

УДК 577.152.193:582.32

**АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗА МХА *Dicranum scoparium*:
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА, АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА**
А. О. Онеле¹, А. В. Часов^{1,2}, Т. В. Трифонова¹, Ф. В. Минибаева^{1,2,*}

Представлено академиком РАН И.А. Тарчевским 23.04.2019 г.

Поступило 21.05.2019 г.

В настоящей работе впервые клонирован и секвенирован ген *APX*, кодирующий аскорбатпероксидазу у мха *Dicranum scoparium*, показана высокая гомологичность *APX* с генами аскорбатпероксидазы мхов *Grimmia pilifera* и *Physcomitrella patens*. Методами биоинформатики охарактеризована структура белка и изучена активность фермента при абиотическом стрессе. Обнаружено повышение активности аскорбатпероксидазы при обезвоживании побегов *D. scoparium*. Выявлено, что при воздействии теплового шока снижение активности аскорбатпероксидазы коррелирует с уменьшением экспрессии *APX*. Обнаруженные в настоящей работе консервативные элементы в структуре гена и белка аскорбатпероксидазы свидетельствуют о сохранении этих последовательностей в геноме растений в ходе эволюции ввиду важности данного фермента в поддержании редокс-статуса клеток.

Ключевые слова: мох *Dicranum scoparium*, абиотический стресс, аскорбат пероксидаза, идентификация *APX* гена, гидроксильный радикал.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524894424-428>

В настоящее время считаются доказанными регуляторные функции активных форм кислорода (АФК), однако накопление АФК чрезвычайно токсично для клеток [1]. Уровень АФК контролируется разнообразными ферментативными и неферментативными механизмами. Наряду с секреторными пероксидазами (ПО; КФ 1.11.1.7) одним из основных антиоксидантных ферментов растительной клетки является аскорбатпероксидаза (АПО; КФ 1.11.1.11), использующая аскорбат в качестве донора электронов при восстановлении H_2O_2 до воды. Аскорбатпероксидаза локализуется в различных клеточных компартментах, таких как хлоропласты, цитозоль, митохондрии, пероксисомы и апопласт, имеет одну или несколько изоформ [2, 3]. Активность и экспрессия генов АПО в разных видах растений изменяется в ответ на воздействие различных стрессоров [2, 3]. В отличие от сосудистых растений во мхах роль АПО в детоксикации H_2O_2 изучена недостаточно. Мхи — древнейшие несосудистые высшие растения, представители гаметофитной линии эволюции, характеризуются высокой стрессовой устойчивостью к неблагоприятным условиям среды. Они способны сохранять

жизнеспособность при потере большого количества воды, поэтому могут служить модельными объектами при изучении стрессовых реакций и редокс-метаболизма при обезвоживании. Ранее нами было продемонстрировано вовлечение ПО в образование и детоксикацию АФК в побегах мха *Dicranum scoparium* Hedw. при обезвоживании и регидратации [4]. В настоящей работе мы впервые идентифицировали ген, кодирующий АПО у мха *D. scoparium*, охарактеризовали структуру белка и изучили изменения активности АПО при абиотическом стрессе. С эволюционной точки зрения молекулярно-генетический анализ АПО бриофитов является актуальным для понимания консервативных свойств и роли этого фермента в стрессовых ответах в растениях.

Побеги мха *D. scoparium* Hedw. были собраны в Айшинском лесничестве близ г. Казани. Активности ПО (*o*-дианизидина, $\epsilon_{460} = 30 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) и АПО (аскорбат, $\epsilon_{265} = 8,24 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) определяли в экстрактах *D. scoparium* спектрофотометрическим методом. Образование гидроксильного радикала оценивали в эквивалентах малонового диальдегида (МДА, $\epsilon_{532} = 0,156 \text{ мкМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) путём измерения скоростей окисления дезоксирибозы по описанному ранее методу [4]. После клонирования трансформацию гена АПО (*APX*) осуществляли в компетентные клетки *Escherichia coli*. Секвенирование *de novo* выполняли по реакции Sanger. Идентификацию генной последовательности и биоинформатический анализ

