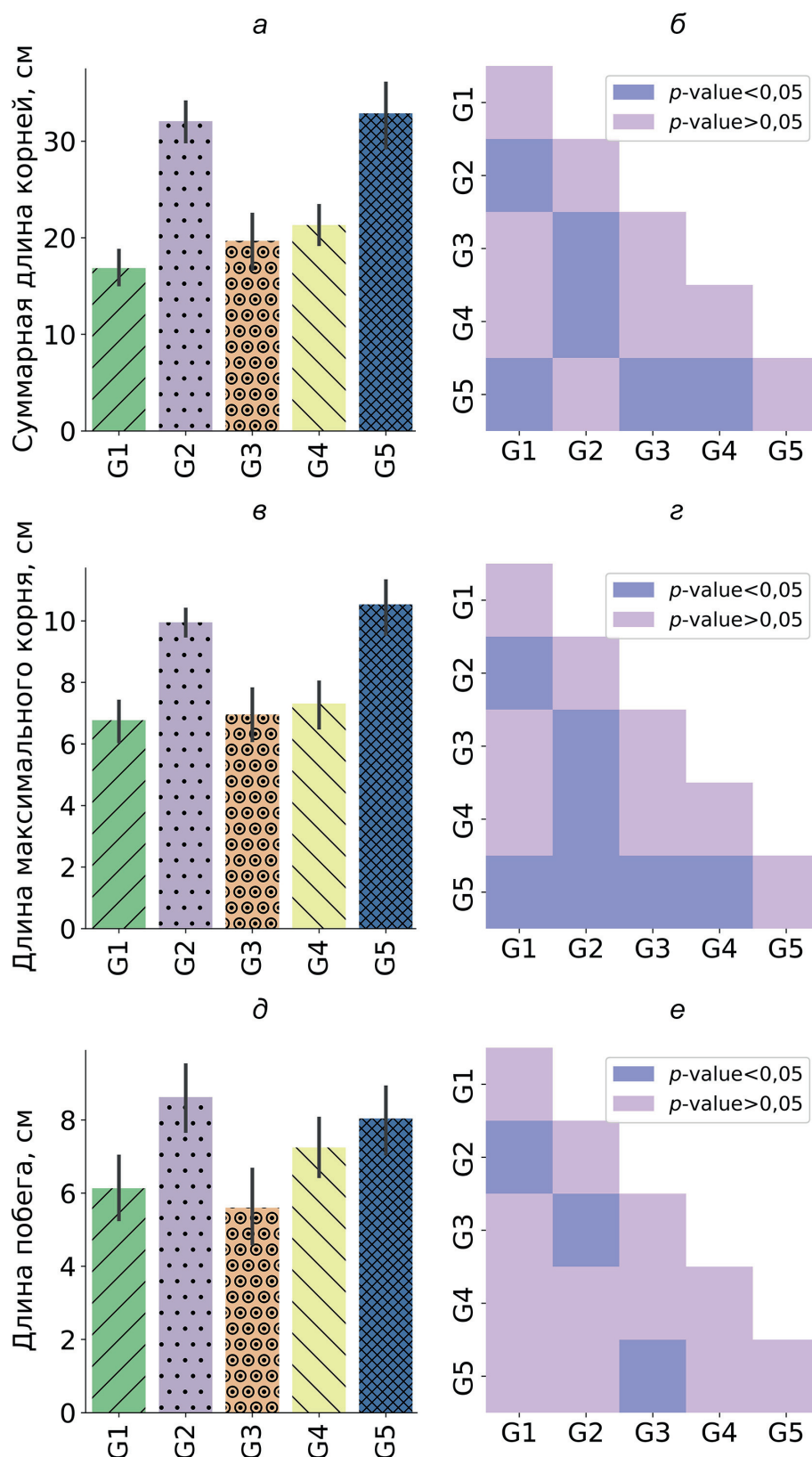


Рис. 1. Отличия морфометрических показателей (средние значения длины побега, длины максимального корня и суммарной длины корней) в 7-дневных проростках озимой пшеницы вследствие обработки препаратами железа. Средние значения и значения стандартных отклонений рассчитаны для значений из середины распределения, с 25-го по 75-й процентиль включительно (панели а, в и д). Статистический анализ выполняли с использованием критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони, p -value (панели б, з и е). Обозначения: G1 – необработанное зерно; G2 – зерно, обработанное раствором А; G3 – НЧ Fe в концентрации $10^{-5}\%$ в растворе А; G4 – НЧ Fe в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А; G5 – FeSO_4 в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А

