

На правах рукописи



Онеле Алфред Обинна

Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.

1.5.21. Физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2022

Работа выполнена в лаборатории окислительно-восстановительного метаболизма Казанского института биохимии и биофизики - обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН)

Научный руководитель: Часов Андрей Васильевич

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
лаборатории окислительно-восстановительного метаболизма
КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань

Официальные оппоненты: Максимов Игорь Владимирович

доктор биологических наук, профессор, заведующий
лаборатории биохимии иммунитета растений, Институт
биохимии и генетики - обособленное структурное
подразделение Федерального государственного бюджетного
научного учреждения Уфимского федерального
исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа.

Емельянов Владислав Владимирович

кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики и
биотехнологии, Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования «Санкт-
Петербургский государственный университет», г. Санкт-
Петербург

Ведущая организация:

Институт биологии - обособленного структурного
подразделения Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Федеральный исследовательский центр
«Коми научный центр Уральского отделения Российской
академии наук», г. Сыктывкар

Защита состоится «30» марта 2022 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.225.02 на базе ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» по адресу: г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке КазНЦ РАН и на официальном сайте КИББ ФИЦ КазНЦ РАН <http://www.kibb.knc.ru>.

Автореферат разослан « » февраля 2022 г.

Почтовый адрес: 420111, Казань, а/я 261, КИББ ФИЦ КазНЦ РАН учёному секретарю диссертационного совета (e-mail: dissovet@kibb.knc.ru)

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Пономарева Анастасия Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ. Мохообразные (бриофиты), включающие в себя мхи, печеночники и антоцеротовые, являются древнейшими наземными растениями - потомками ранних расходящихся линий эмбриофитов (Rensing et al., 2008). Таким образом, бриофиты занимают оптимальную филогенетическую позицию для изучения древних эволюционных изменений в растениях в период одного из самых важных событий в истории Земли - колонизации ее растениями (Ponce de León, Montesano, 2013, 2017). Известно, что мхи обладают высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям среды и зачастую используются исследователями в качестве модельных объектов для изучения реакций на действие стрессовых факторов (Turetsky et al., 2012). Одним из важнейших процессов при стрессе является изменение окислительно-восстановительного метаболизма. Эволюционное развитие аэробных метаболических процессов, таких как дыхание и фотосинтез, неизбежно привело к образованию активных форм кислорода (АФК) (Uarrota et al., 2016). АФК обладают высокой токсичностью, поскольку подвергают окислительным модификациям жизненно важные высокомолекулярные соединения, такие как белки, липиды, нуклеиновые кислоты, углеводы, что влияет на их физико-химические свойства и функциональную активность (Das, Roychoudhury, 2014). Время жизни АФК крайне невелико и составляет, в зависимости от типа АФК, от нескольких микросекунд до минут. Они быстро обезвреживаются с помощью различных клеточных ферментативных и неферментативных механизмов. Известно, что растения, которые могут выживать в стрессовых условиях, обладают эффективной антиоксидантной системой, защищающей их от токсичного действия АФК (Breusegem et al., 2001). Как и в клетках цветковых растений, антиоксидантная система бриофитов включает в себя антиоксидантные ферменты, такие как каталаза, пероксидаза (POD), аскорбатпероксидаза (APX), супероксиддисмутаза (SOD), а также низкомолекулярные антиоксиданты (Deu, De, 2012). Известно, что в цветковых растениях высокая активность пероксидаз может коррелировать с устойчивостью к действию неблагоприятных факторов. Вероятно, что пероксидазы несосудистых растений - бриофитов, как и пероксидазы сосудистых растений - ключевые ферменты, принимающие участие в стрессовых реакциях. Свойства пероксидаз сосудистых растений и их роль при биотическом и абиотическом стрессе широко изучены с помощью различных биохимических и молекулярно-биологических методов. Несмотря на очевидную важность, биохимические свойства пероксидаз и гены, их кодирующие, у мохообразных изучены крайне недостаточно.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы – исследовать биохимические и молекулярные характеристики пероксидаз мха дикранума метловидного (*Dicranum scoparium*).

Были поставлены **следующие задачи:**

1. Оценить интенсивность образования супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$), перекиси водорода (H_2O_2) и гидроксильного радикала ($\cdot OH$) в *D. scoparium* в норме и при стрессе. Оценить возможный вклад пероксидаз в детоксикацию и образование АФК в *D. scoparium*.
2. Определить изоферментный состав и активность при абиотическом стрессе, индуцированном обезвоживанием/регидратацией и действием положительных и отрицательных температур, пероксидаз III класса и аскорбатпероксидазы в *D. scoparium*.

3. Идентифицировать гены и провести биоинформатический анализ физико-химических свойств и структуры белков пероксидаз III класса и аскорбатпероксидазы мха *D. scoparium*.

4. Проанализировать уровень экспрессии генов, кодирующих пероксидазы III класса (*DsPOD*) и аскорбатпероксидазу (*DsAPX*), при обезвоживании/регидратации, действии CdCl_2 , параквата, положительных и отрицательных температур.

Научная новизна работы. Установлено, что все изоферменты пероксидазы класса III мха обладают как про-, так и антиоксидантной активностью. Впервые показано, что во мхе *D. scoparium* изоферменты пероксидаз принимают участие в образовании $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Впервые идентифицированы 22 гена пероксидаз класса III (*DsPOD*) дикранума с использованием базы данных архива чтений последовательностей. С помощью биоинформатического анализа первичной структуры белков пероксидаз *D. scoparium* охарактеризованы *in silico* их физико-химические свойства, выявлены консервативные мотивы и домены, сайты пост-трансляционных модификаций, субклеточная локализация белков. Проанализированы вторичная и третичная структуры пероксидаз класса III дикранума. На основании филогенетического анализа аминокислотных последовательностей показана эволюционная взаимосвязь между пероксидазами дикранума и других видов растений.

Впервые идентифицирован ген аскорбатпероксидазы (*DsAPX*) дикранума. В результате клонирования и секвенирования последовательностей гена *DsAPX* выявлена высокая степень гомологии с *APX Grimmia pilifera* и *Physcomitrella (Physcomitrium) patens*. Проведен биоинформатический анализ первичной, вторичной и третичной структуры белка *DsAPX*, а также сравнение со структурой *APX* других мхов. Экспериментальные данные об изменении профиля экспрессии генов *DsPOD* и *DsAPX* при воздействии на побеги мха CdCl_2 , параквата, неблагоприятных температур и обезвоживания/регидратации свидетельствуют о вовлечении этих антиоксидантных ферментов в ответы *D. scoparium* на действие абиотических стрессоров.

Научно-практическая значимость. Мох дикранум, обладающий высокой стрессовой устойчивостью, является удобной моделью для изучения роли пероксидаз в ответах высших растений на абиотические стрессовые воздействия. Совокупность биохимических и молекулярно-биологических методов и подходов, а также полученные результаты могут служить теоретической основой для фундаментальных исследований по выявлению механизмов устойчивости растений к различным стрессовым факторам, а также методологической основой для прикладных работ по экологическому мониторингу и мероприятиям по повышению устойчивости сельскохозяйственных растений. Данные, полученные в ходе работ, могут быть использованы в лекционных материалах при чтении курсов лекции по стрессологии, физиологии растений, биохимии и молекулярной биологии в ВУЗах.

Связь работы с научными программами и личное участие автора. Работа проводилась с 2016 по 2021 г.г. в соответствии с планом научных исследований КИББ ФИЦ КазНЦ РАН по теме: «Развитие геномных и постгеномных исследований для выяснения молекулярных механизмов функционирования живых систем и создания организмов с заданными свойствами (государственный регистрационный № АААА-А18-118022790082-2). Исследования по теме диссертации были поддержаны грантами РФФИ и Правительства Республики Татарстан в рамках научных проектов № 17-44-160142 «Стрессовая устойчивость»

мхов как критерий выживания в экстремальных условиях среды» и № 18-44-160031 «Листостебельные мхи – биоиндикаторы загрязнения тяжелыми металлами окружающей среды Республики Татарстан».

Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора и на данных, полученных при его непосредственном участии. Эксперименты по очистке белков и определению образования гидроксильного радикала проведены совместно с к.б.н. Викторовой Л.В. и к.б.н. Трифионовой Т.В. (обе КИББ ФИЦ КазНЦ РАН). Материалы, вошедшие в совместные публикации, обсуждались с соавторами и руководителем работы.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Во мхе *D. scoparium* абиотический стресс, индуцированный обезвоживанием и регидратацией побегов, вызывает повышение уровня АФК. Одним из основных источников образования $O_2^{\cdot-}$ в клеточной стенке побегов *D. scoparium* являются пероксидазы III класса.

2. Во мхе *D. scoparium* пероксидазы III класса и аскорбатпероксидаза являются стрессовыми маркерами, что подтверждается повышением активности ферментов и стимуляцией экспрессии кодирующих их генов при действии абиотических стрессоров, таких как обезвоживание/регидратация, неблагоприятные температуры, $CdCl_2$, паракават.