¹ Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской Академии наук”

² Казанский (Приволжский) федеральный университет
*E-mail: minibayeva@kibb.knc.ru; fminibayeva@gmail.com

структуры гена, как и анализ первичной структуры белка, проводили с помощью программы BLAST на сервере NCBI. Выравнивание последовательностей проводили с использованием программ Vector NTI Suite 9. Предсказание экзон-интронной структуры гена осуществляли с помощью онлайн-сервера Ensemblplants, поиск мотивов — с помощью сервера 3DLigandSite, предсказание вторичной и третичной структуры и построение компьютерной модели АПО проводили с помощью сервера I-TASSER. Оценку уровня экспрессии *APX* *D. scoparium* осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени относительно референсных генов: 18S рибосомальной РНК (*18S*), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) и α -тубулина (α -*TUB1* и α -*TUB2*) [5].

До настоящего времени гены, кодирующие *APX* у бриофитов, практически не секвенированы и не охарактеризованы. Идентифицирован един-

ственный *APX* во мхе *G. pilifera*. В связи с этим для идентификации *APX* в *D. scoparium* в качестве запроса использовалась кДНК *G. pilifera* (номер доступа в GenBank GU989311) [6]. Нами были выявлены и секвенированы нуклеотидные последовательности кодирующего домена (CDS) *APX*, секвенированные фрагменты соответствовали предполагаемым последовательностям из базы данных NCBI. Биоинформатический анализ экзон-интронной структуры *APX* при выравнивании аминокислотных последовательностей *D. scoparium*, *G. pilifera*, *Phycometrella patens* выявил наличие до десяти консервативных экзонов (рис. 1). Кроме того, обнаружено наличие девяти интронов.

В литературе имеется много данных о структуре *APX* в сосудистых растениях, наиболее изученным является ген, кодирующий цитозольную АПО, — *APX1*. При анализе последовательности нуклеотидов

