ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

РОЛЬ ПРОТЕОМНЫХ И ФОСФОПРОТЕОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ПРОЯВЛЕНИИ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТИЛЖАСМОНАТА НА РАСТЕНИЯ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ВЛАГИ

**Федорова К.А., Авальбаев А.М.,
Аллагулова Ч.Р., Юлдашев Р.А., Шакирова Ф.М.**

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа
E-mail: avalbaev@yahoo.com

В работе исследовали влияние метилжасмоната (МеЖ) на распределение растворимых белков и уровень тирозинового фосфорилирования полипептидов побегов проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в условиях обезвоживания. Обнаружено, что засуха вызывала уменьшение уровня большинства белков, в частности, белков фотосинтеза, роста и энергетического обмена растений. Вместе с тем, в условиях обезвоживания было выявлено значительное снижение уровня фосфорилирования белков по тирозину и уменьшение количества фосфотирозиновых белков в побегах проростков пшеницы. Предобработка растений МеЖ способствовала адаптации протеома и тирозинового фосфопротеома к действию стресса. В пользу этого свидетельствуют данные об уменьшении в условиях обезвоживания в предобработанных фитогормоном проростках уровня ряда защитных белков в сравнении с необработанными растениями. Вместе с тем, предобработка МеЖ предотвращала стресс-индуцированное падение содержания белков фотосинтеза, роста и энергетического обмена растений, а также резкое снижение уровня тирозинового фосфорилирования и количества фосфотирозиновых полипептидов. Таким образом, полученные результаты демонстрируют регуляторную роль МеЖ в активации белкового метаболизма, лежащего в основе проявления его защитного эффекта на растения пшеницы в условиях дефицита влаги.

Ключевые слова: метилжасмонат, протеом, тирозиновое фосфорилирование, засуха

ROLE OF PROTEOMIC AND PHOSPHOPROTEOMIC CHANGES IN THE PROTECTIVE ACTION OF METHYL JASMONATE ON WHEAT PLANTS UNDER DEHYDRATION CONDITIONS

**Fedorova K.A., Avalbaev A.M.,
Allagulova Ch.R., Yuldashev R.A., Shakirova F.M.**

Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal
Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: avalbaev@yahoo.com

In this work, we investigated the effect of methyl jasmonate (MeJA) on the distribution of soluble proteins and the level of tyrosine phosphorylation in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) shoots under dehydration conditions. It was found that drought caused a decrease in the levels of most proteins, in particular, proteins involved in photosynthesis, growth and energy metabolism processes. Meanwhile, dehydration resulted in a significant decrease in the level of tyrosine phosphorylation as well as a decrease in the amount of phosphotyrosine proteins in wheat seedling shoots. Pretreatment of plants with MeJA contributed to the adaptation of the proteome and tyrosine phosphoproteome to the action of stress. This is supported by data on a decrease in the contents of protective proteins in MeJA-pretreated seedlings in comparison with untreated plants under drought conditions. At the same time, pretreatment with MeJA prevented stress-induced decrease in the contents of proteins involved in photosynthesis, growth and energy metabolism processes as well as a sharp decrease in the level of tyrosine phosphorylation and the amount of phosphotyrosine polypeptides. Thus, the obtained results demonstrate the regulatory role of MeJA in the activation of protein metabolism, which is the basis for the display of its protective effect on wheat plants under dehydration conditions.

Keywords: methyl jasmonate, proteome, tyrosine phosphorylation, drought

Поступила в редакцию: 2.07.2019

DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-3-246-252](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-246-252)

ВВЕДЕНИЕ

Жасмоновая кислота и ее функционально активные производные, в частности метилжасмонат (МеЖ), объединенные в самостоятельную группу фитогормонов жасмонатов, участвуют в регуляции разнообразных процессов роста и развития растений [Huang et al., 2017; Ruan et al., 2019]. Жасмонаты играют ключевую роль в формировании индуцированной системной устойчивости растений к некротрофным патогенам и поранению насекомыми, в основе которой лежит экспрессия защитных белков [Wasternack, Hause, 2013]. Вместе с тем, в последнее время получены веские доказательства участия жасмонатов в регуляции устойчивости разных культур к стрессовым факторам абиотической природы, в том числе, вызывающим нарушение водного режима в растениях [Ullah et al., 2018].

