

· 专题论坛 ·

亚硝基化在植物细胞死亡及防御反应中的作用

刘振, 刘霞, 刘建中*

浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004

摘要 亚硝基化是近年来新发现的不依赖于环磷酸鸟苷的一氧化氮信号转导途径, 是一氧化氮分子通过共价结合修饰靶蛋白的半胱氨酸残基从而改变其功能的过程。该文重点综述了近年来亚硝基化在细胞死亡和抗病反应这两个紧密关联的生物学过程中的最新研究成果, 总结了亚硝基化通过修饰和调控靶蛋白从而促进或抑制细胞死亡和抗病反应, 并对现有研究结果中某些不一致之处提出自己的观点。最后根据动物学领域的最新研究进展对植物学领域未来亚硝基化的研究方向进行了展望。

关键词 细胞死亡, 抗病性, 一氧化氮, 亚硝基谷胱甘肽还原酶, 亚硝基化

刘振, 刘霞, 刘建中 (2016). 亚硝基化在植物细胞死亡及防御反应中的作用. 植物学报 51, 130–143.

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一个具生物活性的气体小分子, 在动植物的生长发育、病理及生理反应等方面起着广泛的作用(Lamattina et al., 2003; Wendehenne et al., 2004; Mannick, 2007; 王鹏程等, 2009; 姚涛等, 2011)。在植物中, NO调控气孔关闭(Neill et al., 2002)、开花时间(He et al., 2004)、细胞死亡(Delledonne et al., 1998)以及对细菌和病毒的抗性(Durner et al., 1998; Klessig et al., 2000; Wendehenne et al., 2004; Zeidler et al., 2004)。

亚硝基化是近年来新发现的不依赖于环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的NO信号转导途径。它是一个基于细胞内氧化还原(redox)状态的反应, 即将NO加到蛋白的半胱氨酸残基上而起到改变蛋白功能的作用(Astier et al., 2012)。此反应不是酶促反应, 而是一种依赖于NO浓度的可逆反应。在有还原剂存在的条件下可发生去亚硝基化(de-nitrosylation)反应。一个蛋白能否被亚硝基化取决于其半胱氨酸残基两端的氨基酸组成及蛋白形成的空间结构。亚硝基化一般只发生在蛋白的1或2个半胱氨酸残基上, 靶蛋白被亚硝基化后, 其功能被改变。蛋白功能的改变包括增强或抑制蛋白酶的活性、改变蛋白质在细胞内的转运和亚细胞定位等(Stamler

et al., 1997)。自Stamler (1994)首次发现蛋白质的亚硝基化途径后, 已有大量研究表明, 亚硝基化在不同的生理和病理过程中发挥着广泛的作用(Hess and Stamler, 2012)。在动物中已鉴定出上千种亚硝基化的靶蛋白(Lee et al., 2012; Zhang et al., 2012)。从模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中也已鉴定出了上百种参与不同生物学过程的亚硝基化靶蛋白(Lindermayr et al., 2005; Romero-Puertas et al., 2008; Sell et al., 2008), 其中包括一些与细胞死亡及抗病有关的靶蛋白, 如MTA、PrxII E、NPR1和SABP3, 且已证明其功能受亚硝基化修饰的调控(Lindermayr et al., 2006; Belenghi et al., 2007; Romero-Puertas et al., 2007; Tada et al., 2008; Wang et al., 2009; Li et al., 2013)。迄今为止, 已有大量英文综述性文章总结了亚硝基化在植物不同生物学过程中所起的作用(Leitner et al., 2009; Lindermayr and Durner, 2009; Wang et al., 2010; Gupta, 2011; Astier et al., 2012; Yu et al., 2012; Groß et al., 2013; Romero-Puertas et al., 2013; Trapet et al., 2014; Yu et al., 2014), 但尚未见有对此领域进行系统性总结的中文综述性文章发表。因此, 我们对亚硝基化在植物细胞死亡和抗病反应这两个紧密相关联的生物学过程中的研究进

收稿日期: 2014-12-25; 接受日期: 2015-03-30

基金项目: 国家自然科学基金(No.31371407)、浙江省钱江人才计划(No.2013R10074)、人力资源和社会保障部留学人员择优资助项目(No.ZC304013131)和浙江省自然科学基金(No.LY12C14001)

* 通讯作者。E-mail: jzliu@zjnu.cn

展进行全面而系统的综述, 对不同文献中不一致的结果提出自己的观点和看法, 最后对植物学该领域的发展前景进行了展望, 希望对国内从事此领域研究的植物科技工作者有一定的帮助。

1 细胞内蛋白亚硝基化稳态平衡的调控

细胞内亚硝基化稳态平衡(homeostasis)是由细胞内NO的浓度、氧化还原状态以及去亚硝基化的能力共同决定的。植物可以通过类似于动物中的一氧化氮合成酶途径(nitric oxide synthase-associated, NOA)、多胺途径(polyamine)、胞质中的硝酸还原酶/亚硝酸还原酶途径(nitrate/nitrite reductase)、质膜上的nitrite-NO还原酶途径、线粒体中的亚硝酸盐还原途径以及位于过氧化物酶体中的黄嘌呤氧化还原酶途径(xanthine oxidoreductase, XOR)催化产生NO, 也可在质外体(apoplast)中经非催化途径产生NO (Crawford and Guo, 2005; Yu et al., 2014) (图1)。另外, 微生物产生的NO对植物也有一定的影响(Crawford and Guo, 2005; Yu et al., 2014) (图1)。值得一提的是, NO在植物体内的合成受生物和非生物胁迫诱导(Yu et al., 2014) (图1)。

亚硝基谷胱甘肽还原酶(S-nitrosogluthione reductase, GSNOR1) (Liu et al., 2001)和硫氧还蛋白(thioredoxins, TRX) (Benhar et al., 2008; Tada et al., 2008)是去亚硝基化的关键酶。其功能在细菌、酵母、哺乳动物及植物中都是保守的(Liu et al., 2001; Feechan et al., 2005; Benhar et al., 2008; Tada et al., 2008)。GSNOR1可将GSNO (亚硝基谷胱甘肽)还原为GSH (谷胱甘肽)和NO。在胁迫条件下, 细胞内NO浓度升高, NO与GSH结合形成GSNO, GSNO可将NO反式转移至靶蛋白(Liu et al., 2001; Feechan et al., 2005) (图1)。GSNO是亚硝基化的NO供体, 亚硝基化的实现是由GSNO而非直接由NO介导。细胞内亚硝基化稳态平衡由GSNO的浓度及去亚硝基化的能力决定。因此, 在细菌、小鼠(*Mus musculus*)及拟南芥中, 失去GSNOR1功能的突变体, 其体内蛋白亚硝基化水平显著提高(Liu et al., 2001; Feechan et al., 2005)。

硫氧还蛋白是广泛存在于生物体内的一组大小只有12 kDa的氧化还原蛋白, 该蛋白通过保守的活

性位点W-C-G(P)-P-C参与硫醇-二硫键的互换反应来维持细胞内的氧化还原状态(Michelet et al., 2006)。遗传与抑制剂实验表明, TRX参与蛋白去亚硝基化, 即TRX具去亚硝基化酶的活性(denitrosylase) (Benhar et al., 2008)。在正常状态下, 人的淋巴细胞中, TRX1-TRXR1 (thioredoxin reductase-1)活跃地将细胞质中的caspase-3去亚硝基化, 保持稳定的、较低的亚硝基化水平(Benhar et al., 2008)。一旦有Fas的刺激, TRX2-TRXR2即介导线粒体中caspase-3的去亚硝基化, 激活caspase-3的活性, 从而促进细胞死亡(Benhar et al., 2008)。在植物中, 已证明定位于细胞质中的TRX-h5和TRX-h3负责NPR1的去亚硝基化(Tada et al., 2008) (图1)。TRX-h3基因在细胞中组成型持续表达, 而TRX-h5基因则受病原菌诱导表达, PR (pathogenesis-related)基因的完全诱导表达需要TRX-h5和TRX-h3同时存在(Tada et al., 2008)。