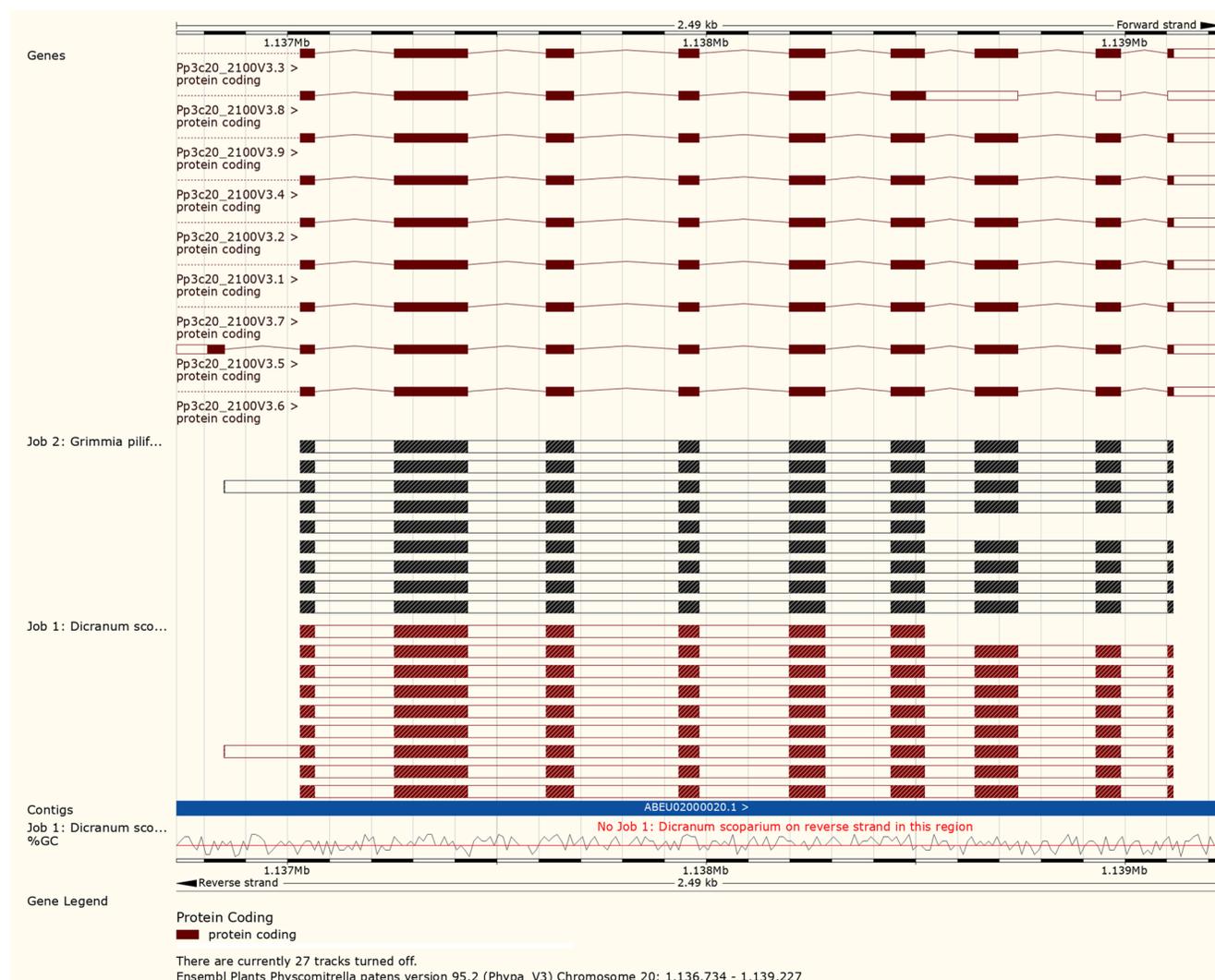


Рис. 1. Экзон-интронная структура *APX* *D. scoparium*. Тёмными прямоугольниками обозначены экзоны, линиями — интроны.

D. scoparium выявлены ССААТ-бокс, входящий в состав промотора (100–104 п.н.), и регуляторный САСГСА (124–129 п.н.) элемент. Считается, что последний находится в ферментах, индуцируемых ксенобиотиками [7]. Сравнительный анализ CDS гена *APX D. scoparium* подтвердил высокую степень гомологии с генами *APX G. pilifera* (91%), *P. patens* (79,9%), *Zea mays* (66,7%) и *Nicotiana tomentosiformis* (66,1%). Филогенетическое древо, построенное на основании анализа нуклеотидных последовательностей *APX* и последовательностей генов этого семейства других представителей, показало, что *APX D. scoparium*, как и ожидалось, наиболее близок к *APX G. pilifera* и *P. patens* (данные не представлены).

Биоинформатический анализ первичной структуры белка показал, что АПО *D. scoparium* содержит 256 аминокислот, предсказанная молекулярная масса 28,35 кДа и pI 5,71. В аминокислотной последовательности АПО *D. scoparium* нами обнаружено несколько высококонсервативных мотивов, важных для ферментативной активности. Так, гистидин Н-163 (рис. 2) присутствует в активном центре АПО всех растений и необходим для взаимодействия с ионом железа гема [8]. Рядом с гистидином находятся остатки R38 и T41 [9], при этом аргинин R38 играет

функциональную роль в контроле связывания и ориентации субстрата [10]. Обнаружены T164, T180, D187 (рис. 2), образующие сайт связывания K⁺, который необходим для активности фермента [9]. Аргинин R173 играет важную роль в утилизации аскорбата при образовании промежуточного соединения II фермента (рис. 2) [11].

