

УДК 577.121;581.1

## КАЧЕСТВЕННЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФАЙЛИНГ СУКЦИНИЛИРОВАНИЯ ЛИЗИНА ВЫЯВИЛ ЕГО УЧАСТИЕ В ПЕРВИЧНОМ МЕТАБОЛИЗМЕ В РАСТЕНИЯХ ЧАЯ (*Camellia sinensis*)<sup>#, 1</sup>

© 2020 г. С. Qiu<sup>a</sup>, Y. Wang<sup>a</sup>, J. H. Sun<sup>a</sup>, W. J. Qian<sup>a</sup>, H. Xie<sup>a</sup>, Y. Q. Ding<sup>a</sup>, Z. T. Ding<sup>a</sup>, \*  
<sup>a</sup>Tea Research Institute, Qingdao Agricultural University, Chengyang District, Qingdao, Shandong, 266109 China  
\*e-mail: dztea@163.com

Поступила в редакцию 27.11.2018 г.

После доработки 01.03.2019 г.

Принята к публикации 07.03.2019 г.

Посттрансляционная модификация остатков лизина сукцинатом влияет на структуру и функцию белков. Однако информация о сукцинировании белков в растениях чая ограничена. Используя метод иммуноблотинга, мы обнаружили сукцинирование белков чая. Проведен глобальный качественный анализ по идентификации сайтов сукцинирования белков с использованием высокоточной нано-LC-МС/МС (жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии) в сочетании с аффинной хроматографией. Идентифицировано 142 сайта сукцинирования лизина в 86 белках чайных листьев. Выявленные сукцинированные белки вовлечены в различные биологические процессы, причем значительная доля сайтов сукцинирования обнаружена в ферментах, участвующих в первичном метаболизме, включая метаболизм глиоксилата и дикарбоксилата, цикл Кребса и метаболизм глицина, серина и треонина. Кроме того, 10 новых сайтов сукцинирования обнаружены в гистонах. На основании полученных результатов можно предполагать, что в растениях чая сукцинированные белки играют важную регуляторную роль в биологических процессах, особенно в первичном метаболизме. В представленной работе проведен не только всесторонний анализ сукцинилома лизинов в растениях чая, но и получена информация, важная для дальнейшего изучения функций сукцинированного лизина.

**Ключевые слова:** *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, посттрансляционная модификация, сукцинирование лизина, метаболизм

**DOI:** 10.31857/S0026898420010127

### ВВЕДЕНИЕ

Динамические и обратимые посттрансляционные модификации (РТМ) играют важную роль в диверсификации функций белков и контроле многих биологических процессов [1–3]. Недавно список из сотен различных РТМ пополнился сукцинированием лизина, обнаруженным у многих белков, включая гистоны. Сукцинирование лизина вызывает значительные структурные изменения путем замены положительно заряженного остатка на отрицательно заряженный [3]. По сравнению с ацетилированием (42 Да) или метилированием (14 Да) сукцинирование вводит большую функциональную группировку (100 Да), что способствует значительным изменениям в

структуре и функции белка [4]. Впервые сукцинированные белки были обнаружены у *Escherichia coli* [4], а впоследствии идентифицированы и в тканях животных [5]. В последнее время интенсивно исследуют сукцинирование лизина в различных организмах, включая бактерии (*Vibrio parahemolyticus* и *Mycobacterium tuberculosis*), животных (*Mus musculus* и *Homo sapiens*) и растениях (томат, пшеница обыкновенная и *Dendrobium officinale*) [2, 6–12]. На основании данных проведенных ранее исследований предполагают, что сукцинирование лизина регулирует структуру и функции гистонов [3]. Более того, недавно показано, что сукцинирование хроматина может быть механизмом, который модулирует тран-

<sup>#</sup> К статье имеются дополнительные материалы, доступные для авторизованных пользователей по doi: 10.1134/S0026898420010127.

<sup>1</sup> Статья представлена авторами на английском языке.

Сокращения: РТМ (post-translational modifications) – посттрансляционные модификации; GO (Gene Ontology) – онтология генов; KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) – Киотская энциклопедия генов и геномов; ТСА (tricarboxylic acid cycle) – цикл трикарбоновых кислот; PPI (protein-protein interactions) – белок-белковые взаимодействия; ppm (parts per million) – одна часть на миллион.

скрипцию всего генома и активность системы репарации ДНК [13].

Чай (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), вечнозеленое древесное растение, — одна из самых популярных культур в мире. После расшифровки полной геномной последовательности чая возрастает важность исследований протеома и модификаций белков этого растения. Однако о модификациях, особенно сукцинировании белков чая, известно мало. На сегодняшний день проведено только одно исследование по сукцинированию лизина в чае Анцзы Байча (Anji Baicha), где показано, что различные сукцинированные белки в основном представлены в процессах фотосинтеза, фиксации углерода, биосинтеза аминокислот и метаболизма порфиринов и хлорофилла [14]. С целью углубить понимание роли сукцинирования лизина мы, используя иммуноблоттинг, проанализировали белки растения *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze и показали, что сукцинирование лизина происходит в основном в листьях этого растения.

В исследовании положено начало систематической идентификации сукцинилома в высокопродуктивном и высококачественном материале сорта QN3. Всего идентифицировано 142 сайта сукцинирования на 86 белках, включая 10 сайтов сукцинирования в гистонах чайных листьев. Проведен биоинформационный анализ всех идентифицированных лизинсукцинированных белков, включающий обогащение по терминам онтологии генов (GO) и Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG), определение субклеточной локализации, идентификацию вероятных белок-белковых взаимодействий (PPI) и т.д. Наконец, обсуждается связь сукцинирования лизина с метаболизмом глиоксилата и дикарбоксилата, циклом трикарбоновых кислот (TCA) и метаболизмом глицина, серина и треонина. Таким образом, в исследовании представлена функциональная аннотация сукцинирования лизина в растениях чая, что, безусловно, углубляет наши знания по РТМ белков.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Растения и условия их роста.** В исследовании использованы однолетние саженцы чая сорта QN3. Саженцы выращивали в фитотроне при 12-часовом световом (25°C)/12-часовом темновом (20°C) фотопериоде с интенсивностью потока фотонов света 18 000 люкс/(м<sup>2</sup> с<sup>2</sup>) и влажностью 75%. Растения орошали питательным раствором Plant-Prod 20-20-20 Fertilizer (“Lambrou Agro”, Кипр) с интервалом в 2 суток. Чайные листья собирали через один месяц и хранили при –80°C до экстракции белков. Проводили три биологических повтора.

**Иммуноблоттинг.** Иммуноблоттинг проводили после разделения белков лизата с помощью электрофореза в денатурирующем 12%-ном ПААГ. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (“Millipore”, США), которую инкубировали сначала в блокирующем буфере (0.05% Твин-20 и 5% обезжиренного сухого молока в PBS), а затем с кроличьими поликлональными антисукциниллизинными антителами (“РТМ Biolabs”, Китай), разведенными в блокирующем буфере в соотношении 1 : 1000, в течение ночи при 4°C. Мембраны промывали, инкубировали с конъюгированными с пероксидазой хрена козьими антителами против антител кролика (“Sigma”, США), разведенными в соотношении 1 : 2000, снова промывали и инкубировали с хемилюминесцентным субстратом (“Sigma”) для последующей детекции сигнала.