2 亚硝基化在植物细胞死亡中的作用

在动物中, 根据细胞类型、细胞氧化还原状态及其浓度, NO兼具促进和抑制细胞死亡的作用(Mannick, 2007; Wang et al., 2010)。一般而言, 由细胞内产生基线水平的NO所造成的亚硝基化具抗细胞死亡的效应。而由诱导产生的较高水平NO所造成的亚硝基化则具促进细胞死亡的效应或作为负反馈调控机制降低细胞死亡反应(Mannick, 2007)。

亚硝基化调控细胞死亡是一个非常复杂的动态过程。在同一信号途径中, 根据NO的来源、所处的位置、去亚硝基化蛋白及靶蛋白的亚细胞定位的不同, 一些蛋白被亚硝基化, 而另一些蛋白则被去亚硝基化。此外, 亚硝基化某些蛋白促进细胞死亡, 而亚硝基化另一些蛋白则可能抑制细胞死亡。例如, 在动物中, N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)接收刺激信号后, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)亚硝基化的增加刺激细胞死亡, 而NMDA受体亚硝基化的增加则降低了该受体的活性, 从而导致细胞的死亡程度降低(Lipton, 1993; Hara et al., 2005)。多种起促进或抑制作用的亚硝基化靶标的存在可能会使细胞更加精细地调控对死亡信号的

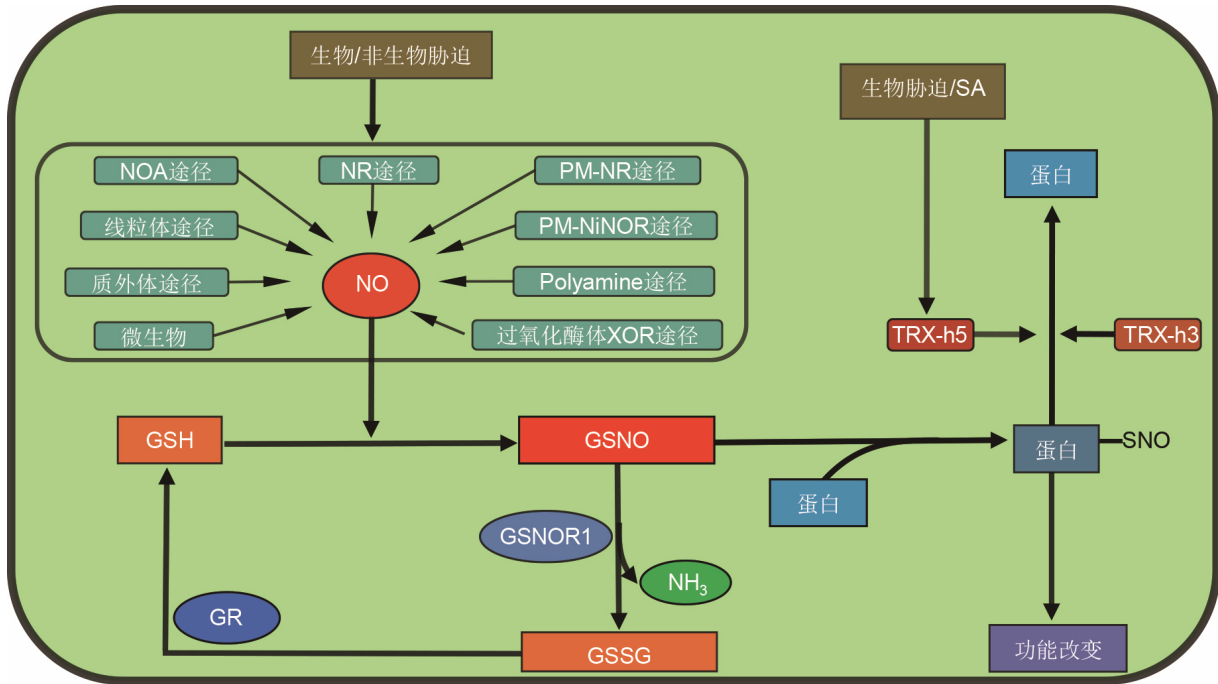


图1 植物胞内蛋白亚硝基化水平的稳态平衡调控

植物体内亚硝基化水平由NO的产生及去亚硝基化的能力决定。植物体内NO可由众多途径产生，包括NOA1途径、NR途径、质膜NR/NiNOR途径、线粒体途径、多胺途径、过氧化酶体XOR途径和质外体途径。另外，微生物产生的NO对植物也有一定的影响(Crawford and Guo, 2005; Yu et al., 2014)。生物和非生物胁迫可诱导NO在植物体内的合成。在胁迫条件下，细胞内NO浓度升高，NO与GSH结合形成GSNO。GSNO是亚硝基化的NO供体，亚硝基化的实现是由GSNO而非由NO直接介导。GSNO可将NO反式转移至靶蛋白从而改变蛋白的功能(Liu et al., 2001; Feechan et al., 2005)。GSNOR1和硫氧还蛋白(thioredoxins, TRX)是去亚硝基化的2个关键酶。GSNOR1通过还原和降低植物体内的GSNO水平间接降低蛋白亚硝基化。而TRX-h3和TRX-h5可直接催化蛋白的去亚硝基化(Tada et al., 2008)。

Figure 1 The homeostasis of cellular S-nitrosylation level in plants

The level of S-nitrosylation in plant cells is determined by balance between the production of NO and the capacity of de-nitrosylation. There are multiple routes for NO production in plants such as NOA1-dependent pathway, NR pathway, plasma-membrane NR/NiNOR pathway, mitochondrial pathway, polyamines pathway, peroxisome (XOR) pathway and apoplast pathway. In addition, micro-organisms also contribute to the NO accumulation in plants (Crawford and Guo, 2005; Yu et al., 2014). Both biotic and abiotic stresses can induce the production of NO. Under stress conditions, NO level is increased in plant cells and as a results, the GSNO is formed in the presence of GSH; GSNO is a major donor of S-nitrosylation and S-nitrosylation is mediated by GSNO rather than by NO directly; NO moiety is transferred from GSNO to proteins *in trans* and thus the protein functions are altered by this modification (Liu et al., 2001; Feechan et al., 2005). GSNOR1 and thioredoxins (TRX) are two key enzymes involved in de-nitrosylation. Whereas GSNOR1 achieves the protein de-nitrosylation indirectly through reducing cellular level of GSNO, TRX (TRX-h3 and TRX-h5) catalyzes de-nitrosylation directly (Tada et al., 2008).

反应。

Delledonne等(1998)在《自然》杂志上发表的具突破意义的研究表明，NO与过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)互作诱导大豆(*Glycine max*)悬浮细胞发生超敏性细胞死亡(hypersensitive cell death)。然而时至今日，NO与H₂O₂互作诱导细胞超敏性细胞死亡

的分子机理仍然是个未解之谜。在细菌、小鼠及拟南芥中失去GSNOR1功能的突变体，其体内蛋白亚硝基化水平显著提高(Liu et al., 2001; Feechan et al., 2005)。小鼠*gsnor1*突变体在受到细菌侵染后，其体内组织的损伤及死亡率大大增加(Liu et al., 2004)，说明亚硝基化可能参与对细胞死亡的调控。近几年的

研究表明, 植物中不同靶蛋白的亚硝基化可能是NO诱导细胞死亡的机制之一。

2.1 NO通过亚硝基化抑制H₂O₂分解及还原相关酶从而促进细胞死亡

NO通过降低活性氧(reactive oxygen species, ROS)解毒相关酶的活性导致ROS增加, 从而造成细胞死亡。植物细胞质抗坏血酸过氧化物酶(cytosolic ascorbate peroxidase, cAPX)通过还原H₂O₂控制细胞内的ROS水平。热激和H₂O₂处理可诱导烟草(*Nicotiana tabacum*) BY-2细胞发生程序性死亡(programmed cell death, PCD)(de Pinto et al., 2013)。在细胞程序性死亡发生时, cAPX被亚硝基化, 其活性受到抑制, 从而使细胞内H₂O₂含量增加并最终导致细胞死亡(de Pinto et al., 2013)。进一步的研究表明, 亚硝基化可导致cAPX泛素化, 促进其通过蛋白酶体的降解(图2)。而NO清除剂cPTIO可以降低cAPX的泛素化及其降解(de Pinto et al., 2013)。与此结果相反, Begara-Morales等(2014)的质谱分析表明, GSNO处理可使豌豆(*Pisum sativum*) APX在Cys³²残基上发生亚硝基化, 此亚硝基化可促进APX活性, 在盐、氧化及硝化胁迫条件下, APX被亚硝基化的同时, 其活性也增加了。但此研究并未建立APX的亚硝基化与细胞死亡之间的关系。