Большой массив данных о вовлечении жасмонатов в регуляцию разнообразных физиологических процессов, лежащих в основе жизнедеятельности растений [Huang et al., 2017], свидетельствует о влиянии этих фитогормонов на протеом. Следует отметить, что в настоящее время протеомный анализ находит широкое применение как мощный и перспективный инструмент для изучения молекулярных механизмов действия фитогормонов [Černý et al., 2015; Zhang et al., 2015]. Хотя на данный момент сведения о белках, вовлекающихся в реализацию физиологического действия жасмонатов в растениях, ограничены. Вместе с тем, интерес вызывает исследование молекулярных механизмов сигналинга жасмонатов. Хорошо известна ключевая роль фосфорилирования/дефосфорилирования белков в преобразовании и передаче сигналов в клетке [Wu et al., 2015]. Хотя тирозиновое фосфорилирование у растений гораздо менее изучено, чем сериновое и треониновое, и составляет незначительную долю от общего фосфорилирования, работы исследователей показали, что оно играет существенную роль в рецепции и дальнейшем формировании ответа клеток на внеклеточные сигналы, в том числе на обработку фитогормонами и воздействие стрессов [Shankar et al., 2015].

Ранее нами были получены данные о сочетании у метилжасмоната ростстимулирующего в норме и протекторного эффектов в условиях дефицита влаги на растения пшеницы [Аллагулова и др., 2018], что свидетельствует об активном воздействии МеЖ на протеом проростков пшеницы в норме и в условиях обезвоживания. В ходе последующих исследований нами было выявлено, что ростстимулирующий эффект метилжасмоната на растения пшеницы может являться следствием увеличения под действием гормона содержания белков и повышения уровня тирозинового фосфорилирования полипептидов, вовлеченных в интенсификацию метаболизма клеток [Авальбаев и др., 2018]. В настоящей работе встает задача выявления роли протеомных и фосфопротеомных перестроек в реализации протекторного действия МеЖ на проростки пшеницы в условиях дефицита влаги.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Башкирская 26. Семена после стерилизации проращивали в течение 3 суток (16 часовая световая день, 15 клк) при 22-24°C. После отделения эндосперма 3-сут. проростки корнями помещали в стаканы с раствором 2%-ной сахарозы в смеси с 0.1 мкМ МеЖ на 24 ч. Далее 4-сут. необработанные и обработанные гормоном проростки подвергали действию

обезвоживания, моделируемой 12%-ным полиэтиленгликолем (ПЭГ), в течение 24 ч. Контролем служили не подвергнутые действию МеЖ и ПЭГ проростки.

Для анализа использовали побеги, которые отделяли от корней и фиксировали в жидком азоте. Экстракцию растворимых белков проводили с помощью буфера, содержащего 50 мМ *N*-пепс КОН, pH 7.5; 1 мМ ДТТ; 1 мМ ФМСФ; 10 мМ ЭГТА; 0.1 мМ ортованадат натрия; 1 мМ теofilлин и 3% поливинилпирролидон. Гомогенат центрифугировали при 12000 g и 4°C в течение 10 мин. Белки супернатанта осаждали 80% ацетоном и растворяли в изофокусирующем буфере. Белки разделяли методом двумерного электрофореза (2DE) и подвергали иммуноблоттингу со специфичными к фосфотирозину антителами PY20 (“Amersham”, Англия) [Федина и др., 2006].