**Пробоподготовка.** Образцы чайных листьев измельчали в жидком азоте и затем переносили в 5-мл центрифужную пробирку. К порошку добавляли 4 объема буфера для лизиса, содержащего 8 М мочевины (“Sigma”), 1% Triton X-100, 10 мМ DTT (“Sigma”), 1% коктейля ингибиторов протеаз (“Calbiochem”, США), 3 мкМ трихостатин А (“Sigma”), 50 мМ ниацинамид (“Sigma”) и 2 мМ EDTA (“Sigma”), и обрабатывали ультразвуком (38 × 3 с перерывами в 5 с) на льду с использованием ультразвукового дезинтегратора высокой интенсивности (“Scientz”, Китай). Осадок отделяли и удаляли центрифугированием при 20 000 × g при 4°C в течение 10 мин. Наконец, белок из полученного лизата осаждали предварительно охлажденной 20%-ной трихлоруксусной кислотой в течение 2 ч при –20°C и отделяли от супернатанта центрифугированием при 12 000 × g в течение 3 мин при 4°C. Осадок трижды промывали предварительно охлажденным ацетоном и повторно растворяли в 8 М мочеvine. Для определения концентрации белка использовали набор BCA kit (“Beyotime”) в соответствии с инструкциями производителя.

Перед протеолитическим гидролизом раствор белка обрабатывали 5 мМ DTT в течение 30 мин при 56°C (для восстановления S-S-связей), а затем алкилировали с использованием 11 мМ йодацетамида (“Sigma”) в течение 15 мин при комнатной температуре. В полученный раствор добавляли 100 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> до конечной концентрации мочевины менее 2 М. Наконец, добавляли трипсин (“Promega”), в массовом соотношении 1 : 50 к суммарному белку, и проводили первый гидролиз в течение ночи при 37°C. С целью добиться полного расщепления белка еще раз добавляли трипсин в массовом соотношении 1 : 100 к суммарному белку и проводили инкубацию в течение 4 ч.

**Аффинное обогащение.** Для обогащения смеси сукцинированными по лизину пептидами триптические пептиды, растворенные в буфере

NETN, содержащем 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0) и 0.5% NP-40, инкубировали с предварительно отмытыми гранулами агарозы, на которых иммобилизованы антисукциниллизинные антитела (Cat. No PTM-402, "PTM Biolabs"), при легком встряхивании в течение ночи при 4°C. Затем гранулы четырежды промывали буфером NETN и дважды деионизированной водой. Связавшиеся пептиды элюировали с гранул 0.1%-ной трифторуксусной кислотой. Фракции элюатов объединяли и высушивали в вакуумном испарителе. Для анализа методом жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS) полученные пептиды обессоливали с помощью колонок C18 ZipTIPS ("Millipore") в соответствии с инструкциями производителя.

**LC-MS/MS.** Триптические пептиды растворяли в 0.1%-ной муравьиной кислоте ("Fluka") (растворитель А) и загружали в аналитическую колонку с обращенной фазой (длина 15 см, диаметр 75 мкм) собственного производства. С помощью растворителя В (0.1%-ная муравьиная кислота в 98%-ном ацетонитриле) создавали градиент с увеличением содержания ацетонитрила: от 6 до 23% в течение 26 мин, от 23 до 35% в течение 8 мин, повышение до 80% в течение 3 мин и удержание при 80% в последние 3 мин — при постоянной скорости потока на всех этапах в 400 нл/мин в хроматографической системе EASY-nLC 1000 UPLC ("Thermo Fisher Scientific", США).

Пептиды подвергали воздействию нанозлектронного источника ионизирующего излучения с последующей тандемной масс-спектрометрией (MS/MS) на приборе Q Exactive™ Plus ("Thermo Fisher Scientific"), подключенном в режиме онлайн к хроматографу UPLC. Подаваемое напряжение распыления электронов составляло 2.0 кВ. Диапазон сканирования  $m/z$  составлял от 350 до 1800 для полного сканирования, и неповрежденные пептиды детектировали в Orbitrap с разрешением 70000. Пептиды выбирали для последующей MS/MS при значении нормализованной энергии столкновения равной 28, и фрагменты детектировали в Orbitrap с разрешением 17500. Определяемую данными процедуру чередования между одним сканированием MS с последующим сканированием 20 MS/MS для 20 лучших предшественников проводили с динамическим исключением 15.0 с. Автоматическую регулировку усиления устанавливали на 5E4, пороговое значение сигнала — на уровне 10000 ионов/с, а максимальное время ввода пробы — на 100 мс.

**Поиск по белковой базе данных.** Идентификацию белков и сайтов сукцинирования выполняли с помощью поисковой системы MaxQuant (v.1.5.2.8). Тандемные масс-спектры анализировали с помощью белковой базы данных, построенной по последовательности генома *Camellia si-*

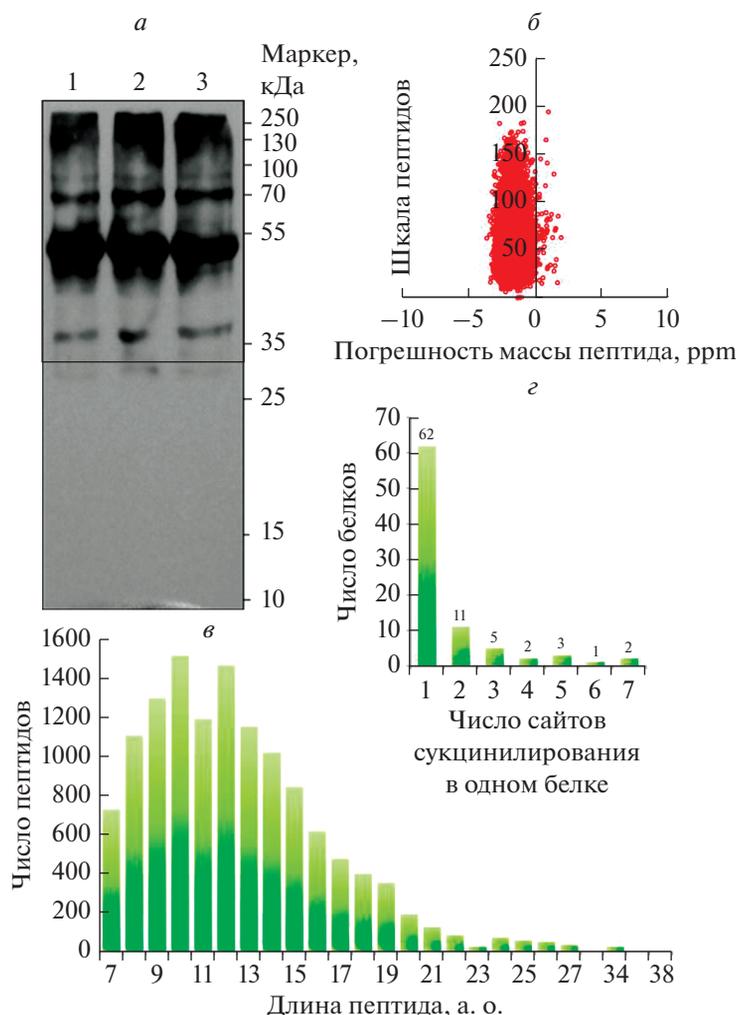
*nensis* ([http://www.plantkingdomgdb.com/tea\\_tree/](http://www.plantkingdomgdb.com/tea_tree/)), объединенной с базой обратных белковых последовательностей. Трипсин/Р указывали в качестве фермента гидролиза и допускали максимум 4 пропущенных сайта расщепления. В первичном поиске погрешность изменения массы ионов-предшественников устанавливали на уровне 20 ppm и 5 ppm — в основном поиске [15]. Разброс по массе фрагментных ионов указывали равным 0.02 Да. Карбамидометилирование цистеина указывали как постоянную модификацию, а модификацию сукцинирования и окисление метионина — как переменные модификации. Частоту ложных обнаружений ограничивали значением < 0.01, а минимальный счет для модифицированных пептидов устанавливали на уровне > 40.