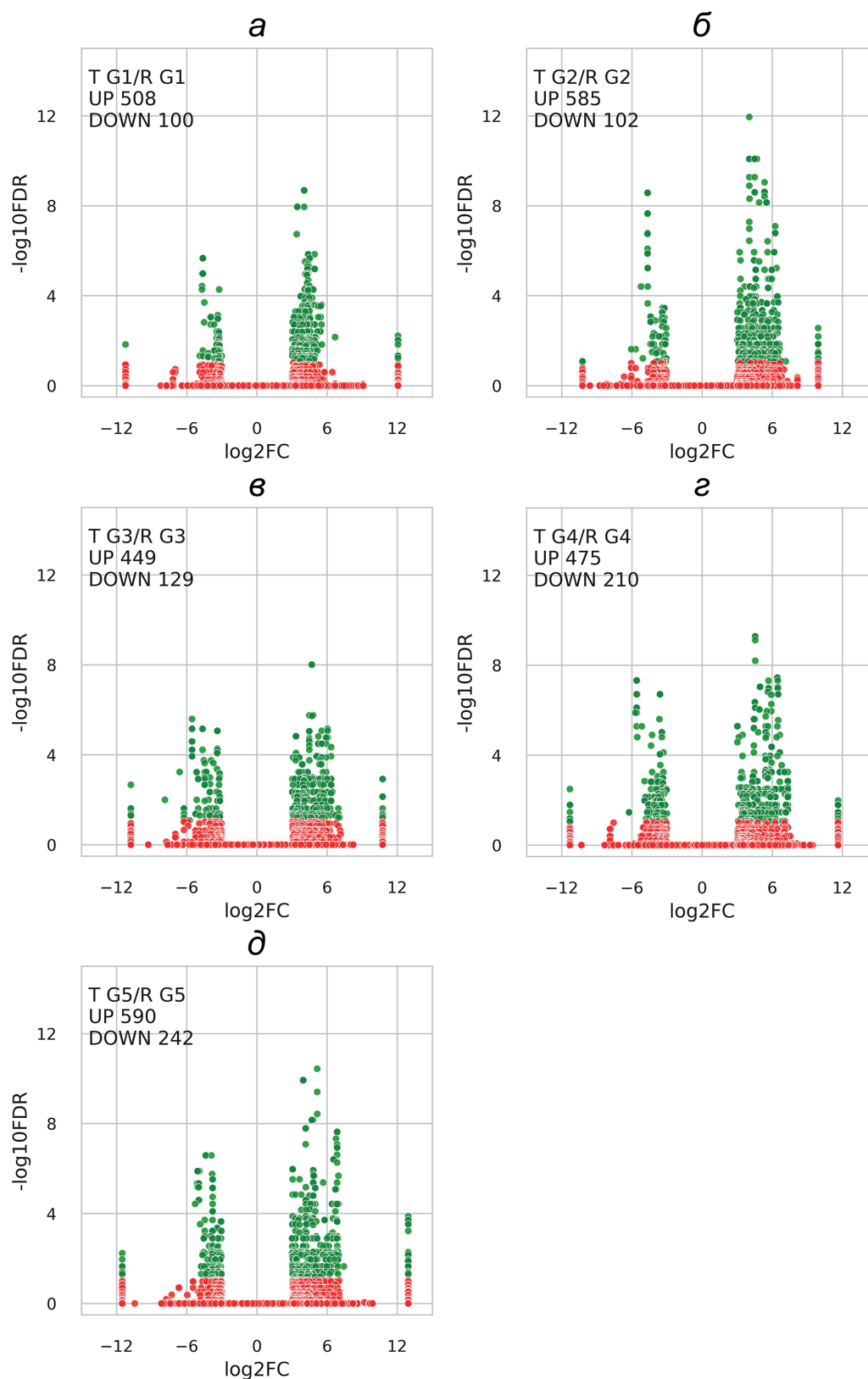


Рис. 2. Диаграммы рассеивания для попарных сравнений протеомов 7-дневных проростков озимой пшеницы при обработке семян препаратами на основе наночастиц и сульфата железа (обработка данных методом DirectMS1Quant [7]). Дифференциально регулированные белки удовлетворяют критериям $|\log_2FC| \geq 3,0$ и $FDR < 0,05$. Обозначения: G1 – необработанное зерно; G2 – зерно, обработанное раствором А; G3 – НЧ Fe в концентрации $10^{-5}\%$ в растворе А; G4 – НЧ Fe в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А; G5 – $FeSO_4$ в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А; FDR – статистическая значимость с коррекцией на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга, рассчитанная DirectMS1Quant; FC = T/R, где FC – кратное изменение количественного содержания белка в побегах (T) относительно корней (R)

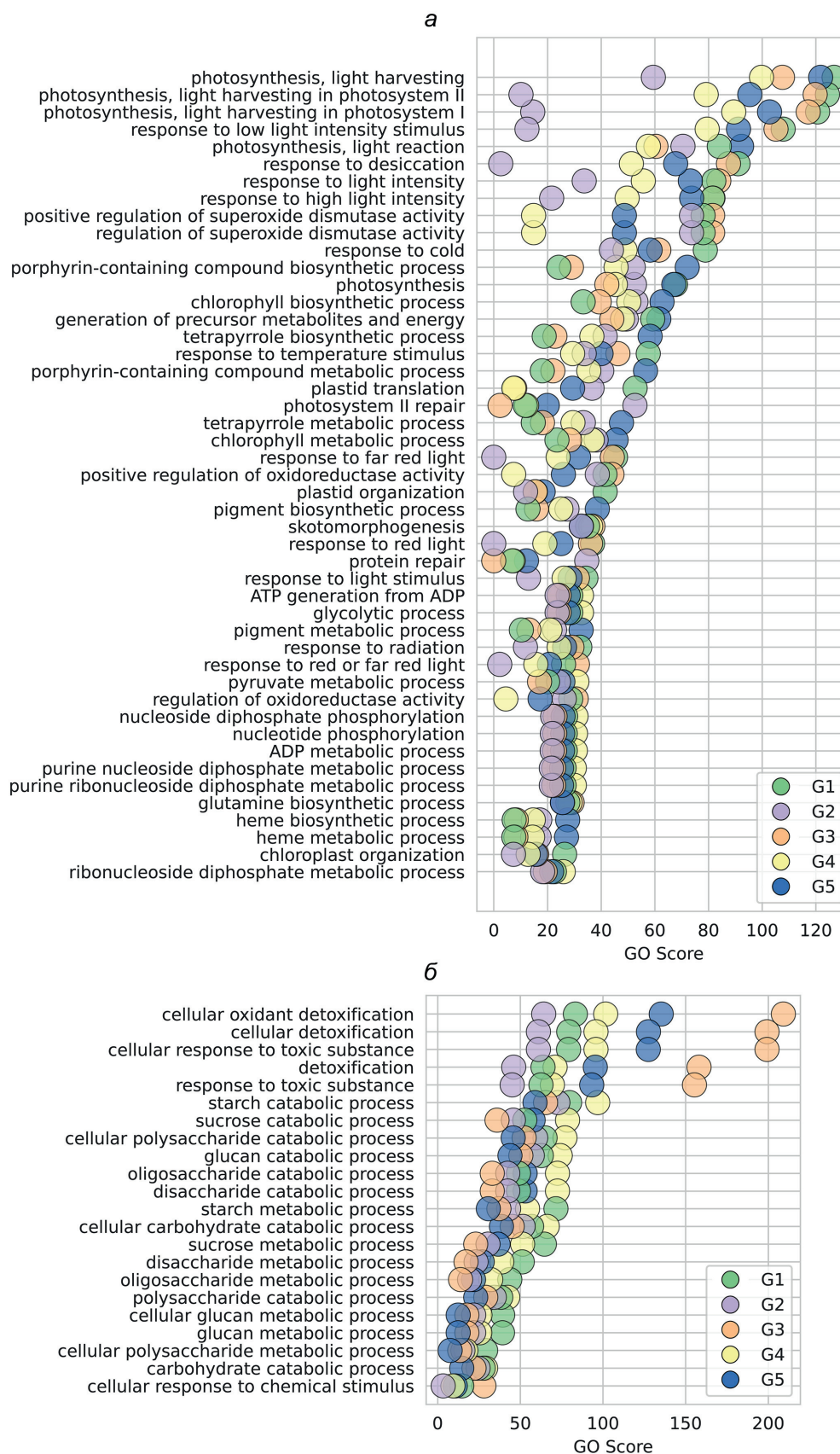


Рис. 3. Результаты анализа обогащений биологических процессов при различных типах обработки семян для генов, кодирующих дифференциально регулированные белки (метод DirectMS1Quant): *a* – процессы, обогащенные в побегах; *б* – процессы, обогащенные в корнях. GO Score = $\log_{10}(E) \times |\log_{10}(\text{FDR})|$, где *E* – обогащение биологического процесса, FDR – статистическая значимость обогащения с коррекцией на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга

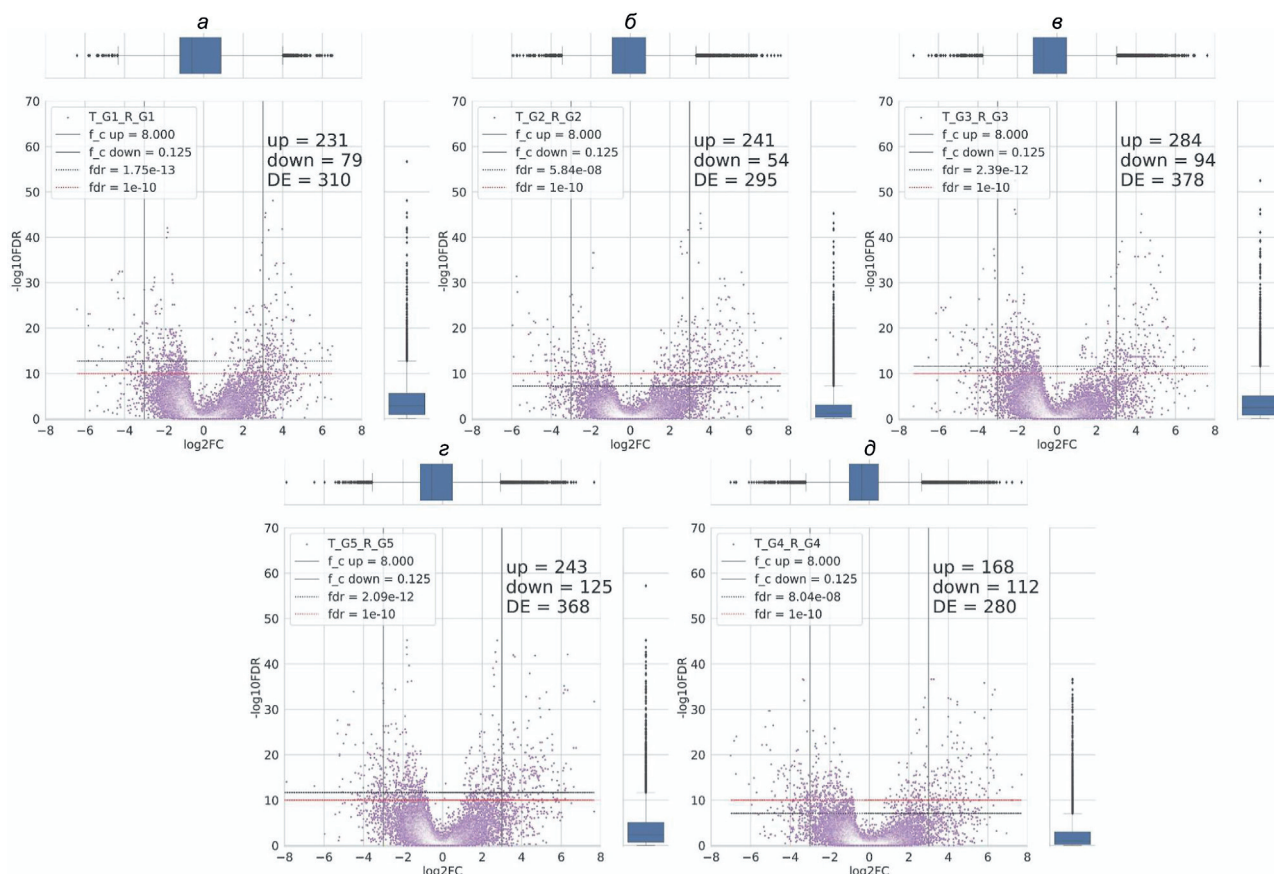


Рис. 4. Диаграммы рассеивания для попарных сравнений протеомов 7-дневных проростков озимой пшеницы при обработке семян препаратами на основе наночастиц и сульфата железа (обработка данных методом Diffacto). Дифференциально регулированные белки удовлетворяют критериям: $FDR < 10^{-10}$ и $|\log_2 FC| \geq 3,0$. Обозначения: G1 – необработанное зерно; G2 – зерно, обработанное раствором А; G3 – НЧ Fe в концентрации $10^{-5}\%$ в растворе А; G4 – НЧ Fe в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А; G5 – $FeSO_4$ в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А; FDR – статистическая значимость (рассчитано программой Diffacto [25]) с корректировкой на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга [26]; FC = T/R, где FC – кратное изменение количественного содержания белка в побегах (Т) относительно корней (R)

Для обработки НЧ Fe $10^{-5}\%$ (G3) обогащение процесса, снижающего токсичность вещества (*detoxification* на рис. 3, б) оказалось на порядок выше, чем в контрольных группах (G1 и G2). Кроме того, для этого процесса наблюдалась концентрационная зависимость от процентного содержания железа в препарате от максимальной к минимальной (НЧ $10^{-5}\%$, соль $10^{-7}\%$, НЧ $10^{-7}\%$, 0%, 0%). По обогащению метаболизма полисахаридов в опытных и контрольных группах концентрационной зависимости не наблюдалось.

DirectMS1Quant: побеги и корни с обработкой НЧ и сульфатом железа относительно необработанного контроля. Попарное сравнение протеомов побегов, принадлежавших растениям из опытных групп G2, G3, G4 и G5, с контрольной группой G1 показало полное отсутствие статистически значимых отличий (рис. П1, а–г в Приложении). Малый отклик был зарегистрирован при сравнении протеомов корней из опытных групп G2, G3, G4 и G5

с контрольной группой G1: 3↑ и 32↓ (G2/G1), 9↓ (G3/G1), 7↓ (G4/G1), 55↑ и 8↓ (G5/G1), где ↑ и ↓ обозначают повышенную и пониженную регуляцию соответственно (рис. П1, д–з в Приложении). Среди дифференциально регулированных белков были представлены альфа- и бета-амилазы, субъединицы ингибиторов амилаз, регуляторы активности ферментов, пероксиредоксины, белки теплового шока и стресса. Анализ ГО выявил обогащение метаболизма дисахаридов и полисахаридов, в том числе крахмала, для белков с повышенной регуляцией в сравнении G5/G1 и G2/G1 (рис. П1, и в Приложении). Данный результат может свидетельствовать о том, что отклик на предпосевную обработку препаратами железа в 7-дневных проростках достаточно слабый, чтобы при таком выборе относительного контроля применяемый экспериментальный комплекс (DirectMS1 [1]) или метод количественного анализа интенсивностей ионов пептидов (DirectMS1Quant [7]) могли зарегистрировать