Ortega-Galisteo等(2012)从过氧化物酶体中鉴定出6个被亚硝基化的靶蛋白, 其中包括能还原H₂O₂的过氧化氢酶(catalase), 且该酶的活性受亚硝基化的抑制。但此研究并未就过氧化氢酶的亚硝基化修饰对细胞死亡的效应进行进一步探讨。Lin等(2012)通过筛选发现了叶片有程序化细胞死亡并过量积累NO的水稻(*Oryza sativa*)突变体*noe1* (nitric oxide excess1)。图位克隆法揭示NOE1编码1个过氧化氢酶。NOE1突变造成叶片中H₂O₂含量升高, 而H₂O₂的升高反过来通过激活硝酸还原酶促进一氧化氮的产生。去除过量的NO可以降低*noe1*突变体中的细胞死亡, 表明NO是控制H₂O₂诱导的细胞死亡的重要内源调节因子。在*noe1*突变体中过表达去亚硝基化的关键基因GSNOR1可以减轻发生在*noe1*叶片中的细胞死亡, 表明该细胞死亡可能由亚硝基化控制。通过生物素置换法结合LC-MS/MS, 目前已从*noe1*突变体中鉴定出多个与细胞死亡相关的蛋白, 其中包括GAP-DH、

TRX及细胞质抗坏血酸过氧化物酶(Lin et al., 2012)。其中GAPDH的相关性最为明显。一系列研究表明, GAPDH在逆境胁迫和超敏反应(hypersensitive response, HR)发生的条件下被亚硝基化(Romero-Puertas et al., 2008; Wawer et al., 2010; Zaffagnini et al., 2013)。而动物细胞受到细胞凋亡因子刺激后, 由于NOS的激活导致GAPDH被亚硝基化, 亚硝基化的GAPDH与具核定位信号肽的E3泛素连接酶Siah1结合进入细胞核。在核中, GAPDH能够起到稳定Siah1的作用, 促进其降解有关蛋白从而促进细胞凋亡(Hara et al., 2005)。

拟南芥peroxiredoxin II E (PrxII E)是一种过氧化物氧化还原酶, 它能够还原H₂O₂, 调节植物体内H₂O₂的水平。PrxII E的亚硝基化会抑制其还原H₂O₂的能力。生化与遗传学证据表明, PrxII E还具有解毒过亚硝酸盐(ONOO⁻)的能力(Romero-Puertas et al., 2007)。ONOO⁻是一种由NO和超氧集团形成的强氧化、硝化簇分子, 可以通过不可逆地硝基化(nitration)络氨酸残基而改变蛋白的功能。PrxII E的亚硝基化也抑制了其ONOO⁻的解毒活性, 造成ONOO⁻水平显著上升及蛋白硝基化水平的升高(图2)。在动物中, ONOO⁻可诱导细胞凋亡(Bonfoco et al., 1995), 但在植物中则不能诱导细胞死亡(Romero-Puertas et al., 2007)。Begara-Morales等(2014)的质谱分析表明, ONOO⁻通过在Tyr⁵和Tyr²³⁵两个氨基酸残基上硝基化豌豆APX而抑制其活性, 但未进一步研究该修饰对细胞死亡的效应。

2.2 NO通过亚硝基化抑制H₂O₂合成相关酶负调控细胞死亡

烟酰胺腺嘌呤二核苷磷酸(NADPH)氧化酶(NADPH oxidases)对植物细胞中ROS的产生起着关键作用。NADPH氧化酶是一个存在于细胞质膜上的酶复合体, 由6个亚基组成(AtRBOHA-AtRBOHF)。NADPH氧化酶通过从细胞内NADPH跨膜转移电子耦合分子氧产生超氧离子, 超氧离子通过进一步反应产生H₂O₂或ROS。最新研究表明, NO可通过亚硝基化NADPH氧化酶复合体中的AtRBOHD亚基负反馈抑制其合成H₂O₂的能力, 从而达到降低细胞中H₂O₂的含量及抑制细胞过度死亡的目的(Yun et al., 2011)。遗传学证据表明, 与野生型拟南芥Col-0相比, 过量产生NO的