**Биоинформационный анализ.** Модификации аминокислот проверяли по базе данных Unimod (<http://www.unimod.org/>). Элементы вторичной структуры белков предсказывали с помощью NetSurfP. Вероятность образования элемента вторичной структуры данного типа с модифицированными остатками лизина сравнивали с контрольной последовательностью без модификаций лизина для всех сукцинированных белков, идентификационных в этом исследовании, и *p*-value считывали, как описано ранее. GO-аннотацию результатов протеомного анализа проводили с помощью базы данных UniProt-GOA (<http://www.ebi.ac.uk/GOA/>) и классифицировали белки по трем категориям: биологический процесс, клеточный компонент и молекулярная функция. Базу данных KEGG использовали при аннотировании биохимических путей, в которых участвуют идентифицированные белки. Белки аннотировали также с помощью программы InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>), сканирующей заданную последовательность на соответствие белковым структурам в базе данных InterPro. Коррекцию при проверке множественных гипотез проводили с использованием стандартных методов контроля уровня ложных обнаружений. Аннотации GO и биохимических путей с скорректированным *p*-value < 0.05 считали значимыми. Анализ сети PPI для идентифицированных сукцинированных белков проводили с использованием программного обеспечения Cytoscape, а входную сеть PPI получали из базы данных STRING версии 10.5. Алгоритм теоретической кластеризации графов, MCODE, использовали при анализе плотно связанных узлов сети PPI.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Детекция белков и сайтов сукцинированного лизина*

С целью охарактеризовать степень сукцинирования лизина в белках растений чая мы про-



**Рис. 1.** Контроль качества данных LC-MS/MS. *a* – Анализ сукцинирования белков методом вестерн-блот. Время экспозиции 3 с. На дорожки 1–3 нанесены три биологических повтора. *б* – Пептидная шкала для всех сукцинированных пептидов построена как функция погрешностей массы откалиброванных пептидов, выраженных в частях на миллион (ppm). *в* – Распределение длин идентифицированных пептидов. *г* – Распределение сайтов сукцинирования в белках.

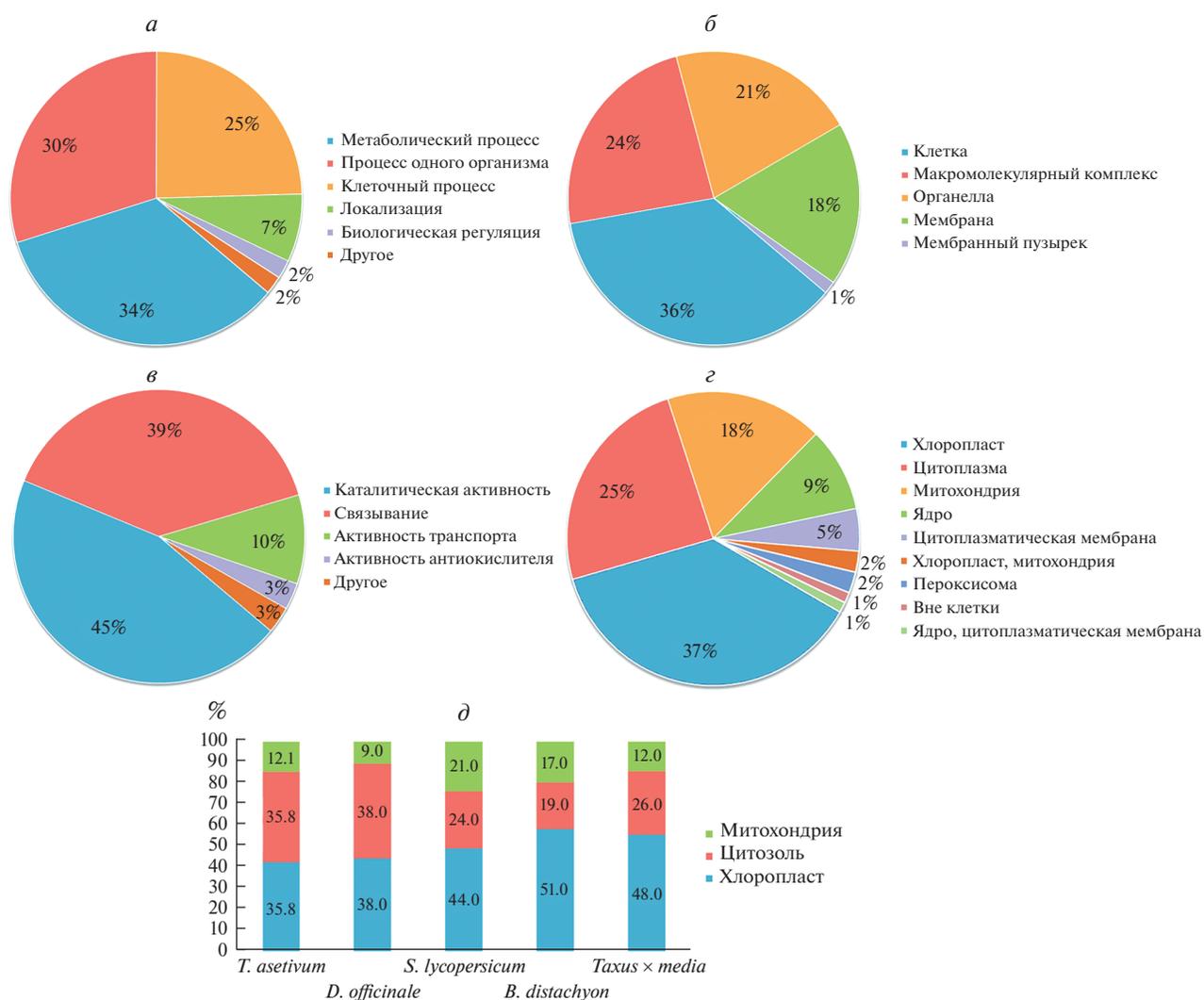
вели анализ Вестерн-блот белковых лизатов листьев чая с антителами против сукциниллизина. Как и ожидалось, обнаружено множество белковых полос, что указывает на присутствие различных сукцинированных белков (рис. 1а).

