

О Г Л Я Д И

УДК 577.15:581.1

ПРОЛИН: ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И РЕГУЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ В РАСТЕНИЯХ В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

© 2014 г. Ю. Е. Колупаев, А. А. Вайнер, Т. О. Ястреб

*Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева
(Харьков, Украина)*

Описаны пути синтеза пролина из глутамата и орнитина, приведены сведения о ключевых ферментах, задействованных в синтезе и деградации пролина, их локализации в клетках и регуляции активности у растений. Обобщены данные об изменении содержания пролина в растениях как ответной реакции на действие стрессоров различной природы. Подробно рассмотрены функции пролина в стрессовых условиях: осмопротекторная, шаперонная, антиоксидантная, его участие в регуляции экспрессии генов антиоксидантных ферментов. Также обсуждаются причины прооксидантных эффектов пролина. Рассмотрено участие сигнальных и гормональных посредников в процессе стресс-индуцированного синтеза пролина. Проанализирована связь между устойчивостью растений к стрессорам и содержанием пролина.

Ключевые слова: *пролин, глутамат, орнитин, антиоксиданты, прооксиданты, шаперонное действие пролина, устойчивость растений*

Пролин является одним из наиболее многофункциональных стрессовых метаболитов растений. В настоящее время считается, что помимо давно установленной осмопротекторной функции, пролин выполняет шаперонную, антиоксидантную, сигнально-регуляторную и другие функции (Szabados, Savoure, 2009; Carvalho et al., 2013). При действии стрессоров создаются условия для наиболее выраженного проявления указанных эффектов пролина. Эта аминокислота выполняет и ряд функций, не связанных с адаптацией растений к действию стрессоров. Так, в физиологически нормальных условиях значительное количество пролина транспортируется в репродуктивные органы растений (Mattioli et al., 2009). Накопление пролина считается одним из важных сигналов для перехода к цветению (Schawacke et al., 1999). Эта аминокислота необходима для нормального развития пыльцы и семян (Funck et al., 2012).

Несмотря на многолетнее изучение физиологических функций «стрессового» пролина, многие вопросы, связанные с его участием в адаптации растений к неблагоприятным условиям, далеки от полного выяснения. Так, не ясно, как соотносятся между собой про- и антиоксидантные эффекты пролина, каким образом пролин, как протекторный агент, взаимодействует с другими защитными системами растительных клеток, в частности с ферментативными антиоксидантами, с чем связано отсутствие стабильных корреляций между накоплением пролина и устойчивостью растений к стрессорам, как взаимодействуют между собой сигнальные и гормональные посредники при регуляции содержания пролина у растений в условиях действия стрессоров. Обобщению данных литературы последних лет, которые позволяют хотя бы частично ответить на очерченный круг вопросов, и посвящен настоящий обзор.

Синтез и деградация пролина

Пролин в растениях может синтезироваться двумя путями – из глутамата или орнитина (рис. 1). Считается, что синтез пролина, индуцированный действием стрессоров, происходит в основном по глутаматному пути (Liang

Адрес для корреспонденции: Колупаев Юрий Евгеньевич, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, п/о «Коммунист-1», Харьков, 62483, Украина;
e-mail: plant_biology@mail.ru

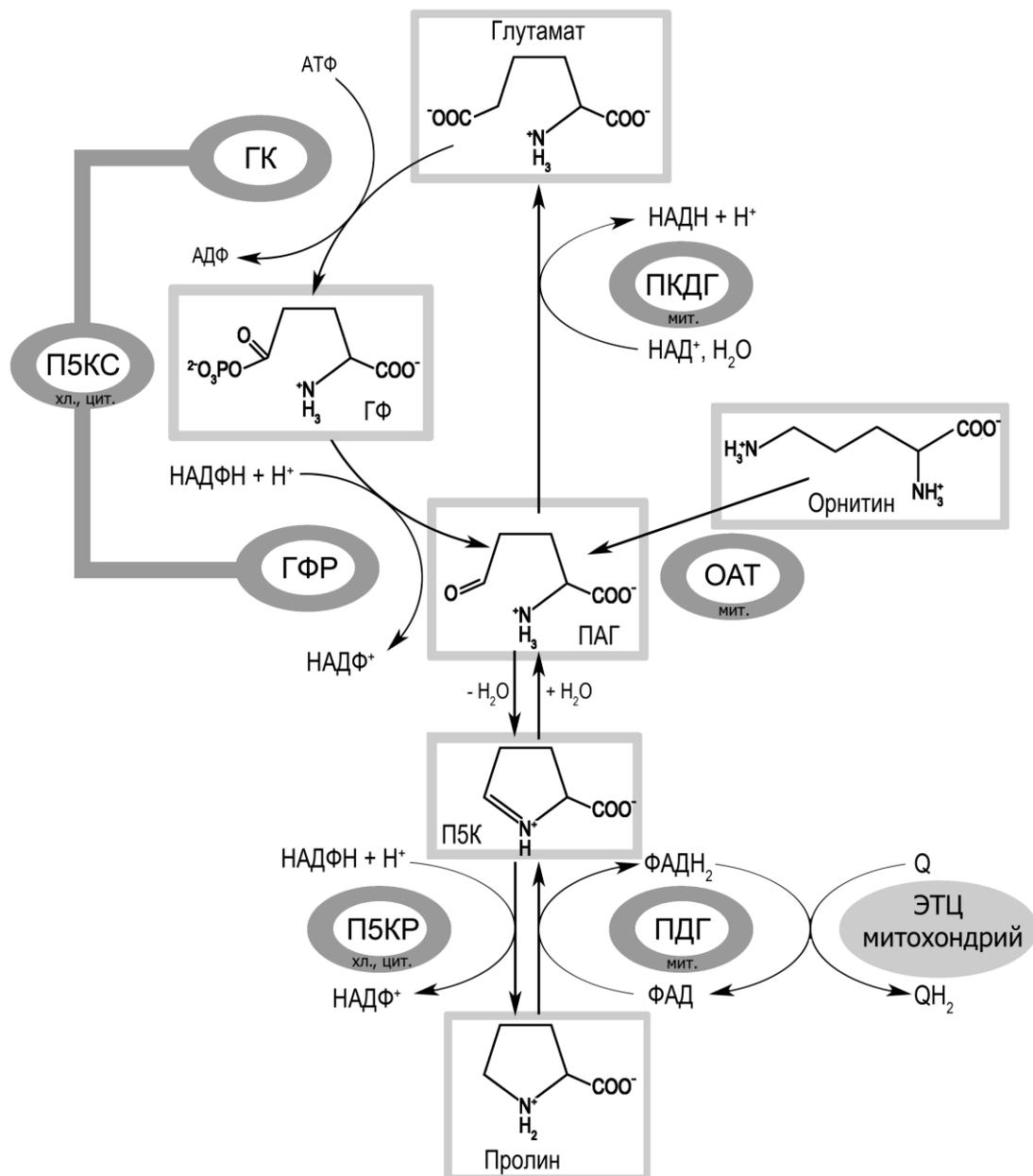


Рис. 1. Синтез и деградация пролина (использованы данные: Szabados, Savoure, 2009; Arentson et al., 2012; Liang et al., 2013).

ГФ – L-глутамил-γ-фосфат; ПАГ – γ-полуальдегид глутаминовой кислоты; П5К – Δ¹-пирролин-5-карбоновая кислота; ГК – глутаматкиназа; ГФР – глутамилфосфатредуктаза; П5КС – Δ¹-пирролин-5-карбоксилатсинтаза; П5КР – Δ¹-пирролин-5-карбоксилатредуктаза; ОАТ – орнитин-δ-аминотрансфераза; ПДГ – пролиндегидрогеназа; ПКДГ – Δ¹-пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназа; мит. – митохондрии; хл. – хлоропласты; цит. – цитоплазма. Пояснения в тексте.

et al., 2013). Ключевым ферментом этого пути является Δ¹-пирролин-5-карбоксилатсинтаза (П5КС, КФ 2.7.2.11.1.2.1.41), которая обладает двойной функцией. Сначала благодаря свойственной этому ферменту γ-глутамилкиназной активности происходит фосфорилирование L-глутамата. Образующийся L-глутамил-γ-фосфат (ГФ) превращается затем в γ-полуальдегид глутаминовой кислоты (ПАГ) с

помощью этого же фермента, функционирующего как НАДФН-зависимая ПАГ-дегидрогеназа. ПАГ подвергается спонтанной циклизации с образованием Δ¹-пирролин-5-карбоновой кислоты (П5К), которая затем восстанавливается до пролина с помощью НАДФН-зависимой Δ¹-пирролин-5-карбоксилат-редуктазы (П5КР, КФ 1.5.1.2).

ПРОЛИН: ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И РЕГУЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ

П5КС у большинства растений кодируется двумя генами и представлена соответственно двумя молекулярными формами – П5КС1 и П5КС2 (Armengaud et al., 2004). П5КС1 локализована в цитоплазме и хлоропластах, П5КС2 – только в цитоплазме (Szekely et al., 2008; Szabados, Savoure, 2009). Скорость синтеза пролина лимитируется именно реакцией, катализируемой П5КС (Szekely et al., 2008; Szabados, Savoure, 2009). Известно также, что П5КС подвергается ингибированию пролином как продуктом реакции (Тищенко, 2013).

П5КР у растений кодируется одним геном и выявлена как в цитозоле, так и в хлоропластах (Verbruggen, Hermans, 2008; Szabados, Savoure, 2009).