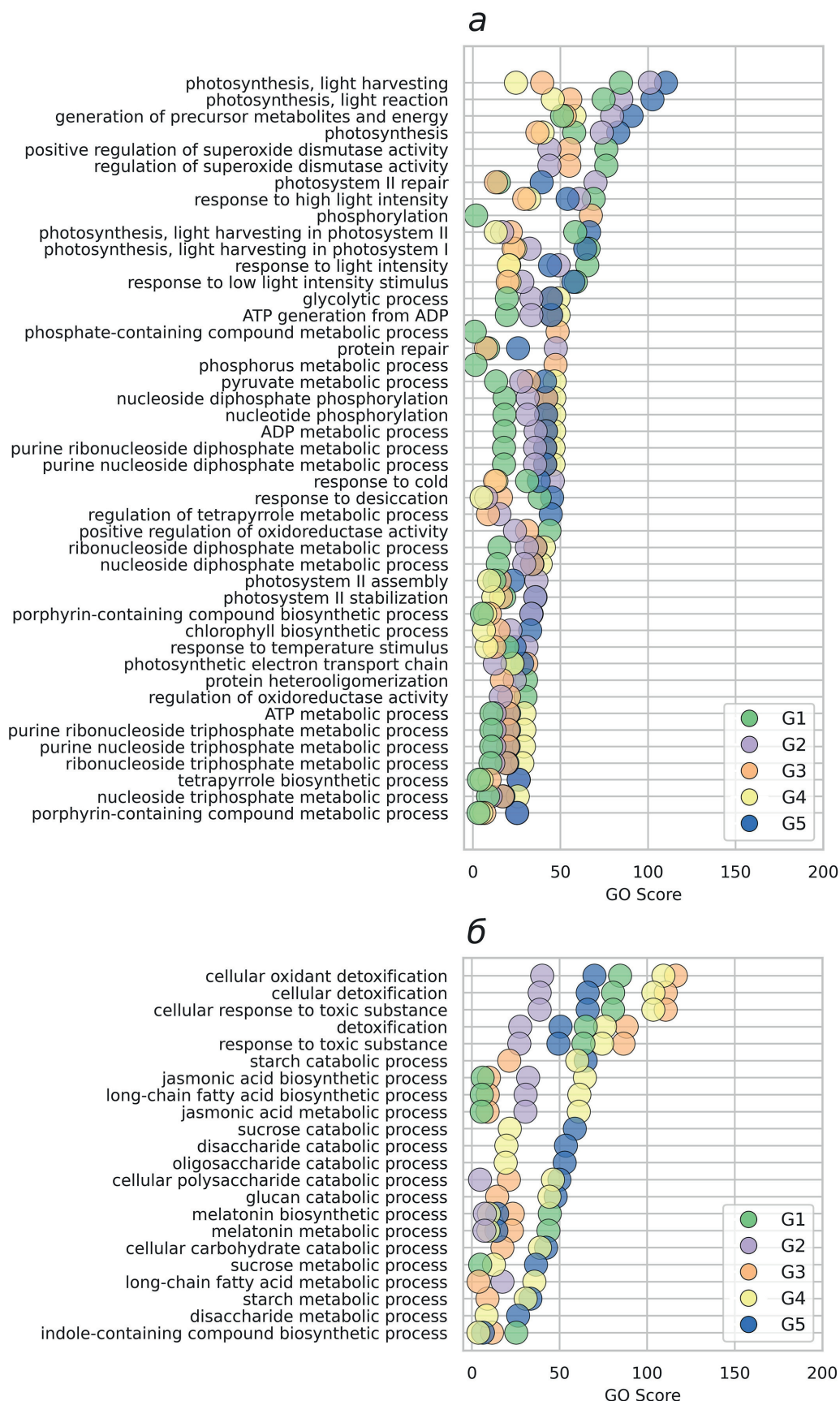


Рис. 5. Результаты анализа обогащений биологических процессов при различных типах обработки семян для генов, кодирующих дифференциально регулированные белки (метод Diffacto): *а* - побеги, *б* - корни. $GO\ Score = \log_{10}(E) \times |\log_{10}(FDR)|$, где E – обогащение биологического процесса, FDR – статистическая значимость обогащения с корректировкой на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга

изменения в числе молекул белков. По этой причине количественный анализ интенсивностей также был выполнен более чувствительным методом: Diffacto [25].

Diffacto: сравнение протеомов побегов относительно корней. На рис. 4 и рис. 5 показаны результаты обработки данных ультрабыстрого хроматомасс-спектрометрического профилирования протеомов побегов относительно корней 7-дневных проростков пшеницы методом Diffacto. Диаграммы рассеивания, построенные для попарных сравнений протеомов побегов относительно корней 7-дневных проростков пшеницы из одной и той же опытной группы (рис. 4), также показали существенную разницу в протеомах, что соответствует сравнению разных типов тканей. Анализ ГО для белков с $\log_2FC \geq 3,0$ и $FDR < 10^{-10}$ показал обогащение таких же процессов, как и в случае с DirectMS1Quant: фотосинтез, регуляция активности СОД, синтез хлорофила и соединений с порфириновым/тетрапиррольным кольцом и др. (рис. 5, а). При этом топовые обогащения процессов, отсортированные по значениям GO Score, совпадали для разных типов обработки семян (*photosynthesis, regulation of superoxide dismutase activity, chlorophyll biosynthetic process* и др.). Вероятную зависимость от концентрации железа можно отметить только для гликолиза и родственных ему процессов (G5 — $FeSO_4$ $10^{-7}\%$, G4 — НЧ $10^{-7}\%$, G2 — 0%, G1 — 0%), однако для G3 — НЧ $10^{-5}\%$ обогащение не обнаружилось. При этом в группах с обработкой НЧ Fe (G3 и G4) по сравнению с контролями (G2 и G1) и $FeSO_4$ (G5) процессы фотосинтеза имеют меньшие значения GO Score, что трактуется, скорее, как «негативный» эффект.

На рис. 5, б показаны результаты анализа обогащений биологических процессов, в которые вовлечены белки, чья регуляция в корнях выше, чем в побегах ($\log_2FC \leq -3,0$ на рис. 4). Здесь также, как и на рис. 3, б, отметим воспроизводимость обогащения метаболизма полисахаридов и ответа на токсичные вещества, для которого наблюдается зависимость от состава препарата и концентрации железа (НЧ $10^{-5}\%$, НЧ $10^{-7}\%$, 0%, $FeSO_4$ $10^{-7}\%$, 0%).

Diffacto: сравнение протеомов побегов относительно необработанного контроля. Сравнение протеомов побегов с помощью Diffacto выявило следующее число дифференциально регулированных белков: 21↑ (G2/G1), 35↑ и 23↓ (G4/G1), 213↑ и 48↓ (G5/G1), где ↑ и ↓ обозначают повышение и понижение относительной концентрации белков соответственно (рис. П2, а–г в Приложении). Анализ ГО показал отсутствие пересекающихся обога-

щений между опытными и контрольными группами растений, а значения GO Score у обогащений не превышали 20, что трактуется как слабое обогащение, похожее на случайный шум (рис. П3, а и б в Приложении). Единственным значимым обогащением может считаться защитный отклик в побегах группы G5 на присутствие грамположительных бактерий (рис. П3, а в Приложении). В целом, данный результат хорошо согласуется с результатами анализа методом DirectMS1Quant (рис. П2 в Приложении).