Для идентификации белков из геля вырезали белковые пятна и проводили триптический гидролиз белка. Масс-спектры фрагментов белков получали на tandemном MALDI-TOF-TOF масс-спектрометре Ultraflex II («Bruker», Германия), оснащенном УФ-лазером, в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск белков осуществлялся в базах данных NCBI и UniProt (подбаза – растения). Регистрацию масс-спектров и идентификацию белков проводили в Междисциплинарном центре протеомных исследований при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Эксперименты проводили в двух–трех повторностях, приведены результаты типичного опыта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью выявления значения протеомных перестроек в проявлении защитного действия МеЖ, мы провели анализ влияния предобработки этим фитогормоном на распределение пула растворимых белков растений пшеницы в условиях дефицита влаги. Из рис. 1б можно видеть, что воздействие 12%-ного ПЭГ приводит к значительным количественным и качественным изменениям в белковом спектре побегов проростков пшеницы. С помощью методов 2DE и MALDI-TOF масс-спектрометрии у подвергнутых обезвоживанию проростков выявлено уменьшение содержания белков фотосинтеза (полипептиды, входящие в состав кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II (№ 1 и 2), малая (№ 3) и большая (№ 5) субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы (РБФК), хлоропластная фруктозо-бисфосфат альдолаза ((№ 4) и др.), роста и энергетического обмена растений (актин (№ 10), α -субъединица тубулина (№ 11) и др.). (Характеристики и названия идентифицированных белков, которые были разделены по функциональным группам, представлены в табл. 1.) Вместе с тем, обнаружено также и исчезновение ряда полипептидов (рис. 1б). В то же время в побегах проростков пшеницы, подвергнутых воздействию засухи, наблюдается существенное повышение содержания защитных белков (2-цис-пероксиредоксин (№ 14), глутатион-S-трансфераза (№ 15), аскорбат пероксидаза (№ 16) и др.), что свидетельствует о сильной стрессовой нагрузке на эти проростки (рис. 1б, табл. 1). Поскольку предобработка МеЖ оказывала протекторный эффект на рост растений пшеницы в условиях обезвоживания [Аллагулова и др., 2018], можно было ожидать активацию этим фитогормоном адаптационного потенциала протеома к возможным неблагоприятным воздействиям. В пользу этого свидетельствуют данные о некотором увеличении (гораздо меньшем в сравнении с действием засухи) в растениях в ответ на обработку МеЖ

содержания идентифицированных нами защитных белков, в частности, 2-цис-пероксиредоксина, аскорбат пероксидазы и глутатион-S-трансферазы (рис. 1в). Перечисленные выше протекторные белки вносят значительный вклад в защиту растений от негативного действия неблагоприятных факторов, в частности дефициту влаги [Тарчевский, Егорова, 2015]. Весьма интересен обнаруженный нами факт увеличения содержания под влиянием МеЖ хлоропластного 2-цис-пероксиредоксина (рис. 1в), важного антиоксиданта хлоропластов, который катализирует утилизацию в них различных перекисей, что в свою очередь, может способствовать защите хлоропластов, фотосинтетического аппарата, прежде всего белков-ферментов фотосинтеза, от разрушительного действия окислительного стресса [Dietz, 2011].

Рис. 1. Разделение растворимых полипептидов побегов МеЖ-предобработанных проростков пшеницы при помощи 2DE в условиях ПЭГ-индуцированной засухи. а – контроль; б – 12% ПЭГ; в – 0.1 мкМ МеЖ; г – 0.1 мкМ МеЖ + 12% ПЭГ. 3-суточные проростки инкубировали в течение 24 ч на среде, содержащей 0.1 мкМ МеЖ, и затем подвергали воздействию 12% ПЭГ в течение 24 ч. Идентифицированные белки пронумерованы и информация о них приведена в табл. 1. Зелеными стрелками обозначены белки фотосинтеза, синими – белки роста и энергетического обмена, красными – защитные белки.

Вместе с тем, в условиях обезвоживания в предобработанных МеЖ проростках пшеницы уровень накопления защитных белков (2-цис-пероксиредоксин, аскорбат пероксидаза, глутатион-S-трансфераза и др.) в сравнении с необработанными растениями существенно снижен (рис. 1б, г), что указывает на уменьшение стрессовой нагрузки на предобработанные МеЖ проростки. На это также указывают данные о предотвращении гормоном стресс-индуцированного снижения белков фотосинтеза (полипептиды, входящие в

состав кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II, малая и большая субъединицы РБФК, фруктозо-бисфосфат альдолаза и др.), роста и энергетического обмена растений (актин, α -субъединица тубулина, глутамин синтетаза) (рис. 1б, г). Полученные результаты иллюстрируют эффективность предобработки МеЖ в снижении уровня негативного действия засухи на проростки и вклад идентифицированных белков в проявление антистрессовой активности исследованного фитогормона на растения пшеницы.