С помощью высокопроизводительного качественного протеомного анализа идентифицировано в общей сложности 142 сайта сукцинирования лизина на 86 белках, что представляет собой существенный объем данных по сукцинилому лизина в растениях чая. Изменение массы составило 100.0186 кДа. Масс-спектрометрические данные доступны в базе данных Proteome Xchange (номер проекта PXD011717). Распределение погрешности массы было около нуля и большинство значений меньше 10 ppm (рис. 1б), что соответствует требованиям по точности массы в данных масс-спектро-

метрии. Кроме того, длины большинства пептидов варьировали от 8 до 20 аминокислотных остатков (рис. 1в), что соответствует типичной длине триптических пептидов. Среди идентифицированных белков около 72.1% (62) имели один сайт сукцинирования, тогда как 27.9% (24) – несколько сайтов (рис. 1г). Наибольшее число сайтов сукцинирования обнаружено на двух белках: DLD и gbcL. Подробная информация по всем идентифицированным сукцинированным белкам представлена в Приложении 1 (см. сайт [http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp\\_Qiu\\_rus.pdf](http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp_Qiu_rus.pdf)).

#### *Функциональная аннотация и субклеточная локализация сукцинированных белков*

GO-анализ служит основным инструментом биоинформатики, позволяющим проводить



**Рис. 2.** Функциональная аннотация и клеточная локализация сукцинированных белков. Классификация сукцинированных белков по биологическим процессам (а), клеточным компонентам (б) и молекулярной функции (в). г – Субклеточная локализация сукцинированных по лизину белков чая. д – Соотношение сукцинированных белков в хлоропластах, цитоплазме и митохондриях *Triticum aestivum*, *Dendrobium officinale*, *Solanum lycopersicum*, *Brachypodium distachyon* и *Taxus × media* на основании данных, полученных в работах [10–12, 17, 18]).

сравнение генов или белков между различными видами [16]. С целью выяснить функциональную роль сукцинирования белков чая все идентифицированные белки проанализировали по трем категориям: биологический процесс, клеточный компонент и молекулярная функция (рис. 2, Приложение 2, см. сайт [http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp\\_Qiu\\_gus.pdf](http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp_Qiu_gus.pdf)). Большинство сукцинированных белков оказалось вовлеченным в процессы метаболизма (34%) и единого организма (30%), в клеточные механизмы (25%) и локализацию (7%) (рис. 2а). Что касается клеточных компонентов, большое число сукцинированных белков распределено в клетке (36%), макромолекулярном комплексе (24%) и органелле (21%) (рис. 2б). Что касается молекулярных функций, то около половины лизинсукцинирован-

ных белков классифицировано как ассоциированные с каталитической активностью (45%) и менее 40% классифицированы как связывающие белки (39%) (рис. 2в). Это значит, что сукцинированные белки в основном аннотированы в биологических процессах и молекулярных функциях.

Предсказание субклеточной локализации белка служит важным этапом в предсказании функции белка и аннотации генома в биоинформационном анализе. С целью лучше понять функции сукцинированных белков проведено исследование их возможной субклеточной локализации. Как представлено на рис. 2г, 32 из идентифицированных сукцинированных белков могут находиться в хлоропласте (37%), 21 в цитоплазме (25%) и 15 в митохондриях (18%). В соответствии с ранее полученными данными по *Triticum ase-*



**Рис. 3.** Классификация сукцинированных по лизину белков по биологическим терминам. Обогащение сукцинированных белков по GO-терминам (*a*), доменам (*б*) и KEGG (*в*). Размерность горизонтальной оси -lg (*p*-value по точному критерию Фишера).

*tivum*, *Dendrobium officinale*, *Solanum lycopersicum*, *Brachypodium distachyon* и *Taxus × media* [10–12, 17, 18], сукцинированные белки встречаются в основном в хлоропласте, цитоплазме и митохондриях растений (рис. 2*д*). На основании этих результатов можно сделать вывод о том, что лизинсукцинированные белки чая выполняют широкий спектр биологических функций.

#### Анализ обогащения GO терминами, состава белковых доменов и путей KEGG с участием сукцинированных белков

С целью глубже понять биологические функции сукцинированных белков мы провели анализ обогащения GO-терминами и состава белко-

вых доменов. В категории клеточного компонента сукцинированные белки в основном относятся к митохондриям ( $p$ -value =  $8.98 \times 10^{-7}$ ), протон-транспортному комплексу АТФ-синтазы ( $p$ -value =  $3.44 \times 10^{-6}$ ) и внутриклеточной части ( $p$ -value =  $4.15 \times 10^{-6}$ ) (зеленая полоса на рис. 3*a*, Приложение 3, см. сайт [http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp\\_Qiu\\_rus.pdf](http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp_Qiu_rus.pdf)). В категории молекулярной функции многим модифицированным белкам приписано связывание кофакторов ( $p$ -value =  $9.04 \times 10^{-10}$ ), оксидоредуктазная активность ( $p$ -value =  $1.06 \times 10^{-5}$ ) и связывание коферментов ( $p$ -value =  $1.54 \times 10^{-5}$ ) (синяя полоса на рис. 3*a*, Приложение 3). В категории биологического процесса идентифицированные белки картированы в метаболическом процессе низкомоле-

кулярных соединений ( $p$ -value =  $5.59 \times 10^{-19}$ ), метаболическом процессе в едином организме ( $p$ -value =  $2.25 \times 10^{-12}$ ), метаболическом процессе карбоновых кислот ( $p$ -value =  $4.3 \times 10^{-11}$ ), в процессе метаболизма оксикислот ( $p$ -value =  $6.42 \times 10^{-11}$ ) и процессе метаболизма органических кислот ( $p$ -value =  $6.61 \times 10^{-11}$ ) (красная полоса на рис. 3а, Приложение 3). Таким образом, сукцинирование лизина может играть важную роль в метаболизме и регуляции растительных клеток. Для понимания регуляторной роли сукцинирования необходимы специальные эксперименты. Между тем, в ходе анализа состава белковых доменов обнаружено значительное обогащение сукцинированных белков доменами для присоединения биотина/липоильной группы, с единичным гибридным мотивом, с гистоновой укладкой и с гистонами H2A/H2B/H3 (рис. 3б, Приложение 3).

Чтобы получить более подробную информацию о метаболических путях, в которые вовлечены лизинсукцинированные белки, мы провели анализ обогащения путей KEGG. Всего идентифицировано 16 значимо обогащенных путей KEGG, включая метаболизм глиоксилата и дикарбоксилата, метаболизм углерода, цикл ТСА, фиксацию углерода в фотосинтезирующих организмах и метаболизм глицина, серина и треонина (рис. 3в, Приложение 4, см. сайт [http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp\\_Qiu\\_rus.pdf](http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp_Qiu_rus.pdf)). Среди них метаболизм глиоксилата и дикарбоксилата представлен наибольшим числом белков. К этому пути отнесены такие белки как HAO, katE, rbcL, glnA, GLDC, GGAT, glyA и AGXT (рис. 4а), в которых суммарно идентифицировано 20 сайтов сукцинирования лизина (табл. 1). Как показано на рис. 4а, 7 сукцинированных белков, включая gcvT, AGXT, glyA, GGAT, GLDC, DLD и gcvH, вовлечены в метаболизм глицина, серина и треонина. В этих белках обнаружено 19 сайтов сукцинирования (табл. 1). Три репрезентативных LC-MS/MS-спектра сукцинированных пептидов, относящихся к белкам glyA, AGXT и GGAT из метаболизма глиоксилата и дикарбоксилата и метаболизма глицина, серина и треонина, представлены в Приложении 5 и на рис. S1–S3 (см. сайт [http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp\\_Qiu\\_rus.pdf](http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp_Qiu_rus.pdf)).