Diffacto: сравнение протеомов корней относительно необработанного контроля. Сравнение протеомов корней выявило следующее число дифференциально регулированных белков: 54↑ и 83↓ (G2/G1), 169↑ и 291↓ (G3/G1), 225↑ и 158↓ (G4/G1), 532↑ и 278↓ (G5/G1), где ↑ и ↓ обозначают повышенную и пониженную регуляцию соответственно (рис. П2, д–з в Приложении). Анализ ГО на белках с повышенной регуляцией показал для корней обогащение биологических процессов, связанных с метаболизмом полисахаридов и дисахаридов (G4/G1, G5/G1 и G3/G1), регуляцией активности эндопептидазы (G2/G1, G5/G1, G4/G1) и ответом на воспаление и цитокины (G2/G1, G4/G1) (рис. П3, в в Приложении). На белках с пониженной регуляцией был зарегистрирован защитный отклик на бактерии и фосфорилирование белков (G3/G1) (рис. П3, г в Приложении). Данный результат согласуется с результатами, представленными на рис. 3, б и рис. 5, б. При этом метаболизм полисахаридов в корнях может быть рассмотрен как маркер биотического действия предпосевной обработки зерна препаратами железа в рамках введенных ранее определений. Отметим также, что, по совокупности полученных данных, ответ на токсичные вещества, наиболее ярко выраженный в группе с обработкой НЧ Fe $10^{-5}\%$ (рис. 3, б и рис. 5, б), может быть связан с прорастанием колоний микроорганизмов в субстрате для проращивания семян, что требует дополнительных исследований.

Реакция на токсины в корнях подтверждается измерением активности СОД. Из протеомных данных следует, что эффекты от обработки семян могут быть связаны с изменениями ферментативных систем, участвующих в поддержании окислительно-восстановительного статуса клетки. Для независимого подтверждения этого наблюдения в побегах и корнях 7-дневных проростков пшеницы была измерена активность СОД, ферментного антиоксиданта, обеспечивающего защиту растения от повреждающего действия активных форм кисло-

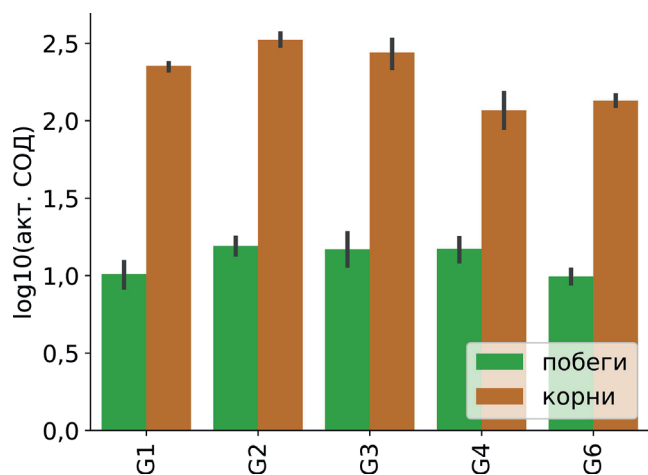


Рис. 6. Активность СОД в свежих побегах и корнях 7-дневных проростков пшеницы. Обозначения: G1 — необработанное зерно; G2 — зерно, обработанное раствором А; G3 — НЧ Fe в концентрации $10^{-5}\%$ в растворе А; G4 — НЧ Fe в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А; G5 — НЧ Fe в концентрации $10^{-6}\%$ в растворе А. Активность СОД (в отн. ед. на мг белка) вычисляли, согласно рекомендациям производителя (T-SOD activity assay, «Elabsience»)

рода (АФК), которые, в том числе, образуются в результате работы фотосистем I и II и неблагоприятных факторов окружающей среды. Измерения показали, что независимо от обработки семян активность СОД в корнях выше, чем в побегах, как минимум на один порядок. При этом в проростках, полученных из семян, обработанных ПП и НЧ Fe, активность СОД увеличилась относительно необработанного контроля G1 (побеги G2–G4; корни G2–G3 на рис. 6). Снижение активности СОД по сравнению с контролем G1 наблюдалось в тканях корней, проростков из семян, обработанных более низкими концентрациями НЧ Fe $10^{-6}\%$ и НЧ Fe $10^{-7}\%$ (корни G4 и G5 на рис. 6).

По совокупности данных мы полагаем, что высокие значения активности СОД в корнях и разброс значений относительно контрольной группы (отсутствие корреляции с типом обработки семян) могут быть связаны с окислительным стрессом в корнях, который возник в результате действия неблагоприятных факторов внешней среды.

Обработка семян препаратами с НЧ Fe не влияла на содержание железа в растительных тканях. Сравнительный анализ концентраций микроэлементов в растительных тканях (проросшее зерно на третьи сутки, побеги и корни 7-дневных проростков) показал, что с течением времени наблюдается увеличение содержания микроэлементов (проанализировано 25 элементов, в том числе железо) (табл. П1, а в Приложении). По количественным показателям такое накопление микроэлементов воз-

можно только из окружающей среды (субстрат, использованный для проращивания, и вода для полива) и не коррелирует с обработкой семян. При сравнении разных типов обработки для одного и того же типа ткани (табл. П1, а в Приложении) видно, что введение НЧ Fe в полимерный пленкообразователь для обработки семян перед проращиванием не приводило к достоверному увеличению содержания железа по сравнению с необработанным контролем ни в проросших семенах, ни в побегах и корнях 7-дневных проростков. Обратим внимание, что средние концентрации микроэлементов Na, Pb, Cd, Co, Sn, Hg, As увеличились в 12 и более раз в корнях по сравнению с содержанием этих элементов в проросших семенах. Сравнение концентраций Pb, Cd и Hg (среднее по G1–G5 для каждого типа ткани) с гигиеническими требованиями СанПин 2.3.2.1078-01 (табл. П1, б в Приложении) дает основание предполагать, что накопленные в корнях концентрации токсичных элементов могли стать причиной окислительного стресса. Отметим, что это наблюдение коррелирует с высокими значениями активности СОД, которые в корнях на один порядок выше, чем в побегах, и с обогащением процессов детоксикации в корнях, согласно протеомным данным.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе был апробирован метод ультра-быстрого хроматомасс-спектрометрического профилирования [1, 6, 7] для количественного анализа протеомов растительных тканей. Объектами исследования были побеги и корни 7-дневных проростков мягкой озимой пшеницы, семена которой были обработаны перед проращиванием препаратами наночастиц железа (II, III) или сульфата железа (II). В тканях побегов была показана дифференциальная регуляция белков, вовлеченных в процессы фотосинтеза, регуляции активности СОД, гликолиза, биосинтеза хлорофилла, а также процессов из цикла трикарбоновых кислот. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными. В частности, в недавнем исследовании влияния наночастиц железа на рост побегов засухоустойчивых и солеустойчивых сортов было показано, что при однократном внесении в почву раствора наночастиц дифференциальная экспрессия белков в побегах обоих сортов в основном связана с фотосинтезом и зависела от сорта культуры [14]. Также было показано увеличение количества белков, связанных с деградацией

крахмала, гликолизом и циклом трикарбонных кислот при корневой подкормке [21]. По нашим данным, увеличение количества белков, вовлеченных в метаболизм дисахаридов и полисахаридов, в том числе крахмала, наблюдалось в тканях корней.