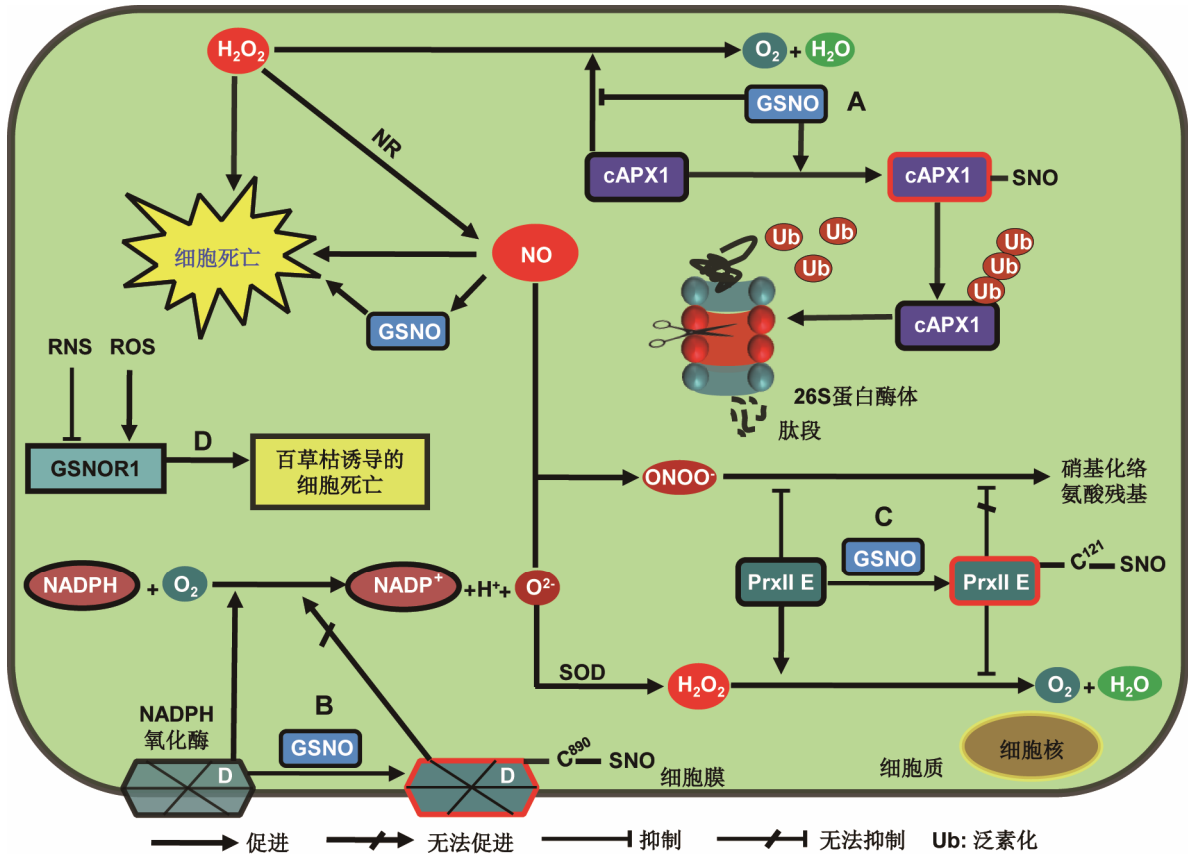


图2 亚硝基化调控植物细胞死亡

(A) NO通过亚硝基化抑制H₂O₂分解及还原相关酶造成细胞内过量积累H₂O₂，从而促进细胞死亡。cAPX是亚硝基化的靶蛋白，被亚硝基化后其活性受到抑制。另一方面亚硝基化可导致cAPX的泛素化，加速其通过蛋白酶体的降解，从而使细胞内H₂O₂含量增加，最终导致细胞死亡(de Pinto et al., 2013)。(B) NO通过亚硝基化质膜上NADPH氧化酶复合体中AtRBOHD亚基的Cys⁸⁹⁰负反馈抑制其合成H₂O₂的能力，从而降低细胞中H₂O₂的含量及抑制细胞过度死亡(Yun et al., 2011)。(C) NO通过亚硝基化过氧化物氧还原酶PrxII E中的Cys¹²¹抑制其还原H₂O₂及过亚硝酸盐(ONOO⁻)解毒能力。过亚硝酸盐通过不可逆地硝基化(nitration)络氨酸残基而改变蛋白的功能，PrxII E具保护蛋白不被硝基化的功能(Romero-Puertas et al., 2007)。(D) GSNOR1蛋白作为正调控因子参与除草剂百草枯诱导的细胞死亡。除草剂百草枯处理可导致野生型拟南芥死亡，但不能导致体内积累过量RNS的GSNOR1功能缺失突变体*par2-1*死亡。ROS具增加细胞内GSNOR1蛋白含量的效应，而RNS则具降低GSNOR1蛋白含量的效应。GSNOR1作用于ROS的下游参与除草剂百草枯诱导的细胞死亡(Chen et al., 2009)。

Figure 2 Regulation of cell death by S-nitrosylation in plants

(A) NO promotes cell death through increasing the accumulation of H₂O₂ excessively by inhibiting H₂O₂ detoxifying enzymes. cAPX is a target of S-nitrosylation and its enzyme activity is severely inhibited by S-nitrosylation. In addition, S-nitrosylation of cAPX results in its ubiquitination and degradation by proteasome and thus leads to the cell death by over-accumulation of H₂O₂ (de Pinto et al., 2013) (B) NO can feedback inhibit H₂O₂ production through S-nitrosylation of Cys⁸⁹⁰ of AtRBOHD, a subunit of NADPH oxidase on the plasmamembrane, and as a result, excessive accumulation of H₂O₂ is relieved and cell death is alleviated (Yun et al., 2011). (C) NO inhibits H₂O₂ reduction and ONOO⁻ detoxification of PrxII E through S-nitrosylation at Cys¹²¹. ONOO⁻ can irreversibly alter protein functions through nitration. PrxII E is an enzyme that can prevent proteins from nitration (Romero-Puertas et al., 2007). (D) GSNOR1 functions as a positive regulator that participates in the cell death induced by paraquat. Application of herbicide paraquat can kill the wild type *Arabidopsis Col-0* but not *par2-1*, a missense mutant of *GSNOR1*. ROS has an effect in increasing the level of GSNOR1, whereas RSN has the opposite effect. GSNOR1 participates paraquat-induced cell death downstream of ROS (Chen et al., 2009).

突变体 *nox1* (He et al., 2004) 和 *GSNOR1* 的功能缺失突变体 *gsnor1-3* 在发生 RPM1-AvrB 或 RPS4-AvrRPS4 诱导的 ETI (effector-triggered immunity) 时, 其体内积累较高水平的亚硝基化巯基 (S-nitrosothiol, SNO), 但抗病反应诱导产生的总水杨酸 (salicylic acid, SA) 和自由 SA 水平却显著降低 (Yun et al., 2011)。在发生 RPM1-AvrB 或 RPS4-AvrRPS4 诱导的 ETI 时, *gsnor1-3* 突变体以及 *gsnor1-3/sid2* 双突变体的叶片上出现较野生型更快且更强的 HR, 这与 *GSNOR1* 反义转基因株系中的结果一致 (Rustérucchi et al., 2007)。相反, HR 在过表达 *GSNOR1* 的突变体 *atgsnor1-1* 植株中的发生则较野生型相对延迟与降低 (Yun et al., 2011)。这一结果与 Rustérucchi 等 (2007) 报道的结果相反, 他们发现, 无毒病原菌诱导的 HR 在拟南芥 *GSNOR1* 过表达转基因株系中也较野生型增强, 但没有在 *GSNOR1* 反义株系中的增强效果显著 (Rustérucchi et al., 2007)。由于 SID2/ICS1 负责合成 90% 的由病原菌诱导合成的 SA (Wildermuth et al., 2001), 说明在不产生 SA 的情况下, SNO 可以促进病原菌感染引起的超敏反应。但在 SNO 过高的情况下, NO 可通过负反馈环限制超敏反应的进一步加剧。该负反馈调节是通过亚硝基化 NADPH 氧化酶复合体中的 AtRBOHD 亚基实现的。AtRBOHD 蛋白的 Cys⁸⁹⁰ 是亚硝基化的靶位点, 该位点的亚硝基化导致 AtRBOHD 合成 ROS 的能力丧失。相应地, 突变此亚硝基化的靶位点可减弱 SNO 对 AtRBOHD 活性的抑制, 从而增强 ROS 在细胞内的积累以及细胞死亡发生的强度 (图 2)。该 Cys⁸⁹⁰ 在人和果蝇的 NADPH 氧化酶中高度保守并可被亚硝基化, 说明此机制可能也参与调控动物的免疫反应, 但这些研究均未揭示 NO 诱导植物细胞死亡的分子机理。以上发现与动物中的研究结果相似。高浓度的 SNO 在不同组织器官中诱导细胞死亡 (Liu et al., 2004), 但高浓度的 SNO 也可以通过亚硝基化促细胞死亡因子 (Matthews et al., 1996) 和 caspase 等以抑制细胞死亡 (Mannick et al., 1999)。

2.3 亚硝基化 Metacaspase 9 (AtMC9) 可能具有抑制细胞死亡的功能

拟南芥 Metacaspase 9 (AtMC9) 的前体是亚硝基化的靶蛋白。AtMC9 的亚硝基化抑制其自我加工 (从原酶加工成成熟的蛋白酶) 及其蛋白水解酶活性。但由于

加工成熟的 AtMC9 失去了对亚硝基化敏感的半胱氨酸, 其活性不再受亚硝基化调控 (Belenghi et al., 2007)。此前 AtMC9 在细胞死亡中的功能未得到证实, 且此项研究也并未建立亚硝基化与细胞死亡之间的关系。Kim 等 (2013) 结合过表达转基因株系的创制和基因沉默揭示辣椒 (*Capsicum annuum*) CaMC9 在病原菌诱导的细胞死亡过程中起着正调控作用。但亚硝基化是否可抑制其促细胞死亡的功能还有待进一步研究。Belenghi 等 (2007) 的研究表明, 拟南芥 AtMC9 的亚硝基化可抑制其自我加工及其蛋白酶活性。由于被亚硝基化的位点在所有 Metacaspase 中高度保守, 因此可以推断 MC9 的亚硝基化很可能抑制由病原菌诱导的细胞死亡。

2.4 NO 在抑制细胞死亡过程中的作用

以上的报道均表明, 在植物中 NO 介导的亚硝基化具促细胞死亡的作用。Chen 等 (2009) 的研究表明, NO 在拟南芥中同时也具抗细胞死亡的作用。拟南芥 *GSNOR1* 突变体 *paraquat resistant2-1 (par2-1)* 具除草剂百草枯 (Paraquat) 诱导的细胞死亡特性 (Chen et al., 2009) (图 2)。此项研究表明, *GSNOR1* 蛋白作为正调控因子参与除草剂百草枯诱导的细胞死亡。ROS 具增加细胞内 *GSNOR1* 蛋白水平的效应, RNS (reactive nitrogen species) 则具降低 *GSNOR1* 蛋白水平的效应。*GSNOR1* 作用于 ROS 的下游, 参与除草剂百草枯诱导的细胞死亡 (图 2)。虽然此项研究并未揭示 *GSNOR1* 突变引起的抗百草枯诱导的细胞死亡是否由亚硝基化造成, 也未鉴定出在抑制细胞死亡过程中起关键作用的亚硝基化的靶蛋白, 但该研究表明, 与动物中的情况相似, 根据在细胞中所处的位置 (区室分割 (compartmentalization)) 及浓度不同, NO 兼具促细胞死亡和抗细胞死亡的作用 (Chen et al., 2009)。