К основным производным цикла ТСА относятся сукцинат и сукцинил-КоА. Из участвующих в этом цикле ферментов 7 модифицированы сукцинированием, включая LSC1, LSC2, DLD, OGDH, DLST, CS и IDH3 (рис. 4б). Двадцать сайтов сукцинирования идентифицировано в этих белках (табл. 1). Три репрезентативных LC-MS/MS-спектра сукцинированных пептидов, полученных из ферментов цикла ТСА: LSC1, LSC2 и DLD, — представлены в Приложении 5, рис. S4–S6. На основании полученных результа-

тов мы предположили, что в чае сукцинирование лизина может быть вовлечено в регуляцию цикла ТСА, метаболизм глицина, серина и треонина и метаболизм глиоксилата и дикарбоксилата.

### Сукцинирование лизинов в гистонах

Посттрансляционные модификации гистонов важны для экспрессии генов и репарации ДНК [3]. В соответствии с анализом состава белковых доменов, значительное количество сукцинированных лизинов обнаружено в гистонах. Всего в гистонах обнаружено 16 сайтов сукцинирования лизина (рис. 5, Приложение 6, см. сайт [http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp\\_Qiu\\_rus.pdf](http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp_Qiu_rus.pdf)). По одному сайту сукцинирования обнаружено в гистонах H2A (K25) и H4 (K31), 9 сайтов сукцинирования обнаружено в гистоне H2B (K11, K17, K29, K55, K69, K108, K109, K131, K139) и 5 сайтов — в гистоне H3 (K14, K23, K56, K79, K122). По сравнению с данными для Anji Baicha [14], впервые в чае идентифицировано 10 сайтов, включая H2AK25, H2BK11, K2BK29, H2BK69, H2BK131, H2BK139, H3K14, H3K23, H3K56 и H3K122. Более того, H3K14, H3K56, H3K122 и H4K31 ранее обнаружены у человека [6], *Drosophila melanogaster* [3] и *Toxoplasma gondii* [19], что указывает на консервативность этих сайтов у животных и растений.

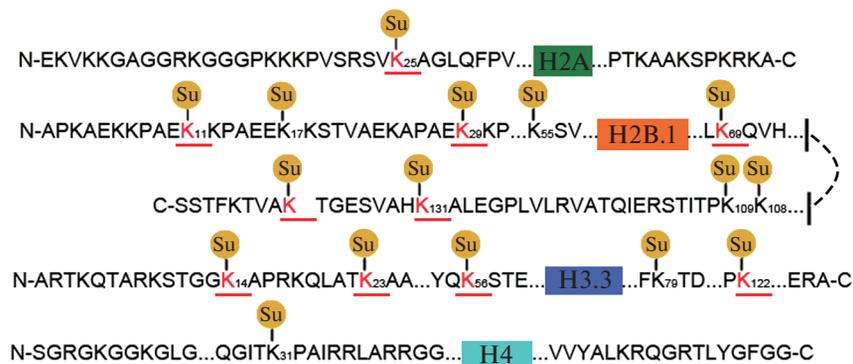
### Сеть PPI по белкам с сукцинированным лизином

В ходе дальнейшего изучения сукцинированных белков чая с помощью базы данных STRING и программного обеспечения Cytoscape сконструированы сети PPI. В результате обнаружена тесная взаимосвязь для 59 сукцинированных белков (рис. 6). Подробная информация о белках, вовлеченных в сеть, представлена в Приложении 7 (см. сайт [http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp\\_Qiu\\_rus.pdf](http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp_Qiu_rus.pdf)). Используя MCODE, из полной сети взаимодействий мы извлекли несколько высокообогащенных кластеров взаимодействия. Три наиболее обогащенные взаимодействиями группы связаны с первичным метаболизмом, что согласуется с анализом путей KEGG (рис. S7 Приложения 5). С целью оценить важность сукцинированных белков, находящихся в узлах полной сети, мы рассчитали степень каждого белка. Выявлено 14 лизинсукцинированных белков, имеющих степень не менее 10. Интересно, что эти белки вовлечены в метаболизм глиоксилата и дикарбоксилата, глицина, серина и треонина и цикл ТСА. Таким образом, сукцинирование лизина может играть важную роль в регуляции первичного метаболизма.