Результаты морфометрии показали, что группы с обработкой ПП, FeSO_4 $10^{-7}\%$ и НЧ Fe $10^{-7}\%$ характеризовались одинаковой средней длиной стебля и максимального корня по сравнению с необработанным контролем и обработкой препаратом с НЧ Fe $10^{-5}\%$ (рис. 1, *в–е*). Соответственно, группа с обработкой ПП в среднем выросла лучше, чем необработанный контроль, а добавление соединений железа в ПП для обработки семян либо не сказывалось на росте растений (FeSO_4 $10^{-7}\%$ и НЧ Fe $10^{-7}\%$), либо способствовало уменьшению длины стеблей и корней (НЧ Fe $10^{-5}\%$). Возможно, имеются другие причины, повлиявшие на развитие проростков. Так, протеомный анализ не выявил зависимость обогащения биологических процессов от содержания железа в составе препаратов, за исключением ответа на токсичные вещества в корнях. Однако остальные процессы регистрировались воспроизводимым образом (рис. 3, *б* и рис. 5, *б*), что дает основание предположить наличие слабых эффектов от обработки, на грани чувствительности метода. Обработка семян препаратами железа в составе ПП потенциально способствует фотосинтезу, регуляции активности СОД и гликолизу в побегах и метаболизму дисахаридов и полисахаридов в корнях. Протеомный анализ также выявил, что при сравнении НЧ Fe $10^{-5}\%$ относительно необработанного контроля наблюдался защитный ответ на присутствие микроорганизмов (рис. П3, *д* в Приложении). Защитный ответ представлен сигнатурой белков-гомологов, среди которых Powdery mildew resistance protein и Rx N-terminal domain-containing protein, контролирующие распознавание патогенов и защитный отклик на них. В группах с обработкой ПП и НЧ Fe $10^{-7}\%$ при сравнении с необработанным контролем наблюдался ответ на воспаление, представленный сигнатурами авенин-подобных белков, обладающих антигрибковой активностью [31]. При этом защитный ответ на токсичные вещества сильнее всего был выражен в группах с обработкой НЧ Fe $10^{-5}\%$ и НЧ Fe $10^{-7}\%$, что на данный момент не поддается однозначной трактовке и требует дополнительных экспериментов. Например, необходимо сравнение с 7-дневными проростками из семян, подвергшихся обработке противогрибковыми препаратами, так как не исключено,

что малый эффект от обработки мог быть скрыт влиянием фитопатогенов. С этой точки зрения интерес также представляет протеомный анализ семян на третьи сутки прорастания, так как такой эксперимент даст представление о биологических процессах при прорастании корешка, когда с момента обработки семян пройдет меньше времени и будет минимизировано возможное влияние фитопатогенов, даже если полностью от них избавиться не удастся. Отметим, что измерения активности СОД подтверждают наличие в корнях окислительного стресса для всех контрольных и тестовых групп растений, а анализ общего содержания микроэлементов в тканях растений выявил вероятную контаминацию токсичными элементами (Cd, Pb, Hg среди наиболее вероятных кандидатов) как еще одну возможную причину активации в корнях процессов детоксикации, представленных гомологами пероксидаз.

Тем не менее воспроизводимое детектирование белков, вовлеченных в обогащенные процессы, предполагает, что их можно использовать в качестве молекулярных маркеров при тестировании новых составов препаратов для обработки семян, листовой и корневой подкормки. Мы проанализировали совокупности белков, на которых, по нашим данным, наблюдалось обогащение процессов фотосинтеза, биосинтеза порфирин-содержащих соединений и хлорофилла, регуляции активности СОД, гликолиза, метаболизма полисахаридов и др. (табл. П2 в Приложении). Совокупности белков, зарегистрированные хотя бы в трех из пяти групп образцов, рассматриваются нами как потенциальная молекулярная сигнатура, по экспрессии которой возможно отслеживать влияние состава препарата на фотосинтез, гликолиз и регуляцию активности СОД в побегах (табл. П2 в Приложении). Также хотелось бы обратить внимание на белки, вовлеченные в процессы биосинтеза соединений с порфириновым/тетрапирольным кольцом. Обогащению данных процессов сопутствовало также обогащение процессов, связанных с биосинтезом гема (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0006783>). Биосинтез гема был зарегистрирован слабо, зависимости от концентрации железа не наблюдалось (рис. 3, *б*), однако процесс имеет непосредственное отношение к составу испытываемых препаратов и может представлять собой интерес. Терминальным ферментом пути биосинтеза гема является феррохелатаза, широко распространенная в природе, в том числе в хлоропластах и митохондриях высших растений (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR019772/>) [32–34]. Фермент

катализирует присоединение двухвалентного железа в кольцо протопорфирина с образованием протогема. Целенаправленное исследование активности феррохелатазы в зависимости от особенностей сорта злаковой культуры, условий роста и состава препарата для предпосевной обработки также представляется интересным направлением. В дальнейших исследованиях планируется расширить коллекцию протеомных данных по различным сортам пшеницы и типам обработки семян, чтобы проверить и подтвердить результаты текущего исследования, а также дополнить молекулярные данные для биосинтеза хлорофилла, гема, тетрапиррол- и порфирин-содержащих соединений.

Метод ультрабыстрого протеомного профилирования DirectMS1 продемонстрировал высокий потенциал для молекулярной диагностики процессов, происходящих в растительных тканях, включая не только влияние обработки препаратами, но и определение возможной контаминации. В комбинации с другими методами исследования предложенный подход является важным источником информации при исследовании молекулярных механизмов действия препаратов и факторов внешней среды на живые системы.

Вклад авторов. И.А. Тарасова — концепция и руководство работой; Т. Кусаинова, Д.Д. Емеева, Е.М. Казакова, И.П. Ольховская, О.А. Богословская, М.Л. Кусков, В.А. Горшков — проведение экспериментов; Ф. Кьелдсен, А.Н. Жигач, Н.Н. Глушенко, И.А. Тарасова — обсуждение результатов исследования; И.А. Тарасова, И.П. Ольховская, Н.Н. Глушенко — написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-26-00109).