3. Стресс-индуцируемая активность и наличие консервативных элементов в структуре генов и белков пероксидаз *D. scoparium* свидетельствуют о сохранении этих последовательностей в геноме растений в ходе эволюции ввиду важности пероксидаз III класса и аскорбатпероксидаз в поддержании окислительно-восстановительного статуса растений.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены автором на 1 студенческой, 1 региональной, 11 Всероссийских и международных конференциях (список представлен в тезисах докладов на стр. 22-23), а также на итоговой конференции КФУ (2018) и итоговых конференциях КИББ ФИЦ КазНЦ РАН (2017, 2019, 2021).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из которых 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. В работе представлено 7 таблиц, 42 рисунок. Список литературы включает 417 источников, из которых 395 – иностранных.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Объекты исследования. Побеги мхов *Dicranum scoparium* Hedw., *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt., *Hylocomium splendens* (Hedw.) B.S.G. были собраны в Айшинском лесничестве в окрестностях г. Казани, Татарстан, Россия (55°53'21.3"N48°38'14.3"E). Изоферментный состав и активность редокс-ферментов анализировали во внутриклеточной растворимой фракции белков (С) и фракциях клеточной стенки (КС). Фракция С – супернатант, полученный после гомогенизации с трис-НСl буфером побегов. Белки клеточной стенки (КС) выделяли, используя, фосфатный буфер Соренсена, дигитонин и NaCl (Li et al., 2010). В результате получали фракции белков, связанных с КС: В₁ – водородными связями, В₂ – ван-дер-ваальсовыми силами и гидрофобными взаимодействиями, В₃ – ионными связями.

1.2. Стрессовые воздействия. Сухие побеги гидратировались в дистиллированной H₂O в течение 1 ч. Обезвоживание проводили в эксикаторе над раствором 35% CaCl₂ (0-168 ч, медленное обезвоживание) или силикагелем (0-72 ч, быстрое обезвоживание). Регидратацию побегов проводили в течение 0,5-2 ч. Относительное содержание воды (ОСВ) определяли по формуле: (масса мха после обезвоживания - сухая масса) / (масса мха после гидратации - сухая масса) x 100%. Воздействие CdCl₂ и параквата на мох осуществляли путем инкубации побегов в растворах 100 мкМ CdCl₂ или 100 мкМ параквата (1,1'-диметил-4,4'-дипиридила дихлорида) в течение 1 и 12 ч. При температурном воздействии образцы мха помещали в термостат (+30° или +50°C) или в морозильную камеру (-20°C) на 2, 12 и 24 ч.

1.3. Определение активности окислительно-восстановительных ферментов. Активность POD класса III и фенолоксидазы определяли с использованием *o*-дианизидина, субстратную специфичность POD с – АВТС, *p*-кумаровой и кофейной кислотами, активность APX определяли по окислению аскорбиновой кислоты в присутствии H₂O₂, активность каталазы определяли по разложению H₂O₂. Активность ферментов измеряли спектрофотометрически на UV-1900 («Shimadzu», Япония). Электрофорез проводили в 7 и 10 % полиакриламидном геле (ПААГ) в модифицированной системе (Laemmli, 1970) на Mini-PROTEAN Tetra Cell («Bio-Rad», США) в нативных и полу-нативных (с добавлением 1% SDS) условиях. Активность POD III класса в ПААГ визуализировалась с помощью *o*-дианизидина и H₂O₂, а активность APX раствором, содержащим аскорбат, ТЕМЕД, NBT, H₂O₂.

1.4. Анализ образования АФК. Интенсивность образования O₂^{•-} оценивали спектрофотометрически с использованием 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамидила (ХТТ, Sutherland, Learmonth, 1997, Chasov et al., 2015). Визуализация образования O₂^{•-} в геле проводилась с использованием NBT и NADH. Образование •ОН оценивали по скорости окисления дезоксирибозы в присутствии 2,6-диметокси-1,4-бензохинон (DMBQ), FeCl₃, щавелевой кислоты в фосфатном буфере, pH 5,0 (Gómez-Toribio et al., 2009). Уровень образования •ОН оценивали в эквивалентах малонового диальдегида (MDA) (Devasagayam et al., 2003). Измерение H₂O₂ проводили с использованием ксиленолового оранжевого (Mayaba et al., 2002). Содержание H₂O₂ рассчитывали по стандартной калибровочной кривой концентрации H₂O₂.

1.5. Очистка белка с помощью ионообменной хроматографии. Растворимые белки гомогената побегов *D. scoparium* осаждали с использованием (NH₄)₂SO₄ (30–80%). Белки были частично очищены с использованием колонки Hi-Trap Q FF (GE Healthcare, Sweden), уравновешенной 25 мМ Трис-НCl буфером, pH 7,5, на Chromatography System (АКТА™ Start). Белки элюировали NaCl с 0–1 М линейным градиентом концентрации.

1.6. Выделение РНК и синтез двухцепочечной кДНК. Для выделения тотальной РНК мха использовали GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, Lithuania). Одно- и двухцепочечная кДНК были синтезированы с использованием набора Evrogen Mint 2 для синтеза двухцепочечной кДНК, согласно протоколу производителя.

1.7. Идентификация генов *POD* и *APX* в *D. scoparium*. Метатранскриптомные данные *D. scoparium* были извлечены из базы данных архива чтения последовательностей с целью идентификации POD класса III. Для клонирования гена *APX* из *D. scoparium* использовалась кодирующая последовательность *GpAPX* из *Grimmia pilifera*. Клонирование *POD* в вектор pAL2-T и *APX* в pGEM-T Easy проводили согласно протоколам производителей (Евроген,

Россия и Promega, США, соответственно). Нуклеотидные последовательности определяли с помощью ДНК-анализатора ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США).

1.8. Анализ аминокислотных и нуклеотидных последовательностей. Физико-химические свойства белков анализировали с помощью ProtParam ExPASy (Gasteiger et al., 2005). Структуры доменов белков были предсказаны с помощью CDD (Marchler-Bauer et al., 2017), а TVtools использовался для перестройки карты домена (Chen et al., 2020). Вторичная и третичная структуры белков были предсказаны с помощью NPSA-PRABI (Geourjon, Deléage, 1995) и SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018), соответственно. Филогенетическое древо было построено и модифицировано в MEGA X (Kumar et al., 2018).

1.9. Анализ экспрессии генов. Тотальную РНК *D. scorarium* выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия). В качестве источника матриц для ПЦР-РВ использовали полученную комплементарную ДНК (кДНК).

1.10. Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов проводили с помощью Теста Тьюки в программе R. При анализе экспрессии генов все реакции проводили в трех биологических и шести аналитических повторах. Различия в экспрессии генов оценивали по нормализованной экспрессии ($\Delta\Delta Cq$) в Bio-Rad CFX MaestroTM.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Образование АФК в *D. scorarium*. Обнаружено, что побеги *D. scorarium* могут образовать внеклеточный $\cdot\text{OH}$ (рис. 1А, Б). Уровень $\cdot\text{OH}$ после гидратации сухого мха был почти в два раза выше (рис. 1Б), чем в предварительно гидратированных побегах за те же промежутки времени инкубации с акцептором (рис. 1А). Образование $\cdot\text{OH}$ может происходить как неферментативно в реакции Фентона, так и ферментативно с помощью редокс-ферментов (Gechev et al., 2006; Hasanuzzaman et al., 2020). В частности, реакция Фентона в среде, содержащей ионы железа, стимулируется H_2O_2 , образующейся в результате окислительного взрыва, происходящего

после обезвоживания и последующей гидратации. Так, нами показано, что в *D. scorarium* происходило значительное увеличение содержания H_2O_2 после гидратации в течение 1 ч сухих побегов мха, при этом дальнейшее обезвоживание приводило к постепенному снижению содержания H_2O_2 (рис. 2А). Регидратация мха после 72 ч обезвоживания также приводила к увеличению содержания H_2O_2 (примерно в 2 раза в

сравнении с контрольным вариантом (рис. 2А)). Анализ восстановления ХТТ показал, что *D. scorarium* может образовать $\text{O}_2^{\cdot-}$ в присутствии NADH (рис. 2Б). Добавление SOD почти на

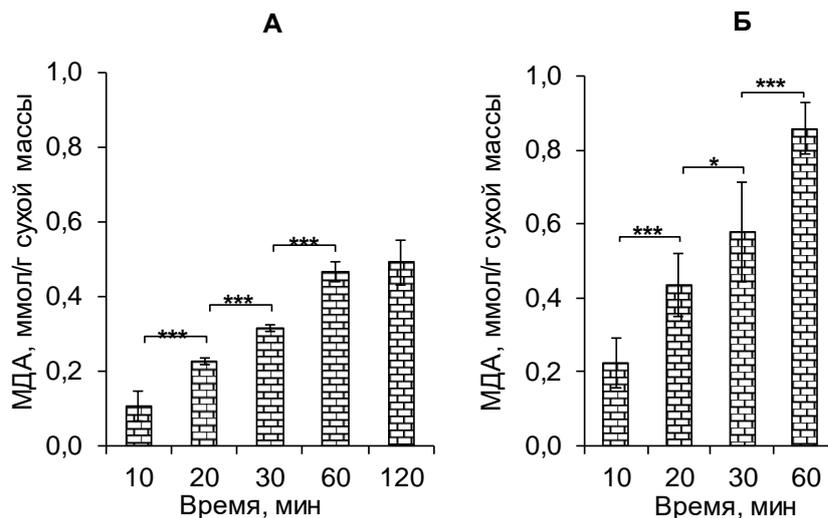


Рис. 1. А – образование $\cdot\text{OH}$ предварительно регидратированным побегом *D. scorarium*. Б – образование $\cdot\text{OH}$ при гидратации сухого мха. Здесь и далее разница достоверна при $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***)