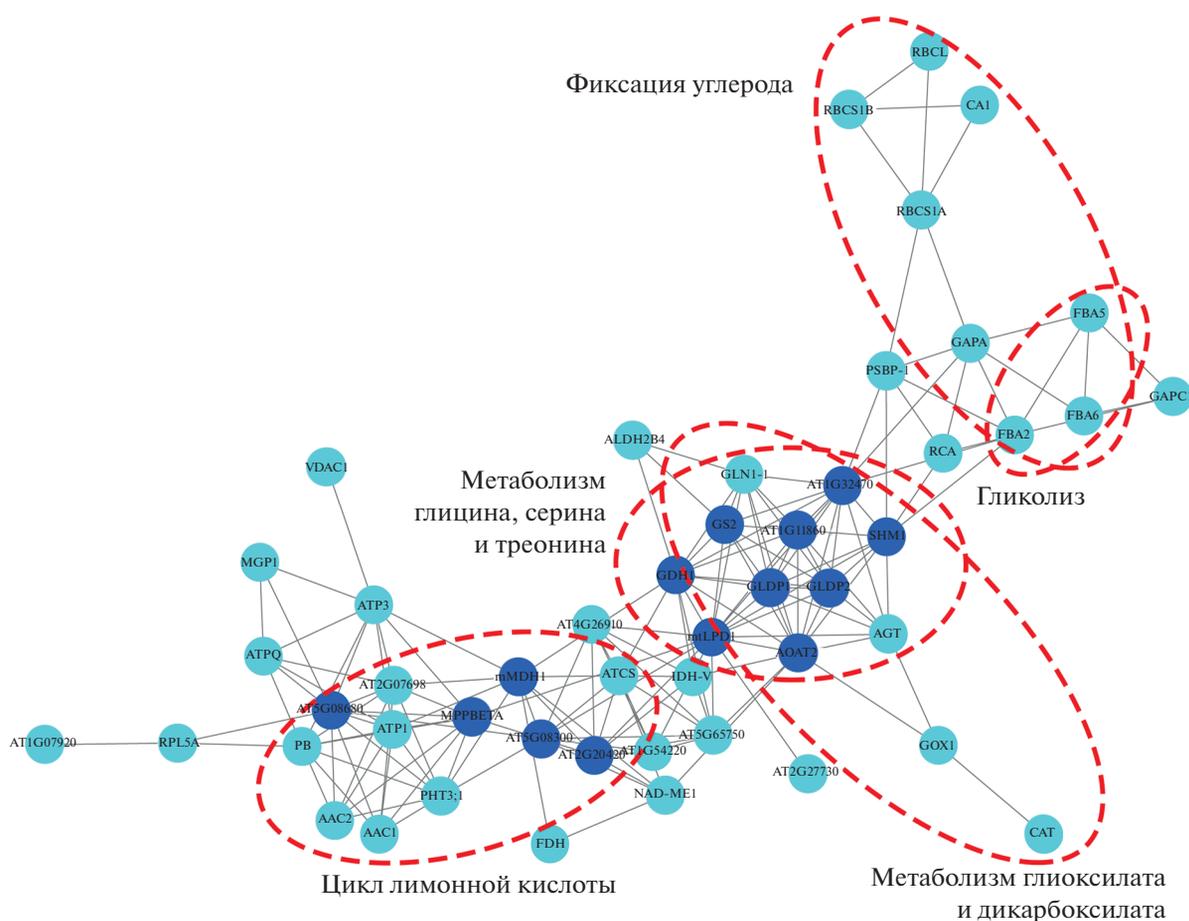


**Таблица 1.** Позиции сукцинированного лизина в белках

ID белка	Описание	Позиция
CSA010160.1	Дигидролипоилдегидрогеназа 1, митохондриальная [ <i>Ricinus communis</i> ]	K149, K334, K431, K154, K446, K411, K146
CSA017504.1	Цитратсинтаза, митохондриальная [ <i>Juglans regia</i> ]	K81, K165, K370, K372
CSA032333.1	2-оксоглутаратдегидрогеназа, митохондриальная [ <i>Vitis vinifera</i> ]	K531, K600, K604
CSA028548.1	Субъединица $\alpha$ -1 сукцинил-КоА-лигазы [ADP-образующей], митохондриальная [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	K67, K90
CSA019997.1	Компонент сукцинилтрансферазы остатка дигидролипоиллизина из 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса 2, подобный митохондриальному [ <i>Nelumbo nucifera</i> ]	K369
CSA028417.1	Компонент сукцинил-трансферазы остатка дигидролипоиллизина из 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса 2, подобный митохондриальному [ <i>Nelumbo nucifera</i> ]	K334
CSA016078.1	Каталитическая субъединица 5 изоцитратдегидрогеназы [NAD], подобная митохондриальной [ <i>Malus domestica</i> ]	K139
CSA035317.1	Серин-глиоксилат-аминотрансфераза [ <i>Capsicum annuum</i> ]	K25, K353, K223
CSA025613.1	Серин-гидроксиметилтрансфераза, митохондриальная [ <i>Nicotiana attenuata</i> ]	K407
CSA026298.1	Серин-гидроксиметилтрансфераза, митохондриальная [ <i>Vitis vinifera</i> ]	K488
CSA000918.1	Глутамат-глиоксилат-аминотрансфераза 2 [ <i>Jatropha curcas</i> ]	K35
CSA015996.1	Глициндегидрогеназа (декарбоксилирующая), митохондриальная [ <i>Nelumbo nucifera</i> ]	K459
CSA020117.1	Глициндегидрогеназа (декарбоксилирующая), митохондриальная [ <i>Nelumbo nucifera</i> ]	K454
CSA019996.1	Аминометилтрансфераза, митохондриальная [ <i>Nelumbo nucifera</i> ]	K395, K168
CSA029723.1	Н-белок 3 системы расщепления глицина, митохондриальный [ <i>Juglans regia</i> ]	K152, K156
CSA035939.1	Изоформа X1 пероксисомальной оксидазы GLO1 (S)-2-гидроксикислот [ <i>Cajanus cajan</i> ]	K347
CSA001272.1	Изофермент 3 каталазы [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	K495
CSA020605.1	Большая цепь рибулозобисфосфаткарбоксилазы (хлоропласт) [ <i>Camellia crapnelliana</i> ]	K60, K62, K68, K150, K139, K190, K300
CSA036938.1	Большая цепь рибулозобисфосфаткарбоксилазы (хлоропласт) [ <i>Camellia crapnelliana</i> ]	K21, K25, K198, K267
CSA001114.1	Изофермент глутаминсинтетазы в листьях (хлоропласт) [ <i>Juglans regia</i> ]	K355
CSA010785.1	Цитоплазматический изофермент 1 глутаминсинтетазы [ <i>Gossypium raimondii</i> ]	K272, K267
CSA034848.1	$\beta$ -субъединица сукцинил-КоА-лигазы [ADP-образующей] [ <i>Morus notabilis</i> ]	K89



**Рис. 5.** Сукцинирование по лизинам в гистонах чая. Выделены красным и подчеркнуты новые, ранее не идентифицированные сайты.



**Рис. 6.** Сеть PPI для белков чая, сукцинированных по лизину. Темно-синие кружки представляют собой сукцинилированные белки со степенями, большими или равными 10. Красными эллипсами обведены высокообогащенные взаимодействиями кластеры.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе изучен сукциниллизин в листьях чая QN3. Для характеристики сукцинированных белков и биохимических путей с их участием использованы методы биоинформатики. В ре-

зультате обнаружено 142 лизина со сдвигом массы 100.0186 Да. Согласно аннотации Unimod, наиболее вероятной структурой для этого сдвига масс считается сукцинильная группа или ее изомер – метилмалонильная группа. Стоит отме-

тить, что антитела, использованные в работе, специфически узнают сукцинилирование. Об использовании этих высокоспецифичных антител уже сообщалось ранее [4, 10–12, 14]. Это главная причина, по которой есть основание считать, что определенная нами модификация — сукцинилирование.

Сайты сукцинилирования обнаружены в 86 белках. Эти белки ассоциированы с метаболизмом глиоксилата и дикарбоксилата, метаболизмом глицина, серина и треонина и циклом ТСА. Анализ сети PPI показал, что сукцинилированные белки этих трех путей метаболизма находятся в тесном взаимодействии. На основании полученных данных можно говорить о том, что сукцинилирование лизина играет важную роль в метаболических путях в листьях чая. Метаболизм глиоксилата и дикарбоксилата тесно связан с метаболизмом глицина, серина и треонина, так как последний обеспечивает первый гидроксипироватом и глиоксилатом. Обнаружено 34 сайта сукцинилирования в 11 участвующих в обоих процессах белках, включая glyA, AGXT, GGAT, GLDC и другие.

Среди этих белков glyA (EC 2.1.2.1) представляет собой пиридоксальфосфат (витамин В6)-зависимый фермент, который катализирует превращение серина в глицин и наоборот [20]. У растений активность glyA обнаружена в цитозоле [21–23], митохондриях [21–25], пластидах [21, 23, 26] и ядре [25]. В отсутствие glyA происходит повреждение ДНК растений; останавливается ряд реакций, таких как фотосинтез, что ведет к возникновению соответствующих заболеваний [27, 28]. Сообщалось, что рецессивная мутация *glyA 1-1* вызывала нарушение регуляции гибели клеток и, как следствие, приводила к образованию хлоротических и некротических повреждений в различных условиях окружающей среды [29]. На сегодняшний день нет сообщений, в которых изучена функциональная значимость сукцинилирования glyA в растениях. Нами идентифицировано 2 сайта сукцинилирования glyA (K407 в CSA025613.1, K488 в CSA026298.1) в пиридоксальфосфатзависимом трансферазном домене. Это значит, что сукцинилирование glyA может играть важную роль в регуляции конверсии серина в глицин. Кроме того, в одном из исследований показано, что glyA важен в одноуглеродном метаболизме и фотодыхании у высших растений, то есть он вовлечен в процессы роста и развития растений и устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам [30]. Это говорит о том, что сукцинилирование glyA может также существенно влиять на рост и развитие, а также на устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам у растений чая.

