

листьев, содержание хлорофилла и активность фотосистемы II). Были подобраны условия для изолирования фракции хлоропластов в градиенте перколя. Из выделенных хлоропластов после лизиса был изолирован белок, который гидролизовали трипсином с применением техники FASP (Filter Aided Sample Preparation). Полученные пептиды были проанализированы на тандемном жидкостном хромато-масспектрометре (nanoLC-MS/MS). Всего было найдено 116 сайтов, несущих модификацию Nε-(ацетил)лизин и Nε-(формил)лизин. В растениях, выращенных в нормальных условиях всего выявлено 39 таких сайтов, из них 13 сайтов Nε-(ацетил)лизина и 27 сайтов Nε-(формил)лизина, тогда как у экспериментальных растений после 5 дней засухи – всего 47 сайтов, из них 20 и 27 сайтов Nε-(ацетил)лизина и Nε-(формил)лизина соответственно. В настоящее время проводится количественная оценка изменений, происходящих по отдельным сайтам. В частности, относительное количественное содержание гликированного пептида DQYIA^YVK_{acetyl}DK, относящегося к большой субъединице RuBisCo увеличилось в 1,5 раза в хлоропластах растений экспериментальной группы по сравнению с контролем.

Таким образом показаны качественные и количественные изменения в протеоме хлоропластов *Nicotiana benthamiana* при стрессе засухой; обсуждается их физиологическая роль, в том числе сигнальная и регуляторная.

НО-опосредованная аутофагия в высших растениях: от идентификации аутофагических генов до посттрансляционной модификации белков

Мазина А. Б.^{A*}, Газизова Н. И.^A, Даминова А. Г.^A, Лексин И. Ю.^A, Лукашева Е. М.^B, Шумилина Ю. С.^B, Горбач Д. П.^B, Фролов А. А.^B, Минибаева Ф. В.^A

^A Казанский институт биохимии и биофизики - обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия. *E-mail abmazina@gmail.com

^B Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

^B Институт физиологии растений РАН им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Аутофагия является универсальным механизмом деградации поврежденных или токсичных компонентов во время развития или стрессового ответа в эукариотических клетках. В ходе аутофагии нежелательные компоненты окружаются аутофагосомами (двойными мембранными везикулами), посредством которых эти компоненты доставляются в вакуоли для последующей деградации (Yang, Klionsky, 2009). Нами показано, что в растениях одними из индукторов аутофагии являются активные формы

азота, в том числе оксида азота (NO) (Minibayeva *et al.*, 2023). Одним из ключевых механизмом NO-опосредованной сигнализации является посттрансляционная модификация (ПТМ) белков посредством S-нитрозилирования. Аутофагия участвует в процессах формирования органов и тканей, биогенеза растительных вакуолей, в процессах старения организма, а также устойчивости к стрессу (Phillips *et al.*, 2008, Tang *et al.*, 2018). В связи с этим, расшифровка механизмов, контролирующую индукцию, развитие или ингибирование аутофагии, может способствовать разработке способов повышения резистентности растительного организма к условиям неблагоприятной среды.

На сегодняшний день в высших сосудистых растениях аутофагические гены и белки довольно хорошо изучены. Этому способствовал полногеномный анализ нескольких видов сосудистых растений, в том числе *Arabidopsis*, *Oryza*, *Zea*. Обратная ситуация наблюдается для пшеницы *Triticum aestivum* – одной из наиболее востребованных в мире сельскохозяйственных культур, чей аллогексаплоидный геном и протеом до сих пор полностью не аннотированы. Представляется важным выявить консервативные участки аутофагических генов и белков у пшеницы и оценить возможную эволюционную древность этих последовательностей.

Генетический механизм аутофагии был систематически расшифрован путем идентификации и функционального анализа более 40 аутофагических (ATG) генов у эукариот (Furukawa *et al.*, 2019). Геномы растений кодируют множество ATG ортологов, идентифицированных у дрожжей и млекопитающих. ATG белки традиционно делят на четыре белковых кластера: 1) киназный комплекс ATG1/ATG13, который инициирует образование аутофагосом в ответ на недостаток питания и в ходе онтогенеза; 2) специфический для аутофагии фосфатидилинозитол (PI) 3-киназный комплекс III класса (PI3K); 3) комплекс ATG9, способствующий экспансии фагофора; 4) убиквитин-подобные системы конъюгации ATG8/ATG12, которые действуют во время экспансии и созревания фагофора (Kim *et al.*, 2011).

Для сравнительного анализа аутофагических генов и белков у растений нами были выбраны бриофиты (мохообразные). Бриофиты являются эволюционно древними высшими несосудистыми растениями, промежуточной формой между низшими и высшими сосудистыми растениями. Многие бриофиты являются экстремофилами и способны выживать в чрезвычайно неблагоприятных условиях (Wood *et al.*, 2007). Использование бриофитов в качестве модельных объектов для изучения аутофагии является чрезвычайно перспективным, поскольку выявление различий в морфологических особенностях, экспрессии ATG генов и активности ATG белков, а также биохимических механизмах регуляции данного процесса

в бриофитах и других высших растениях может приблизить нас к пониманию роли аутофагии в процессах роста, развития и устойчивости растений в ходе эволюции.