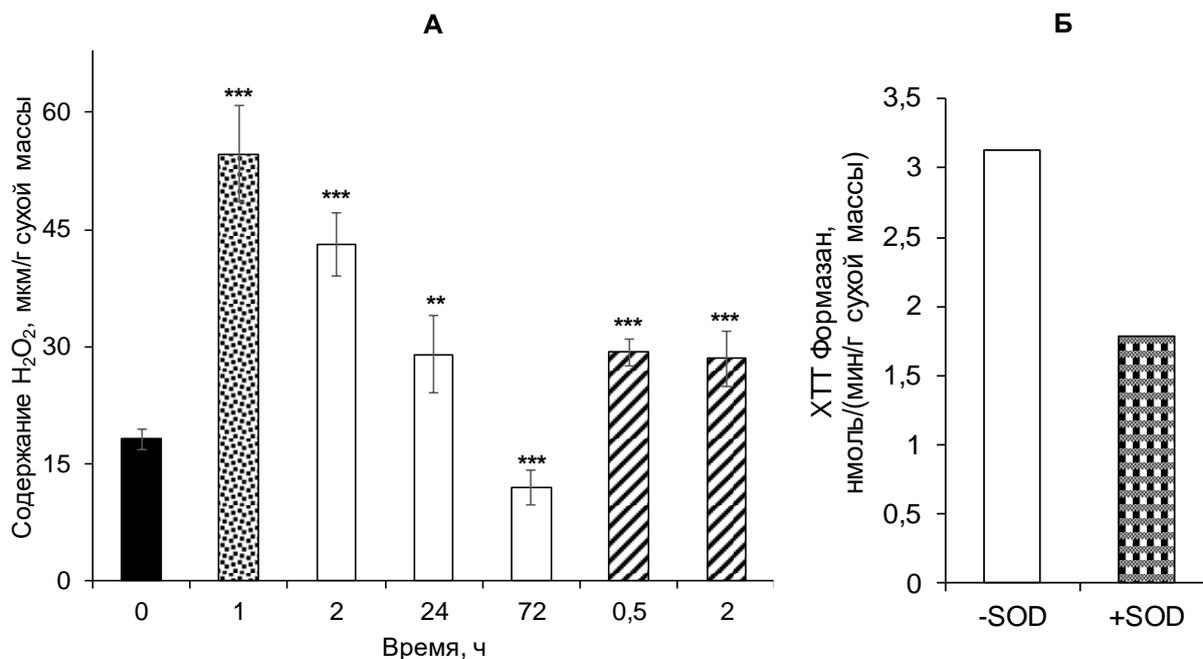


Рис. 2. **А** – Содержание H₂O₂ в *D. scoparium* при обезвоживании над силикагелем и после регидратации. Черный столбик – сухой мох (контроль), столбик с точками – 1 ч гидратации до обезвоживания, белые столбики – обезвоживание, заштрихованные столбики – регидратация. **Б** – Внутриклеточное образование O₂^{•-} во мхе *D. scoparium* в присутствии 0,1 мМ NADH в качестве восстановителя. Образование O₂^{•-} детектировалось с помощью ХТТ в присутствии или в отсутствие 250 ед/мл SOD в натрий-цитратном буфере, рН 7,8.

50% ингибировало степень восстановления, что указывает на то, что некоторое восстановление ХТТ происходило за счет других радикалов. Значительное ингибирование восстановления ХТТ с помощью SOD в ферментативной вытяжке мха подтверждает образование O₂^{•-} (рис. 2Б). Таким образом, при стрессе в клетках бриофитов так же, как и у сосудистых растений, может происходить повышение уровня АФК.

2.2. Активность редокс-ферментов *D. scoparium*. Одним из ключевых компонентов стрессовой устойчивости растений является способность поддерживать редокс-статус клетки и контролировать уровень АФК, в том числе с помощью антиоксидантных ферментов. Активность редокс-ферментов в клетках зависит от комплементарных и/или конкурентных взаимоотношений, в том числе и с другими редокс-ферментами. Конкурировать с POD за субстраты могут фенолоксидаза, реагирующая с фенольными соединениями, и каталаза, элиминирующая H₂O₂. Было показано, что активность POD в *D. scoparium* была на 2 порядка выше активности каталазы и на 3 порядка выше активности фенолоксидазы. Аналогично, высокая активность POD в сравнении с активностью других редокс-ферментов наблюдалась у бриофита антоцерос *A. natalensis* (Chasov et al., 2015). Вероятно, что высокая активность POD *D. scoparium* связана с большой функциональной ролью, которую она играет в данном мхе. Кинетический анализ выявил, что POD *D. scoparium* окисляет как природные, так и синтетические субстраты. Сродство POD к субстратам (K_m) увеличивалось в следующем порядке: *p*-кумаровая кислота < кофейная кислота < *o*-дианизидин < ABTS, тогда как максимальная скорость реакции повышалась в ряду: ABTS < *p*-кумаровая кислота < кофейная кислота < *o*-дианизидин. Сравнение активности POD в совместно произрастающих лесных мхах *H. splendens*, *D. scoparium*, *P. schreberi* показало, что у *D. scoparium* наблюдалась

наивысшая активность POD, которая оставалась высокой в течение длительного времени хранения мха. Во всех видах мхов обнаруживалось большое разнообразие изоформ POD.

2.3. Активность POD в цикле обезвоживания/регидратация *D. scoparium*.

Можно полагать, что класс III POD играют важную роль в формировании устойчивости к обезвоживанию мха *D. scoparium*. Было обнаружено, что активность POD повышалась как при медленном, так и при быстром обезвоживании *D. scoparium*, а также при последующей гидратации сухих побегов мха (рис. 3). Считается, что поддержание высокого уровня или увеличение активности POD при водном стрессе важно для предотвращения накопления АФК и окислительного повреждения (Wang et al., 2003). Обнаруженное нами повышение активности POD в ходе регидратации после длительного обезвоживания *D. scoparium* (рис. 3А, Б) согласуется с данными литературы об увеличении количества транскриптов POD, участвующих в защите от окислительного стресса при регидратации мха, устойчивого к обезвоживанию (Oliver et al., 2004). Таким образом, увеличение активности при медленном и быстрым обезвоживании и быстрое ее восстановление после

регидратации позволяют предположить, что POD играют важную роль в устойчивости к обезвоживанию мхов, возможно, за счет снижения стрессиндуцируемых АФК.

2.4. Локализация пероксидазы класса III во фракции мха *D. scoparium* и возможная роль POD в образовании $O_2^{\cdot-}$.

Известно, что пероксидазы бриофитов активируются при стрессовых воздействиях и высококомобильны (Lehtonen et al., 2009, Chasov et al., 2015). С целью выявления зависимости активности POD от прочности связей фермента со структурными

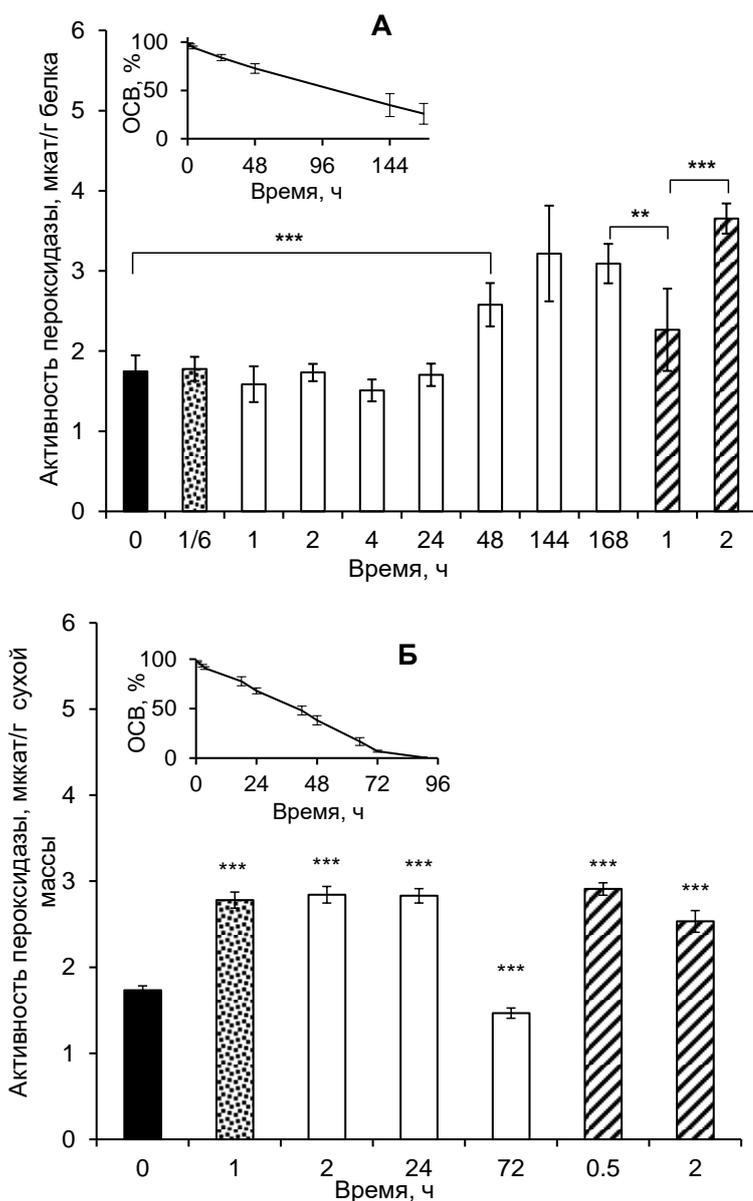


Рис. 3. А – POD активность в побегах мха *D. scoparium* при медленном обезвоживании над раствором 35% $CaCl_2$ и регидратации. Б – При быстром обезвоживании над силикагелем и регидратации. Черный столбик – сухой мох (контроль), столбик с точками – 1 ч гидратации до обезвоживания, белые столбики – обезвоживание, заштрихованные столбики – регидратация. Относительное содержание воды (OCB, врезка).