В орнитиновом пути ПАГ и П5К образуются из орнитина с помощью орнитин- δ -аминотрансферазы (ОАТ, КФ 2.6.1.13). Этот процесс у растений происходит в митохондриях (Szabados, Savoure, 2009) (рис. 1). Вклад ОАТ в синтез пролина до сих пор остается предметом дискуссии. Высказываются даже предположения, что ОАТ не принимает участия в синтезе пролина, а является ферментом синтеза других аминокислот – аргинина и орнитина (Герасимова и др., 2011). В то же время имеется немало сведений, указывающих на участие ОАТ в синтезе пролина, в т.ч. в ответ на действие стрессоров. Так, у *Brassica juncea* активность ОАТ и содержание пролина повышались с нарастанием концентрации соли в среде (Madan et al., 1995). У *Brassica napus* экспрессия ОАТ активировалась только при сильном и продолжительном действии осмотического стресса (Герасимова и др., 2011). В условиях осмотического стресса показано усиление синтеза транскриптов и активности ОАТ и у проростков *Arabidopsis thaliana* (Sharma, Verslues, 2010). Примечательно, что индукция экспрессии гена ОАТ не наблюдалась у растений, мутантных по гену основного пути биосинтеза пролина – П5КС. В связи с этим предполагается, что накопление пролина вызывает индукцию ОАТ (Sharma, Verslues, 2010; Герасимова и др., 2011).

В настоящее время предполагается, что ОАТ участвует не только в синтезе П5К, который затем превращается в пролин, но и в конвертации пролина в глутамат (Sharma, Verslues, 2010). При этом в дальнейшем глутамат орнитинового происхождения может вступать в стандартный путь биосинтеза пролина.

Если считать, что глутамат является основным источником «стрессового» пролина,

количество которого может возрасти в десятки раз, то становится понятной необходимость синтеза при стрессе не только пролина, но и глутамата. В свою очередь доступность глутамата для синтеза пролина прямо зависит от системы фиксации минерального азота растениями (Diaz et al., 2010). Глутамат в клетке образуется двумя путями: присоединением иона аммония к α -кетоглутарату глутаматдегидрогеназой, а также путем переноса глутамин-оксоглутарат аминотрансферазой аминокетогруппы с глутамин-оксоглутарата на α -кетоглутарат с образованием двух молекул глутамата (Герасимова и др., 2011). В свою очередь глутамин образуется путем присоединения аммония к глутамату глутаминсинтазой. Таким образом, для достаточного накопления пролина в ответ на действие стрессора необходима активация биосинтеза глутамата и фиксации азота (Diaz et al., 2010). В ряде работ продемонстрирована активация аминирующей активности глутаматдегидрогеназы и глутаминсинтазы в ответ на осмотический стресс и установлена связь накопления пролина с интенсивностью фиксации азота (см. обзор: Герасимова и др., 2011).

В то же время некоторое увеличение содержания пролина в ответ на действие стрессоров и экзогенных соединений, индуцирующих его синтез, возможно, по-видимому, и без поглощения «внешнего» азота. Так, показано полуторакратное увеличение содержания пролина в проростках пшеницы, инкубированных на растворе сахарозы, под влиянием экзогенных цитокинина и брассиностероида (Юлдашев, 2009). В молодых растениях проса, которые выращивали на водопроводной воде, зарегистрировано повышение содержания пролина при солевом стрессе (Вайнер и др., 2013). По-видимому, возможен синтез определенного количества пролина за счет перераспределения внутренних источников азота.

Деградация пролина происходит в митохондриях путем последовательного его окисления пролиндегидрогеназой (ПДГ, КФ 1.5.99.8) до П5К и затем пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназой (ПКДГ, КФ 1.5.1.12) до глутамата (Liang et al., 2013) (рис. 1). При этом скорость деградации пролина определяется активностью ПДГ (Liang et al., 2013). ПДГ содержит нековалентно связанный ФАД, который принимает электроны от пролина, затем происходит передача электронов от восстановленного ФАД к убихинону внутренней мембраны митохондрий. Образовавшаяся при окислении пролина П5К спонтанно пре-

вращается в ПАГ, а последний окисляется в глутамат ПКДГ с участием НАД⁺ как акцептора электронов (Arentson et al., 2012) (рис. 1). Глутамат входит в цикл Кребса, превращаясь в α -кетоглутарат. Окисление одной молекулы L-пролина может дать около 30 эквивалентов АТФ, поддерживая тем самым клеточную энергетику, особенно при недостатке других энергетических субстратов (Phang et al., 2008; 2010).

Увеличение содержания пролина при действии стрессоров может быть связано с изменениями скорости его синтеза и катаболизма (Тищенко, 2013). При этом у гликофитов и галофитов эффекты могут быть схожими. У галофита *Thellungiella halophita* зарегистрировано увеличение содержания транскриптов П5КС и П5КР после воздействия 300 мМ NaCl (Радюкина и др., 2007). Авторы полагают, что активность этих ферментов регулируется не только на транскрипционном, но и на посттранскрипционном уровнях. В проростках пшеницы в ответ на солевой стресс отмечалось повышение активности П5КС и ОАТ (Сун и др., 2005). С другой стороны, показано, что активность фермента деградации пролина ПДГ угнетается при обезвоживании и действии солевого стресса (Verslues et al., 2007; Sharma, Verslues, 2010) и активируется после прекращения действия стресс-фактора (Sato et al., 2002). В целом считается, что увеличение содержания пролина при действии стресс-факторов происходит как вследствие повышения активности П5КС и возможно других ферментов синтеза пролина, так и вследствие угнетения активности ПДГ (Kavi Kishor et al., 2014).

В регуляции синтеза пролина по принципу обратной связи принимает участие и сам пролин. Так, показано, что синтез и активность П5КС находится под метаболическим контролем пролина (Szabados, Savoure, 2009). Также накопление пролина индуцирует экспрессию генов ПДГ и П5КДГ, что усиливает деградацию пролина (Liang et al., 2013).

Изменение содержания пролина при действии стрессоров

Увеличение содержания пролина в ответ на действие стрессоров выявлено не только у растений, но и у бактерий, простейших, морских беспозвоночных (Csonka, 1981; Csonka, Hanson, 1991; Verbruggen, Hermans, 2008; Liang et al., 2013). У некоторых растений зарегистрировано более чем стократное повышение содержания пролина в ответ на действие неблагоприятных факторов (Liang et al., 2013). Наиболее изучен этот эффект при действии на расте-

ния засоления (Paek et al., 1988; Misra, Saxena, 2009; Miranda et al., 2014) и засухи (Naidu et al., 1987; Choudhary et al., 2005; Маевская, Николаева, 2013). Многократное увеличение содержания пролина в данном случае рассматривается как классический осмопротекторный эффект (Кузнецов, Шевякова, 1999). Предполагается, что осмопротекторное значение может иметь пролин и при накоплении в условиях закаливания растений к морозу (Yoshida et al., 1997; Джавадиан и др., 2010; Luo et al., 2011; Colton-Gagnon et al., 2014), поскольку при образовании внеклеточного льда клетки растений подвергаются обезвоживанию. У растений *Avena nuda* L. воздействие низкой положительной температуры и промораживания вызывало накопление пролина (Liu et al., 2013). Увеличение содержания пролина при холодовой адаптации зарегистрировано у растений земляники (Luo et al., 2011).

В то же время повышение содержания пролина происходит и при действии факторов, не вызывающих прямых осмотических эффектов – тяжелых металлов (Wang et al., 2009; Islam et al., 2009a; Стеценко и др., 2011), высокой освещенности и ультрафиолета (Saradhi et al., 1995; Katerova et al., 2009), агентов окислительного стресса (Радюкина и др., 2008; Yang et al., 2009). Также накопление пролина происходит в ответ на инфицирование растений несовместимыми (авирулентными) патогенами (Fabro et al., 2004). Эти факты свидетельствуют о важных функциях пролина, не связанных с осморегуляцией клеток.

Функции пролина в стрессовых условиях

Помимо хорошо известной функции как инертного совместимого осмолита (Csonka, Hanson, 1991; Hare, Cress, 1997), пролин при действии стрессоров выполняет целый ряд других взаимосвязанных функций: мембранопротекторную, шаперонную, антиоксидантную, а также принимает участие в регуляции экспрессии некоторых генов (рис. 2). В последние годы происходит интенсивное накопление результатов исследований таких функций пролина (Szabados, Savoure, 2009). В связи с этим представляется целесообразным подробнее остановиться на их вкладе в феноменологию стресс-протекторного действия пролина.