Благодарности. Авторы выражают благодарность к.ф.-м.н. Ольге Жигалиной и Дмитрию Хмеленину (Институт кристаллографии им. Шубникова ФНЦ «Кристаллография и фотоника» РАН) за сбор высококачественных ПЭМ-изображений наночастиц железа, а также к.т.н. Надежде Березкиной (ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семёнова РАН) за профессиональную работу и выдающееся усердие при обработке и измерении более 5000 ПЭМ-изображений частиц. И.А.Т. благодарит к.ф.-м.н. Марка Иванова и к.ф.-м.н. Михаила Горшкова за дискуссии в области прикладных аспектов метода DirectMS1 и всех волонтеров за неоценимую помощь в извлечении проростков пшеницы из субстрата и проведении ручных морфометрических измерений: к.ф.-м.н. Марина Придатченко, к.ф.-м.н. Максим Бражников, Артур Яблоков, Валерий Постоенко, Иван Федоров, Лейла Гарибова, Иван Емеев и Леонид Бражников. Научный коллектив выражает глубокую признательность проф. Виктору Згоде за реализацию метода ультрабыстрой хроматомасс-спектрометрии на оборудовании ЦКП «Протеом человека» в ИБМХ им. В.Н. Ореховича.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ivanov, M. V., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Tarasova, I. A., Levitsky, L. I., Lobas, A. A., Solovyeva, E. M., Pridatchenko, M. L., Kjeldsen, F., and Gorshkov, M. V. (2020) DirectMS1: MS/MS-Free identification of 1000 proteins of cellular proteomes in 5 minutes, *Anal. Chem.*, **92**, 4326-4333, doi: 10.1021/acs.analchem.9b05095.
2. Ivanov, M. V., Tarasova, I. A., Levitsky, L. I., Solovyeva, E. M., Pridatchenko, M. L., Lobas, A. A., Bubis, J. A., and Gorshkov, M. V. (2017) MS/MS-free protein identification in complex mixtures using multiple enzymes with complementary specificity, *J. Proteome Res.*, **16**, 3989-3999, doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00365.
3. Wang, X., Shen, S., Rasam, S. S., and Qu, J. (2019) MS1 ion current-based quantitative proteomics: a promising solution for reliable analysis of large biological cohorts, *Mass Spectrom. Rev.*, **38**, 461-482, doi: 10.1002/mas.21595.
4. Meyer, J. G., Niemi, N. M., Pagliarini, D. J., and Coon, J. J. (2020) Quantitative shotgun proteome analysis by direct infusion, *Nat. Methods*, **17**, 1222-1228, doi: 10.1038/s41592-020-00999-z.
5. Demichev, V., Messner, C. B., Vernardis, S. I., Lilley, K. S., and Ralser, M. (2020) DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput, *Nat. Methods*, **17**, 41-44, doi: 10.1038/s41592-019-0638-x.
6. Ivanov, M. V., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Abdrakhimov, D. A., Kjeldsen, F., and Gorshkov, M. V. (2021) Boosting MS1-only proteomics with machine learning allows 2000 protein identifications in single-

- shot human proteome analysis using 5 min HPLC gradient, *J. Proteome Res.*, **20**, 1864-1873, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00863.
7. Ivanov, M. V., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Tarasova, I. A., Levitsky, L. I., Solovyeva, E. M., Lipatova, A. V., Kjeldsen, F., and Gorshkov, M. V. (2022) DirectMS1Quant: ultrafast quantitative proteomics with MS/MS-free mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **94**, 13068-13075, doi: 10.1021/acs.analchem.2c02255.
 8. Kashyap, P. L., Kumar, S., Jasrotia, P., Singh, D. P., and Singh, G. P. (2020) Nanotechnology in Wheat Production and Protection, in *Environmental Nanotechnology Volume 4* (Dasgupta, N., Ranjan, S., and Lichtfouse, E., eds) Springer International Publishing, Cham, pp. 165-194, doi: 10.1007/978-3-030-26668-4_5.
 9. Shang, Y., Hasan, M. K., Ahammed, G. J., Li, M., Yin, H., and Zhou, J. (2019) Applications of nanotechnology in plant growth and crop protection: a review, *Molecules*, **24**, 2558, doi: 10.3390/molecules24142558.
 10. Paramo, L. A., Feregrino-Pérez, A. A., Guevara, R., Mendoza, S., and Esquivel, K. (2020) Nanoparticles in agroindustry: applications, toxicity, challenges, and trends, *Nanomaterials*, **10**, 1654, doi: 10.3390/nano10091654.
 11. Zhao, L., Lu, L., Wang, A., Zhang, H., Huang, M., Wu, H., Xing, B., Wang, Z., and Ji, R. (2020) Nanobiotechnology in agriculture: use of nanomaterials to promote plant growth and stress tolerance, *J. Agric. Food Chem.*, **68**, 1935-1947, doi: 10.1021/acs.jafc.9b06615.
 12. Husen, A., and Siddiqi, K. S. (2014) Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application, *Nanoscale Res. Lett.*, **9**, 229, doi: 10.1186/1556-276X-9-229.
 13. Khot, L. R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R., and Schuster, E. W. (2012) Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review, *Crop Prot.*, **35**, 64-70, doi: 10.1016/j.cropro.2012.01.007.
 14. Yasmeen, F., Raja, N. I., Razzaq, A., and Komatsu, S. (2016) Gel-free/label-free proteomic analysis of wheat shoot in stress tolerant varieties under iron nanoparticles exposure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, 1586-1598, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.08.009.
 15. Du, W., Yang, J., Peng, Q., Liang, X., and Mao, H. (2019) Comparison study of zinc nanoparticles and zinc sulphate on wheat growth: from toxicity and zinc biofortification, *Chemosphere*, **227**, 109-116, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.168.
 16. Das, C. K., Srivastava, G., Dubey, A., Roy, M., Jain, S., Sethy, N. K., Saxena, M., Harke, S., Sarkar, S., Misra, K., Singh, S. K., Bhargava, K., Philip, D., and Das, M. (2016) Nano-iron pyrite seed dressing: a sustainable intervention to reduce fertilizer consumption in vegetable (beetroot, carrot), spice (fenugreek), fodder (alfalfa), and oilseed (mustard, sesamum) crops, *Nanotechnol. Environ. Eng.*, **1**, 2, doi: 10.1007/s41204-016-0002-7.
 17. Yuan, J., Chen, Y., Li, H., Lu, J., Zhao, H., Liu, M., Nechitaylo, G. S., and Glushchenko, N. N. (2018) New insights into the cellular responses to iron nanoparticles in *Capsicum annuum*, *Sci. Rep.*, **8**, 3228, doi: 10.1038/s41598-017-18055-w.
 18. Yoon, H., Kang, Y.-G., Chang, Y.-S., and Kim, J.-H. (2019) Effects of zerovalent Iron nanoparticles on photosynthesis and biochemical adaptation of soil-grown *Arabidopsis thaliana*, *Nanomaterials (Basel)*, **9**, 1543, doi: 10.3390/nano9111543.
 19. Sharma, J. K., Sihmar, M., Santal, A. R., and Singh, N. P. (2019) Impact assessment of major abiotic stresses on the proteome profiling of some important crop plants: a current update, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **35**, 126-160, doi: 10.1080/02648725.2019.1657682.
 20. Hossain, Z., Yasmeen, F., and Komatsu, S. (2020) Nanoparticles: synthesis, morphophysiological effects, and proteomic responses of crop plants, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3056, doi: 10.3390/ijms21093056.
 21. Yasmeen, F., Raja, N. I., Razzaq, A., and Komatsu, S. (2017) Proteomic and physiological analyses of wheat seeds exposed to copper and iron nanoparticles, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1865**, 28-42, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.10.001.
 22. Leipunsky, I. O., Zhigach, A. N., Kuskov, M. L., Berezkina, N. G., Afanasenkova, E. S., Kudrov, B. V., Lopez, G. W., Vorobjeva, G. A., and Naumkin, A. V. (2019) Synthesis of TiH₂ nanopowder via the Guen-Miller flow-levitation method and characterization, *J. Alloys Compd.*, **778**, 271-279, doi: 10.1016/j.jallcom.2018.11.088.
 23. Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., van der Walt, S. J., Brett, M., Wilson, J., Millman, K. J., Mayorov, N., Nelson, A. R. J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., et al. (2020) SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python, *Nat. Methods*, **17**, 261-272, doi: 10.1038/s41592-019-0686-2.
 24. Elias, J. E., and Gygi, S. P. (2010) Target-Decoy Search Strategy for Mass Spectrometry-Based Proteomics, in *Proteome Bioinformatics* (Hubbard, S. J., and Jones, A. R., eds) Humana Press, Totowa, NJ, pp. 55-71, doi: 10.1007/978-1-60761-444-9_5.
 25. Zhang, B., Pirmoradian, M., Zubarev, R., and Käll, L. (2017) Covariation of peptide abundances accurately reflects protein concentration differences, *Mol. Cell. Proteomics*, **16**, 936-948, doi: 10.1074/mcp.O117.067728.
 26. Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.*, **57**, 289-300, doi: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
 27. Kazakova, E. M., Solovyeva, E. M., Levitsky, L. I., Bubis, J. A., Emekeeva, D. D., Antonets, A. A., Nazarov, A. A., Gorshkov, M. V., and Tarasova, I. A. (2022) Proteomics-based scoring of cellular response to stimuli for improved characterization of signaling pathway activity, *Proteomics*, **23**, e2200275, doi: 10.1002/pmic.202200275.