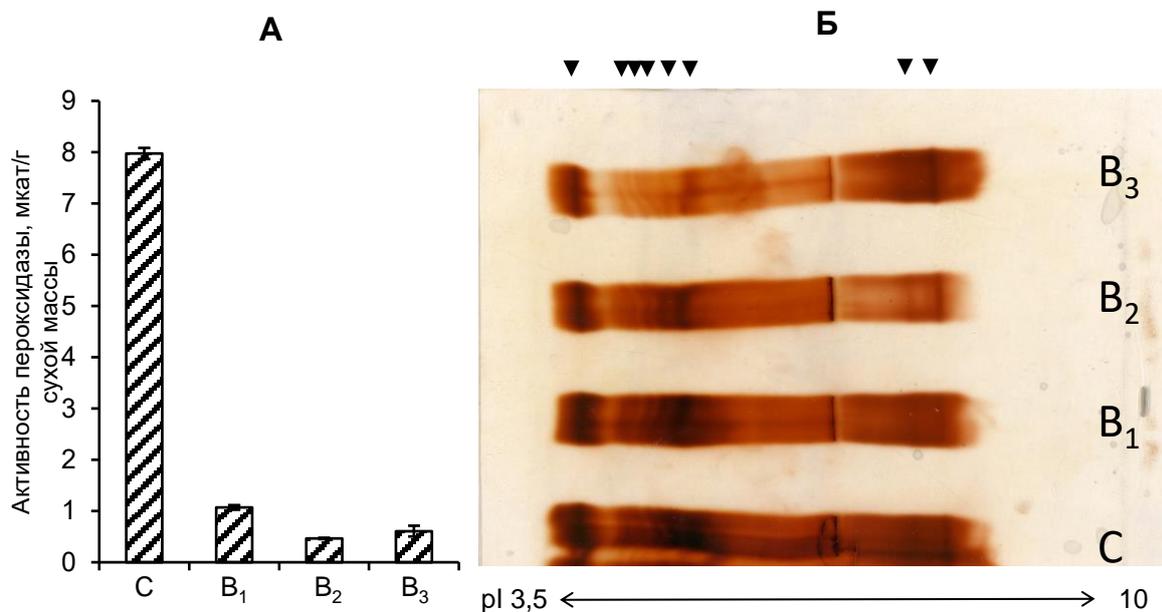


Рис. 4. А – Активность POD из фракций клеточной стенки С, В₁, В₂ и В₃ и их изоферментный состав. С – внутриклеточная фракция. Фракции белков, связанных с клеточной стенкой: В₁ – водородными связями, В₂ – вандерваальсовыми силами и гидрофобными взаимодействиями, В₃ – ионными связями. Б – ИЭФ изоформ POD из фракций С, В₁, В₂, В₃. Изоформы POD указаны стрелками. Визуализация *o*-дианизидином.

элементами клеточной стенки проводили фракционирование белков. Было показано, что несмотря на то, что активность POD во внутриклеточной фракции была выше, чем в других

фракциях, существенная часть активности POD была связана с клеточной стенкой различными связями. (рис. 4А). При разделении белков с помощью ИЭФ во всех фракций было обнаружено 8 мажорных изоформ с *pI* 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,8, 5,1, 9,5, 9,8 (рис. 4Б). POD *D. scorarium* представлены, в основном, анионными изоформами.

Известно, что POD высших сосудистых растений и POD бриофитов имеют сложный окислительно-восстановительный цикл и, в определенных условиях, могут переключаться на прооксидантный режим (Minibayeva et al., 2009; Chasov et al., 2015). Ранее нами было

показано, что ряд лишайников, мхов, а также печеночник и антоцерос обладают высокой редокс-активностью, в частности, при образовании $O_2^{\cdot-}$ (Minibayeva, Beckett, 2001). Было продемонстрировано, что POD класса III принимает участие в образовании $O_2^{\cdot-}$ в корнях *T.*

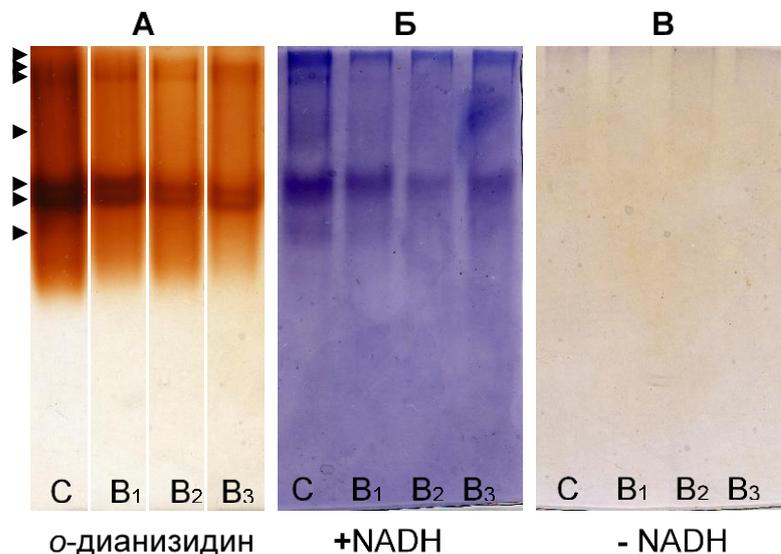


Рис. 5. Электрофоретическое разделение белков из фракций: С, В₁, В₂ и В₃ (7% ПААГ): А – изоформы POD мха *D. scorarium* отмечены треугольниками (гель был окрашен *o*-дианизидином), Б – образование NADH-зависимого $O_2^{\cdot-}$ (гель был окрашен NBT), В – гель, окрашенный NBT в отсутствие NADH (контроль).

aestivum (Minibayeva et al., 2009), в семенах *Castanea sativa* и *Trichilia* (Roach et al., 2010; Whitaker et al., 2010), в печеночнике (Li et al., 2010) и в антоцеросе (Chasov et al., 2015). С помощью окрашивания гелей NBT нами было подтверждено участие POD *D. scoparium* в генерации $O_2^{\cdot-}$ (рис. 5А, Б). Было показано, что все изоформы POD с 0,01, 0,05, 0,08, 0,31, 0,35 внутриклеточной фракции и во фракции белков, связанных с клеточной стенкой, могут образовать $O_2^{\cdot-}$ в присутствии NADH (рис. 5А, Б). Электрофоретический анализ различных

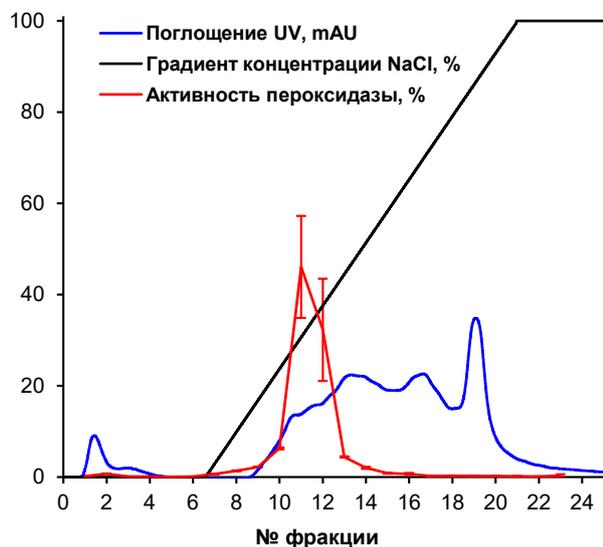


Рис. 6. Очистка POD дикранума с помощью анионообменной хроматографии (Hi-Trar Q FF 25 mM Трис-НСl буфер, рН 7,5). Белки элюировались градиентом NaCl (0-1 М).

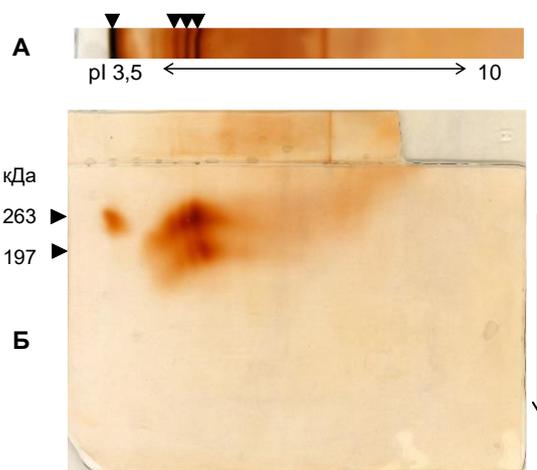


Рис. 7. А – ИЭФ белков после анионообменной хроматографии (фракции Σ 10-14) с последующим разделением в 10 % ПААГ (2D-электрофоретическое разделение белков) (Б).

клеточных фракций в 7% ПААГ показал, что визуализированные полосы изоформ POD из всех фракций: С, В₁, В₂ и В₃ (рис. 5А), соответствовали полосам, визуализирующим образование $O_2^{\cdot-}$ в присутствии NBT и NADH (рис. 5Б). Кроме того, две полосы с $O_2^{\cdot-}$ -образующей способностью с Rf 0,2 и 0,42 из фракции С, не соответствовали полосам с POD активностью (рис. 5Б). Таким образом, $O_2^{\cdot-}$ в данной фракции мог образовываться еще и другими ферментами. Окрашивание геля NBT в отсутствие NADH (рис. 5В) не выявило образования $O_2^{\cdot-}$.