В ряде исследований показано шаперонное действие пролина на некоторые белки. Пролин обладает способностью предотвращать образование агрегатов белковых молекул (Samuel et al., 2000). Показано, что пролин защищал изозим М4-лактат дегидрогеназы мы-

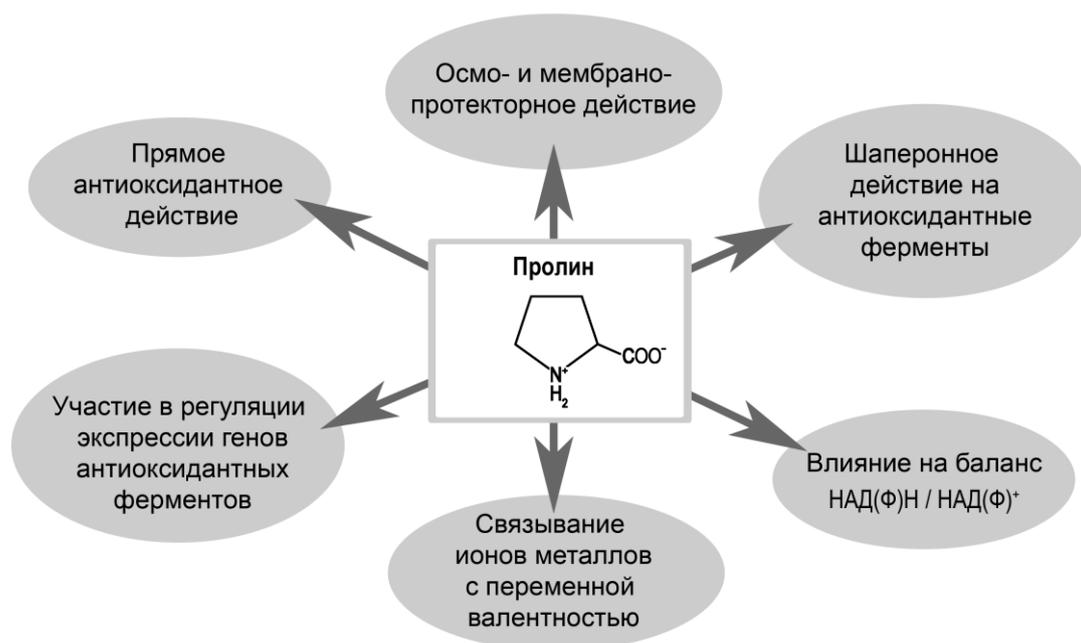


Рис. 2. Защитное (антиоксидантное) действие пролина в растительных клетках. Пояснения в тексте.

шечных тканей кролика от денатурации, вызываемой замораживанием-оттаиванием, действием высокой температуры и химических агентов. Авторы полагают, что в отличие от других осмолитов, пролин стабилизирует фермент не только усиливая гидратацию белка, но также и путем взаимодействия с доступными гидрофобными его областями (Rajendrakumar et al., 1994).

Также выявлено защитное влияние пролина на нитратредуктазу растений риса, подвергнутых воздействию осмотического стресса и алюминия (Sharma, Dubey, 2005). Установлено, что пролин *in vitro* восстанавливал активность РНКазы проростков риса после денатурирующего действия на арсенит на этот белок (Mishra, Dubey, 2006).

Как отдельная функция в настоящее время рассматриваются антиоксидантные эффекты пролина. Так, экзогенный пролин, уменьшая содержание активных форм кислорода (АФК), предотвращал программируемую гибель мутантного грибного патогена люцерны *Colletotrichum trifolii* с нарушенным образованием АФК (Chen, Dickman, 2005), устранял индуцируемую экзогенным пероксидом водорода фрагментацию ДНК и гибель опухолевых клеток человека (Krishnan et al., 2008). Показано защитное влияние пролина на растения в условиях окислительного стресса, вызываемого паракватом (Радюкина и др., 2008) и пероксидом водорода (Сошникова и др., 2013). В ряде работ сообщается об уменьшении содержания про-

дукта пероксидного окисления липидов (ПОЛ) малонового диальдегида в растительных тканях в стрессовых условиях под влиянием пролина (Alia et al., 1997; Sairam, Srivastava, 2000). В то же время в клетках дрожжей с пониженным содержанием пролина, обусловленным сверхэкспрессией ПДГ, генерировалось повышенное количество АФК (Szabados, Savoure, 2009). Установлено, что экзогенный пролин в концентрации 1 мМ снимал эффект повышения содержания пероксида водорода в корнях и побегах проростков пшеницы, вызываемый действием гипертермии, в то же время аланин в такой же концентрации подобного эффекта не проявлял (Вайнер и др., 2014а).

Однако механизмы уменьшения содержания пероксида водорода и возможно других АФК в клетках растений под влиянием пролина объяснить довольно сложно. Его структурные особенности дают основания рассматривать возможность прямой инактивации радикальных форм кислорода. Так, пролин может образовывать устойчивый радикал, поскольку содержит третичный углеродный атом. Образование такого устойчивого радикала приводит к «тушению» или обрыву каскада свободнорадикальных реакций, запускаемых супероксид-радикалом, пероксид-радикалом или гидроксил-радикалом (Радюкина и др., 2008). Антирадикальное действие пролина проявлялось в системе *in vitro* при реакции со свободным стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида (Okuma et al., 2004). Показа-

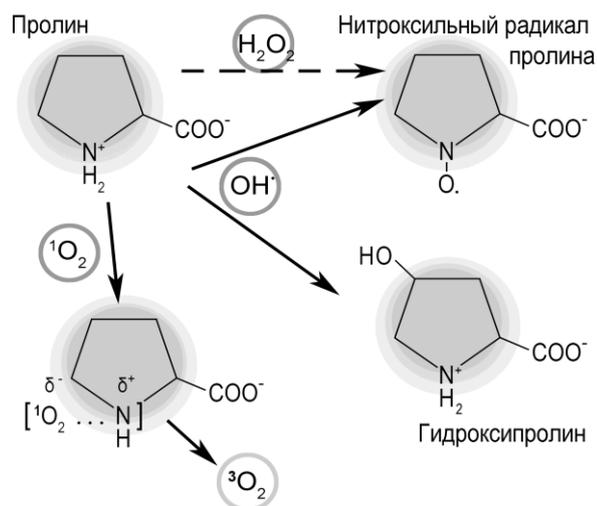


Рис. 3. Взаимодействие пролина и АФК (по: Liang et al., 2013 с изменениями). Пунктирной стрелкой обозначена медленно происходящая фаза превращения. Пояснения в тексте.

но, что при pH 7-8 свободный пролин, а также его концевые группы в составе полипептидов, могут прямо реагировать с пероксидом водорода, гидроксильным радикалом и синглетным кислородом с образованием стабильных свободных радикалов – аддуктов производных пролина и гидроксипролина (Floyd, Zs Nagy, 1984; Kaul et al., 2008; Liang et al., 2013) (рис. 3). В то же время прямая реакция между пероксидом водорода и пролином возможна при довольно высоких концентрациях последнего (Kumar et al., 2012), что ставит под сомнение значение этого процесса в клетках растений (Liang et al., 2013).

Как отдельная причина антиоксидантного действия пролина рассматривается его способность связывать ионы металлов с переменной валентностью и тем самым ограничивать неферментативные свободнорадикальные процессы (Liang et al., 2013).

Естественно, что *in vivo* антиоксидантные эффекты пролина могут отличаться от его действия в искусственной системе. *In vivo* представляется весьма вероятным косвенное антиоксидантное действие пролина в стрессовых условиях, связанное с его шаперонным эффектом в отношении антиоксидантных ферментов (рис. 2).

В культурах клеток показано повышение экзогенным пролином активности ряда антиоксидантных ферментов при действии засоления (Hoque et al., 2008), ионов кадмия (Islam et al., 2009a, 2009b), агентов окислительного стресса (Chen, Dickman, 2005). При таких условиях выявлено положительное действие пролина на супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, ферменты аскорбат-глутатионового цикла (Chen,

Dickman, 2005; Islam et al., 2009a). Обработка растений экзогенным пролином в условиях солевого стресса стабилизировала пул восстановленного глутатиона и вызвала повышение активности глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы (Hoque et al., 2008).

Однако разностороннее действие пролина на про-/антиоксидантный баланс может по-разному сказываться на активности антиоксидантных ферментов. Так, показано, что у мутантов арабидопсиса *p5cs1*, отличающихся пониженной активностью Δ^1 -пирролин-5-карбоксилатсинтазы и содержанием пролина, активность каталазы и гваяколпероксидазы в условиях солевого стресса была выше, чем у растений дикого типа. Однако эти же мутанты отличались пониженной активностью других антиоксидантных ферментов – СОД, аскорбатпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы – в условиях солевого стресса (Szekely et al., 2008). Авторы полагают, что при недостатке пролина, который может выполнять функции молекулярного шаперона, в растениях происходили окислительные повреждения указанных ферментов.

С другой стороны, трансгенные водоросли (Siripornadulsil et al., 2002) и растения табака (Hong et al., 2000), сверхэкспрессирующие П5КС и накапливающие повышенное количество пролина при действии тяжелых металлов и засоления, отличались меньшими генерацией свободных радикалов и образованием продуктов ПОЛ, но большим содержанием восстановленного глутатиона.

В последние годы получены сведения о возможности вовлечения пролина в регуляцию активности и экспрессии генов антиоксидант-

ных ферментов (рис. 2). Так, показано, что экзогенный пролин снимал ингибирующее влияние UV-B облучения на общую активность СОД у растений шалфея (Радюкина и др., 2011). При этом под влиянием пролина на электрофореграммах появлялись две дополнительные молекулярные формы Fe-СОД, хотя интенсивность транскрипции соответствующего гена не изменялась. Авторы полагают, что активность Fe-СОД при UV-B облучении и действии экзогенного пролина регулируется на субстратном (аллостерическом) уровне, а не на уровне изменения экспрессии *FSD* гена. Более того, появление активностей двух новых изозимов этого фермента при действии пролина и UV-B облучения растений может быть связано с активацией их латентных форм (Радюкина и др., 2011). С другой стороны, добавление экзогенного пролина в питательную среду на фоне UV-B облучения сопровождалось снижением количества транскриптов генов *CSD* и *MSD*, а также ингибированием стимулирующего влияния ультрафиолета на активность Cu/Zn-СОД. В то же время под влиянием UV-B и пролина активность Mn-СОД существенно не изменялась. Таким образом, UV-B в сочетании с пролином вызывали дифференциальную регуляцию активности форм СОД, локализованных в различных клеточных компартментах (Радюкина и др., 2011). По мнению авторов, в основе дифференциальной регуляции активности различных форм фермента лежит интенсивность окислительного стресса, которая характерна для каждого из клеточных компартментов.