Для анализа нами был выбран мох *Dicranum scoparium* Hedw., который отличается значительной устойчивостью к действию абиотических стрессовых факторов. До настоящего времени геном мха *D. scoparium* не аннотирован, и последовательности *ATG* генов в базе данных отсутствуют. На основании имеющихся в базе данных NCBI SRA транскриптомных данных мха *D. scoparium* нами были *in silico* идентифицированы уникальные транскрипты *ATG* генов, далее их последовательности были подтверждены экспериментально путем клонирования и секвенирования.

Множественное выравнивание последовательностей *ATG* белков пшеницы, дикранума и других растений выявило высокую гомологию аминокислотных последовательностей и наличие консервативных участков. Стоит отметить, что в аминокислотных последовательностях ключевого аутофагического белка *ATG8* пшеницы наблюдались точечные аминокислотные замены, которые сохранялись в нескольких изоформах белка. Филогенетический анализ последовательностей *ATG* белков бриофитов и высших сосудистых растений на основе полученных множественных выравниваний показал, что последовательности мха *D. scoparium* находятся в одной группе с бриофитами и наиболее близкородственны белкам *Physcomitrella patens*. Это позволяет предположить, что дивергентность изоформ белка *ATG8* эволюционно возникла относительно недавно. Таким образом, обнаружено близкое родство *ATG* белков *D. scoparium* с гомологичными белками других бриофитов, а также близкое родство *ATG* белков пшеницы с гомологичными белками других высших сосудистых и несосудистых растений.

С целью анализа паттернов влияния *NO* на аутофагию в клетках высших несосудистых и сосудистых растений нами проводились эксперименты по анализу экспрессии *ATG* генов, вовлеченных в различные этапы формирования аутофагосом во мхе и пшенице, подвергнутых воздействию доноров *NO*. Было обнаружено, что во мхе *D. scoparium* действие нитрата и нитрита калия, нитропруссиды натрия и спермина (полиамин) в течение 3 ч стимулировало в несколько раз экспрессию транскриптов изоформ *ATG8*. Дальнейшее воздействие до 6 ч нитрита калия еще больше повышало уровень экспрессии всех анализируемых транскриптов.

В корнях пшеницы анализ экспрессии *ATG* генов во временной динамике 3-6-12 ч показал, что доноры *NO* повышают экспрессию *ATG* генов при 3 и 6 ч действии, к 12 ч воздействия уровень экспрессии снижался. Интересно, что экспрессия *ATG* генов под действием спермина имела колоколообразную форму с максимальным уровнем в 6 ч. Таким образом,

можно предположить, что доноры NO вызывают повышение уровня экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие во всех этапах формирования аутофагосомы.

Маркерными белками аутофагии являются белки ATG4 и ATG8. Белки ATG4, принадлежащих к семейству цистеиновых протеаз, и белки ATG8 из семейства убиквитин-подобных белков необходимы для образования аутофагосомальных мембран (Farré, Subramani, 2016). Методом иммунодетекции с использованием поликлональных антител против ATG4 и ATG8 нами было показано накопление белков ATG4 и ATG8 в корнях, подвергшихся воздействию доноров NO. Самый высокий и статистически достоверный уровень ATG4 и ATG8 наблюдался после 3 ч обработки проростков пшеницы спермином. Интересно, что после 3 ч обработки нитритом калия ATG8 визуализировался в делипидированной и липидированной формах, появляющихся на финальных стадиях образования аутофагосом. Таким образом, результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что наиболее эффективным индукторами аутофагии среди NO доноров являются спермин и нитрит калия.

Известно, что белки, вовлеченные в процесс аутофагии, подвергаются разнообразным посттрансляционным модификациям (Agbemaflé *et al.*, 2023). К сожалению, информация о роли NO-опосредованных модификаций, в том числе S-нитрозилирования белков, в регуляции аутофагии чрезвычайно ограничена. S-нитрозилирование – это обратимое преобразование тиоловых групп белков в S-нитрозотиолы. S-нитрозилирование является динамической, обратимой посттрансляционной модификацией, которая регулирует функции многих белков (Lindermaуr *et al.*, 2005; Niu *et al.*, 2019). На данный момент аутофагические механизмы, опосредованные S-нитрозилированием белков, активно изучаются на клетках млекопитающих (Montagna *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2019), однако существуют лишь единичные публикации о подобных исследованиях на клетках растений.

Воздействие на интактные корни *T. aestivum* донора NO (нитрит калия) или ингибитора митохондриальной электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) антимицина А приводило к накоплению в клетках аутофагосом и повышению экспрессии *ATG* генов. Биоинформатический анализ выявил наличие сайтов S-нитрозилирования в структуре белков ATG4a, ATG4b, ATG16 (Таблица 1).

