

УДК 577.122

## ИНДУКЦИЯ ОКСИДОМ АЗОТА ПРОЛИН-ИМИНОПЕПТИДАЗЫ МОЖЕТ БЫТЬ ПРИЧИНОЙ НАКОПЛЕНИЯ ПРОЛИНА В КОРНЯХ ГОРОХА

© 2021 г. А. М. Егорова<sup>1,\*</sup>, академик РАН И. А. Тарчевский<sup>1</sup>

Поступило 14.05.2021 г.

После доработки 26.05.2021 г.

Принято к публикации 28.05.2021 г.

Донор оксида азота (NO) – нитропруссид Na вызывал в корнях проростков гороха повышение содержания пролин-иминопептидазы. Предполагается, что NO вызывает активацию депролинизации обогащенных пролином белков, о чем свидетельствует повышение содержания свободного пролина, как известно, защищающего растения от действия абиотических и биотических стрессоров.

**Ключевые слова:** пролин, оксид азота, фитоиммунитет, нитропруссид Na

**DOI:** 10.31857/S2686738921050085

Общепризнано, что иминокислота пролин является уникальным фактором устойчивости растений к действию разнообразных абиотических и биотических стрессоров. Первоначально сильное повышение содержания пролина под влиянием обезвоживания было обнаружено у проростков райграса [1] и под влиянием почвенной засухи – в листьях, стеблях и колосьях пшеницы [2]. Если в первой работе накопление пролина объяснялось усилением его синтеза, то во второй – его освобождением при деградации белков. В дальнейшем было опубликовано множество экспериментальных и обзорных статей, посвященных различным аспектам пролинологии, и подтверждена роль пролина в повышении устойчивости растений. В большинстве работ повышение содержания пролина объясняли активацией ферментов его синтеза из глутамата и орнитина, что подтверждалось использованием трансгенных растений с усиленной экспрессией генов этих ферментов [3]. После обнаружения и исследования белков, обогащенных пролином (БОП), а также ферментов пролин-иминопептидаз, способных осуществлять депролинизацию БОП, стали допускать возможность накопления пролина за счет деградации БОП.

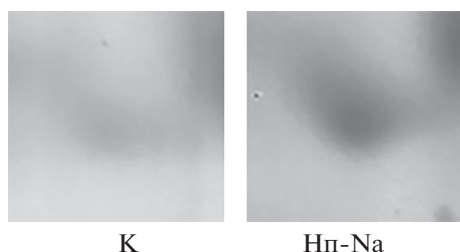
“Пролинологи” отмечают, что роль и функции пролина в адаптации растений к неблагоприят-

ным условиям до сих пор остаются неясными и загадочными [3]. В значительной степени это связано со многими путями синтеза, деградации и использования свободного пролина, их зависимости от силы и продолжительности воздействия одного стрессора или последовательности действия нескольких стрессоров, участия в регуляции пролинового метаболизма фитогормонов и эндогенных ключевых факторов фитоиммунитета.

Одним из таких факторов является монооксид азота (NO), быстро образующийся и накапливающийся в тканях растений при их инфицировании микроорганизмами и вызывающий защитное перепрограммирование экспрессии генов [4]. Необходимо отметить, что ответ на действие NO исследовался в основном на надземных органах растений, но известно, что NO образуется эндогенно и в корнях при действии на них патогенов. Следует также учитывать, что корни могут подвергаться действию экзогенного NO, продуцируемого почвенными микроорганизмами [5]. Учитывая все это, мы поставили перед собой задачу исследовать ответ корней на действие NO с помощью протеомного анализа.

8-дневные проростки гороха *Pisum sativum* L. сорт Тан, выращенные на ¼ питательной среды Хогланда–Арнона, помещались корнями в среду роста, содержащую донор NO – нитропруссид Na (150 мкМ). Обработку проводили в течение 72 ч, с ежедневной сменой растворов. Контролем служили растения, не обработанные нитропруссидом Na. Выделение растворимых белков корней гороха и двумерный электрофорез проводили по методике, использованной в нашей ранее опубли-

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики  
Федеральный исследовательский центр  
Казанский научный центр РАН, г. Казань, Россия  
\*e-mail: egorova@kibb.knc.ru



**Рис. 1.** Фрагменты двумерных электрофореграмм растворимых белков корней гороха. Показан участок геля, содержащий белок, идентифицированный как пролин-иминопептидаза в контрольных (К) и обработанных нитропруссидом Na (Нп-Na) корнях.

ликующей работе [6]. Разделение белков осуществляли на стрипах с иммобилизованным градиентом pH 4–7, 17 см (Bio-Rad, США). Для выявления белков, содержание которых изменялось под влиянием донора NO, двумерные электрофореграммы анализировали с помощью программы PDQuest 8.1 (Bio-Rad, США). Использовали по три контрольных и обработанных нитропруссидом Na гелей, каждый из которых представлял биологическую повторность. Идентифицировали только белки, содержание которых повышалось более чем в 1.5 раза. Анализ полученных после трипсинолиза пептидов проводили с помощью HPLC-MS/MS масс-спектрометрии на приборе MicrOTOF-Q (Bruker, Германия) с последующим поиском возможных совпадений по MS BLAST, описанным в работе [6]. Анализ первичной структуры белков осуществляли на сервере NCBI.