2.5. Очистка POD *D. scoparium* с помощью анионообменной хроматографии. Белки POD мха *D. scoparium*, осажденные сульфатом аммония, подвергались разделению с помощью ионообменной хроматографии (рис. 6). Изоформы из фракций, соответствующих пику элюции POD

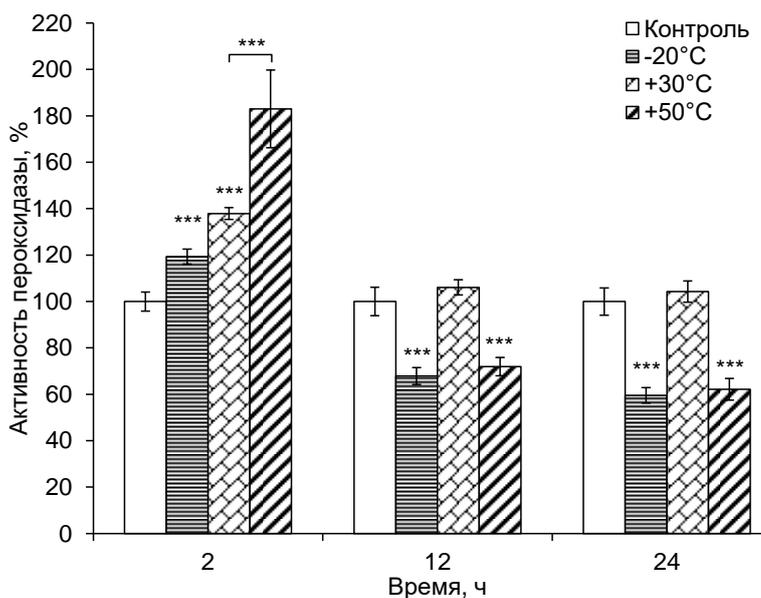


Рис. 8. POD активность *D. scoparium*, выдержанного при -20°C, +30°C, +50°C в течение 2, 12, 24 ч.

при ионообменной хроматографии, в дальнейшем разделяли с помощью 2D гель-электрофореза: ИЭФ (рис. 7А) с последующим разделением в ПААГ (рис. 7Б). Анализ с помощью 2D гель-электрофореза выявил наличие 7 мажорных анионных изоформ: каждой полосе с *pI* 4,6, 4,8, 5,1 (рис. 7А) соответствовало по два белка с молекулярными массами 197 и 263 кДа, а полосе с *pI* 4,0 – один белок с молекулярной массой 263 кДа (рис. 7Б). Эти белки, вероятно, являются олигомерами, исходя из типичной массы мономерной POD класса III около 40 кДа (Hirata et al., 2000).

2.6. Влияние температуры на активность класс III POD *D. scoparium*. Было обнаружено, что активность POD дикранума повышалась после 2 ч воздействия как низких, так и высоких температур (рис. 8). Наибольшая активность фермента наблюдалась при +50°C. При охлаждении до -20°C активность POD значительно снижалась через 12 ч и 24 ч воздействия. Обнаружено, что длительное воздействие на мхи температуры +30°C не привело к изменению активности POD. Активность POD значительно подавлялась при длительном воздействии (12 ч и 24 ч) высокой температуры +50°C (рис. 8). Интересно, что POD мха *D. scoparium* была устойчива и при низких, и при высоких температурах, поскольку она сохраняла свою активность почти на 70–75% при -20°C и +50°C в течение 12 и 24 ч воздействия (рис. 8).

2.7. Идентификация генов и характеристика белков POD III класса в *D. scoparium*. В отличие от сосудистых растений, кодирующие гены *POD* у мохообразных идентифицированы недостаточно полно даже в секвенированных геномах. На сегодняшний день геном мха

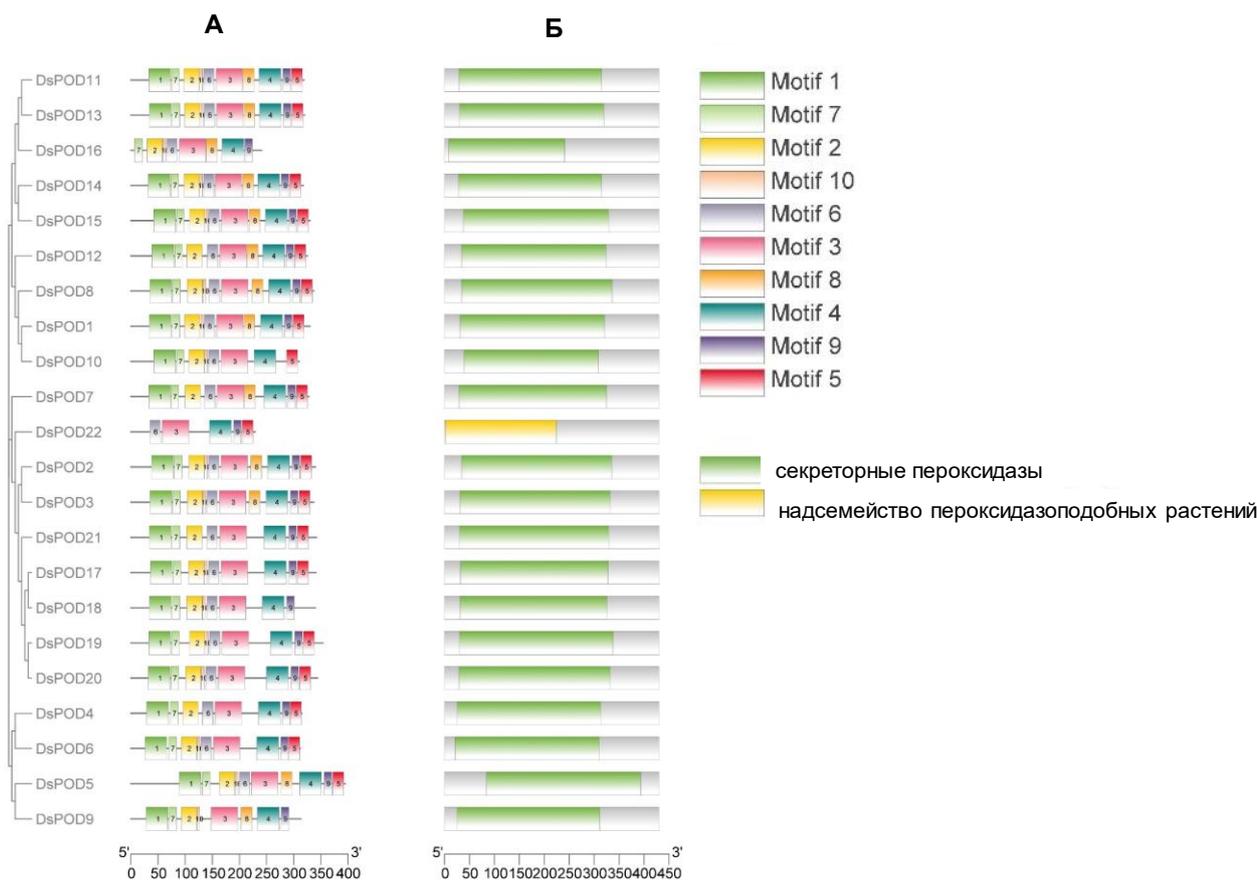


Рис. 9. Анализ консервативных мотивов и домена пероксидаз класс III. А – распределение 10 предполагаемых консервативных мотивов в белках DsPOD. Консервативные мотивы представлены прямоугольниками разного цвета, пронумерованными от 1 до 10. Б – присутствие домена пероксидазы в DsPOD. Зеленый прямоугольник обозначает секреторную пероксидазу, желтый прямоугольник – надсемейство растительной пероксидазы.

D. scoparium не секвенирован, и гены *POD* в базе данных отсутствуют. Мы идентифицировали 22 уникальных транскрипта *POD* дикранума из архива чтения последовательностей в NCBI (Chen et al., 2018, 2019). Для верификации идентифицированных *in silico* *POD*-транскриптов дикранума были клонированы и секвенированы две *POD* последовательности. Blast-сравнение выявило высокую гомологию секвенированных *POD* с *POD* других растений в базе данных NCBI (79–82%). Анализ консервативных мотивов и доменов показал, что все найденные аминокислотные последовательности, обозначенные соответствующим образом: DsPOD1–DsPOD22, содержат 10 различных консервативных мотивов длиной от 6 до 50 аминокислотных остатков и доменов *POD* (рис. 9 А, Б). Предсказание субклеточной локализации показало, что большинство белков DsPOD являются экстраклеточными пероксидазами. Для дальнейшего анализа белков *POD* дикранума нами было выбрано восемь белков DsPOD с самой высокой гомологией к *POD* III класса *P. nutans* и *P. patens*. Нами предсказано, что у DsPOD имеются такие сайты посттрансляционных модификаций, как фосфорилирование, N-гликозилирование, N-миристоилирование и S-пальмитоилирование. В результате компьютерного анализа вторичной и третичной структуры белков DsPOD обнаружено, что *POD* дикранума состоят, в основном, из α -спиралей и неструктурированных петель. Филогенетический анализ показал, что белки DsPOD сгруппированы в разных ветвях древа (рис. 10). Вероятно, разнообразие изоформ *POD* может быть результатом дупликаций в геноме далеких предков мхов (Ramsey, Schemske, 1998; Liu et al., 2011). Расположение различных изоферментов *POD* одного вида растения в разных группах и одновременное расположение в этих же группах изоферментов других видов растений других классов и даже отделов может свидетельствовать о том, что дивергентность изопероксидаз возникла до разделения растений на две эволюционные ветви: сосудистые и несосудистые высшие растения (рис. 10).