AGXT (EC 2.6.1.44/2.6.1.45/2.6.1.51) и GGAT (EC 2.6.1.4/2.6.1.2/2.6.1.44) — это два ключевых фермента процесса фотодыхания, которые ката-

лизируют реакцию трансаминирования [31, 32]. Функция AGXT — катализ конверсии серина и глиоксилата в гидроксипироват и глицин [33, 34]. Ранее показано, что физиологическая функция AGXT заключается в преодолении таких стрессов, как инфекция патогенами, засоление и засуха [35]. Например, сверхэкспрессия AGXT в *Cucumis melo* приводила к значительному повышению устойчивости растения к болезням [36]. Сверхэкспрессия гена *AtAGT1 Arabidopsis thaliana*, кодирующего AGXT, значительно повышала солеустойчивость трансгенной ряски [37]. Аналогично, GGAT катализирует превращение глутамата и глиоксилата в  $\alpha$ -кетоглутарат и глицин [38, 39]. Ранее показано, что фотореспираторные аминотрансферазные реакции, катализируемые GGAT и AGXT, важны для регуляции уровня содержания аминокислот [40]. Нами в AGXT идентифицировано три сайта сукцинилирования (K52, K353, K223 в CSA035317.1) и один сайт в GGAT (K35 в CSA000918.1). Следовательно, активности AGXT и GGAT могут регулироваться сукцинилированием лизина. Однако регуляция фотодыхания под действием AGXT и GGAT изучена не до конца [31, 32]. Проведенное нами исследование открывает новые возможности для понимания механизмов регуляции AGXT и GGAT.

В ходе анализа нами обнаружены сукцинилированные белки, вовлеченные в цикл ТСА. Ранее сукцинилирование лизина картировано в ферментах цикла ТСА в *Brachypodium distachyon* L. [17] и *Taxus × media* [18]. Нами идентифицировано 20 сайтов сукцинилирования на семи белках, функционирующих в цикле ТСА, что предполагает участие сукцинилирования лизина в регуляции цикла ТСА. Интересно, что два сайта сукцинилирования (K67 и K90 в CSA028548.1) найдены в LSC1 (EC 6.2.1.4/6.2.1.5) и один (K89 в CSA034848.1) в LSC2 (EC 6.2.1.4/6.2.1.5). Функция LSC заключается в катализе нуклеотидзависимой конверсии сукцинил-КоА в сукцинат [41]. По-видимому, сукцинилирование лизина, влияя на ферментативную активность LSC, опосредованно регулирует выработку сукцинил-КоА и, как следствие, сукцинилирование. Кроме того, белок DLD (EC 1.8.1.4), который наиболее интенсивно сукцинилирован по остаткам лизина (K146, K149, K154, K334, K431 и K446 в CSA010160.1), также участвует в цикле ТСА. Ранее установлено, что сверхэкспрессия DLD повышает фотосинтез и, в свою очередь, накопление биомассы арабидопси-са [42]. Однако, насколько нам известно, пока нет сообщений о функциональной роли сукцинилирования DLD в растениях чая. Может ли сукцинилирование DLD регулировать фотосинтез, еще предстоит выяснить.

Работа выполнена при финансовой поддержке Significant Application Projects of Agriculture Technology Innovation in Shandong Province, the Tech-

nology System of Modern Agricultural Industry in Shandong Province (SDAIT-19-01) и the Special Foundation for Distinguished Taishan Scholar of Shandong Province (no. ts201712057).

Статья не содержит исследований с участием людей или животных, выполненных кем-либо из авторов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Witze E.S., Old W.M., Resing K.A., Ahn N.G. (2007) Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nat. Methods*. **4**(10), 798–806.
- Pan J., Chen R., Li C., Li W., Ye Z. (2015) Global analysis of protein lysine succinylation profiles and their overlap with lysine acetylation in the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Proteome Res.* **14**(10), 4309–4318.
- Xie Z., Dai J., Dai L., Tan M., Cheng Z., Wu Y., Boeke J.D., Zhao Y. (2012) Lysine succinylation and lysine malonylation in histones. *Mol. Cell. Proteomics*. **11**(5), 100–107.
- Zhang Z., Tan M., Xie Z., Dai L., Chen Y., Zhao Y. (2011) Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification. *Nat. Chem. Biol.* **7**(1), 58–63.
- Du J., Zhou Y., Su X., Yu J.J., Khan S., Jiang H., Kim J., Woo J., Kim J.H., Choi B.H. (2011) Sirt5 is an NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science*. **334**(6057), 806–809.
- Weinert B., Schölz C., Wagner S., Iesmantavicius V., Su D., Daniel J., Choudhary C. (2013) Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation. *Cell Rep.* **4**(4), 842–851.
- Xie L., Liu W., Li Q., Chen S., Xu M., Huang Q., Zeng J., Zhou M., Xie J. (2014) First succinyl-proteome profiling of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* revealed involvement of succinylation in cellular physiology. *J. Proteome Res.* **14**(1), 107–119.
- Cheng Y., Hou T., Ping J., Chen G., Chen J. (2016) Quantitative succinylome analysis in the liver of non-alcoholic fatty liver disease rat model. *Proteome Sci.* **14**(1), 3.
- Xie L., Li J., Deng W., Yu Z., Fang W., Chen M., Liao W., Xie J., Pan W. (2017) Proteomic analysis of lysine succinylation of the human pathogen *Histoplasma capsulatum*. *J. Proteomics*. **154**, 109–117.
- Jin W., Wu F. (2016) Proteome-wide identification of lysine succinylation in the proteins of tomato (*Solanum lycopersicum*). *PLoS One*. **11**(2), e0147586.
- Zhang Y., Wang G., Song L., Mu P., Wang S., Liang W., Lin Q. (2017) Global analysis of protein lysine succinylation profiles in common wheat. *BMC Genomics*. **18**(1), 309.
- Feng S., Jiao K., Guo H., Jiang M., Hao J., Wang H., Shen C. (2017) Succinyl-proteome profiling of *Dendrobium officinale*, an important traditional Chinese orchid herb, revealed involvement of succinylation in the glycolysis pathway. *BMC Genomics*. **18**(1), 598.
- Smestad J., Erber L., Chen Y., Maher L.J. 3rd. (2018) Chromatin succinylation correlates with active gene expression and is perturbed by defective TCA cycle metabolism. *iScience*. **2**, 63–75.
- Xu Y.X., Shen C.J., Ma J.Q., Chen W., Mao J., Zhou Y.Y., Chen L. (2017) Quantitative succinyl-proteome profiling of *Camellia sinensis* cv. “Anji Baicha” during periodic albinism. *Sci. Rep.* **7**(1), 1873.
- Tyanova S., Temu T., Cox J. (2016) The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat. Protoc.* **11**(12), 2301–2319.
- Young M.D., Wakefield M.J., Smyth G.K., Oshlack A. (2010) Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol.* **11**(2), R14.
- Zhen S., Deng X., Wang J., Zhu G., Cao H., Yuan L., Yan Y. (2016) First comprehensive proteome analyses of lysine acetylation and succinylation in seedling leaves of *Brachypodium distachyon* L. *Sci. Rep.* **6**, 31576.
- Shen C., Xue J., Sun T., Guo H., Zhang L., Meng Y., Wang H. (2016) Succinyl-proteome profiling of a high taxol containing hybrid *Taxus* species (*Taxus × media*) revealed involvement of succinylation in multiple metabolic pathways. *Sci. Rep.* **6**, 21764.
- Li X., Hu X., Wan Y., Xie G., Li X., Chen D., Cheng Z., Yi X., Liang S., Tan F. (2014) Systematic identification of the lysine succinylation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Proteome Res.* **13**(12), 6087–6095.
- Bhavani B.S. (2009) Structure-function relationships in serine hydroxymethyltransferase. *Thesis for the degree of PhD in Biochemistry to the University of Mysore, Mysore, India*.
- Besson V., Neuburger M., Rebeille F., Douce R. (1995) Evidence for three serine hydroxymethyltransferases in green leaf cells. Purification and characterization of the mitochondrial and chloroplastic isoforms. *Plant Physiol. Biochem.* **33**(6), 665–673.
- Gardeström P., Edwards G.E., Henricson D., Ericson I. (2010) The localization of serine hydroxymethyltransferase in leaves of C3 and C4 species. *Physiol. Plant* **64**(1), 29–33.
- Neuburger M., Rébeillé F., Jourdain A., Nakamura S., Douce R. (1996) Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **271**(16), 9466–9472.
- Turner S.R., Ireland R.J., Morgan C., Rawsthorne S. (1992) Identification and localization of multiple forms of serine hydroxymethyl transferase in pea (*Pisum sativum*) and characterization of a cDNA encoding a mitochondrial isoform. *J. Biol. Chem.* **267**(19), 13528–13534.
- Rebeille F., Neuburger M., Douce R. (1994) Interaction between glycine decarboxylase, serine hydroxymethyltransferase and tetrahydrofolate polyglutamates in pea leaf mitochondria. *Biochem. J.* **302**(1), 223–228.
- Zhang Y., Sun K., Sandoval F.J., Santiago K., Roje S. (2010) One-carbon metabolism in plants: characterization of a plastid serine hydroxymethyltransferase. *Biochem. J.* **430**(1), 97–105.
- Mouillon J.M., Aubert S., Bourguignon J., Gout E., Douce R., Rebeille F. (2010) Glycine and serine catabolism