Содержание пролина в корнях проростков гороха определяли по методу Bates с модификациями [7].

Среди белков, индуцируемых нитропруссидом Na в корнях гороха, была выявлена пролин-иминопептидаза (ПИП), имеющая молекулярную массу 44.7 кДа и pI 5.83. Анализ двумерных электрофореграмм растворимых белков корней горо-

ха показал, что содержание белка под влиянием донора NO повышалось почти в 3 раза (рис. 1).

Выявленная нами ПИП корней гороха была идентифицирована по гомологии с белком XP\_004485649.1 нута [*Cicer arietinum*], с которым совпали 4 пептида, полученные после трипсинолиза. Был проведен поиск BLAST аминокислотной последовательности в базе данных белков гороха <https://urgi.versailles.inrae.fr/blast/> и найдена последовательность белка Psat1g212200.1, содержащая идентифицированные пептиды и имеющая 80% гомологии с белком XP\_004485649.1 из нута. ПИП гороха состояла из 395 аминокислотных остатков.

Идентифицированная нами ПИП относится к суперсемейству альфа/бета гидролаз, семейству пролин-иминопептидаза подобных белков (сериновых экзопептидаз S33). Согласно базе данных пептидаз MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=S33>), для активности этого фермента важна каталитическая триада S-D-H (серин-аспарагиновая кислота-гистидин), содержащая консервативный остаток серина S в последовательности GxSxG (у ПИП гороха S находится в 184 положении). ПИП обладает узкой субстратной специфичностью и отщепляет лишь конечный остаток пролина от полипептидной цепи обогащенных пролином и оксипролином белков. ПИП являются в значительной степени консервативными практически для всех организмов, и, согласно MEROPS, во многих организмах с секвенированными геномами представлены одной или двумя изоформами.

Наш анализ показал, что ПИП корней гороха не имеет транспортного сигнального пептида и, в связи с этим, или функционирует внутри клеток, или его перенос в апопласт осуществляется с помощью неклассического механизма [8]. Неклассическому типу транспорта в последнее время уделяется большое внимание, так как получены факты его связи с защитным ответом клеток [9].

```

1      MNLGFNFGPNTFSLSTTTTTFKFSPSFI FTTPISHPQTNSSGKTKLLRVQNTDNHIIHSTPT
61     TTPFMASQQRI PQLNPNFY PDIQPYTTGFLKVS DLHSIYWEQSGNPTGHPVVFLHGGPGG
121    GTSPSNRRFFDPEFYRI IILFDQRGAGKSTPHACLEHNTTWDLIDDIEKLEHLEIPEWQV
181    FGGSWGSTLALAYSQSHDPKVTGMVLRGIFLLRKKEIDWFYEGGAAAI FPDWEPFRDLI
241    PENERGCFIDAYKKRLNSDDIETQYAAARAWTKWEMMTAHLFPNEENVKR GDDDYFSLAF
301    ARIENHYFVNKGFFPSDSFLLDGVDKIRHINTTIVQGRYD ICCPIMSAWDLHKAWPEADF
361    RVVADAGHSANEPGIAAELIAANEKLNILKNKGD

```

**Рис. 2.** Аминокислотная последовательность белка Psat1g212200.1, идентифицированного нами как пролин-иминопептидаза. Жирным шрифтом выделены идентифицированные пептиды. Цветным выделением (желтым) обозначены консервативные аминокислоты, содержащие S-D-H каталитическую триаду.

Полученная нами информация об NO-индукции ПИП в корнях свидетельствует о возможности вызванной этим активации депролинации БОП и накопления свободного пролина. Действительно, мы обнаружили, что нитропруссид Na повышает содержание пролина в корнях гороха в 1.6 раза. Это дополняет еще одной возможной причиной полученные ранее данные о повышении содержания пролина у растений под влиянием NO за счет активации его синтеза [10], а также мнение о том, что гомеостаз пролина тонко регулируется его синтезом, деградацией и транспортом [11].

К БОП относятся, главным образом, компоненты клеточных стенок, которые подразделяются на несколько обширных семейств [12]: наиболее гликозилированные белки – экстенсины; арабиногалактановые белки; собственно БОП; гибридные белки, содержащие не только пролиновые домены, но и консервативные последовательности аминокислот, характерные, главным образом, для липид-переносящих белков; небольшие (менее 200 аминокислот) арабинозилированные белки.

БОП клеточных стенок обладают видо-, органо- и тканеспецифичностью [13] и отличаются большим многообразием. Например, экстенсины и арабиногалактановые белки включают в себя более 100 форм.