Обнаружено, что АПО *D. scoparium* вовлечена в абиотические стрессовые ответы. Так, показано увеличение активности АПО ко вторым суткам медленного обезвоживания побегов мха (рис. 3). Наивысшая активность АПО наблюдалась через две недели обезвоживания, когда относительное содержание воды (ОСВ) достигало 40%. Во мхе *Octoblepharum albidum* активность АПО также увеличивалась при обезвоживании над силикагелем в течение 24–72 ч [12]. Кроме того, мы наблюдали изменения в активности АПО при выдерживании побегов *D. scoparium* в условиях температурного стресса: при –20 °С и +50 °С. Обнаружено, что при выдерживании при –20 °С в течение 2 ч активность АПО имела тенденцию к повышению, а при воздействии теплового шока за это же время активность АПО падала более чем в два раза по сравнению с контролем (табл. 1). При этом экспрессия гена *APX* уменьшалась в обоих случаях, значительно при тепловом шоке. Снижение

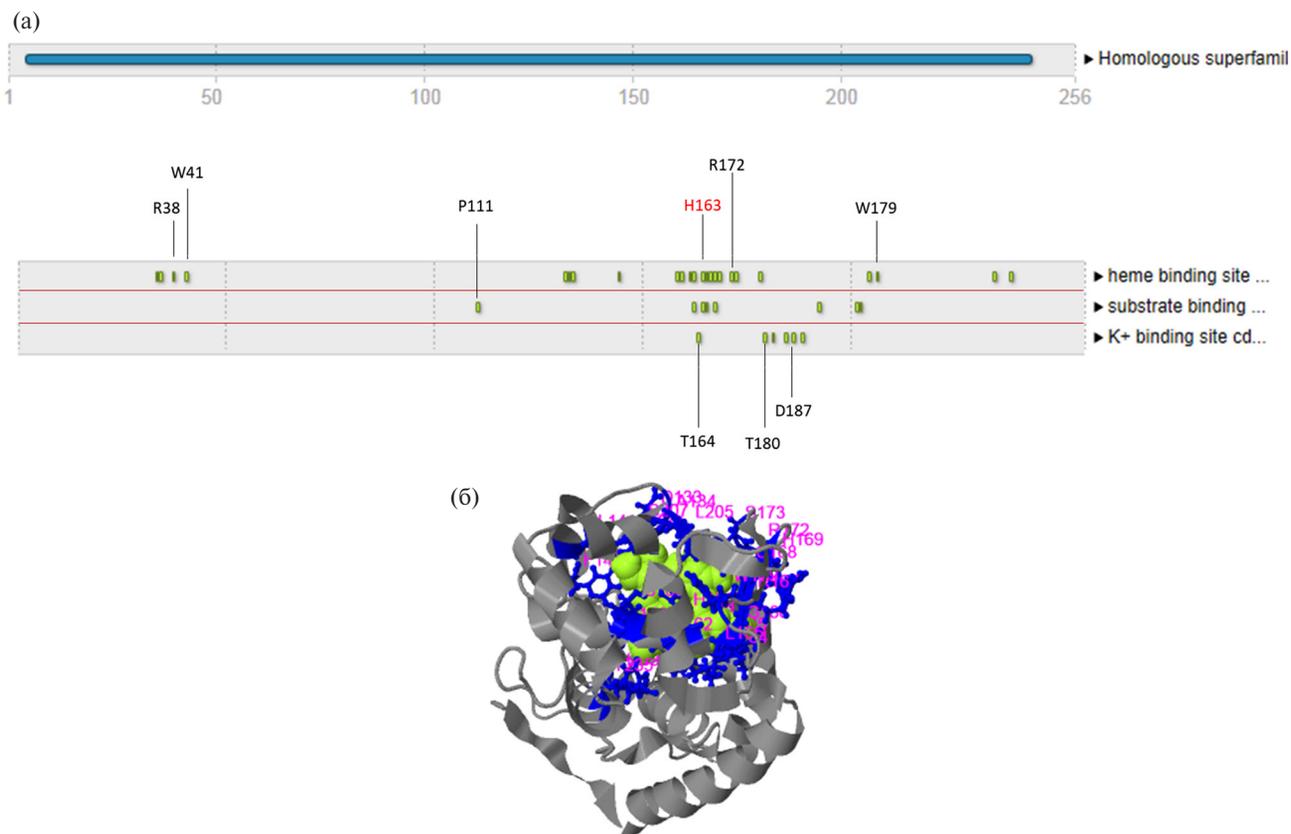


Рис. 2. Первичная структура, консервативные мотивы (а) и третичная структура (б) белка АПО *D. scoparium*.