3 亚硝基化在植物抗病反应中的作用

早在 2000 年, Klessig 等 (2000) 证明 NO 可参与 *PR-1 (pathogenesis-related-1)* 基因的诱导表达以及 SIPK/MPK6 (SA-inducible protein kinase/mitogen-activated protein kinases 6) 的激活。*PR-1* 基因表达的诱导依赖于 cGMP (Klessig et al., 2000)。脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 是革兰氏阴性细菌细胞表面的成分,

是微生物病原菌相关分子程式(microbe/pathogen-associated molecular patterns, MAMP或PAMP)。在拟南芥中, LPS可快速诱导依赖于NOA1 (nitric oxide associated 1)的NO大量产生(NO迸发)并伴随抗病相关基因的表达。*noa1*突变体对细菌病害表现超敏感, 说明NO参与植物的防御反应(Zeidler et al., 2004)。近几年的研究表明, NO通过亚硝基化修饰抗病相关的因子参与抗病反应。

3.1 亚硝基化通过修饰SA结合蛋白影响抗病反应

SA结合蛋白3 (SABP3)是一个叶绿体蛋白, 最早从烟草中被分离鉴定出来, 定位于叶绿体基质中, 以高亲和力结合SA。除了可以结合SA, 它还具有碳酸酐酶活性(carbonic anhydrase (CA) activity)及抗氧化活性。在烟草叶片中沉默CA可以抑制*Pto-AvrPto*介导的HR反应及抗性反应(Slaymaker et al., 2002)。NO可以在Cys²⁸⁰残基上亚硝基化水杨酸结合蛋白3 (salicylic acid-binding protein 3, AtSABP3)。AtSABP3的亚硝基化可以抑制其与SA的结合及其CA活性。而CA活性是植物表达抗性所必需的。因此, 亚硝基化抑制AtSABP3碳酸酐酶的活性, 在负向反馈调控植物抗病反应中起着重要作用(Wang et al., 2009)。

3.2 GSNOR1在抗病反应中的作用

拟南芥中失去GSNOR1功能可导致细胞中SNO及蛋白亚硝基化水平升高(Feechan et al., 2005)。病原菌侵染研究结果表明, *gsnor1-3*突变体中抗病基因(*R* gene)或效应子介导的对*Pseudomonas syringae* DC3000 (*avrRps4*或*avrB*)的抗性(effector-triggered immunity, ETI)、对*P. syringae* DC3000及*Hyaloperonospora parasitica* isolate Noco2小种的基础抗性(basal resistance或PAMP-triggered immunity, PTI)以及对小麦白粉病菌(wheat powdery mildew pathogen) (*Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*, *Bgt*)的非寄主抗性(non-host resistance)均显著下降; 而过表达AtGSNOR1的株系对*P. syringae* DC3000及*H. parasitica* isolate Noco2小种的基础抗性增强(Feechan et al., 2005)。有趣的是, 拟南芥GSNOR1反义转基因株系对*H. parasitica* isolate Noco2的基础抗性增强, 但对*P. syringae* DC3000的基础抗性无显著效应

(Rustérucchi et al., 2007)。系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)是由无毒病原菌(能被寄主的抗病基因识别而引起HR反应的病菌)侵染诱导的抗性反应, SAR能显著提高对各种不同病原菌再次侵染的抗性(Ryals et al., 1996)。先用携带无毒基因*avrRPM1*的*P. syringae* ES4326细菌菌株侵染拟南芥诱导SAR, 48小时后在上部系统叶片接种*H. parasitica* isolate Noco2以检测SAR。结果表明GSNOR1反义转基因株系的SAR增强, 而过表达AtGSNOR1的转基因株系SAR则降低(Rustérucchi et al., 2007)。拟南芥抗病基因*RPP4*编码的蛋白可识别霜霉菌(*H. arabidopsidis*) *Emwa1*菌株并激活对其的抗性。该抗病反应依赖于SA, *RPP4*介导的抗性在SA合成突变体*sid2*中丧失。尽管*atgsnor1-3/sid2*双突变体与*sid2*突变体一样缺乏SA的合成, 但该双突变体株系对*Emwa1*菌株的抗性较*sid2*突变体株系显著增强。与在野生型中的表型一致, *Emwa1*菌株在*atgsnor1-3/sid2*双突变体中不能完成其生活周期, 说明由于SNO水平增加导致的细胞死亡在缺乏SA及其相关防御反应的情况下足以抵抗*Emwa1*小种的侵染(Yun et al., 2011)。

*gsnor1-3*对*P. syringae* DC3000及*H. parasitica* isolate Noco2的基础抗性降低(Feechan et al., 2005), 而GSNOR1反义转基因株系则对*H. parasitica* isolate Noco2的基础抗性增强(Rustérucchi et al., 2007)。过表达GSNOR1转基因株系的结果在两项研究间正好相反; 二者所用的细菌不同, 但霜霉菌则完全一致, 为何得到相反的结果? 究其原因, 我们认为除了两个研究用于侵染实验的拟南芥植株生长时期不同可能导致截然不同的结果外, 不能排除GSNOR1活性降低程度(knock out vs knock down)不同对拟南芥抗病性具不同效应的可能性。同一研究小组(Loake小组)的结果表明: TIR-NBS-LRR类抗病基因*RPS4*及CC-NBS-LRR类抗病基因*RPM1*介导的对携带相应无毒基因细菌小种的抗性在*gsnor1-3*中均丧失(Feechan et al., 2005); 而*RPP4*介导的对*H. arabidopsidis* isolate *Emwa1*的抗性则在*atgsnor1-3*中并未完全丧失, 且在*atgsnor1-3/sid2*双突变体中的抗性较在*sid2*中显著增强。另外, *gsnor1-3*对霜霉菌中*R*基因介导的抗性和基础抗性的反应也不同。与野生型相比, *gsnor1-3*对*H. parasitica* isolate Noco2的

基础抗性降低(Feechan et al., 2005), 但对RPP4介导的*H. arabidopsidis* isolate Emwa1抗性则无明显改变。以上差异说明, SNO对抗病性的影响非常复杂, 因植株体内SNO水平高低、侵染病原菌的类型、病原菌是否携带效应子或无毒基因以及所用植株的年龄、生长状况及生长的环境条件等不同造成对抗病结果效应的不同。要彻底了解GSNOR1在抗性反应中的作用, 统一以上研究差异的原因, 需要回答以下2个问题。

(1) GSNOR1水平对拟南芥体内SA含量的影响。SA及SAG的合成以及PR1基因对病原菌侵染的诱导表达在*gsnor-3*中显著下降(Feechan et al., 2005)。*gsnor1-3*中HR的加剧及抗病性增强不依赖于SA(Yun et al., 2011)。而PR1基因在GSNOR1反义转基因株系中则持续表达, SAR在GSNOR1反义转基因株系中也显著增强(Rustérucci et al., 2007)。GSNOR1反义转基因株系中HR加剧及抗性增强(包括SAR)是否依赖于SA则未做调查。鉴于SAR依赖于SA, 由此推断, SA的水平在GSNOR1反义转基因株系中有可能是上升的。如果SA的水平在GSNOR1反义转基因株系中是上升的, 那为什么在*gsnor1-3*中是下降的? 可能的解释是GSNOR1水平降低程度的不同对拟南芥体内SA积累具不同的效应。要彻底回答这个问题就需对GSNOR1反义转基因株系进行SA含量测定。

(2) *gsnor1-3*突变体对不同病原菌抗性差异的原因。与野生型相比, 为什么*gsnor1-3*对R基因介导的细菌抗性和R基因介导的霜霉菌抗性有显著差异? 为什么*gsnor1-3*中对霜霉菌的基础抗性丧失但对R基因介导的霜霉菌抗性无显著影响? 如果SNO对霜霉菌具不依赖于SA的抑制效应, 为什么*gsnor1-3*对霜霉菌的基础抗性或PTI丧失?