2.8. Экспрессия генов *DsPOD* при действии абиотических стрессоров: CdCl_2 , параквата, неблагоприятных температур и обезвоживания/регидратации. Повышение активности *POD* во мхе *D. scoparium* в условиях водного (рис. 3) и температурного (рис. 8) стрессов может быть обусловлено как регуляцией активности белков, так и регуляцией активности генов. Анализ экспрессии генов *DsPOD1–DsPOD8* показал, что четыре гена из восьми (*DsPOD1*, *DsPOD2*, *DsPOD6* и *DsPOD8*) активировались в различной степени при воздействии хлорида кадмия (CdCl_2), параквата, отрицательных и положительных температур, при обезвоживании/регидратации, что предполагает функциональное разнообразие этих генов. Установлено, что воздействие CdCl_2 в течение 1 ч значительно усилило экспрессию всех четырех генов *DsPOD1*, *DsPOD2*, *DsPOD6*, и *DsPOD8*, более длительное (12 ч) выдерживание в CdCl_2 приводило к снижению экспрессии этих генов до уровня контроля (*DsPOD6*), или ниже (*DsPOD1*, *DsPOD8*), за исключением *DsPOD2*, который остался активированным после 12 ч обработки хлоридом кадмия (рис. 11А). Действие прооксиданта параквата подавляло экспрессию генов в обоих исследуемых промежутках времени, за исключением *DsPOD2*, экспрессия которого усиливалась через 12 ч (рис. 11А). Показано, что воздействие низкой отрицательной температуры (-20°C) на побеги мхов значительно усилило экспрессию *DsPOD1*, *DsPOD2* и *DsPOD6* через 1 ч (рис. 11Б), а через 12 ч экспрессия *DsPOD2* снижалась, но у *DsPOD6* экспрессия оставалась повышенной. Наблюдалось также небольшое, но значимое увеличение экспрессии *DsPOD8* через 12 ч воздействия минусовых температур (рис. 11Б). Воздействие умеренных положительных температур $+30^\circ\text{C}$ на мхи либо не влияло, либо

снижало экспрессию всех генов POD, за исключением *DsPOD6*. Обнаружено, что

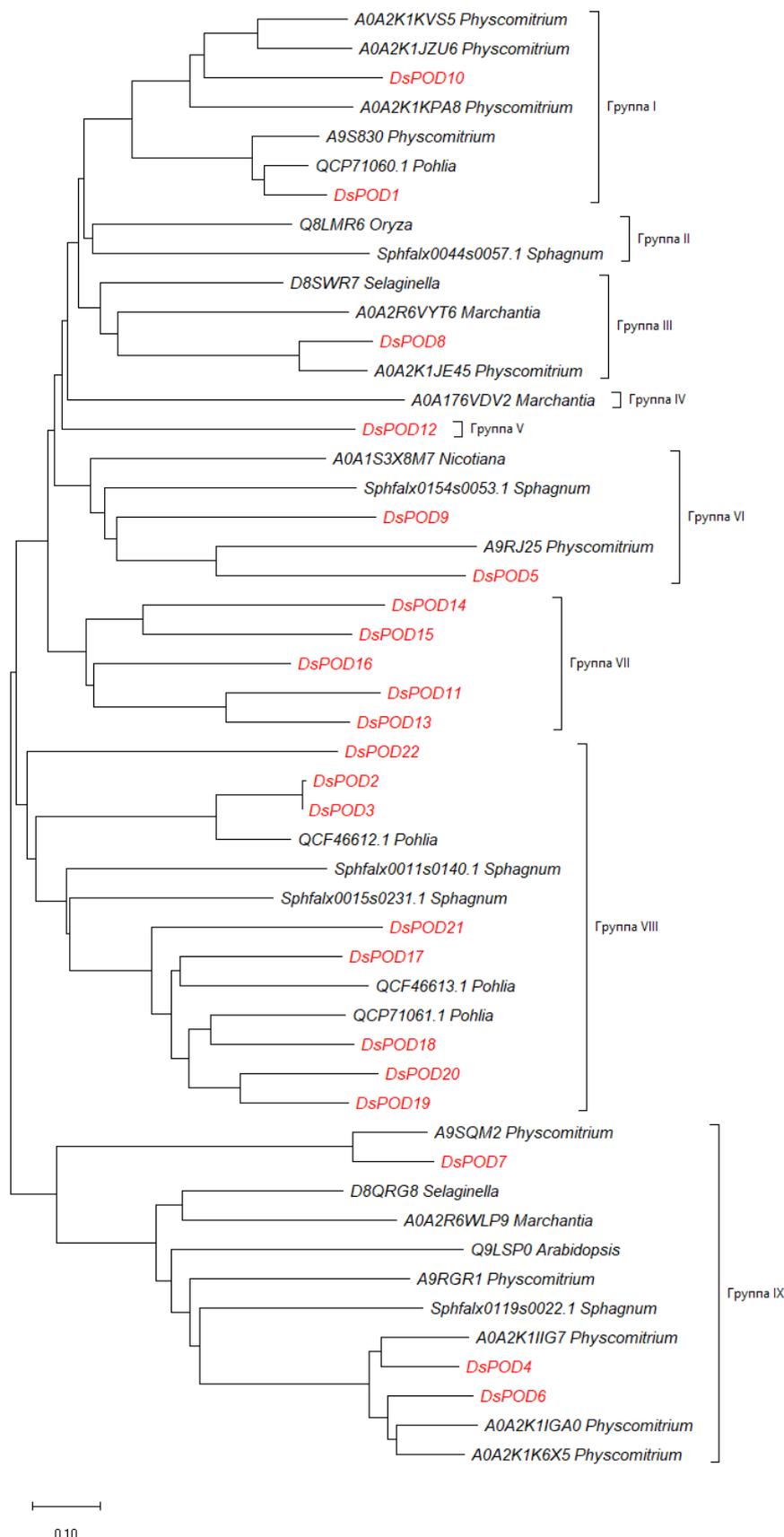


Рис. 10. Филогенетическое древо, показывающее взаимосвязь между аминокислотными последовательностями DsPOD и аминокислотными последовательностями POD III класса других видов растений. Масштабная линия представляет 10% расчетное расхождение последовательностей.

кратковременное и длительное воздействие температур в +30°C на мхи приводило к усилению экспрессии *DsPOD6* (рис. 11Б). При гидратации, обезвоживании и регидратации экспрессия генов *DsPOD* заметно варьировала (рис. 11В). Экспрессия *DsPOD1* снижалась в условиях водного стресса. Обнаружено, что ген *DsPOD2* активизировался при обезвоживании, причем максимальная экспрессия наблюдалась через 24 ч обезвоживания, а через 72 ч его экспрессия