На культивируемых клетках галофита *Thellungiella salsuginea* показано повышение активности СОД и аскорбатпероксидазы под влиянием 2 или 5 мМ пролина (Сошникова и др., 2013), что авторы связывают с прооксидантным действием пролина, обусловленным активацией под его влиянием ПДГ и усилением образования АФК в электрон-транспортной цепи митохондрий.

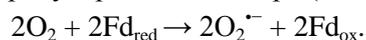
У трансформированных гибридов грейпфрута и понцируса, дефектных по синтезу ПБКС, отмечалась усиленная экспрессия генов разных форм аскорбатпероксидазы, Fe-СОД, Mn-СОД и хлоропластной глутатионредуктазы в физиологически нормальных условиях и при водном стрессе (Carvalho et al., 2013). Можно полагать, что в данном случае пролин действует как негативный регулятор экспрессии генов антиоксидантных ферментов.

Как указывалось выше, экзогенный пролин в относительно низкой концентрации (1

мМ) снимал эффект увеличения содержания пероксида водорода в корнях проростков пшеницы, вызываемый кратковременным закаливающим прогревом (Вайнер и др., 2014а). На этой же модели показано, что обработка проростков 1 мМ пролином нивелировала и вызываемое закаливанием повышение активности антиоксидантных ферментов – СОД, аскорбатпероксидазы и гваяколпероксидазы (Вайнер и др., 2014б). В то же время при обработке проростков 1 мМ аланином подобных эффектов не наблюдалось.

В контексте упомянутых феноменов следует отметить сравнительные исследования функционирования ферментативной и неферментативной (включающей пролин) антиоксидантных систем растений галофитов и гликофитов, проведенные Н.Л. Радюкиной и соавт. (2007). Авторами показано, что в основе высокой солеустойчивости галофита *Thellungiella salsuginea* лежит его способность к стресс-зависимому накоплению пролина. В то же время у растений *Plantago major*, характеризующихся более низкой устойчивостью к засолению, не обнаруживалось высокого конститутивного и стресс-индуцированного уровня пролина, но они отличались высокой конститутивной активностью СОД. Иными словами, между содержанием пролина и активностью СОД проявлялись реципрокные отношения (Радюкина и др., 2007). Позднее подобные взаимоотношения между содержанием пролина и активностью СОД были показаны на ряде других дикорастущих видов растений (Карташов и др., 2008), а также у сортов пшеницы (Yang et al., 2011).

Наряду с возможным влиянием на экспрессию генов и активность антиоксидантных ферментов пролин может участвовать в регуляции окислительно-восстановительного баланса клеток путем изменения соотношения НАДФН/НАДФ⁺ (Szabados, Savoure, 2009) (рис. 2). Известно (Foyer, Shigeoka, 2011), что в стрессовых условиях, например при действии засухи, засоления, высоких температур, происходит ограничение фиксации CO₂, вследствие чего пул НАДФН расходуется слабо, что увеличивает вероятность «утечки» в фотосистеме I электрона от ферредоксина к молекулярному кислороду в реакции Мелера (Mehler):



Фотосистема II рассматривается в качестве основного источника синглетного кислорода. Он образуется в результате перехода хлорофилла P680 в триплетное состояние в реакционных центрах ФС II и/или в светособираю-

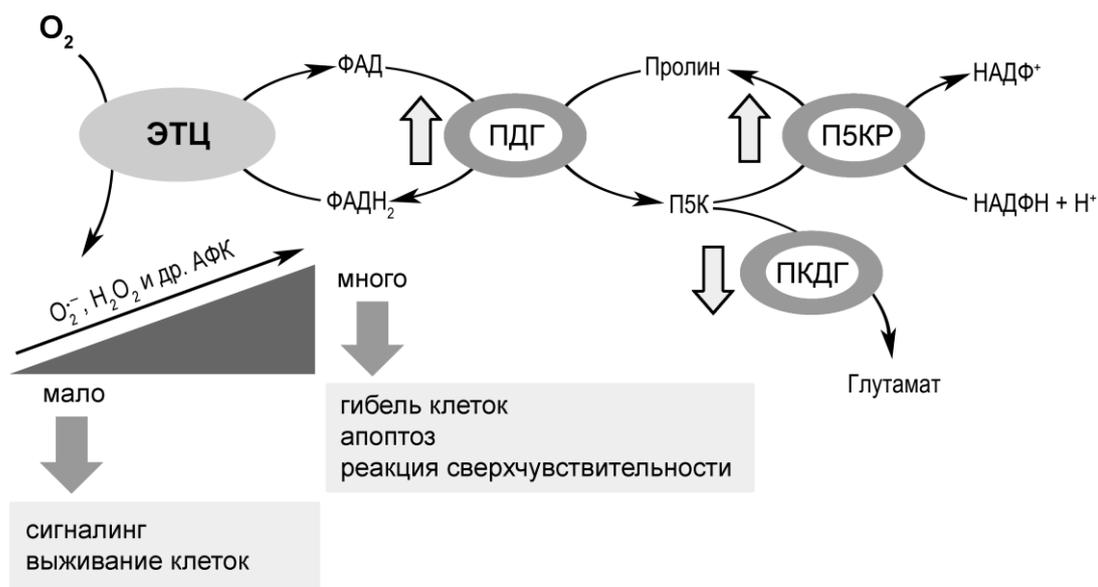


Рис. 4. Образование АФК в митохондриях с участием пролина (по: Liang et al., 2013 с изменениями и дополнениями).

щем комплексе. Вероятность образования синглетного кислорода также увеличивается при перевосстановленности электрон-транспортной цепи в результате поглощения света высокой интенсивности или действия других стресс-факторов (Креславский и др., 2012).

Активация биосинтеза пролина в хлоропластах в стрессовых условиях усиливает расход НАДФН и увеличивает количество НАДФ⁺, который может быть использован в качестве акцептора электронов. Таким образом, синтез пролина, снижая соотношение НАДФН/НАДФ⁺, может способствовать поддержанию потока электронов в электрон-транспортных цепях хлоропластов, стабилизировать окислительно-восстановительный баланс и уменьшать фотоингибирование и повреждения фотосинтетического аппарата (Hare, Cress, 1997). У растений сои, трансформированных антисмысловым геном П5КР, отмечалось торможение синтеза пролина, увеличение соотношения НАДФН/НАДФ⁺ и повышение чувствительности фотосинтетического аппарата к засухе. Напротив, избыточная экспрессия гена П5КР вызывала увеличение содержания НАДФ⁺ и повышение устойчивости растений (De Rondeet al., 2004).

Как функцию, опосредованно связанную с защитными эффектами пролина, можно рассматривать его окисление в митохондриях с участием ПДГ и ПКДГ. В этом случае пролин увеличивает восстановительный потенциал ми-

тохондрий и таким образом может способствовать энергоснабжению клеток, что особенно важно в постстрессовый период (Kavi Kishor et al., 2005).

С другой стороны, как уже упоминалось, катаболизм пролина в митохондриях может вызывать усиление образования АФК (Miller et al., 2009) (рис. 4). У растений арабидопсиса при реакции сверхчувствительности на инфицирование авирулентными патогенами (например, *Pseudomonas syringe*) накопление пролина сопровождалось последующим усилением экспрессии гена ПДГ, повышением активности этого фермента и, как следствие, увеличением количества П5К (Cecchini et al., 2011). В сочетании с АФК П5К может функционировать как триггер реакции сверхчувствительности и апоптоза (Deuschle et al., 2004; Fabro et al., 2004).

В целом предполагается, что благодаря способности как связывать АФК, так и усиливать их образование пролин может быть задействован в АФК-сигналинге (Szabados, Savoure, 2009).

Сигнальные и гормональные посредники, участвующие в индукции синтеза пролина

Механизмы сигнализации, с помощью которых происходит индуцирование синтеза пролина при действии на растения абиотических стрессоров (в первую очередь, обезвоживания и засоления) включают в себя абсцизо-

вую кислоту (АБК), ионы кальция, АФК и, возможно, другие сигнальные и гормональные посредники (Liang et al., 2013).

Изменение кальциевого гомеостаза является одной из наиболее ранних реакций растений на действие стрессоров различной природы (Penfield, 2008). Имеется немало сведений об активации поступления кальция в клетки растений при осмотическом и солевом стрессах (Knight et al., 1997; 1998). Так, в ответ на действие на проростки арабидопсиса маннитола, вызывающего обезвоживание клеток, концентрация цитозольного кальция возрастала от 0,1 до 1,65 мкМ (Knight et al., 1997). Такой эффект нивелировался ионами лантана, блокирующими кальциевые каналы.