3.3 NPR1与TGA1的亚硝基化与抗病性的关系

NPR1是SA介导的系统抗性中调控抗病相关基因表达的关键因子(Yan and Dong, 2014)。NPR1可以感知植物体内氧化还原状态的变化(Mou et al., 2003)。在未遭受病原菌侵染的植物中, NPR1以通过对氧化还原敏感的二硫键形成寡聚体的形式存在于细胞质中(Mou et al., 2003)。一旦遭受病原菌的侵染, 植物细胞内抗病信号分子SA水平升高, 氧化还原状态发

生变化, 导致NPR1寡聚体分子间的二硫键还原, 从而释放出NPR1单体。释放出的NPR1单体从细胞质转运至细胞核并调控抗病相关基因的表达(Mou et al., 2003)。NPR1蛋白中的Cys⁸²和Cys²¹⁶残基对形成寡聚体非常关键, 它们的突变可导致NPR1单体水平增加、NPR1持续性定位于核中以及在无病原菌侵染的情况下抗病相关基因的持续性激活(Mou et al., 2003)。董欣年研究组近期的研究表明, NPR1是亚硝基化的靶蛋白, 亚硝基化靶位点定位在Cys¹⁵⁶上。Cys¹⁵⁶的亚硝基化有利于NPR1形成寡聚体。通过创制在*npr1*突变体背景中过表达35S::NPR1-GFP和35S::NPR1^{C156A}-GFP证明Cys^{C156A}突变可导致NPR1单体水平的增加以及NPR1蛋白持续定位于核中(Tada et al., 2008)。SA诱导的NPR1由寡聚体向单体转化是由细胞质硫氧还蛋白TRX-h5和TRX-h3催化完成的。TRX-h3的表达是组成型的, 而TRX-h5则是受病原菌诱导表达。TRX-h5及TRX-h3催化NPR1从寡聚体向单体的释放, 同时可阻止单体转化成多聚体(Tada et al., 2008)。SA诱导产生的NO可同时使NPR1亚硝基化, 从而有利于NPR1的寡聚化以防止NPR1的耗尽。NPR1介导的抗病性在TRX-h5的突变体中降低(Tada et al., 2008)。在哺乳动物中, NO可以间接调控NF-κB的转录活性。在正常条件下, 通过与IκB (inhibitory κB)结合, NF-κB被保留在细胞质中。当NF-κB途径被激活时, IκB被IKK (IκB kinase)磷酸化并被泛素蛋白酶体系统降解。IκB被降解后, 自由态的NF-κB便从细胞质转运至细胞核, 从而激活下游基因的转录。NO通过亚硝基化IKK抑制其磷酸化活性, 从而阻止IκB降解实现其调控NF-κB途径的效应(Marshall et al., 2004; Reynaert et al., 2004), 这与NPR1被亚硝基化后形成寡聚体从而阻止其进入细胞核相似, 说明通过氧化还原调节的转录调控机制是动物和植物免疫反应的共同特征(Tada et al., 2008)。

TGA1转录因子也是植物系统获得防御反应过程中的关键调控因子。NPR1以单体形式与还原态TGA1结合, 从而促进TGA1与防御相关基因启动子区域的激活序列(activation sequence-1, as-1)结合(Lindermayr et al., 2010)。TGA1也是亚硝基化的靶蛋白, 其Cys²⁶⁰和Cys²⁶⁶既可被亚硝基化, 也可被谷胱甘肽化(S-glutathionylation)(Lindermayr et al., 2010)。在NPR1存在的条件下, GSNO处理可以保护TGA1免受

氧化介导的修饰以增强其结合as-1的活性。与Tada等(2008)报道的结果相反, Lindermayr等(2010)发现NO可以促进NPR1从细胞质进入细胞核。根据Tada等(2008)的报道, 亚硝基化的NPR1以寡聚体的形式存在于细胞质中, 在SA存在的条件下, SA诱导的TRX-h5及组成型表达的TRX-h3将NPR1去亚硝基化, 使其从多聚体还原成单体。NPR1以单体的形式进入细胞核, 促进TGA1与抗病相关基因的启动子结合, 从而启动抗病相关基因的表达。而Lindermayr等(2010)的研究结果表明, GSNO可诱导NPR1从细胞质进入细胞核, 而且GSNO可增强NPR1促进TGA1结合as-1的能力。Lindermayr等(2010)的解释是, 亚硝基化介导的NPR1多聚体化可以看作是其单体积累前的一个步骤, NPR1只是以单体形式转运至核中。由于GSNO可增强NPR1促进TGA1结合as-1的能力, 很可能NPR1在进入核中后被重新亚硝基化, 即亚硝基化的NPR1可使亚硝基化的TGA1具更强的结合as-1的能力, 从而使激活抗病相关基因的能力增强。Lindermayr等(2010)的另一个解释是, NO可诱导SA的合成, GSNO诱导NPR1的核转移其实是通过SA实现的。但这种解释忽略了二者研究所用的材料和方法不同所导致的差别。Tada等(2008)是通过以下现象得出结论SA能诱导野生型背景中转基因表达的: 35S::NPR1-GFP从细胞质进入细胞核, 而不能诱导gsn-or1-3突变体背景中35S::NPR1^{C156A}-GFP从细胞质进入细胞核。而Lindermayr等(2010)则是通过用GSNO处理过表达NPR1-GFP的野生型拟南芥原生质体得出结论。笔者认为, 外源GSNO处理原生质体的效应是瞬时的, 对被处理细胞的不同亚细胞部位的影响(亚硝基化或氧化还原状态)是相对均一的。而gsnor1-3突变体中GSNOR1表达的缺失对细胞内亚硝基化或氧化还原状态的影响则是持久的, 对细胞内不同亚细胞部位的影响是非均一的, 即其影响与GSNOR1的亚细胞定位相关。因此, 外源施用NO并不能完全模拟植物细胞所经历的真实生理状态。而用突变体研究则更贴近真实生理状况。鉴于以上两个研究得到截然相反结论, NPR1在进入核以后究竟是以单体还是寡聚体形式结合和促进TGA1启动PR基因的表达, 还有待进一步探讨, 同时造成以上差异的原因也有待进一步查清。TGA1是在细胞质中被亚硝基化后进入细胞核还是在细胞核中被亚硝基化仍不清楚。另外, TGA1

中的Cys²⁶⁰和Cys²⁶⁶既可被低浓度范围的GSNO亚硝基化, 也可被此浓度范围的GSNO谷胱甘肽化(Lindermayr et al., 2010)。GSNO是通过亚硝基化还是通过谷胱甘肽化或是二者皆需才可以促进TGA1结合as-1元件也有待进一步精细区分。此外, NPR1是否也受谷胱甘肽化的调控也值得研究。

3.4 泛素化相关蛋白的亚硝基化与烟草花叶病毒运动的关系

在动物中, 已知亚硝基化通过调控泛素化-蛋白酶体途径以及磷酸化途径调控细胞凋亡及其它生物学过程(Reynaert et al., 2004; Hara et al., 2005; Sen et al., 2008; Nakamura et al., 2010; Feng et al., 2013)。近期在植物中的研究表明, 泛素介导的蛋白水解参与植物的防御反应(Trujillo and Shirasu, 2010)以及H₂O₂诱导的细胞死亡(Vannini et al., 2012)。CDC48 (Cell Division Cycle Protein 48)或称p97或VCP (Vasolin-Containing Protein)是AAA⁺ ATPase酶家族成员之一。CDC48含有2个ATPase结构域(D1和D2), D1和D2结构域由参与结合与水解ATP的2个Walker区组成。该酶与分子伴侣酶类似, 利用ATP水解产生的能量改变泛素化蛋白的构象, 使之伸展从而有利于蛋白酶体的降解功能(Elsasser and Finley, 2005; Baek et al., 2013)。CDC48是依赖于泛素蛋白降解途径中的核心成员。在动物中, 其参与一系列细胞过程, 包括细胞周期、转录调控、ER相关的降解途径(endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation pathway, ERAD)、免疫反应、胞内运输、细胞凋亡以及自噬等(Meyer et al., 2012)。近期的研究暗示拟南芥CDC48可与TMV病毒的运动蛋白(movement protein, MP)互作, 使MP从ER的包涵体(inclusion body)中释放到细胞质中促进其降解(Niehl et al., 2012)。过表达AtCDC48会破坏病毒的运动, 说明CDC48通过将MP从ER转运途径中转移出及干扰其与微管的动态控制病毒运动。CDC48的ATP酶活性是降解MP所必需的, CDC48在隐地蛋白-1 (cryptogein-1)诱导的烟草细胞中发现被亚硝基化(Astier et al., 2012)。其亚硝基化位点被定位在参与ATP结合并诱导局部构型变化的D2结构域的Walker A区中的Cys⁵²⁶。CDC48 Cys⁵²⁶的亚硝基化抑制该酶的ATP酶活性, 暗示了NO可通过亚硝基化CDC48抑制其ATP