- olism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism. *Plant J.* **20**(2), 197–205.
28. Li M., Limei C. (2008) The research advances on serine hydroxymethyltransferase gene in plants. *Biotechnology Bulletin.* **2**, 15–19.
  29. Moreno J.I., Martín R., Castresana C. (2010) *Arabidopsis* SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *Plant J.* **41**(3), 451–463.
  30. Wang D., Liu H., Li S., Zhai G., Shao J., Tao Y. (2015) Characterization and molecular cloning of a serine hydroxymethyltransferase 1 (OsSHM1) in rice. *J. Integr. Plant Biol.* **57**(9), 745–756.
  31. Zhang Z., Mao X., Ou J., Ye N., Zhang J., Peng X. (2015) Distinct photorespiratory reactions are preferentially catalyzed by glutamate:glyoxylate and serine:glyoxylate aminotransferases in rice. *J. Photochem. Photobiol. B.* **142**(142C), 110–117.
  32. Liang Y., Zeng X., Peng X., Hou X. (2018) *Arabidopsis* glutamate:glyoxylate aminotransferase 1 (Ler) mutants generated by CRISPR/Cas9 and their characteristics. *Transgenic Res.* **27**(1), 1–14.
  33. Liepman A.H., Olsen L.J. (2010) Peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **25**(5), 487–498.
  34. Zhang Q., Lee J., Pandurangan S., Clarke M., Pajak A., Marsolais F. (2013) Characterization of *Arabidopsis* serine:glyoxylate aminotransferase, AGT1, as an asparagine aminotransferase. *Phytochemistry.* **85**(2), 30–35.
  35. Abogadallah G.M. (2011) Differential regulation of photorespiratory gene expression by moderate and severe salt and drought stress in relation to oxidative stress. *Plant Sci.* **180**(3), 540–547.
  36. Taler D., Galperin M., Benjamin I., Cohen Y., Kenigsbuch D. (2004) Plant eR genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease. *Plant Cell.* **16**(1), 172–184.
  37. Yang L., Han H., Liu M., Zuo Z., Zhou K., Lü J., Zhu Y., Bai Y., Wang Y. (2013) Overexpression of the *Arabidopsis* photorespiratory pathway gene, serine:glyoxylate aminotransferase (*AtAGT1*), leads to salt stress tolerance in transgenic duckweed (*Lemna minor*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **113**(3), 407–416.
  38. Igarashi D., Miwa T., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Ohsumi C. (2010) Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in *Arabidopsis*. *Plant J.* **33**(6), 975–987.
  39. Liepman A.H., Olsen L.J. (2003) Alanine aminotransferase homologs catalyze the glutamate:glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **131**(1), 215–227.
  40. Igarashi D., Tsuchida H., Miyao M., Ohsumi C. (2006) Glutamate:glyoxylate aminotransferase modulates amino acid content during photorespiration. *Plant Physiol.* **142**(3), 901–910.
  41. Przybyla-Zawislak B., Dennis R.A., Zakharkin S.O., McCammon M.T. (1998) Genes of succinyl-CoA ligase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **258**(2), 736–743.
  42. Timm S., Wittmiß M., Gamlien S., Ewald R., Florian A., Frank M., Wirtz M., Hell R., Fernie A.R., Bauwe H. (2015) Mitochondrial dihydrolipoyl dehydrogenase activity shapes photosynthesis and photorespiration of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* **27**(7), 1968–1984.

## A QUALITATIVE PROTEOME-WIDE LYSINE SUCCINYLACTION PROFILING OF TEA REVEALED ITS INVOLVEMENT IN PRIMARY METABOLISM

C. Qiu<sup>1</sup>, Y. Wang<sup>1</sup>, J. H. Sun<sup>1</sup>, W. J. Qian<sup>1</sup>, H. Xie<sup>1</sup>, Y. Q. Ding<sup>1</sup>, and Z. T. Ding<sup>1</sup>,\*

<sup>1</sup>Tea Research Institute, Qingdao Agricultural University, Changcheng Road, Chengyang District, Qingdao, Shandong, 266109 China

\*e-mail: dztea@163.com

Lysine succinylation of proteins has potential impacts on protein structure and function, which occurs on post-translation level. However, the information about the succinylation of proteins in tea plants is limited. In the present study, the significant signal of succinylation in tea plants was found by western blot. Subsequently, we performed a qualitative analysis to globally identify the lysine succinylation of proteins using high accuracy nano LC-MS/MS combined with affinity purification. As a result, a total of 142 lysine succinylation sites were identified on 86 proteins in tea leaves. The identified succinylated proteins were involved in various biological processes and a large proportion of the succinylation sites were presented on proteins in the primary metabolism, including glyoxylate and dicarboxylate metabolism, TCA cycle and glycine, serine and threonine metabolism. Moreover, 10 new succinylation sites were detected on histones in tea leaves. The results suggest that succinylated proteins in tea plants might play critical regulatory roles in biological processes, especially in the primary metabolism. This study not only comprehensively analyzed the lysine succinylome in tea plants, but also provided valuable information for further investigating the functions of lysine succinylation in tea plants.

**Keywords:** *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, post-translational modification, lysine succinylation, metabolism