Регуляция активности белков может вносить существенный вклад в формирование устойчивости растительных организмов к неблагоприятным условиям среды. Как уже упоминалось выше, регуляция активности белков может осуществляться на уровне их посттрансляционных модификаций, в частности, фосфорилирования. Фосфорилирование белков по тирозину является ключевой реакцией сигнальных систем и необходимым регуляторным компонентом многих интегральных процессов клеток, в том числе, поддержания клеточного гомеостаза [Shankar et al., 2015]. Поэтому далее мы с помощью иммуноблоттинга с применением высокоспецифичных антител к фосфотирозину проанализировали эффект предобработки МеЖ на уровень тирозинового фосфорилирования растворимых белков проростков пшеницы при воздействии 12%-ного ПЭГ (рис. 2).

Рис. 2 - Фосфорилирование по тирозину растворимых полипептидов побегов МеЖ-предобработанных проростков пшеницы в условиях ПЭГ-индуцированной засухи. а – контроль; б – 12% ПЭГ; в – 0.1 мкМ МеЖ; г – 0.1 мкМ МеЖ + 12% ПЭГ. 3-суточные проростки инкубировали в течение 24 ч на среде, содержащей 0.1 мкМ МеЖ, и затем подвергали воздействию 12% ПЭГ в течение 24 ч. Идентифицированные белки пронумерованы и информация о них приведена в табл. 1. Зелеными стрелками обозначены белки фотосинтеза, синими – белки роста и энергетического обмена, красными – защитные белки, черными – неидентифицированные белки.

Таблица 1. Характеристика растворимых белков *Triticum aestivum* идентифицированных с помощью MALDI-TOF MS

№ пятна ^а	№ белка в базах NCBI или UniProt	Достоверность поиска ^б	Идентифицированные белки <i>Triticum aestivum</i> и тождественные белкам других организмов ^в
Фотосинтез			
1	gi 474352688	76	Полипептид 1 кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II <i>Triticum urartu</i>
2	gi 21837	104	Полипептид 2 кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II <i>Triticum aestivum</i>
3	gi 11990895	100	Малая субъединица РБФК <i>Triticum aestivum</i>
4	gi 357157399	76	Хлоропластная фруктозо-1,6-бисфосфат альдолаза <i>Brachypodium distachyon</i>
5	gi 14017580	221	Большая субъединица РБФК <i>Triticum aestivum</i>
6	gi 474438538	74	РБФК-связывающий белок <i>Triticum urartu</i>
7	gi 129915	62	Фосфоглицерат киназа <i>Triticum aestivum</i>
8	gi 723047999	130	Активазы РБФК <i>Triticum aestivum</i>
Рост и энергетический обмен			
9	gi 473798701	61	β -субъединица АТФ-синтазы <i>Triticum urartu</i>
10	ACT1_ORYSI	64	Актин 1 <i>Oryza sativa</i>
11	gi 90289596	81	α -тубулин <i>Triticum aestivum</i>
12	gi 474323684	61	Протеинкиназа семейства SHAGGY <i>Triticum urartu</i>
13	gi 473997750	69	Рибонуклеопротеин <i>Triticum urartu</i>
19	GLNA2_HORVU	58	Изоформа глутамин синтетазы <i>Hordeum vulgare</i>
Защитные белки			
14	BAS1_WHEAT	116	2-цис-пероксиредоксин <i>Triticum aestivum</i>
15	gi 20067415	123	Глутатион-S-трансфераза <i>Triticum aestivum</i>
16	gi 474311703	127	L-аскорбат пероксидаза 1 <i>Triticum urartu</i>
17	gi 474407512	129	Шаперонин с М.м.20 кД <i>Triticum urartu</i>
18	gi 376372849	63	Полипептид семейства PINB-2v2-2 <i>Triticum aestivum</i>

^а № пятна на 2D-геле.