酶活性从而抑制病毒运动的可能性。

4 结束语

近期对亚硝基化研究获得的认识将NO调控植物细胞死亡及抗病反应的机制探讨提高到了一个新的层次。鉴于气体分子NO自由基难以研究的特性及亚硝基化鉴定灵敏度的限制,在植物中仅有少数蛋白被鉴定为亚硝基化的靶蛋白且其功能受亚硝基化调控。要揭示NO调控植物抗性的完整画面并建立NO在抗病反应中的完整调控系统,需了解不同的RNS在抗病反应发生时精细的动态时空分布、变化状况以及鉴定出更多的受亚硝基化调控并参与抗病反应的蛋白。以往大多数研究鉴定的靶蛋白并不是在内源NO生理学浓度条件下鉴定出的,而是通过过量施用外源NO供体的情况下得到的。过量施用外源NO供体,忽略了NO信号的时空性、流动性和可逆性等特性,不能真实地反映活体植株中这些蛋白是否可被生理浓度NO所修饰,有时可能得到没有生理学意义的结论。因此鉴定出植株正常活体生理状态下亚硝基化的靶蛋白和靶位点更具意义。低灵敏度的亚硝基化鉴定方法是制约以上两个方面进展的关键性限制因素。生物素置换法结合液相色谱-串联质谱以及同位素代码亲和标签技术等新型亚硝基化鉴定技术的建立和应用将更能精准地鉴定出参与此过程的因子并准确地反映NO在植物免疫或抗性中的作用(汪达丽等, 2014)。NO不但能亚硝基化蛋白,也可以谷胱甘肽化同一蛋白的半胱氨酸残基,因此,阐明亚硝基化和谷胱甘肽化对同一蛋白修饰的动力学特征、动态平衡以及如何协同调控某一生物学过程也是近来研究的方向之一。NO的非特异性决定了其可与其它不同激素互作参与调控植物的不同生物学过程,现已知NO可以与水杨酸、乙烯、生长素及细胞分裂素互作调控植物的抗性与生长发育。随着研究的深入,NO与其它激素的互作机制也将被揭示,因此建立NO与不同激素互作的调控网络也是未来研究的热点。在动物中,已知亚硝基化通过调控泛素化-蛋白酶体途径以及磷酸化途径调控细胞凋亡及其它生物学过程。近期在植物中发现,CDC48为亚硝基化的靶蛋白且其活性受亚硝基化调控,但还未见激酶或磷酸酶受亚硝基化调控的报道。鉴定出参与抗病反应且受亚硝基化调控的磷酸化/去磷酸化过程也将

是未来研究的方向之一。NO的研究成果在新药的开发和应用上已非常成功,但在植物中仍未有应用,将NO的研究成果用于创制抗病的农作物品种将是该领域研究的终极目标。

参考文献

- 汪达丽, 张双双, 刘建中 (2014). 蛋白质亚硝基化检测和鉴定方法的研究进展. *植物生理学报* **50**, 1079–1088.
- 王鹏程, 杜艳艳, 宋纯鹏 (2009). 植物细胞一氧化氮信号转导研究进展. *植物学报* **44**, 517–525.
- 姚涛, 白素兰, 李苗苗, 张耀川, 何奕昆 (2011). DELLA蛋白参与拟南芥幼苗对一氧化氮逆境的抵抗. *植物学报* **46**, 481–488.
- Astier J, Besson-Bard A, Lamotte O, Bertoldo J, Bourque S, Terenzi H, Wendehenne D (2012). Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogean signaling in tobacco cells. *Biochem J* **447**, 249–260.
- Baek GH, Cheng H, Choe V, Bao X, Shao J, Luo S, Rao H (2013). Cdc48: a swiss army knife of cell biology. *J Amino Acids* **2013**, 183421.
- Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Chaki M, Valde-rama R, Mata-Pérez C, López-Jaramillo J, Padilla MN, Carreras A, Corpas FJ, Barroso JB (2014). Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *J Exp Bot* **65**, 527–538.
- Belenghi B, Romero-Puertas MC, Vercammen D, Brack-ener A, Inzé D, Delledonne M, Van Breusegem F (2007). Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J Biol Chem* **282**, 1352–1358.
- Benhar M, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS (2008). Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science* **320**, 1050–1054.
- Bonfoco E, Kraic D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 7162–7166.
- Chen R, Sun S, Wang C, Li Y, Liang Y, An F, Li C, Dong H, Yang X, Zhang J, Zuo J (2009). The Arabidopsis PARAQUAT RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Res* **19**, 1377–1387.
- Crawford NM, Guo FQ (2005). New insights into nitric oxide

- metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci* **10**, 195–200.
- de Pinto MC, Locato V, Sgobba A, Romero-Puertas Mdel C, Gadaleta C, Delledonne M, De Gara L** (2013). S-nitrosylation of ascorbate peroxidase is part of programmed cell death signaling in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol* **163**, 1766–1775.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585–588.
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF** (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 10328–10333.
- Elsasser S, Finley D** (2005). Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat Cell Biol* **7**, 742–749.
- Feechan A, Kwon E, Yun BW, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ** (2005). A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 8054–8059.
- Feng X, Sun T, Bei Y, Ding S, Zheng W, Lu Y, Shen P** (2013). S-nitrosylation of ERK inhibits ERK phosphorylation and induces apoptosis. *Sci Rep* **3**, 1814.
- Groß F, Durner J, Gaupels F** (2013). Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Front Plant Sci* **4**, 419.
- Gupta KJ** (2011). Protein S-nitrosylation in plants: photorespiratory metabolism and NO signaling. *Sci Signal* **4**, jc1.
- Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD, Ferris CD, Hayward SD, Snyder SH, Sawa A** (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol* **7**, 665–674.
- He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, Fiorani F, Jackson RB, Crawford NM, Pei ZM** (2004). Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science* **305**, 1968–1971.
- Hess DT, Stamler JS** (2012). Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J Biol Chem* **287**, 4411–4418.
- Kim SM, Bae C, Oh SK, Choi D** (2013). A pepper (*Capsicum annuum* L) metacaspase 9 (Camc9) plays a role in pathogen-induced cell death in plants. *Mol Plant Pathol* **14**, 557–566.
- Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H** (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8849–8855.
- Lamattina L, Garcia-Mata C, Graziano M, Pagnussat G** (2003). Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 109–136.
- Lee TY, Chen YJ, Lu CT, Ching WC, Teng YC, Huang HD, Chen YJ** (2012). dbSNO: a database of cysteine S-nitrosylation. *Bioinformatics* **28**, 2293–2295.
- Leitner M, Vandelle E, Gaupels F, Bellin D, Delledonne M** (2009). NO signals in the haze: nitric oxide signaling in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 451–458.
- Li H, Wan A, Xu G, Ye D** (2013). Small changes huge impact: the role of thioredoxin 1 in the regulation of apoptosis by S-nitrosylation. *Acta Biochim Biophys Sin* **45**, 153–161.
- Lin A, Wang Y, Tang J, Xue P, Li C, Liu L, Hu B, Yang F, Loake GJ, Chu C** (2012). Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice. *Plant Physiol* **158**, 451–464.
- Lindermayr C, Durner J** (2009). S-nitrosylation in plants: pattern and function. *J Proteomics* **73**, 1–9.
- Lindermayr C, Saalbach G, Bahnweg G, Durner J** (2006). Differential inhibition of Arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *J Biol Chem* **281**, 4285–4291.
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J** (2005). Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* **137**, 921–930.
- Lindermayr C, Sell S, Müller B, Leister D, Durner J** (2010). Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *Plant Cell* **22**, 2894–2907.
- Lipton SA** (1993). Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends Neurosci* **16**, 527–532.
- Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS** (2001). A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490–494.
- Liu L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, McMahon TJ, Dickfeld T, Marshall HE, Que LG, Stamler JS** (2004). Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell* **116**, 617–628.

