

СЕКРЕТОМЫ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР ГРЕЧИХИ С РАЗНОЙ МОРФОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Н.И. Румянцева¹, А.Н. Акулов^{1,2}, А.В. Лайков², Е.А. Гумерова¹, Ю.А. Костюкова¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, Казань, Россия

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия, alexander.laykov@yandex.ru

Аннотация. Проведен сравнительный анализ секретомов морфогенной (МСК) и неморфогенной (НСК) суспензионных культур *Fagopyrum tataricum*. Сделан вывод о том, что состав белков секретомы зависит от степени дифференцированности суспензионной культуры и, в целом, отражает ее физиолого-биохимические особенности.

Ключевые слова: гречиха татарская, морфогенная и неморфогенная суспензионная культура, экстраклеточные белки, идентификация белков, классификация белков

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1358-1362

Основная стратегия, позволяющая растениям адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды, заключается в изменении метаболизма, активации или синтезе защитных соединений различной природы, локализуемых в основном апопластно, т.е. в периплазматическом пространстве, клеточных стенках и на поверхности клеток. Белки, секретируемые в апопласт, могут формировать первую линию защиты в ответ на действие биотических и абиотических стрессоров, поэтому секреторные процессы обуславливают одну из важнейших функций при взаимодействии растений с окружающей средой. Цель работы состояла в сравнительном изучении секретомов морфогенной (МСК) и неморфогенной (НСК) суспензионных культур *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn – дикого вида гречихи, отличающегося высоким содержанием биологически активных флавоноидов. Сведения о секретоме сем. *Polygonaceae* в литературе отсутствуют.

Суспензионные культуры гречихи татарской были получены из морфогенного и неморфогенного каллусов как описано ранее [Румянцева и др., 2004; Гумерова и др., 2015]. Экстраклеточные белки выделяли на четвертые сутки пассажа, в фазу наиболее активного деления клеток. Среду культивирования отделяли от клеток и их обломков фильтрацией через Miracloth, центрифугировали и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, а затем лиофильно высушивали. Лиофилизат использовали для выделения белков фенольным методом, белки трипсинолизировали и анализировали с помощью HPLC-MS/MS. Для получения масс-листов масс-спектры обрабатывали в программе DataAnalysis 4.1. Белки идентифицировали по масс-листам с помощью программы Mascot 2.4.0, используя базу данных белковых последовательностей, полученную на основе полногеномного РНК-секвенирования *F. tataricum* (предоставлена М.Д. Логачёвой, МГУ). Белки считали достоверно идентифицированными при score выше 28. Переидентификацию белков и аннотирование делали по протеомной базе UniProtKB и литературным данным. Белки анализировали на присутствие C- и N- концевых гидрофобных доменов, а также трансмембранных доменов, используя следующие информационные ресурсы SignalP, Phobius, PrediSi, PredGPI, GPI-SOM, TMHMM; для анализа субклеточной локализации: TargetP 1.1, WoLF PSORT; белки классифицировали по биологическим и молекулярным функциям.