Не имеется информации, какие формы БОП являются мишенями ПИП, подобных идентифицированной нами. Это относится и к случаям с использованием трансгенных растений с усиленной экспрессией ПИП, для которых были характерны накопление пролина и повышение устойчивости к неблагоприятным факторам [14–16]. Не исключено, что некоторые формы БОП представляют собой своеобразные хранилища пролина и способны освобождать его с помощью ПИП, индуцируемых при действии стрессоров.

Мишенью ПИП растений не могут быть все виды БОП, так как их депролинация и связанный с ним протеолиз должны были бы отрицательно сказаться на осуществлении барьерной функции клеточных стенок. О важности этой функции в защите растений от патогенов можно судить по фактам продукции ПИП патогенными микроорганизмами для разрушения БОП клеточных стенок растений. Более того, установлено, что ПИП являются факторами вирулентности фитопатогенных бактерий и грибов [17, 18].

Полученные нами данные свидетельствуют о возможном участии в NO-индуцируемом накоплении пролина не только активации его синтеза [10], но и депролинации БОП.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kemble A.R., Macpherson H.T.* Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting // *Biochemical J.* 1954. V. 58. № 1. P. 46–49.
2. *Тарчевский И.А.* Продукты фотосинтеза листьев пшеницы и влияние на их образование почвенной и атмосферной засухи // *Ученые записки КГУ.* 1958. Т. 118. С. 111–153.
3. *Meena M., Divyanshu K., Kumar S., et al.,* Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions // *Heliyon.* 2019. V. 5. № 12. e02952.
4. *Imran Q.M., Hussain A., Lee S-U., et al.,* Transcriptome profile of NO-induced Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative regulatory role in multiple biological processes // *Scientific Reports.* 2018. V. 8. № 1. P. 771.
5. *Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J.* Nitric oxide in the offensive strategy of fungal and oomycete plant pathogens // *Front Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 252.
6. *Тарчевский И.А., Егорова А.М.* Протеомный анализ влияния циклогексимида на корни гороха // *Физиология растений.* 2015. Т. 62. № 6. С. 893–905.
7. *Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D.* Rapid determination of free proline for water-stress studies // *Plant Soil.* 1973. V. 39. № 1. P. 205–207.
8. *de la Canal L., Pinedo M.* Extracellular vesicles: a missing component in plant cell wall remodeling // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. № 20. P. 4655–4658.
9. *Wang X., Chung K.P., Lin W., et al.,* Protein secretion in plants: conventional and unconventional pathways and new techniques // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 69. № 1. P. 21–37.
10. *Filippou P., Antoniou C., Fotopoulou V.* The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants // *Free Radic Biol Med.* 2013. V. 56. P. 172–183.
11. *Weltmeier F., Ehlert A., Mayer C.S., et al.,* Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 3. P. 3133–3143.
12. *Kishor P.B.K., Kumari P.H., Sunita M.S.L., et al.,* Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 544.
13. *Gujjar R.S., Pathak A.D., Karkute S.G., et al.,* Multifunctional proline rich proteins and their role in regulating cellular proline content in plants under stress // *Biologia plantarum.* 2019. V. 63. P. 448–454.

14. Sun X., Wang F., Cai H., et al., Functional characterization of an Arabidopsis prolyl aminopeptidase AtPAP1 in response to salt and drought stresses // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2013. V. 114. № 3. P. 325–338.
15. Wang Y., Liu H., Wang S., et al., Overexpressing of a novel wheat prolyl aminopeptidase gene enhances zinc stress tolerance in transgenic Arabidopsis thaliana // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2015. V. 121. № 2. P. 489–499.
16. Zdunek-Zastocka E., Grabowska A., Branicki T., et al., Biochemical characterization of the triticale TsPAP1, a new type of plant prolyl aminopeptidase, and its impact on proline content and flowering time in transgenic Arabidopsis plants // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2017. V. 116. P. 18–26.
17. Muszevska A., Stepniewska-Dziubinska M.M., Steczkiewicz K., et al., Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire // *Sci Rep*. 2017. V. 7. № 5. P. 9147.
18. Feng L., Schaefer A.L., Hu M., et al., Virulence factor identification in the banana pathogen *Dickeya zeae* MS2 // *Applied and environmental microbiology*. 2019. V. 85. № 23. e01611–19.

## INDUCTION OF PROLINE IMINOPEPTIDASE BY NITRIC OXIDE MAY RESULT IN THE PROLINE ACCUMULATION IN THE PEA ROOTS

A. M. Egorova<sup>a, #</sup> and Academician of the RAS I. A. Tarchevsky<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: egorova@kibb.knc.ru

The donor of the nitric oxide (NO) sodium nitroprusside upregulated the proline iminopeptidase content in the pea seedling roots. It is assumed that NO activates deprolinization of the proline-rich proteins, confirmed by an increase of the free proline content, known as protecting plants from the abiotic and biotic stressors.

*Keywords:* proline, nitric oxide, phytoimmunity, sodium nitroprusside