- Mannick JB** (2007). Regulation of apoptosis by protein S-nitrosylation. *Amino Acids* **32**, 523–526.
- Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS** (1999). Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* **284**, 651–654.
- Marshall HE, Hess DT, Stamler JS** (2004). S-nitrosylation: physiological regulation of NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 8841–8842.
- Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT** (1996). Inhibition of NF- κ B DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* **24**, 2236–2242.
- Meyer H, Bug M, Bremer S** (2012). Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat Cell Biol* **14**, 117–123.
- Michelet L, Zaffagnini M, Massot V, Keryer E, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Issakidis-Bourguet E, Lemaire SD** (2006). Thioredoxins glutaredoxins and glutathionylation: new crosstalks to explore. *Photosynth Res* **89**, 225–245.
- Mou Z, Fan W, Dong X** (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**, 935–944.
- Nakamura T, Wang L, Wong CC, Scott FL, Eckelman BP, Han X, Tzitzilonis C, Meng F, Gu Z, Holland EA, Clemente AT, Okamoto S, Salvesen GS, Riek R, Yates III JR, Lipton SA** (2010). Transnitrosylation of XIAP regulates caspase-dependent neuronal cell death. *Mol Cell* **39**, 184–195.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT** (2002). Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* **128**, 13–16.
- Niehl A, Amari K, Gereige D, Brandner K, Mély Y, Heinlein M** (2012). Control of tobacco mosaic virus movement protein fate by CELL-DIVISION-CYCLE protein48. *Plant Physiol* **160**, 2093–2108.
- Ortega-Galisteo AP, Rodríguez-Serrano M, Pazmiño DM, Gupta DK, Sandalio LM, Romero-Puertas MC** (2012). S-nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *J Exp Bot* **63**, 2089–2103.
- Reynaert NL, Ckless K, Korn SH, Vos N, Guala AS, Wouters EF, van der Vliet A, Janssen-Heininger YM** (2004). Nitric oxide represses inhibitory κ B kinase through S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 8945–8950.
- Romero-Puertas MC, Campostrini N, Mattè A, Righetti PG, Perazzolli M, Zolla L, Roepstorff P, Delledonne M** (2008). Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* **8**, 1459–1469.
- Romero-Puertas MC, Laxa M, Matte A, Zaninotto F, Finkemeier I, Jones AM, Perazzolli M, Vandelle E, Dietz KJ, Delledonne M** (2007). S-nitrosylation of peroxiredoxin II promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**, 4120–4130.
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Sandalio LM** (2013). Protein S-nitrosylation in plants under abiotic stress: an overview. *Front Plant Sci* **4**, 373.
- Rustérucci C, Espunya MC, Díaz M, Chabannes M, Martínez MC** (2007). S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in Arabidopsis, both locally and systemically. *Plant Physiol* **143**, 1282–1292.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD** (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**, 1809–1819.
- Sell S, Lindermayr C, Durner J** (2008). Identification of S-nitrosylated proteins in plants. *Methods Enzymol* **440**, 283–293.
- Sen N, Hara MR, Kornberg MD, Cascio MB, Bae BI, Shahani N, Thomas B, Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH, Sawa A** (2008). Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* **10**, 866–873.
- Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB, Klessig DF** (2002). The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 11640–11645.
- Stamler JS** (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* **78**, 931–936.
- Stamler JS, Toone EJ, Lipton SA, Sucher NJ** (1997). (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron* **18**, 691–696.
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X** (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952–956.
- Trapet P, Kulik A, Lamotte O, Jeandroz S, Bourque S, Nicolas-Francès V, Rosnoblet C, Besson-Bard A, Wendehenne D** (2014). NO signaling in plant immunity: a tale of messengers. *Phytochemistry* **112**, 72–79.
- Trujillo M, Shirasu K** (2010). Ubiquitination in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 402–408.

- Vannini C, Marsoni M, Cantara C, De Pinto MC, Locato V, De Gara L, Bracale M** (2012). The soluble proteome of tobacco Bright Yellow-2 cells undergoing H₂O₂-induced programmed cell death. *J Exp Bot* **63**, 3137–3155.
- Wang Y, Chen C, Loake GJ, Chu C** (2010). Nitric oxide: promoter or suppressor of programmed cell death. *Protein Cell* **1**, 133–142.
- Wang YQ, Feechan A, Yun BW, Shafiei R, Hofmann A, Taylor P, Xue P, Yang FQ, Xie ZS, Pallas JA, Chu CC, Loake GJ** (2009). S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *J Biol Chem* **284**, 2131–2137.
- Wawer I, Bucholc M, Astier J, Anielska-Mazur A, Dahan J, Kulik A, Wyslouch-Cieszynska A, Zareba-Kozioł M, Krzywinska E, Dadlez M, Dobrowolska G, Wendehe-
nne D** (2010). Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *Biochem J* **429**, 73–83.
- Wendehe-
nne D, Durner J, Klessig DF** (2004). Nitric oxide: a new player in plant signaling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 449–455.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562–565.
- Yan S, Dong X** (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Curr Opin Plant Biol* **20**, 64–68.
- Yu M, Lamattina L, Spoel SH, Loake GJ** (2014). Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytol* **202**, 1142–1156.
- Yu M, Yun BW, Spoel SH, Loake GJ** (2012). A sleigh ride through the SNO: regulation of plant immune function by protein S-nitrosylation. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 424–430.
- Yun BW, Feechan A, Yin M, Saidi NB, Le Bihan T, Yu M, Moore JW, Kang JG, Kwon E, Spoel SH, Pallas JA, Loake GJ** (2011). S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, 264–268.
- Zaffagnini M, Fermani S, Costa A, Lemaire SD, Trost P** (2013). Plant cytoplasmic GAPDH: redox post-translational modifications and moonlighting properties. *Front Plant Sci* **4**, 450.
- Zeidler D, Zähringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J** (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 15811–15816.
- Zhang X, Huang B, Zhang L, Zhang Y, Zhao Y, Guo X, Qiao X, Chen C** (2012). SNObase, a database for S-nitrosation modification. *Protein Cell* **3**, 929–933.

The Roles of Protein S-nitrosylation in Plant Cell Death and Disease Resistance

Zhen Liu, Xia Liu, Jianzhong Liu*

College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract S-nitrosylation, a newly identified cGMP-independent nitric oxide (NO) signaling pathway, is a post-translational modification in which NO moiety is covalently attached to the cysteine thiol group of a target protein, thereby leading to functional changes of modified proteins. Here, we review the recent progress in understanding the roles of S-nitrosylation in plant cell death and disease resistance, two closely interconnected biological processes. We summarize how NO promotes or inhibits cell death and disease resistance through S-nitrosylation of key proteins that participate in certain biological processes. We also give our comments on the inconsistent results regarding the role of S-nitrosylation in cell death and disease resistance from different groups. From the most recent progress made in animal systems, we provide perspectives for plant biologists in this field.

Key words cell death, disease resistance, nitric oxide, S-nitrosogluta thionereductase (GSNOR1), S-nitrosylation

Liu Z, Liu X, Liu JZ (2016). The roles of protein S-nitrosylation in plant cell death and disease resistance. *Chin Bull Bot* **51**, 130–143.

* Author for correspondence. E-mail: jzliu@zjnu.cn