Нами показано, что МСК секретирует в 8-9 раз больше белков по сравнению с НСК. Ранее было установлено, что морфогенные культуры содержат в 2-2,5 раза больше внутриклеточных растворимых белков по сравнению с неморфогенными [Румянцева и др., 2004; Акулов и др., 2010]. При использовании проточной цитофлуометрии выявлено, что содержание ДНК в большинстве ядер морфогенных культур гречихи татарской преимущественно соответствует диплоидному числу хромосом, в то время как в неморфогенных оно варьирует от 4С до 64С, что соответствует полиплоидным наборам хромосом [Betekhtin et al., 2017]. Тем не менее, несмотря на увеличение числа хромосом и, соответственно, содержания ДНК в ядре, НСК секретирует гораздо меньше белков по сравнению с МСК. Нами идентифицировано 226 экстраклеточных белков МСК и 136 экстраклеточных белков НСК. Установлено, что содержание белков с N-концевым сигнальным пептидом в секретах МСК и НСК составляет 40,3% и 52,2%, соответственно. В обеих культурах значительную часть экстраклеточных белков, не имеющих N-концевого сигнального пептида, представляют многофункциональные (moonlighting) белки. Это наиболее “древний” класс белков, которые помимо энзиматической функции, выполняемой в одних компартментах, могут осуществлять другие, неэнзиматические функции (например, функции шаперонов, рецепторов, адгезинов) при перемещении в другие компартменты клетки, в том числе и экстраклеточный матрикс [Jeffery et al., 2016]. К ним относятся белки, вовлеченные в гликолиз (например, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, енолаза, пируваткиназа), цикл трикарбоновых кислот (аконитаза, изоцитратдегидрогеназа), факторы элонгации, некоторые антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза). Кроме того, среди белков, не имеющих N-концевого сигнального пептида, были выявлены антиоксидантные ферменты (глутатион-S-трансферазы, каталаза, глутатионредуктаза), шапероны (белки теплового шока, 14-3-3 белки, калретикулин, кальмодулин), а также сериновые и аспарагиновые эндопептидазы, ингибиторы сериновых протеаз. Ортологи этих белков были обнаружены в секретах других растений [Pechanova et al., 2010, Gupta et al., 2011; Hafidh et al., 2016]. Полученные результаты указывают на вклад неклассической секреции белков в формирование секрета суспензионных культур *F. tataricum*.

Отмечено, что неклассически секретируемые белки присутствуют во всех изученных секретах растений [Krause et al., 2013; Delaunoy et al., 2014]. В секрете пыльцевых трубок [Hafidh et al., 2016] и в экссудатах кончиков корней [Wen et al., 2007] их содержание достигает 80%. Большее содержание белков без сигнального пептида в МСК по сравнению с НСК может свидетельствовать о том, что процессы дифференцировки в растениях (в случае МСК – формирование проэмбриональных клеточных комплексов-ПЭКК), так же как и в животных, сопряжены с неклассической секрецией белков.

Согласно классификации по биологическим функциям, наибольшую долю в секретах как МСК, так и НСК формируют белки, вовлеченные в углеводный метаболизм (с преобладанием белков клеточной стенки) (рис.1). Отличительной чертой секрета МСК по сравнению с секретом НСК является большая доля белков, участвующих в метаболизме белков и поддержании редокс гомеостаза (рис. 1). При этом основную часть защитных белков секрета НСК составляют шапероны (белки теплового шока), а МСК – протеазы, а также ингибиторы протеаз и полигалактуроназ. Высокое содержание протеаз в секрете МСК может быть обусловлено их разнообразной активностью, связанной не только с защитой клеток хозяина от чужеродных белков, но и вовлечением в процессинг белков, выделение биоактивных пептидов, шеддинг белков с поверхности клеток [Guerra-Guimarães et al., 2016]. Преобладающую часть класса белков с сигнальными функциями в секрете НСК

составляют шапероны, в то время как в классе сигнальных белков МСК шапероны и протеинкиназы представлены одинаково. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными о том, что морфогенные культуры гречихи татарской имеют более активный белковый метаболизм и содержат больше внутриклеточных белков по сравнению с неморфогенными культурами [Румянцева и др., 2004; Акулов и др., 2010]. Нами было также показано, что морфогенные культуры более устойчивы к различным стрессовым воздействиям по сравнению с неморфогенными, что объясняется высокой активностью антиоксидантных ферментов, а также большим содержанием неферментативных антиоксидантов, таких как фенольные соединения и восстановленный глутатион [Нигматуллина и др., 2014; Akulov et al., 2018]. Согласно классификации по молекулярным функциям основу секретомов в обеих культурах составляют ферменты, из них гидролазы и оксидоредуктазы представляют наиболее крупные классы (рис. 2). Основное отличие состоит в том, что класс связывающих белков в секретоме НСК более значителен, чем в МСК и представлен, в основном, шаперонами.