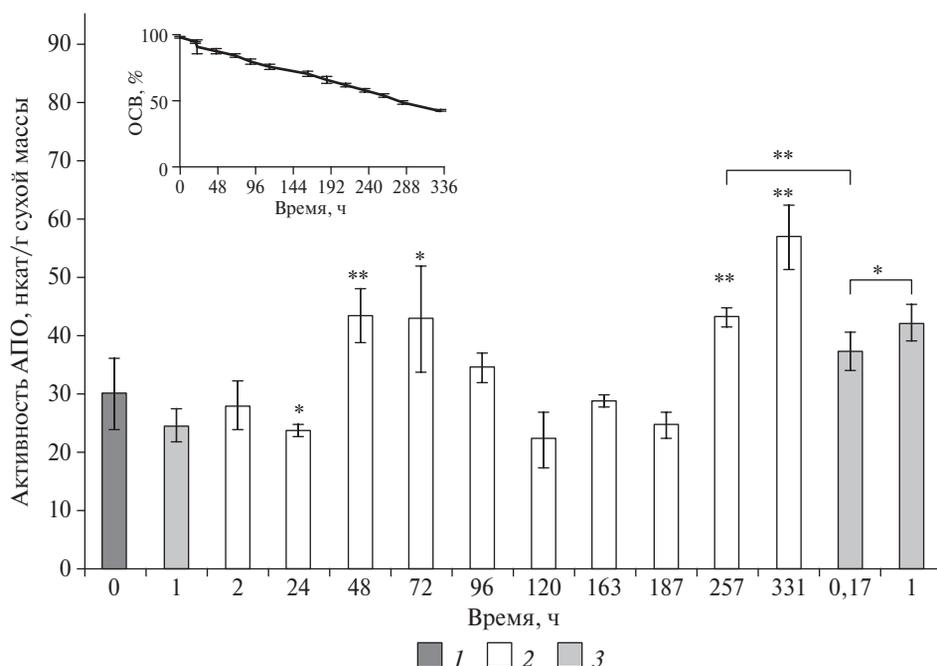


Рис. 3. Активность АПО и ОСВ (врезка) в побегах мха *D. scoparium* при обезвоживании над парами 35% CaCl₂ и регидратации. 1 — сухой мох, 2 — обезвоживание, 3 — регидратация. Здесь и далее разница достоверна при $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), 0,001 (***)

Таблица 1. Экспрессия *APX*, активность пероксидаз и образование гидроксильного радикала через 2 ч температурного воздействия на побеги *D. scoparium*.

| Параметр | Воздействие | | |
|---|-------------|--------------|----------------|
| | Контроль | -20 °C | +50 °C |
| ПО (окисление <i>o</i> -дианизидина, мккат/г сухой массы) | 3,2 ± 0,1 | 3,8 ± 0,1*** | 5,9 ± 0,5*** |
| Экспрессия <i>APX</i> (отн. ед.) | 1 ± 0 | 0,67 ± 0,09 | 0,39 ± 0,11 |
| АПО (убыль аскорбата, нкат/г сухой массы) | 184 ± 7 | 190 ± 6 | 78 ± 9*** |
| Образование \cdot ОН (МДА, мкМ/(ч·г сухой массы)) | 3,20 ± 0,07 | 3,33 ± 0,02* | 0,83 ± 0,08*** |

экспрессии гена *APX* в случае воздействия минусовых температур, по-видимому, в дальнейшем могло приводить и к снижению активности АПО, что привело к усилению образования АФК, в частности гидроксильных радикалов (\cdot ОН, табл. 1). В случае теплового шока происходило значительное снижение образования \cdot ОН (табл. 1). На фоне значительных снижений как экспрессии гена *APX* (более чем в 2,5 раза), так и активности фермента АПО данный факт можно объяснить включением других компенсаторных механизмов, в частности значительной активацией ПО (табл. 1). Пероксидаза активировалась при обоих воздействиях, но при тепловом шоке её активность превышала не только контрольный вариант, но и вариант с холодовым воздействием больше чем в 1,5 раза (табл. 1).