Значение кальция в синтезе пролина у растений изучалось на разных объектах. Показана способность Ca^{2+} усиливать накопление пролина в проростках клевера при осмотическом стрессе (Zhang et al., 2002), в проростках арабидопсиса в условиях натрий-хлоридного засоления (Ma, Zhao, 2006). Идентичные результаты получены и при действии соли кальция на сеянцы *Casuarina equisetifolia*, подвергнутые засухе (Liang et al., 2004).

На арабидопсисе было показано угнетение экспрессии гена *At5pct*, который кодирует Δ^1 -пиролин-5-карбоксилатсинтетазу, при обработке растений солью лантана или ЭГТА перед осмотическим стрессом (Knight et al., 1997). Это свидетельствует о роли кальция в индуцировании синтеза пролина в ответ на обезвоживание. Антагонисты кальция также угнетали вызываемое действием хлорида натрия накопление пролина у галофита *Nitraria tangutorum* Vobr. (Yang et al., 2013). В необходимом для синтеза пролина увеличении концентрации цитозольного Ca^{2+} , по-видимому, участвует инозитолтрифосфат, освобождаемый из мембранных фосфолипидов фосфолипазой С, поскольку стресс-индуцируемое накопление пролина у растений угнеталось ингибитором фосфолипазы С U73122 (Tuteja, Sopory, 2008).

С другой стороны, на примере галофита *Thellungiella halophila* с использованием ингибитора фосфолипазы С U73122 показано, что этот фермент может выступать как в роли положительного регулятора накопления пролина при сильном (400 мМ NaCl) стрессовом воздействии, так и в качестве отрицательного регулятора содержания этой аминокислоты в отсутствие стрессового воздействия или при слабом (200 мМ NaCl) солевом стрессе (Ghars et al., 2008; 2012).

Позитивным регулятором содержания пролина в условиях жесткого солевого или осмотического стресса у галофита *Thellungiella halophila* наряду с фосфолипазой С может выступать фосфолипаза D. Накопление пролина при сильном стрессовом воздействии (400 мМ NaCl или 400 мМ манитол) угнеталось бутанолом-1 – ингибитором зависимого от фосфолипазы D образования фосфатидной кислоты (Ghars et al., 2012). Как фосфолипаза С, так и фосфолипаза D, задействованы в регуляции содержания цитозольного кальция. В свою очередь кальциевый сигнал передается к транскрипт-фактору MYB2 с участием CaM4 кальмодулина, что приводит к активации синтеза П5КС1 (Yoo et al., 2005).

Еще одним сигнальным посредником, задействованным в процессах индуцирования синтеза пролина, может быть пероксид водорода. В клетках каллусной культуры галофита *N. tangutorum* в ответ на действие NaCl происходило повышение содержания пероксида водорода и пролина (Yang et al., 2013). Обработка культуры скавенжером H_2O_2 диметилтиомочевинной (ДМТМ) препятствовала накоплению пролина и повышению активности орнитин-δ-аминотрансферазы – одного из ключевых ферментов орнитинового пути синтеза пролина (Yang et al., 2013).

Одним из основных ферментативных источников активных форм кислорода (АФК) у растений является НАДФН-оксидаза (Sagi, Fluhr, 2006; Глянко и др., 2009). Показано, что индуцируемое солевым стрессом образование АФК у растений арабидопсиса происходило с участием этого фермента и подавлялось его ингибитором дифенилениодонием (Leshem et al., 2007). Обработка растений ингибитором НАДФН-оксидазы снижала и их солеустойчивость.

Предобработка проростков проса скавенжером пероксида водорода ДМТМ или ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом снимала как вызываемое солевым стрессом повышение содержания пероксида водорода в растениях проса, так и накопление пролина в листьях (Вайнер и др., 2013). В связи с этим можно полагать, что индуцирование накопления пролина при солевом стрессе опосредовано зависимым от НАДФН-оксидазы накоплением пероксида водорода как сигнального посредника. Увеличение содержания пролина в растениях под действием АФК может быть связано с их влиянием на комплекс ферментов, задей-

ствованных в его синтезе, в частности на П5КС (Verslues et al., 2007).

Увеличение содержания пролина в колеоптилях пшеницы индуцировалось обработкой пероксидом водорода (Колупаев и др., 2005). Также пероксид водорода вызывал накопление пролина в колеоптилях и корнях интактных проростков кукурузы, при этом отмечалось повышение активности и экспрессии гена П5КС и снижение активности ПДГ (Yang et al., 2009). Этими же авторами отмечено повышение под действием H_2O_2 активности орнитин-δ-аминотрансферазы и глутаматдегидрогеназы, также причастных к синтезу пролина.

Накопление пролина в растениях может быть индуцировано и действием экзогенной салициловой кислоты. Такой эффект, в частности, был получен на проростках пшеницы. Их обработка салициловой кислотой вызывала накопление пероксида водорода и повышение содержания пролина в листьях и корнях (Колупаев та ін., 2007). При этом на фоне солевого стресса, который сам по себе повышал содержание пролина в тканях, отмечалось дополнительное его увеличение в вариантах с предобработкой салициловой кислотой. Можно полагать, что эффект повышения салициловой кислотой содержания пролина опосредован АФК, поскольку он угнетался обработкой проростков антиоксидантом ионолом (Колупаев та ін., 2007).

В листьях чечевицы отмечалось увеличение содержания пролина под влиянием экзогенной салициловой кислоты. Оно может быть связано с повышением активности П5КР и снижением активности ПДГ (Misra, Saxena, 2009).

Повышение количества пролина в тканях растений происходит и при инфицировании растений авирулентными патогенами. В этом случае накоплению пролина предшествует увеличение содержания салициловой кислоты и АФК и последующая активация экспрессии гена П5КС2 (Fabro et al., 2004).

Имеются сведения, что накопление пролина может быть индуцировано и другим стрессовым фитогормоном – АБК. При этом посредником в трансдукции сигнала, вызывающего экспрессию гена П5КС, также являются АФК (Verslues et al., 2007).

Весьма неоднозначны сведения об участии brassinosteroidов как особого класса стрессовых фитогормонов в регуляции содержания пролина. У растений сорго под влиянием brassinosteroidов установлено повышение содержания пролина в условиях водного стрес-

са (Vardhini, Rao, 2003). На растениях огурца (Пустовойтова и др., 2001), риса (Ozdemir et al., 2004) и проростках пшеницы (Юлдашев, 2009) выявлено повышение содержания пролина при обработке brassinosteroidами без действия стрессоров. Однако у растений перца 24-эпибрасинолид снижал накопление пролина в условиях засоления (Houimli et al., 2010). Похожие результаты получены и на низших – *Spirulina platensis* (Saygideger et al., 2008).

У арабидопсиса экзогенный brassinosteroid ингибировал экспрессию гена основного изофермента П5КС и не влиял на образование транскриптов ПДГ (Abraham et al., 2003). Также 24-эпибрасинолид подавлял активацию экспрессии гена П5КС, вызываемую светом, засолением и действием абсцизовой кислоты.

Таким образом, сведения о влиянии brassinosteroidов на содержание пролина весьма противоречивые. Не исключено, что эти эффекты во многом зависят от видовых (генетических) особенностей растений.

В целом можно говорить об участии широкого спектра сигнальных и гормональных посредников, задействованных в регуляции экспрессии генов, контролирующих содержание пролина. Среди них особое значение, по видимому, имеют ионы кальция, АФК, абсцизовая и салициловая кислоты.

Существует ли связь между устойчивостью растений и содержанием пролина?

Несмотря на многочисленные факты, свидетельствующие о полифункциональной роли пролина у растений в стрессовых условиях, сведения о связи между содержанием пролина в растениях и их устойчивостью к действию абиотических стрессоров далеко неоднозначны. Так, сообщается об отсутствии корреляции между содержанием пролина и солеустойчивостью ячменя (Chen et al., 2007; Widodo et al., 2009). Мутанты арабидопсиса, отличающиеся повышенной чувствительностью к засолению (Liu, Zhu, 1997) и холоду (Xin, Browse, 1998), имели высокое содержание пролина. У холодоустойчивого генотипа риса при нормальной и пониженной температуре содержание пролина в листьях и побегах было ниже, чем у неустойчивого (Aghaee et al., 2011).

В то же время холодостойкое закалывание растений пшеницы вызывало повышение содержания пролина в листьях, этот эффект у морозоустойчивого озимого сорта был более выраженным по сравнению с яровым (Джавадиан и др., 2010). У более холодоустойчивого генотипа земляники отмечено более высокое со-

держание пролина при холодной адаптации, которое сочеталось с меньшим проявлением окислительных повреждений (Luo et al., 2011). У растений ржи и тритикале, отличающихся большей морозоустойчивостью по сравнению с растениями пшеницы, зарегистрировано более высокое содержание пролина в период перезимовки в полевых условиях (Поморцев, 2013). Показана положительная корреляция между содержанием пролина и засухоустойчивостью сортов риса (Choudhary et al., 2005).

Значение пролина как фактора, важного для выживания при действии стрессоров, удалось подтвердить и в экспериментах с трансгенными растениями. Например, растения табака, экспрессирующие П5К *Vigna aconitifolia*, накапливали в 10-18 раз больше пролина по сравнению с контрольными растениями и характеризовались высокой солеустойчивостью (Титов и др., 2003). У трансгенных растений картофеля, несущих ген П5К арабидопсиса, отмечалось повышенное содержание пролина и проявлялась высокая солеустойчивость, тогда как у контрольных растений в условиях засоления значительно падала урожайность (Колодяжная и др., 2009).