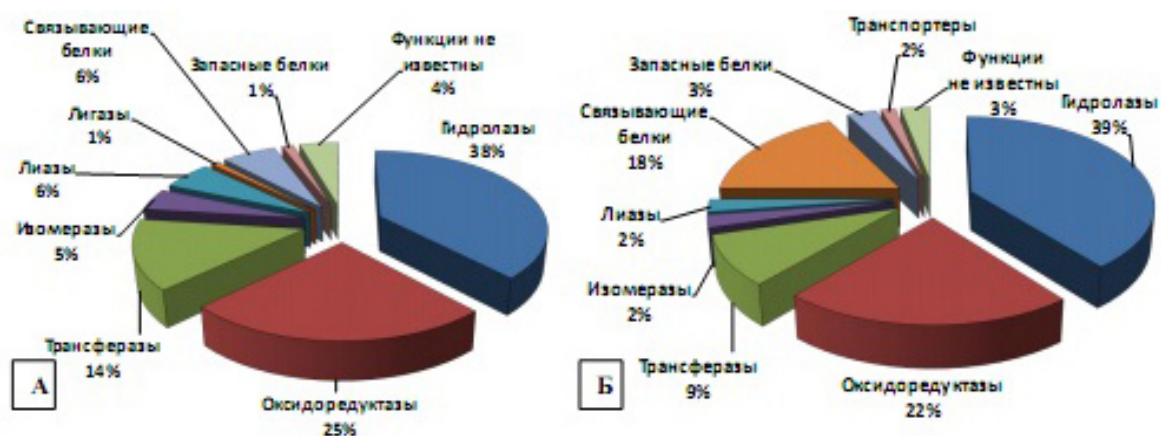


Рис. 1. Классификация экстраклеточных белков суспензионных культур *Fagopyrum tataricum* по биологическим функциям. А – морфогенная суспензионная культура; Б – неморфогенная суспензионная культура.

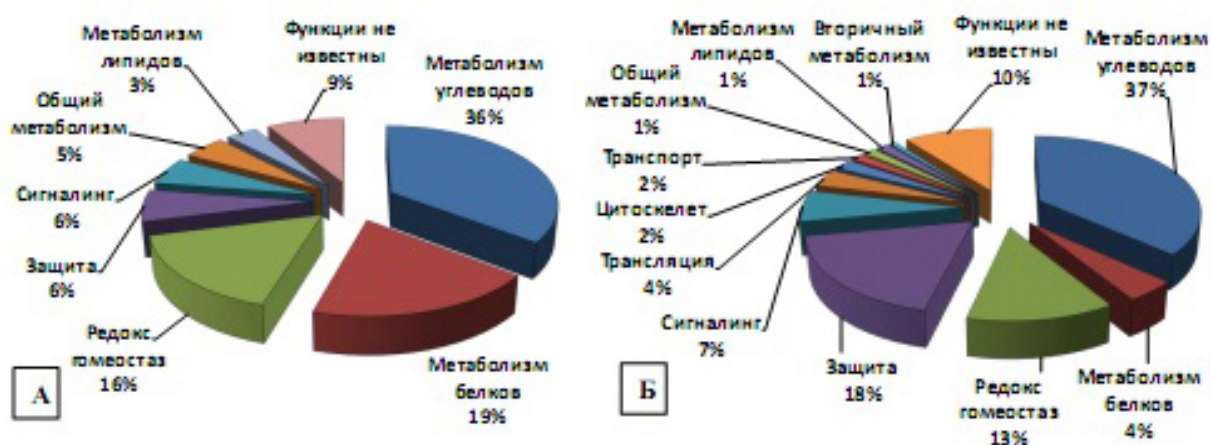


Рис. 2. Классификация экстраклеточных белков суспензионных культур *Fagopyrum tataricum* по молекулярным функциям. А – морфогенная суспензионная культура; Б – неморфогенная суспензионная культура.

Таким образом, нами впервые проведено изучение секретомы гречихи татарской. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что состав секретомы зависит от степени дифференцированности суспензионной культуры и, в целом, отражает ее физиолого-биохимические особенности. Изучение состава и динамики экстраклеточных белков в норме и при определенных стрессовых нагрузках может способствовать выявлению новых механизмов защиты растений, а также биомаркеров для создания или отбора форм растений, устойчивых к стрессорам различной природы.

Литература

Акулов А.Н., Скрипников А.Ю., Румянцева Н.И. Экспрессия 1-цис пероксиредоксина в морфогенных и неморфогенных каллусах гречихи татарской // Физиология растений. – 2010. – Т. 57. – С. 433–440.

Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Румянцева Н.И. Влияние метилжасмоната на ростовые характеристики суспензионной культуры гречихи татарской и накопление в ней фенольных соединений // Физиология растений. – 2015. – Т. 62. – С. 212–221.

Нигматуллина Л.Р., Румянцева Н.И., Костюкова Ю.А. Влияние D,L-бутионин-S,R-сульфоксимины на соотношение форм глутатиона и рост каллусов гречихи татарской // Онтогенез. – 2014. – Т. 45. – С. 50–62.

Румянцева, Н.И., Акулов А.Н., Мухитов А.Р. Экстраклеточные полимеры в каллусных культурах *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. с разной морфогенной активностью: динамика в ходе культурального цикла // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40 – С. 571–578.

Akulov A.N., Gumerova E.A., Rumyantseva N.I. Cell cultures of *Fagopyrum tataricum* as a source of biologically active phenolic compounds // Buckwheat Germplasms in the (eds. World. M. Zhou, I. Kreft, G. Suvorova et al.). – Elsevier: Academic press, 2018. – P. 259–270.

Betekhtin A., Rojek M., Jaskowiak J., Milewska-Hendel A., Kwasniewska J., Kostyukova Y., Kurczynska E., Rumyantseva N., Hasterok R. Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. // PLoS One. – 2017. – V. 12. – doi.org/10.1371/journal.pone.0173537.

Delaunoy B., Colby T., Belloy N., Conreux A., Harzen A., Baillieul F., Clément C., Schmidt J., Jeandet P., Cordelier S. Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes // Plant Biol. – 2013. – V. 8 – P. 13–24.

Guerra-Guimarães L., Pinheiro P., Chaves I., Barros D.R., Ricardo C.P. Protein dynamics in the plant extracellular space // Proteomes. – 2016. – V. 4. – doi:10.3390/proteomes4030022.

Gupta S., Wardhan V., Verma S., Gayali S., Rajamani U., Datta A., Chakraborty S., Chakraborty N. Characterization of the secretome of chickpea suspension culture reveals pathway abundance and the expected and unexpected secreted proteins // J. Proteome Res. – 2011. – V. 10. – P. 5006–5015.

Hafidh S., Potěšil D., Fíla J., Čapková V., Zdráhal Z., Honys D. Quantitative proteomics of the tobacco pollen tube secretome identifies novel pollen tube guidance proteins important for fertilization // Genome Biology. – 2016. – V. 17. – P. 1–29.

Jeffery C.J. Protein species and moonlighting proteins: Very small changes in a protein's covalent structure can change its biochemical function // J. Proteomics. – 2016. – V. 134. – P. 19–24.

Krause C., Richter S., Knöll C., Jürgens G. Plant secretome - from cellular process to biological activity // Biochimica et Biophysica Acta. – 2013 – V. 1834. – P. 2429–2441.

Pechanova O., Hsu C.Y., Adams J.P., Pechan T, Vandervelde L., Drnevich J., Jawdy S., Adeli A., Suttle J.C., Lawrence A.M., Tschaplinski T.J., Séguin A., Yuceer C. Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar // BMC Genomics. – 2010. – V. 11. – P. 674.

Wen F., VanEtten H.D, Tsaprailis G., Hawes M.C. Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates // Plant Physiol. – 2007. – V. 143. – P. 773–783.

SECRETOMES OF BUCKWHEAT SUSPENSION CULTURES WITH DIFFERENT MORPHOGENIC ACTIVITY

N.I. Rumyantseva¹, A.N. Akulov^{1,2}, A.V. Laykov², E.A. Gumerova¹,
Yu.A. Kostyukova¹

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia, nat_rumyantseva@mail.ru

²Kazan University, Kazan, Russia, alexander.laykov@yandex.ru

Abstract. Secretomes of morphogenic (MSC) and non-morphogenic (NSC) suspension cultures of *Fagopyrum tataricum* were compared. We concluded that the composition of secretomes depend on the degree of differentiation of cells and reflect their physiological and biochemical characteristics.

Keywords: *tartary buckwheat, morphogenic and non-morphogenic suspension cultures, extracellular proteins, protein identification, protein classification*