Таким образом, АПО является ключевым фактором стрессовых ответов мха *D. scoparium* на действие аботических стрессоров. Обнаруженные в настоящей работе консервативные элементы в структуре гена и белка АПО *D. scoparium* свидетельствуют о сохранении этих последовательностей в геноме растений в ходе эволюции ввиду важности этого фермента в поддержании окислительно-восстановительного статуса в клетках растений.

Источники финансирования. Работа выполнена частично при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 18-04-01060, 18-44-160031), Программы повышения конкурентоспособности КФУ и в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Foyer C.H. // Environ. Exp. Bot. 2018. V. 154. P. 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003>
2. Gest N., Gautier H., Stevens R. // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 33–53. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers297>
3. Smirnov N. // Free Radic. Biol. Med. 2018. V. 122. P. 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033>
4. Onele A.O., Chasov A., Viktorova L., et al. // S. Afr. J. Bot. 2018. V. 119. P. 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.08.014>
5. Li X., Zhang D., Li H., et al. // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 38. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00038>
6. Song X.H., Sha W., Jin Z.M., et al. // Adv. Intel. Soft. Compu. 2012. V. 134. P. 433–440. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27537-1_53
7. Rushmore T.H., Morton M.R., Pickett C.B.J. // Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 11 632–11 639.
8. Dabrowska G., Kata A., Goc A., et al. // Acta Biol. Crac. 2007. V. 1. P. 7–17.
9. Jespersen H.M., Kjaersgard I.V.H., Ostergaard L., et al. // Biochem. J. 1997. V. 326. P. 305–310. <https://doi.org/10.1042/bj3260305>
10. Celik A., Cullis P.M., Sutcliffe M.J., et al. // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. P. 78–85. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.01851.x>
11. Burse E.H., Poulos T.L. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 7374–7377. <https://doi.org/10.1021/bi000446s>
12. Lubaina A.S., Meenu Krishnan V.G., Murugan K. // Indian J. Plant Sci. 2013. V. 2. P. 12–22.

**ASCORBATE PEROXIDASE OF MOSS *Dicranum scoparium*:
GENE IDENTIFICATION, ENZYME ACTIVITY**

A. O. Onele¹, A. V. Chasov^{1,2}, T. V. Trifonova¹, F. V. Minibayeva^{1,2}

¹*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center
of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russian Federation*

²*Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russian Federation*

Presented by Academician of the RAS I.A. Tarchevsky April 23, 2019

Received May 21, 2019

In present work, the *APX* gene encoding ascorbate peroxidase in the moss *Dicranum scoparium* was for the first time cloned and sequenced, high homology of *APX* with ascorbate peroxidase genes of the mosses *Grimmia pilifera* and *Physcomitrella patens* was shown. The structure of the protein was characterized using bioinformatics approach and the activity of the enzyme under abiotic stresses was studied. An increase in the activity of ascorbate peroxidase was detected during desiccation of *D. scoparium* shoots. When exposed to heat shock, a decrease in the activity of ascorbate peroxidase correlated with a decrease in the expression of *APX*. Conserved elements, which were found in the structure of ascorbate peroxidase gene and protein, indicate that these sequences are preserved in the plant genome during evolution, in support of the importance of this enzyme in maintaining cellular redox status.

Keywords: moss *Dicranum scoparium*, abiotic stress, ascorbate peroxidase, identification of *APX* gene, hydroxyl radical.