^б Достоверность идентификации белков (Score) в базе данных NCBI или UniProt (подбаза – растения) с использованием программы Mascot, где предел отсечения составлял 58 ($p < 0.05$). Критерием достоверности поиска является значение, характеризующееся уникальностью регистрируемого набора масс для белка из базы данных, количеством предполагаемых пептидов и полнотой перекрывания последовательности.

^в Название белка согласно базе данных NCBI или UniProt.

Как можно видеть из рис. 2б, воздействие обезвоживания приводит к радикальному уменьшению числа фосфотирозиновых белков. Вместе с тем, интенсивность фосфорилирования полипептидов у подвергнутых действию засухи проростков, среди которых 2-цис-пероксиредоксин, актин и глутамин синтетаза, значительно снижена (рис. 2б).

Эти результаты оказались несколько неожиданными для нас, поскольку ранее в литературе описывалось усиление тирозинового фосфорилирования при действии стресса, в частности, в растениях гороха при действии натрий-хлоридного засоления [Федина, 2013]. По-видимому, различие в действии засухи (полученные нами данные) и засоления [Федина, 2013] на фосфорилирование белков по тирозину объясняется разницей в силе стресса: 12%-ный ПЭГ, использовавшийся в наших экспериментах, оказывал более сильный ингибирующий эффект на уровень тирозинового фосфорилирования в сравнении с таковым 100 мМ NaCl на растения гороха [Федина, 2013]. Полученные нами данные указывают на драматичное нарушение клеточной сигнализации в подверженных действию обезвоживания проростках, что может объяснять резкое нарушение ростовых процессов растений в условиях этого стресса [Аллагулова и др., 2018].

Предобработка проростков пшеницы МеЖ, заметно снижающая повреждающий эффект 12%-ного ПЭГ на рост [Аллагулова и др., 2018], способствует адаптации фосфопротеома проростков к неблагоприятному действию засухи. Об этом свидетельствует восстановление до контрольного уровня количества фосфотирозиновых белков и уровня фосфорилирования полипептидов по тирозину под влиянием гормона (рис. 2б, г). Таким образом, важный вклад в реализацию защитного действия МеЖ к действию засухи может вносить вызванное гормоном восстановление до уровня контроля стресс-индуцированного снижения числа фосфотирозиновых полипептидов и уменьшение уровня тирозинового фосфорилирования.

Совокупность полученных результатов свидетельствует, что в основе защитного действия метилжасмоната на растения пшеницы лежит регуляция под влиянием этого фитогормона изменений в протеоме и тирозиновом фосфопротеоме.

Работа выполнена в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350029-1) при частичной поддержке гранта РФФИ № 17-04-01853_а, с привлечением приборного парка ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авальбаев А.М., Юлдашев Р.А., Федорова К.А., Аллагулова Ч.Р., Гильманова Р.И., Федина Е.О., Петрова Н.В., Каримова Ф.Г., Шакирова Ф.М. Вклад изменений в протеоме и тирозиновом фосфопротеоме в реализацию ростстимулирующего действия метилжасмоната на проростки пшеницы // Известия УНЦ РАН. 2018. № 3-1. С. 5–10.
2. Аллагулова Ч.Р., Авальбаев А.М., Юлдашев Р.А., Шакирова Ф.М. Сравнительный анализ защитного действия 6-бензиламинопурина и метилжасмоната на проростки пшеницы в условиях дефицита влаги // Известия УНЦ РАН. 2018. № 3-1. С. 11–15.
3. Тарчевский И.А., Егорова А.М. Протеомный анализ влияния циклогексимида на корни гороха // Физиология растений. 2015. Т. 62, № 6. С. 893–905.
4. Федина Е.О. Влияние 24-эпибрасинолида на фосфорилирование белков по тирозину у гороха после действия засоления // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 360–368.
5. Федина Е.О., Каримова Ф.Г., Тарчевский И.А. Влияние брасинолида на тирозинное фосфорилирование белков листьев гороха // Биохимия. 2006. Т. 71. Вып. 4. С. 525–532.