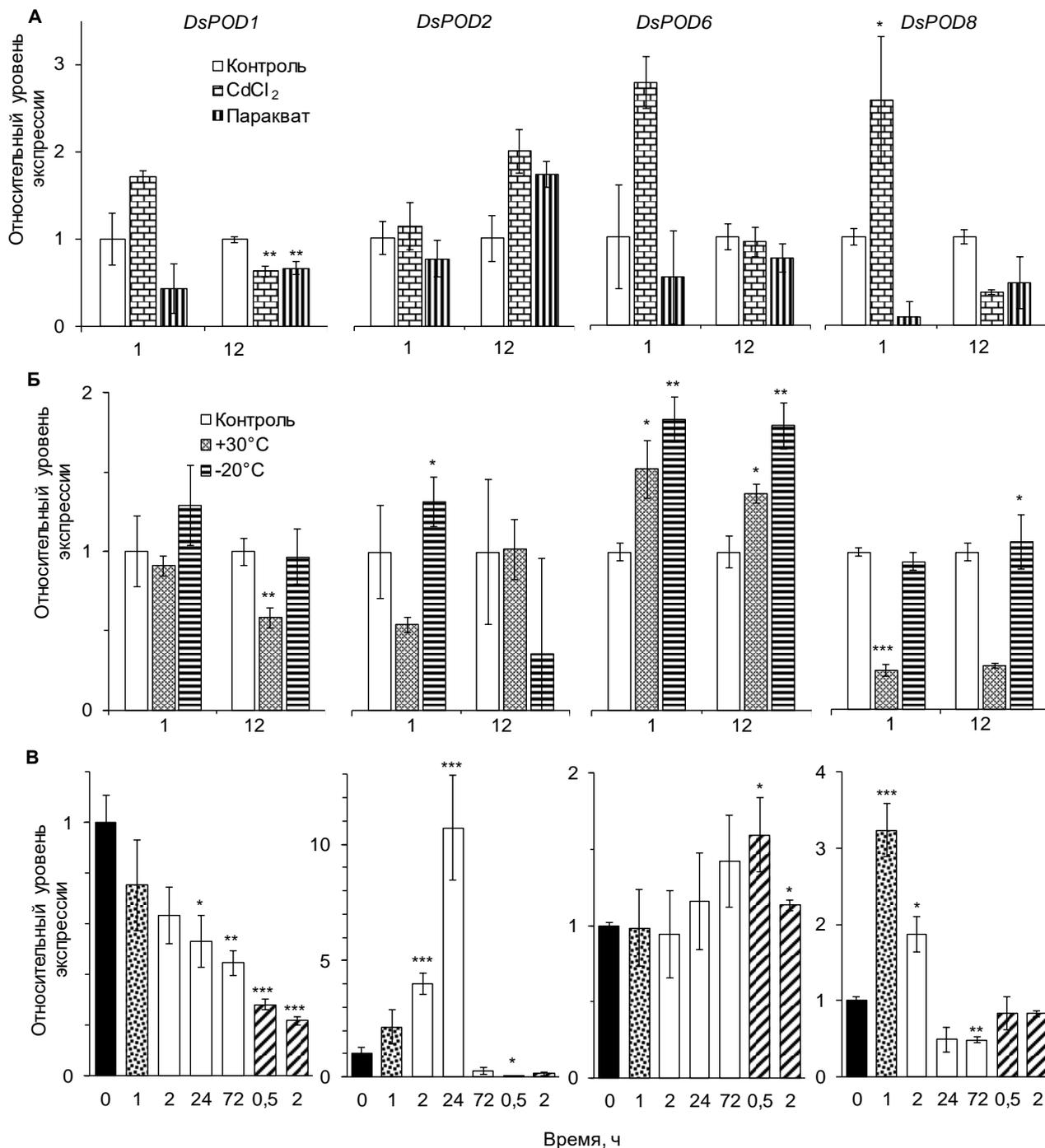


Рис. 11. Относительный уровень экспрессии генов *DsPOD* при выдерживании побегов *D. scoparium* в А – CdCl_2 (100 мкМ) и параквате (100 мкМ) в течение 2 и 12 ч. Белые столбики – контроль, столбики с прямоугольными коробками – мхи обработанные CdCl_2 , столбики с вертикальными линиями – мхи обработанные паракватом. Б – воздействие неблагоприятных температур (-20°C) и (+30°C) в течение 2 и 12 ч. Белые столбики – контроль (+25°C), столбики со звездочками – +30°C, столбики с горизонтальными линиями – (-20°C). В – обезвоживание/регидратация. Черные столбики – сухой мох (контроль), столбики с точками - 1 ч гидратации до обезвоживания, белые столбики – обезвоживание над силикагелем (1 г мха/10 г силикагель), заштрихованные столбики – регидратация.

снижалась и оставалась низкой при регидратации. Небольшое увеличение в экспрессии *DsPOD6* наблюдалось при обезвоживании и ранней (0,5 ч) регидратации, а затем экспрессия снижалась при дальнейшей регидратации (2 ч). После 1 ч гидратации экспрессия *DsPOD8* значительно усиливалась, оставалась повышенной в течение первого часа обезвоживания, затем снижалась через 24 и 72 ч обезвоживания, но поднималась до уровня контроля при последующей гидратации (рис. 11В). В целом, обнаружено, что изменения экспрессии были более значительными при обезвоживании, чем при регидратации после обезвоживания (рис. 11В). На основании результатов анализа экспрессии генов *DsPOD*, можно предположить, что *DsPOD1*, *DsPOD2* и *DsPOD8* вовлечены в ранние ответы на воздействие стрессоров, а *DsPOD6* участвует как в краткосрочных, так и долгосрочных ответах мха на воздействие всех агентов, индуцирующих окислительный стресс.

2.9. Аскорбатпероксидаза мха дикранум метловидный: влияние обезвоживания/регидратации. В клетках высших сосудистых растений одним из основных механизмов детоксикации H_2O_2 является ASC-GSH цикл, в котором ферменты APX играют ключевую роль, катализируя превращение H_2O_2 в H_2O с использованием аскорбата в качестве специфического донора электронов (Caverzan et al., 2012; Sofu et al., 2015). Было показано, что APX дикранума имеет более высокое сродство к аскорбату (K_m 9,5 мкМ), чем APX других фотосинтезирующих организмов. Например, K_m неочищенного экстракта из *Crocus sativus* составляет 150 мкМ (Ghamsari, Keyhani, 2004), тогда как K_m очищенных APX из различных

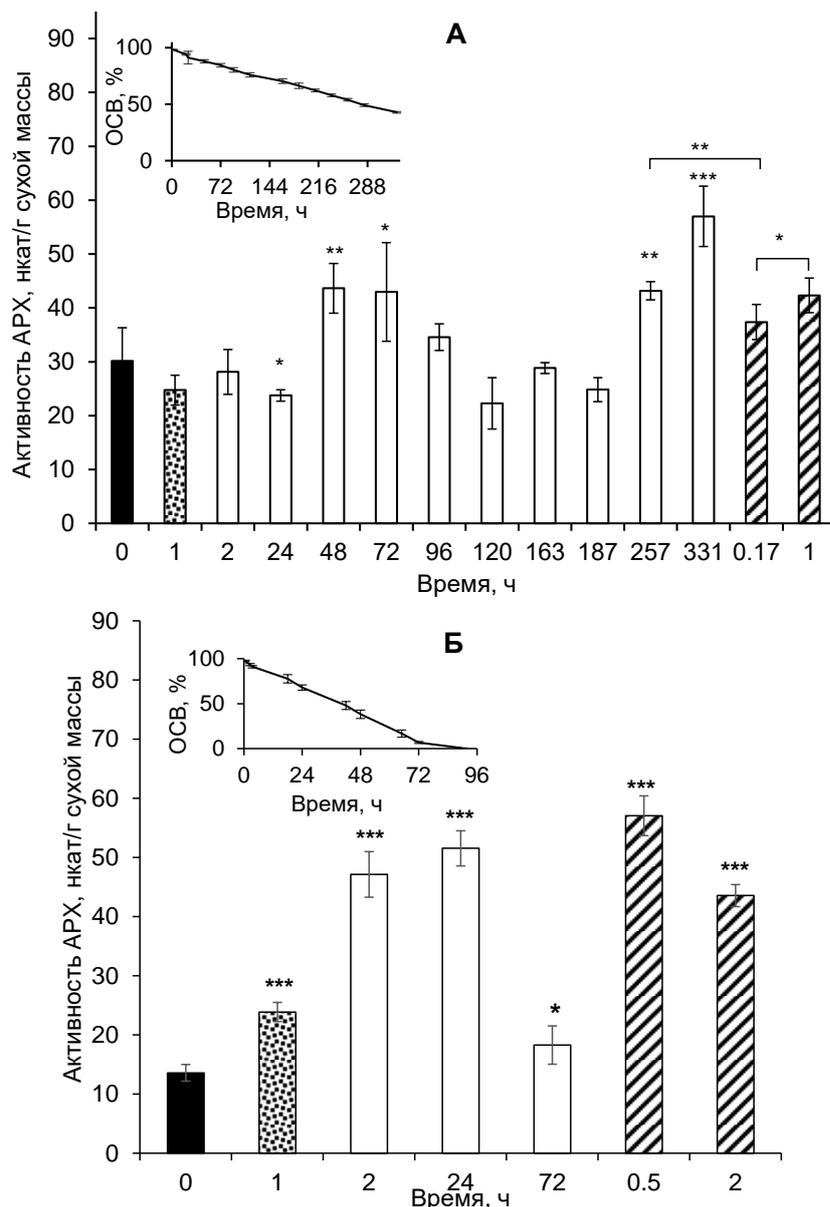


Рис. 12. Активность APX и в побегах мха *D. scoparium* при обезвоживании, А – над парами 35% $CaCl_2$, Б – над силикагелем и регидратации. Черный столбик – сухой мох (контроль), столбик с точками – 1 ч гидратации до обезвоживания, белые столбики – обезвоживание, заштрихованные столбики – регидратация. OCB (врезка).

видов растений составляет от 220–480 мкМ (Mittler, Zilinskas, 1991; Ishikawa et al., 1996; Takeda et al., 1998). Оптимальный pH для активности APX дикранума составляет 6-7, что типично для большинства APX сосудистых и несосудистых растений (Chen, Asada, 1989; Sajitha Rajan, Murgan, 2010). Обнаружено, что активность APX повышалась как при медленном, так и при быстром обезвоживании (рис. 12А, Б).

2.10. Влияние неблагоприятных температур на активность APX в *D. scoparium*. В сосудистых растениях показано,

что при температурном стрессе происходит повышенное образование АФК и стимуляция активности антиоксидантных ферментов (Chakraborty, Pradhan, 2011; Kaushal et al., 2016). Результаты наших исследований показали, что активность APX увеличивалась только после кратковременного воздействия температуры +30°C (рис. 13), в то время как более длительное воздействие (12 и 24 ч) как низких отрицательных, так и повышенных температур снижало активность APX (рис. 13). Первоначальное повышение

активности APX во мхе, выдержанного при +30°C, может быть обусловлено усилением активности фермента, нейтрализующего АФК, в то время как ингибирование после более длительных или более жестких температурных воздействий, вероятно, является отражением общего повреждения структуры белка, вызванного температурой.

2.11. Электрофоретическое разделение APX *D. scoparium*.

В результате проведения полу-нативного градиентного гелеэлектрофореза в *D. scoparium* были обнаружены две изоформы APX: мажорная с молекулярной массой 31 кДа и минорная с молекулярной массой 43 кДа (рис. 14). Возможно, что мажорная цитозольная изоформа APX является основной изоформой, а минорный изофермент может быть пластидным (Mittler, Zilinskas 1991; Madhusudhan et al., 2003).

3.3. Идентификация гена и характеристика белка APX *D. scoparium*.