На растениях табака было показано, что экспрессия трансформированного гена П5К приводила к повышению устойчивости растений не только к осмотическому стрессу, но и к низким температурам (Konstantinova et al., 2002).

Отсутствие связи между содержанием пролина и устойчивостью растений к тем или иным стрессорам, показанное в ряде работ, может быть обусловлено спецификой их адаптации, связанной с более эффективной работой других стресс-протекторных механизмов, например, ферментативной антиоксидантной системы и (или) накоплением других совместимых осмолитов (в частности, сахаров). Следует отметить, что во многих работах зарегистрировано накопление пролина при достаточно жестких стрессовых воздействиях (Кузнецов, Шевякова, 1999). Так, на проростках пшеницы показано, что содержание пролина после теплового и осмотического закаливаний существенно не изменялось, но увеличивалось в закаленных образцах после повреждающих воздействий (Обозный и др., 2013). Примечательно, что накопление пролина в условиях действия осмотического шока индуцировалось предварительным закаливающим прогревом, что свидетельствует об участии этого соединения в развитии перекрестной устойчивости рас-

тений к указанным стрессорам. Таким образом, для использования содержания пролина как биохимического маркера устойчивости растений, по-видимому, необходим корректный выбор силы стрессового воздействия, а также учет явлений функционального взаимодействия пролина с другими стресс-протекторными системами, в частности, с антиоксидантной (Luo et al., 2011). Однако сравнительных исследований такого взаимодействия у сортов и видов культурных растений, отличающихся по устойчивости к стрессорам, пока недостаточно.

Заключение

Пролин является иминокислотой, сочетающей в себе функции стрессового метаболита и соединения, задействованного в регуляции клеточных процессов. Пролин в растениях может синтезироваться из глутамата и орнитина. Считается, что синтез пролина, индуцированный действием стрессоров, происходит в основном по глутаматному пути. Ключевым ферментом этого пути является Δ^1 -пирролин-5-карбоксилатсинтаза, локализованная в цитоплазме и хлоропластах. В орнитиновом пути предшественники пролина ПАГ и П5К образуются в митохондриях из орнитина с помощью орнитин- δ -аминотрансферазы.

Дегградация пролина происходит в митохондриях путем последовательного окисления пролиндегидрогеназой до П5К и затем пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназой до глутамата. Увеличение содержания пролина при действии стрессоров может быть связано как с изменениями активности ферментов его синтеза, так и катаболизма.

Увеличение содержания пролина в ответ на действие стрессоров выявлено не только у растений, но и у бактерий, простейших и других организмов. Наиболее известны эффекты повышения содержания пролина при действии на растения стресс-факторов, вызывающих осмотический эффект: засуха, засоление, образование льда в межклетниках под влиянием отрицательных температур. В то же время увеличение содержания пролина зарегистрировано и при действии стрессоров иной природы: тяжелых металлов, ультрафиолета и даже авирулентных патогенов, что уже само по себе свидетельствует о полифункциональной роли пролина. Помимо хорошо известной функции как инертного совместимого осмолита, пролин при действии стрессоров выполняет целый ряд других взаимосвязанных функций: мембранопротекторную, шаперонную, антиоксидантную, а также принимает участие в регуляции экспрес-

сии некоторых генов. Известна его способность поддерживать нативную структуру белков при неблагоприятных воздействиях и даже восстанавливать функциональную активность денатурированных белков.

Выявлены антиоксидантные эффекты пролина, которые ассоциируют с его способностью к прямому взаимодействию с АФК, в т.ч. со свободными радикалами, а также с косвенными эффектами (влиянием на активность антиоксидантных ферментов). В последние годы получены сведения о возможности вовлечения пролина в регуляцию экспрессии генов антиоксидантных ферментов. Наряду с возможным влиянием на экспрессию генов и активность антиоксидантных ферментов, пролин может участвовать в регуляции окислительно-восстановительного баланса клеток путем изменения соотношения НАДФН/НАДФ⁺. Влияние пролина состояние антиоксидантной системы также может быть связано с его прооксидантным действием, которое проявляется при его высокой концентрации в клетках и интенсивном окислении в митохондриях пролиндегидрогеназой с образованием избытка восстановительных эквивалентов.

Индукирование синтеза пролина при стрессовых воздействиях на растения происходит с участием ряда сигнальных (ионы кальция, АФК) и гормональных (абсцизовая и салициловая кислоты) посредников.

Во многих работах выявлена связь между накоплением пролина и устойчивостью растений к стрессорам. Однако зарегистрированы и противоположные эффекты. Неоднозначность такой связи может быть обусловлена как методическими причинами (различная сила стрессовых воздействий в разных экспериментах), так и сложным взаимодействием пролина с другими стресс-протекторными системами, в частности с ферментативной антиоксидантной. Сравнительные исследования такого взаимодействия у сортов и видов культурных растений, отличающихся по устойчивости к стрессорам, могут быть полезны как для разработки адекватных подходов к оценке устойчивости растений, так и для более глубокого понимания стресс-протекторных функций пролина.

ЛИТЕРАТУРА

Вайнер А.А., Колупаев Ю.Е., Обозный А.И. Влияние экзогенного пролина на содержание пероксида водорода в проростках пшеницы и формирование индуцированной теплоустойчивости // Физиология растений и генетика. – 2014а. – Т. 46, № 3. – С. 252-258.

Вайнер А.А., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Обозный А.И. Экзогенный пролин угнетает повышение активности антиоксидантных ферментов проростков пшеницы, вызываемое закаливающим прогревом // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2014б. – Вип. 1 (31). – С. 66-71.

Вайнер А.А., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О. Участие пероксида водорода в индуцировании накопления пролина в растениях проса при действии NaCl // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2013. – Вип. 2 (29). – С. 32-38.

Герасимова С.В., Кочетов А.В., Ибрагимова С.С., Шумный В.К. Функции дельта-орнитинаминотрансферазы у растений // Успехи соврем. биологии. – 2011. – Т. 131, № 6. – С. 531-542.

Глянько А.К., Ищенко А.А., Митанова Н.Б., Васильева Г.Г. НАДФН-оксидаза растений // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2009. – Вип. 2 (17). – С. 6-18.

Джавадян Н., Каримзаде Г., Мафузи С., Ганати Ф. Вызванные холодом изменения активности ферментов и содержания пролина, углеводов и хлорофиллов у пшеницы // Физиология растений. – 2010. – Т. 57, № 4. – С. 580-588.

Карташов А.В., Радюкина Н.Л., Иванов Ю.В., Пашковский П.П., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. Роль антиоксидантных систем при адаптации дикорастущих видов растений к солевому стрессу // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. – С. 516-522.

Колодяжная Я.С., Куцоконь Н.К., Левенко Б.А., Сютникова О.С., Рахметов Д.Б., Кочетов А.В. Трансгенные растения, толерантные к абиотическим стрессам // Цитология и генетика. – 2009. – Т. 43, № 2. – С. 72-93.

Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Акинина Г.Е. Влияние салициловой кислоты и перекиси водорода на содержание пролина в колеоптилях пшеницы при тепловом и солевом стрессах // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2005. – Вип. 1 (6). С. 51-56.

Колупаев Ю.С., Карпец Ю.В., Мусатенко Л.И. Участь активних форм кисню в індукованні солестійкості проростків пшениці салициловою кислотою // Доповіді НАН України. – 2007. – № 6. – С. 154-158.

Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов Вл.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 163-178.

Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 2. – С. 321-336.

Маевская С.Н., Николаева М.К. Реакция антиоксидантной и осмопротекторной систем проростков

ПРОЛИН: ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И РЕГУЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ

- пшеницы на засуху и регидратацию // Физиология растений. – 2013. – Т. 60, № 3. – С. 351-359.
- Обозный А.И., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О. Активность супероксиддисмутазы и содержание низкомолекулярных протекторных соединений при формировании перекрестной устойчивости проростков пшеницы к тепловому и осмотическому стрессам // Агробиохимия. – 2013. – № 8. – С. 59-67.
- Поморцев А.В. Физиологические и биохимические процессы, определяющие зимостойкость озимых зерновых культур в условиях Восточной Сибири: Автореферат дисс. ... канд. биол. наук. – Иркутск, 2013. – 22 с.
- Пустовойтова Т.Н., Жданова Н.Е., Жолкевич В.Н. Повышение засухоустойчивости растений под воздействием элибрассинолида // Докл. АН [Россия]. – 2001. – Т. 376, № 5. – С. 697-700.
- Радюкина Н.Л., Карташов А.В., Иванов Ю.В., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. Сравнительный анализ функционирования защитных систем у представителей галофитной и гликофитной флоры в условиях прогрессирующего засоления // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 6. – С. 902-912.
- Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Макарова С.С., Кузнецов Вл.В. Экзогенный пролин модифицирует дифференциальную экспрессию генов супероксиддисмутазы в растениях шалфея при UV-B облучении // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, № 1. – С. 49-57.
- Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. Участие пролина в системе антиоксидантной защиты у шалфея при действии NaCl и парахвата // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 721-730.
- Сошинкова Т.Н., Радюкина Н.Л., Королькова Д.В., Носов А.В. Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Theilungiella salsuginea* при окислительном стрессе // Физиология растений. – 2013. – Т. 60, № 1. – С. 47-60.
- Стеценко Л.А., Шевякова Н.И., Ракитин В.Ю., Кузнецов Вл.В. Пролин защищает растения *Atropa belladonna* от токсического действия солей никеля // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, № 2. – С. 275-282.
- Сун С.К., Леу Е.Б., Тянь К.Р. Метаболизм пролина и перекрестная устойчивость к засолению и тепловому стрессу у прорастающих семян пшеницы // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 6. – С. 897-904.
- Титов С.Е., Кочетов А.В., Коваль В.С., Шумный В.К. Трансгенез как способ повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам // Успехи соврем. биологии. – 2003. – Т. 123, № 5. – С. 487-494.
- Тищенко Е.Н. Генетическая инженерия с использованием генов метаболизма L-пролина для повышения осмотолерантности растений // Физиология растений и генетика. – 2013. – Т. 45, № 6. – С. 488-500.
- Юлдашев Р.А. Регуляция 24-эпибрасинолидом метаболизма цитокининов в растениях пшеницы: Автореферат дисс. ... канд. биол. наук. – Уфа, 2009. – 23 с.
- Abraham E., Rigo G., Szekely G., Nagy Re., Koncz C., Szabados L. Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis* // Plant Mol. Biol. – 2003. – V. 51. – P. 363-372.
- Aghaee A., Moradi F., Zare-Maivan H., Zarinkamar F., Pour Irandoost H., Sharifi P. Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage // Afr. J. Biotechnol. – 2011. – V. 10 (39). P. 7617-7621.
- Alia, Saradhi P.P., Mohanty P. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage // J. Photochem. Photobiol. – 1997. – V. 38. – P. 253-257
- Arentson B.W., Sanyal N., Becker D.F. Substrate channeling in proline metabolism // Front Biosci. – 2012. – V. 17. – P. 375-388.
- Armengaud, P., Thiery L., Buhot N., Grenier-De March G., Savoure A. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features // Physiol. Plant. – 2004. – V. 120. – P. 442-450.
- Carvalho K., Campos M.K., Domingues D.S., Pereira L.F., Vieira L.G. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic *Swingle citrumelo* // Mol. Biol. Rep. – 2013. – V. 40. – P. 3269-3279.
- Cecchini N.M., Monteoliva M.I., Alvarez M.E. Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 2011. – V. 155. – P. 1947-1959.
- Chen C., Dickman M.B. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – V. 102. – P. 3459-3464.
- Chen Z., Cuin T.A., Zhou M., Twomey A., Naidu B.P., Shabala S. Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance // J. Exp. Bot. – 2007. – V. 58. – P. 4245-4255.
- Choudhary N.L., Sairam R.K., Tyagi A. Expression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.) // Indian. J. Biochem. Biophys. – 2005. – V. 42. – P. 366-370.
- Colton-Gagnon K., Ali Mohamed A.B., Mayer B.F., Dionne R., Bertrand A. Comparative analysis of the cold acclimation and freezing tolerance capacities of seven diploid *Brachypodium distachyon* accessions // Ann. Bot. – 2014. – V. 113. – P. 681-693.

- Csonka L.N.* Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium* // *Mol. Gen. Genet.* – 1981. – V. 182. – P. 82-86.
- Csonka L.N., Hanson A.D.* Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1991. – V. 45. – P. 569-606.
- De Ronde J.A., Cress W.A., Kruger G.H., Strasser R.J., Van Staden J.* Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress // *J. Plant Physiol.* – 2004. – V. 161. – P. 1211-1224.
- Deuschle K., Funck D., Forlani G., Stransky H., Biehl A., Leister D., van der Graaff E., Kunze R., Frommer W.B.* The role of [Delta]1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation // *Plant Cell.* – 2004. – V. 16. – P. 3413-3425.
- Diaz P., Betti M., Sanchez D.H., Udvardi M.K., Monza J., Marquez A.J.* Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress // *New Phytol.* – 2010. – V. 188. – P. 1001-1013.
- Fabro G., Kovacs I., Pavet .V, Szabados L., Alvarez M.E.* Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis* // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2004. – V. 17. – P. 343-350.
- Floyd R.A., Zsnagy I.* Formation of long-lived hydroxyl free-radical adducts of proline and hydroxyproline in a fenton reaction // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1984. – V. 790. – P. 94-97.
- Foyer C.H., Shigeoka S.* Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis // *Plant Physiol.* – 2011. – V. 155. – P. 93-100.
- Funck D., Winter G., Baumgarten L., Forlani G.* Requirement of proline synthesis during *Arabidopsis* reproductive development // *BMC Plant Biology.* – 2012. – V. 12. – doi:10.1186/1471-2229-12-191
- Ghars M.A., Parre E., Leprince A.S., Bordenave M., Delphine L.D.V., Richard L., Abdelly C., Saviouré A.* Opposite lipid signaling pathways tightly control proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* // *Biosaline Agriculture and High Salinity Tolerance.* – 2008. – P. 317-324.
- Ghars M.A., Richard L., Lefebvre-De Vos D., Leprince A.S., Parre E., Bordenave M, Abdelly C, Saviouré A.* Phospholipases C and D modulate proline accumulation in *Thellungiella halophila/salsuginea* differently according to the severity of salt or hyperosmotic stress // *Plant Cell Physiol.* – 2012. – V. 53. – P. 183-192.
- Hare P., Cress W.* Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants // *Plant Growth Regul.* – 1997. – V. 21. – P. 79-102.
- Hong Z., Lakkineni K., Zhang Z., Verma D.P.* Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress // *Plant Physiol.* – 2000. – V. 122. – P. 1129-1136.
- Hoque M.A., Banu M.N., Nakamura Y., Shimoishi Y., Murata Y.* Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells // *J. Plant Physiol.* – 2008. – V. 165. – P. 813-824.
- Houimli S.I.M., Denden M., Mouhandes B.D.* Effects of 24-epibrassinolide on growth, chlorophyll, electrolyte leakage and proline by pepper plants under NaCl-stress // *EurAsia J. BioSci.* – 2010. – V. 4. – P. 96-104.
- Islam M.M., Hoque M.A., Okuma E., Banu M.N., Shimoishi Y., Nakamura Y., Murata Y.* Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells // *J. Plant Physiol.* – 2009a. – V. 166. – P. 1587-1597.
- Islam M.M., Hoque M.A., Okuma E., Jannat R., Banu M.N., Jahan M.S., Nakamura Y., Murata Y.* Proline and glycinebetaine confer cadmium tolerance on tobacco bright yellow-2 cells by increasing ascorbate-glutathione cycle enzyme activities // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2009b. – V. 73. – P. 2320-2323.
- Katerova Z., Ivanov S., Mapelli S., Alexieva V.* Phenols, proline and low-molecular thiol levels in pea (*Pisum sativum*) plants respond differently toward prolonged exposure to ultraviolet-B and ultraviolet-C radiations // *Acta Physiol. Plant.* – 2009. – V. 31. – P. 111-117.
- Kaul S., Sharma S.S., Mehta I.K.* Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays // *Amino Acids.* – 2008. – V. 34. – P. 315-320.
- Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amrutha R.N., Sri Laxmi P., Naidu K.R., Rao K. R.S.S., Rao S., Reddy K.J., Theriappan P., Sreenivasulu N.* Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance // *Current Sci.* – 2005. – V. 88. – P. 424-438.
- Kavi Kishor P.B., Sreenivasulu N.* Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? // *Plant Cell Environ.* – 2014. – V. 37. – P. 300-311.
- Knight H., Brandt S., Knight M.R.* A history of stress alters drought calcium signalling pathways in *Arabidopsis* // *Plant J.* – 1998. – V. 16. – P. 681-687.
- Knight H., Trewavas A.J., Knight M.R.* Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity // *Plant J.* – 1997. – V. 12. – P. 1067-1078.
- Konstantinova T., Parvanova D., Atanassov A., Djilianov D.* Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants // *Plant Sci.* – 2002. – V. 163. – P. 157-164.

ПРОЛИН: ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И РЕГУЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ

- Krishnan N., Dickman M.B., Becker D.F. Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress // *Free Radical Biology Medicine*. – 2008. – V. 44. – P. 671-681.
- Kumar N.S., Zhu W., Liang X., Zhang L., Demers A.J., Zimmerman M.C., Simpson M.A., Becker D.F. Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death // *Free Radical Biology Medicine*. – 2012. – V. 53. – P. 1181-1191.
- Leshem Y., Seri L., Levine A. Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance // *Plant J.* – 2007. – V. 51. – P. 185-197.
- Liang J., Yan C.L., Li Y.H. Effect of Ca(NO₃)₂ on physiological characteristics in *Casuarina equisetifolia* cutting seedlings under NaCl stress // *Acta Ecol. Sin.* – 2004. – V. 24. – P. 1073-1077.
- Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., Becker D.F. Proline mechanisms of stress survival // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – V. 19. – P. 998-1011.
- Liu J., Zhu, J.K. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 1997. – V. 114. – P. 591-596.
- Luo Y., Tang H. Zhang Y. Production of reactive oxygen species and antioxidant metabolism about strawberry leaves to low temperatures // *J. Agr. Sci.* – 2011. – V. 3. – P. 89-96.
- Ma S.Y., Zhao M. Calcium regulation of *Arabidopsis* salt resistance // *Acta Agron. Sin.* – 2006. – V. 32, № 11. – P. 1706-1711.
- Madan S., Nainawatee H.S., Jain R.K., Chowdhury B. Proline and proline metabolizing enzymes in-vitro selected NaCl-tolerant // *Ann. Bot.* – 1995. – V. 76. – P. 51-57.
- Mattioli R., Costantino P., Trovato M. Proline accumulation in plants: not only stress // *Plant Signal. Behav.* – 2009. – V. 4. – P. 1016-1018.
- Miller G., Arik H., Stein H., Suzuki N., Mittler R., Avia Z. Unraveling Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – P. 26482-26492.
- Miranda D., Fischer G., Mewis I., Rohn S., Ulrichs C. Salinity effects on proline accumulation and total antioxidant activity in leaves of the cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) // *J. Appl. Bot. Food Quality*. – 2014. – V. 87. – P. 67-73.
- Mishra S., Dubey R.S. Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant // *J. Plant Physiol.* – 2006. – V. 163. – P. 927-936.
- Misra N., Saxena P. Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress // *Plant Sci.* – 2009. – V. 177. – P. 181-189.
- Naidu B.R., Jones G.P., Paleg L.G., Poljakoff-Mayber A. Proline analogues in *Melaleuca* species: response of *Melaleuca lanceolata* and *M. uncinata* to water stress and salinity // *Austral. J. Plant Physiol.* – 1987. – V. 14. – P. 669-677.
- Okuma E., Murakami Y., Shimoishi Y., Tada M., Murata Y. Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions // *Soil Sci. Plant Nutr.* – 2004. – V. 50. – P. 1301-1305.
- Ozdemir F., Bor M., Demiral T., Turkan I. Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress // *Plant Growth Regul.* – 2004. – V. 42. – P. 203-211.
- Paek K.Y., Chandler S.F., Thorpe T.A. Physiological effects of Na₂SO₄ and NaCl on callus cultures of *Brassica campestris* (Chinese cabbage) // *Physiol. Plant.* – 1988. – V. 72. – P. 160-166.
- Penfield S. Temperature perception and signal transduction in plants // *New Phytol.* – 2008. – V. 179. – P. 615-628.
- Phang J.M., Donald S.P., Pandhare J., Liu Y. The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways // *Amino Acids*. – 2008. – V. 35. – P. 681-690.
- Phang J.M., Liu W., Zahirnyk O. Proline metabolism and microenvironmental stress // *Annu. Rev. Nutr.* – 2010. – V. 30. – P. 441-463.
- Rajendrakumar C.S., Reddy B.V., Reddy A.R. Proline-protein interactions: protection of structural and functional integrity of M4 lactate dehydrogenase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – V. 201. – P. 957-963.
- Sagi M., Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141. – P. 336-340.
- Sairam R.K., Srivastava G.C. Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes // *Biol. Plant.* – 2000. – V. 43. – P. 381-386.
- Samuel D., Kumar T.K., Ganesh G., Jayaraman G., Yang P.W., Chang M.M., Trivedi V.D., Wang S.L., Hwang K.C., Chang D.K., Yu C. Proline inhibits aggregation during protein refolding. // *Protein Sci.* – 2000. – V. 9. – P. 344-352.
- Saradhi P.P., Alia, Arora S., Prasad K.V.S.K. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1995. – V. 209. – P. 1-5.
- Satoh R., Nakashima K., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. ACTCAT, a novel cis-acting el-

- ement for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 130. – P. 709-719.
- Saygideger S., Deniz F. Effect of 24-epibrassinolide on biomass, growth and free proline concentration in *Spirulina platensis* (Cyanophyta) under NaCl stress // *Plant Growth Regul.* – 2008. – V. 56. – P. 219-223.
- Schwacke R., Grallath S., Breitzkreuz K.E., Stransky E., Stransky H., Frommer W.B., Rentsch D. LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen // *Plant Cell.* – 1999. – V. 11. – P. 377-392.
- Sharma P., Dubey R.S. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant // *J. Plant Physiol.* – 2005. – V. 162. – P. 854-889.
- Sharma S., Verslues P.E. Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery // *Plant Cell Environment.* – 2010. – V. 33. – P. 1838-1851.
- Siripornadulsil S., Traina S., Verma D.P., Sayre R.T. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae // *Plant Cell.* – 2002. – V. 14. – P. 2837-2847.
- Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // *Trends Plant Sci.* – 2009. – V. 15, № 2. – P. 89-97.
- Szekely G., Abraham E., Cseplo A., Rigo G., Zsigmond L., Csisza J., Ayaydin F., Strizhov N., Jasik J., Schmelzer E., Koncz C., Szabados L. Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis // *Plant J.* – 2008. – V.53. – P. 11-28.
- Tuteja N., Sopory S.K. Chemical signaling under abiotic stress environment in plants // *Plant Signal. Behav.* – 2008. – V. 3. – P. 525-536.
- Vardhini B.V., Rao S.S.R. Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum // *Plant Growth Regul.* – 2003. – V. 41. – P. 25-31.
- Verbruggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: a review // *Amino Acids.* – 2008. – V. 35. – P. 753-759.
- Verslues P.E., Kim Y.-S., Zhu J.-K. Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis* glutamate:glyoxylate aminotransferase mutant // *Plant Mol. Biol.* – 2007. – V. 64. – P. 205-217.
- Wang F., Zeng B., Sun Z., Zhu C. Relationship between proline and Hg²⁺-induced oxidative stress in a tolerant rice mutant // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* – 2009. – V. 56. – P. 723-731.
- Widodo J.H.P., Newbiggin E., Tester M., Bacic A., Roessner U. Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars // *J. Exp. Bot.* – 2009. – V. 60. – P. 4089-4103.
- Xin Z., Browse J. Eskimo1 mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – V. 95. – P. 7799-7804.
- Yang Y., Yang F., Li X., Shi R., Lu J. Signal regulation of proline metabolism in callus of the halophyte *Nitraria tangutorum* Bobr. grown under salinity stress // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2013. – V. 112, Is. 1. – P. 33-42.
- Yang S.L., Shan-Shan L., Gong M. Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings // *J. Plant Physiol.* – 2009. – V. 166. – P. 1694-1699.
- Yang Y., Zhang Y., Wei X., You J., Wang W., Lu J., Shi R. Comparative antioxidative responses and proline metabolism in two wheat cultivars under short term lead stress // *Ecotoxicol. Environ. Safety.* – 2011. – V. 74. – P. 733-740.
- Yoo J.H., Park C.Y., Kim J.C., Heo W.D., Cheong M.S., Park H.C., Kim M.C., Moon B.C., Choi M.S., Kang Y.H., Lee J.H., Kim H.S., Lee S.M., Yoon H.W., Lim C.O., Yun D.J., Lee S.Y., Chung W.S., Cho M.J. Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in *Arabidopsis* // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – P. 3697-3706.
- Yoshida Y., Kiyosue T., Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress // *Plant Cell Physiol.* – 1997. – V. 38. – P. 1095-1102.
- Zhang J., Iu M., Liu W. Ca²⁺ influence on damage by active oxygen and membranous lipids peroxidation of leaves at osmotic stress // *J. Xuzhou Norm. Univ. Natur. Sci. Ed.* – 2002. – V. 20, № 3. – P. 58-60.

Поступила в редакцию
05.05.2014 г.

ПРОЛИН: ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И РЕГУЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ

PROLINE: PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS AND REGULATION OF ITS CONTENT IN PLANTS UNDER STRESS CONDITIONS

Yu. E. Kolupaev, A. A. Vayner, T. O. Yastreba

*V.V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University
(Kharkiv, Ukraine)
e-mail: plant_biology@mail.ru*

The glutamate and ornithine pathways of proline biosynthesis are described. The data on the key enzymes involved in the synthesis and degradation of proline, their localization in cells and regulation of activity in plants are generalized. The information about the changes in proline content in plants as a response to the action of different stressors is summarized. The functions of proline, such as osmoprotective, chaperone, antioxidant and its participation in the regulation of gene expression of antioxidant enzymes, under stress conditions are considered in details. The reasons of prooxidant proline effects are also discussed. The participation of signaling and hormonal mediators in the stress-induced synthesis of proline is considered. The relation between the plants resistance to stressors and proline content are analyzed.

Key words: *proline, glutamate, ornithine, antioxidants, prooxidants, chaperone action of proline, plant resistance*

ПРОЛІН: ФІЗИОЛОГІЧНІ ФУНКЦІЇ І РЕГУЛЯЦІЯ ВМІСТУ У РОСЛИНАХ ЗА СТРЕСОВИХ УМОВ

Ю. Є. Колупаєв, А. О. Вайнер, Т. О. Ястреб

*Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва
(Харків, Україна)
e-mail: plant_biology@mail.ru*

Описані шляхи синтезу проліну з глутамату та орнітину, наведені відомості про ключові ферменти, задіяні в синтезі і деградації проліну, їх локалізації в клітинах і регуляції активності у рослин. Узагальнено дані про зміну вмісту проліну в рослинах у відповідь на дію стресорів різної природи. Детально розглянуті функції проліну в стресових умовах: осмопротекторна, шаперонна, антиоксидантна, його участь в регуляції експресії генів антиоксидантних ферментів. Також обговорюються причини прооксидантних ефектів проліну. Розглянуто участь сигнальних і гормональних посередників в процесі стрес-індукованого синтезу проліну. Проаналізовано зв'язок між вмістом проліну і стійкістю рослин до стресорів.

Ключові слова: *пролін, глутамат, орнітин, антиоксиданти, прооксиданти, шаперонна дія проліну, стійкість рослин*