28. Kulmanov, M., and Hoehndorf, R. (2020) Deep-
GOPlus: improved protein function prediction from
sequence, *Bioinformatics*, **36**, 422-429, doi: 10.1093/
bioinformatics/btz595.
29. Klopfenstein, D. V., Zhang, L., Pedersen, B. S., Ra-
mírez, F., Warwick Vesztrocy, A., Naldi, A., Mungall,
C. J., Yunes, J. M., Botvinnik, O., Weigel, M., Dam-
pier, W., Dessimoz, C., Flick, P., and Tang, H. (2018)
GOATOOLS: A python library for gene ontology
analyses, *Sci. Rep.*, **8**, 10872, doi: 10.1038/s41598-
018-28948-z.
30. Габдрахманов И. Т., Горшков М. В., Тарасова
И. А. (2021) Клеточный ответ на стресс в панорам-
ной протеомике: контроль ложноположительных
результатов, *Биохимия*, **86**, 395-408, doi: 10.31857/
S0320972521030088.
31. Zhang, Y., Hu, X., Islam, S., She, M., Peng, Y.,
Yu, Z., Wylie, S., Juhasz, A., Dowla, M., Yang, R.,
Zhang, J., Wang, X., Dell, B., Chen, X., Nevo, E.,
Sun, D., and Ma, W. (2018) New insights into the
evolution of wheat avenin-like proteins in wild emmer
wheat (*Triticum dicoccoides*), *Proc. Natl. Acad. Sci.
USA*, **115**, 13312-13317, doi: 10.1073/pnas.1812855115.
32. Nagahatenna, D. S. K., Parent, B., Edwards, E. J.,
Langridge, P., and Whitford, R. (2020) Barley plants
overexpressing ferrochelatases (HvFC1 and HvFC2)
show improved photosynthetic rates and have re-
duced photo-oxidative damage under drought stress
than non-transgenic controls, *Agronomy*, **10**, 1351,
doi: 10.3390/agronomy10091351.
33. Masuda, T., Suzuki, T., Shimada, H., Ohta, H., and
Takamiya, K. (2003) Subcellular localization of two
types of ferrochelatase in cucumber, *Planta*, **217**, 602-
609, doi: 10.1007/s00425-003-1019-2.
34. Cornah, J. E., Roper, J. M., Singh, D. P., and Smith,
A. G. (2002) Measurement of ferrochelatase activity
using a novel assay suggests that plastids are the major
site of haem biosynthesis in both photosynthetic and
non-photosynthetic cells of pea (*Pisum sativum* L.),
Biochem. J., **362**, 423-432, doi: 10.1042/bj3620423.

ULTRA-FAST MASS SPECTROMETRY FOR PLANT BIOCHEMISTRY: PROTEOMICS RESPONSE OF WINTER WHEAT TO IRON PRE-SOWING TREATMENT

**T. T. Kusainova^{1,2}, D. D. Emekeeva^{1,2}, E. M. Kazakova^{1,2}, V. A. Gorshkov³, F. Kjeldsen³,
M. L. Kuskov¹, A. N. Zhigach¹, I. P. Olkhovskaya¹, O. A. Bogoslovskaya¹,
N. N. Glushchenko¹, and I. A. Tarasova^{1*}**

¹ V. L. Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics,
N. N. Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
119334 Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark,
DK-5230 Odense M, Denmark

In recent years, ultrafast chromatography-mass spectrometry profiling of proteomes has been actively developed for biochemical studies. These methods are intended for fast/rapid monitoring of cell response to a biotic stimulus, correlation of molecular changes with biological processes and phenotype changes. To increase agricultural production, new biotechnologies are being introduced, including the use of nanomaterials. At the same time, thorough testing of new fertilizers and investigation of mechanisms of biotic effects on the germination, growth, and development of plants are required. The aim of this work was to adapt the method of ultrafast chromatography and mass spectrometry for rapid quantitative profiling of molecular changes in 7-day-old wheat seedlings that occur in response to pre-sowing seed treatment with iron compounds. The experimental method is capable of analyzing up to 200 samples per day; its practical value lies in carrying out the proteomic express diagnostics of the biotic action of new treatments, including those for agricultural needs. The regulation of photosynthesis, biosynthesis of chlorophyll, porphyrin- and tetrapyrrole-containing compounds, glycolysis in shoot tissues, and polysaccharide metabolism in root tissues were shown after seed treatments with suspensions containing a polymeric film former (PEG-400, Na-CMC, Na₂-EDTA), iron (II, III) nanoparticles or iron (II) sulfate. Observations at the protein level were consistent with the results of morphometry, measurements of superoxide dismutase activity and microelement analysis of 3-day-old germinated seeds and shoots and roots of 7-day-old seedlings. A characteristic molecular signature has been proposed to determine the regulation of photosynthesis and glycolytic process at the protein level. Such a signature is considered as a potential marker of the biotic effect of seed treatment with iron compounds and will be confirmed by further studies.

Keywords: plant proteomics, nanoparticles, bioinformatics, mass spectrometry