Гипотетические сайты нитрозилирования аутофагических белков *Triticum aestivum*

Белок	Uniprot ID	Гипотетические сайты нитрозилирования
ATG4 ATG4b	C0LP24 U3Q008	48
ATG4.2	C0LP25	50, 101, 289
ATG4a	U3PWQ4	47
ATG16a ATG16b	U3PWS4 U3Q035	391

Методом иммуноцитохимии и иммунопреципитации с использованием моноклональных антител выявлено накопление S-нитрозилированных белков в клетках корней пшеницы при индукции аутофагии. Мы показали, что в корнях пшеницы при действии индукторов аутофагии, напрямую или опосредованно влияющих на уровень оксида азота в клетках, происходит повышение уровня S-нитрозилированных белков. С целью идентификации S-нитрозилированных белков для эффективного поиска белков-кандидатов мы использовали комплексный методический подход, включающий дериватизацию нитрозогруппы с использованием коммерческого набора, идентификацию белков с помощью метода скорострельной протеомики («shotgun») и биоинформатический анализ. С помощью моделирования белок-белковых взаимодействий предсказано вовлечение идентифицированных белков, в т.ч. GAPDH, ABC-транспортера и других, в аутофагические процессы.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что в клетках высших растений NO индуцирует аутофагию, что характеризуется изменениями в уровне экспрессии аутофагических генов и накоплении аутофагических белков. Одной из ключевой ПТМ, регулирующей активность белков, вовлеченных в аутофагические процессы, является их S-нитрозилирование. Можно полагать, что аутофагия в клетках растений является эволюционно древним процессом. Механизмы, опосредованные активными формами азота, являются универсальными для индукции и процессинга аутофагии в высших сосудистых и несосудистых растениях.

Данное исследование выполнено в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

Библиографические ссылки

1. Agbemaflе, W. Transcriptional and post-translational regulation of plant autophagy. / W. Agbemaflе, M. M. Wong, D. C. Bassham // Journal of Experimental Botany. – 2023. – V. 74. – № 19. – P. 6006-6022.

2. Farré, J.-C. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast / J.-C. Farré, S. Subramani // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2016. – V. 17. – № 9. – P. 537-552.
3. Furukawa, K. Regulatory Mechanisms of Mitochondrial Autophagy: Lessons From Yeast / K. Furukawa, A. Innokentev, T. Kanki // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – V. 10.
4. Kim, J. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 / J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, K.-L. Guan // *Nature Cell Biology*. – 2011. V. 13. – № 2. – P. 132-141.
5. Lindermayr, C. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis / C. Lindermayr, G. Saalbach, J. Durner // *Plant Physiology*. – 2005. – V. 137. – № 3. – P. 921-930.
6. Minibayeva, F. Nitric oxide induces autophagy in *Triticum aestivum* roots / F. Minibayeva, A. Mazina, N. Gazizova, S. Dmitrieva, A. Ponomareva, D. Rakhmatullina // *Antioxidants*. – 2023. – V. 12. – № 9.
7. Montagna, C. To eat, or NOT to eat: S-nitrosylation signaling in autophagy / C. Montagna, S. Rizza, E. Maiani, L. Piredda, G. Filomeni, F. Cecconi // *The FEBS Journal*. – 2016. – V. 283. – № 21. – P. 3857-3869.
8. Niu, L. Proteomic investigation of S-nitrosylated proteins during NO-induced adventitious rooting of cucumber / L. Niu, J. Yu, W. Liao, J. Xie, J. Yu, J. Lv, X. Xiao, L. Hu, Y. Wu // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – V. 20. – № 21.
9. Phillips, A.R. The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana* / A.R. Phillips, A. Suttangkakul, R.D. Vierstra // *Genetics*. – 2008. – V. 178. – № 3. – P. 1339-1353.
10. Tang, H.-W. The TORC1-regulated CPA complex rewires an RNA processing network to drive autophagy and metabolic reprogramming / H.-W. Tang, Y. Hu, C.-L. Chen, B. Xia, J. Zirin, M. Yuan, J.M. Asara, L. Rabinow, N. Perrimon // *Cell Metabolism*. – 2018. – V. 27. – № 5. – P. 1040- 1054.e8.
11. Yang, Z. An overview of the molecular mechanism of autophagy / Z. Yang, D.J. Klionsky *Autophagy in Infection and Immunity* / Ed. B. Levine // Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, – 2009. – P. 1–32.
12. Wood, A.J. The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses / A. J. Wood // *The Bryologist*. – 2007. – V. 110. – № 2. – P. 163-177.
13. Zhu, L. PTEN S-nitrosylation by NOS1 inhibits autophagy in NPC cells / L. Zhu, C. Zhang, Q. Liu // *Cell Death & Disease*. – 2019. – V. 10. – № 4. – P. 306.

Влияние цинк-солюбилизующих PGP-ризобактерий и опрыскивания йодом на редокс-реакции в листьях гороха (*Pisum sativum* L. сорт Мадрас)

Малева М. Г.^{A*}, Борисова Г. Г.^A, Ахамуэфуле К. Ч.^A, Дарказанли М.^A

^A Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия. *E-mail: maria.maleva@mail.ru

Изучение растительно-микробных взаимодействий позволяет предложить цельную стратегию экологически устойчивого растениеводства,