Используя последовательность APX

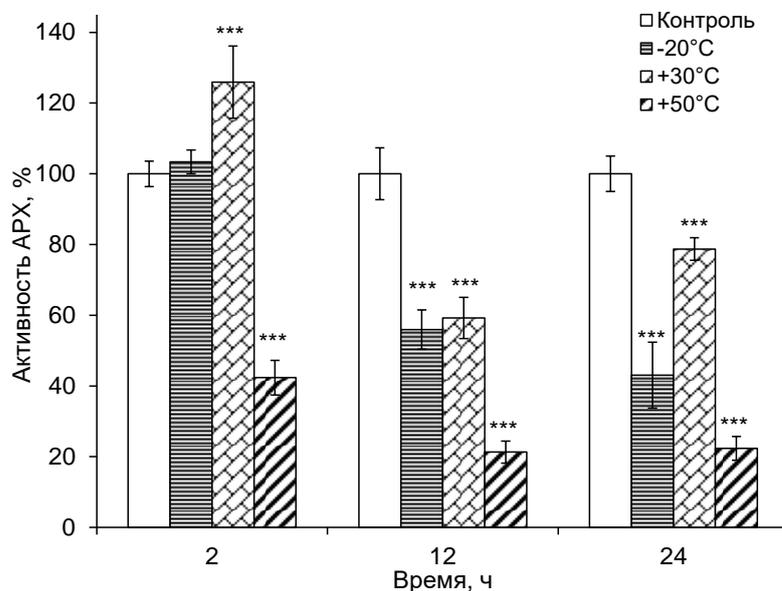


Рис. 13. Активность APX выдержанного при -20°C, +30°C и +50°C в течение 2, 12 и 24 ч. В качестве контроля использовали гидратированные побеги, которые хранили при комнатной температуре.

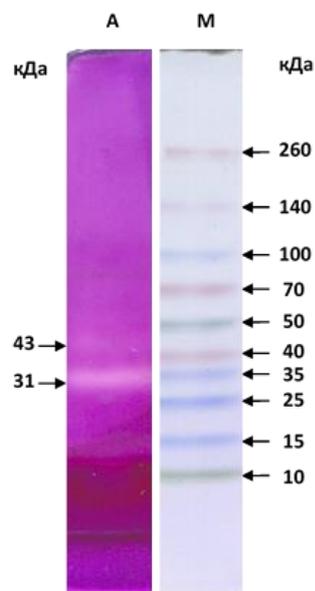


Рис. 14. Электрофоретическое разделение APX *D. scoparium*. А – полу-нативный градиентный (SDS) электрофорез (3% - 12%), гели окрашивали раствором 50 мМ Na-фосфатного буфера pH 7,8 с 28 мМ ТЕМЕД, 2,4 мМ NBT, М – маркеры.

из *G. pilifera* (*GpAPX*, Song et al., 2012), близкого родственника *D. scoparium*, мы идентифицировали и секвенировали кодирующую последовательность *APX* из мха дикранума, обозначив его как *DsAPX*. С помощью Blast в базе данных NCBI было обнаружено, что нуклеотидная последовательности *DsAPX* имеет высокую гомологию (90,79%) с нуклеотидной последовательности *GpAPX*. Идентичность нуклеотидных последовательностей *DsAPX* с другими растениями составляла 64,4–79,9%. В результате *in silico* анализа показано, что *DsAPX* кодирует цитозольную *APX*, содержит 256 аминокислот, имеет молекулярную массу – 28,35 кДа и *pI* – 5,71.

Анализ вторичной структуры белков *DsAPX* показал, что белок состоит, в основном, из α -спирали и неструктурированных петель и очень похож на другие *APX* мха из баз данных, что указывает на высокую консервативность этих белков. В *APX* полностью отсутствует β -поворот, что может негативно влиять на стабильность белка (Marcelino, Gierasch, 2010). Филогенетический анализ показал, что *DsAPX* сгруппирована вместе с *APX* из других видов мхов с одним общим предком, в отличие от *DsPOD* (рис. 10, 15). Оказалось, что *APX* из *M. polymorpha* находится в одной кладе с предком, от которого произошли *APX* сосудистых растений, и располагается между *APX* мхов и сосудистых растений (рис. 15). При этом, *M. polymorpha* занимает критическое положение в эволюционном развитии наземных растений от водорослей, возможно, сохраняя черты предков наземных растений (Bowman et al., 2017).

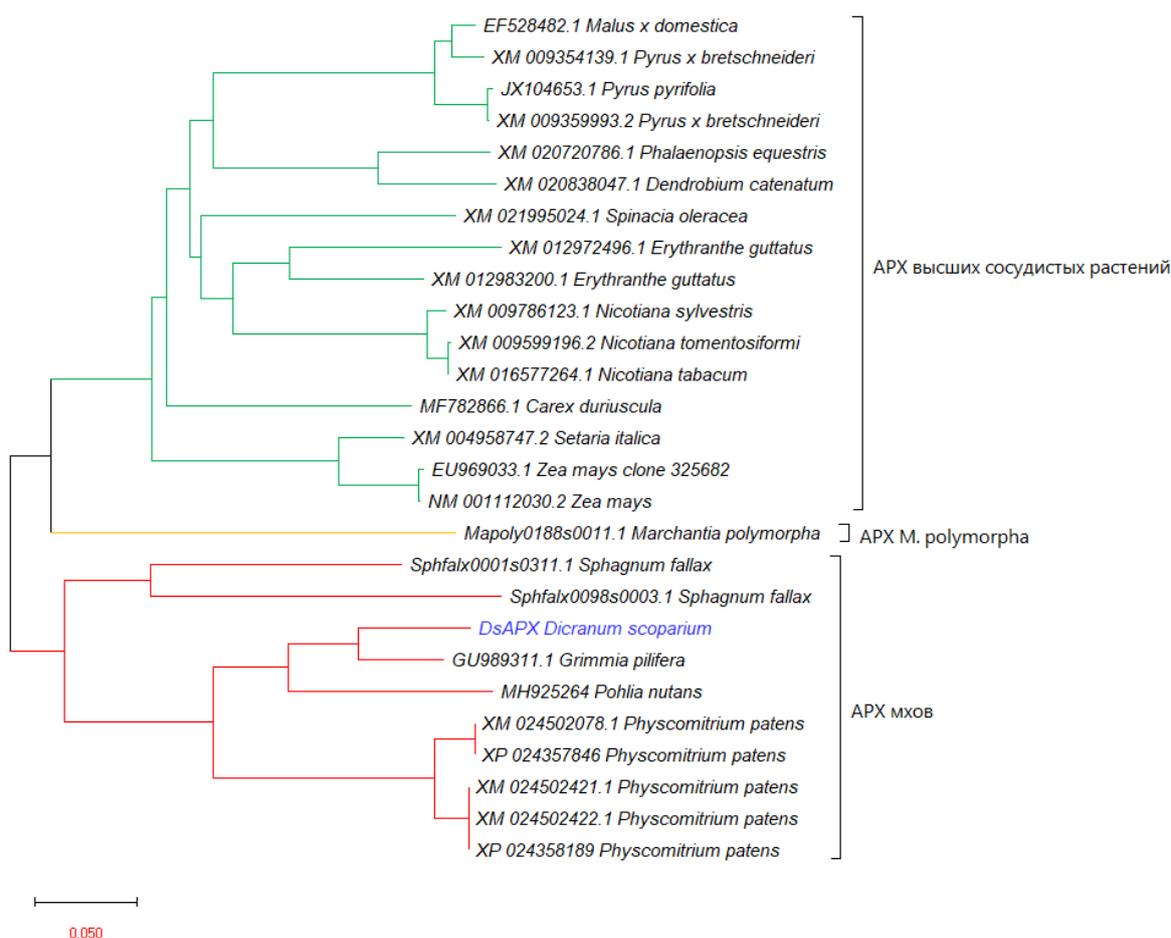


Рис. 15. Филогенетическое древо, показывающее взаимосвязь между аминокислотными последовательностями *DsAPX* и *APX* других растений. Масштабная линия представляет 5% расчетное расхождение последовательностей.

3.4. Экспрессия гена *DsAPX* при температурном воздействии, обезвоживании/регидратации, действии CdCl_2 и параквата. Для сосудистых растений показано, что экспрессия гена *APX* увеличивается при абиотическом и биотическом стрессе, кроме того, экспрессия зависит от стадий развития растения и условий стрессового воздействия (Mittler, Zilinska, 1992; Agrawal et al., 2003; Park et al., 2004; Pandey et al., 2017). Для выявления особенностей активности гена *DsAPX* нами был проведен анализ уровня экспрессии с помощью ПЦР-РВ при воздействии CdCl_2 , параквата, положительных и отрицательных температур и при обезвоживании/регидратации побегов *D. scoparium*. Было обнаружено, что экспрессия гена *DsAPX* не менялась после 1 ч воздействия CdCl_2 , но увеличивалась после 12 ч воздействия. Обработка побегов мха прооксидантом паракватом приводила к незначительному снижению уровня экспрессии после кратковременного (1 ч) воздействия, однако длительное (12 ч) воздействие паракватом повышало уровень экспрессии гена *DsAPX* почти в два раза (рис. 16А). При 1 ч действии положительных температур ($+30^\circ\text{C}$) наблюдалась тенденция к увеличению экспрессии *DsAPX*, которая сохранялась и при длительном воздействии (12 ч) (рис. 16Б). При низкотемпературном воздействии (-20°C) экспрессия *DsAPX* недостоверно снижалась к 12 ч воздействия (рис. 16Б). Можно предположить, что снижение экспрессии гена *DsAPX* при действии отрицательных температур, может приводить и к снижению активности *APX* (рис. 13), и соответственно к усилению образования АФК. Кроме того, было обнаружено, что экспрессия

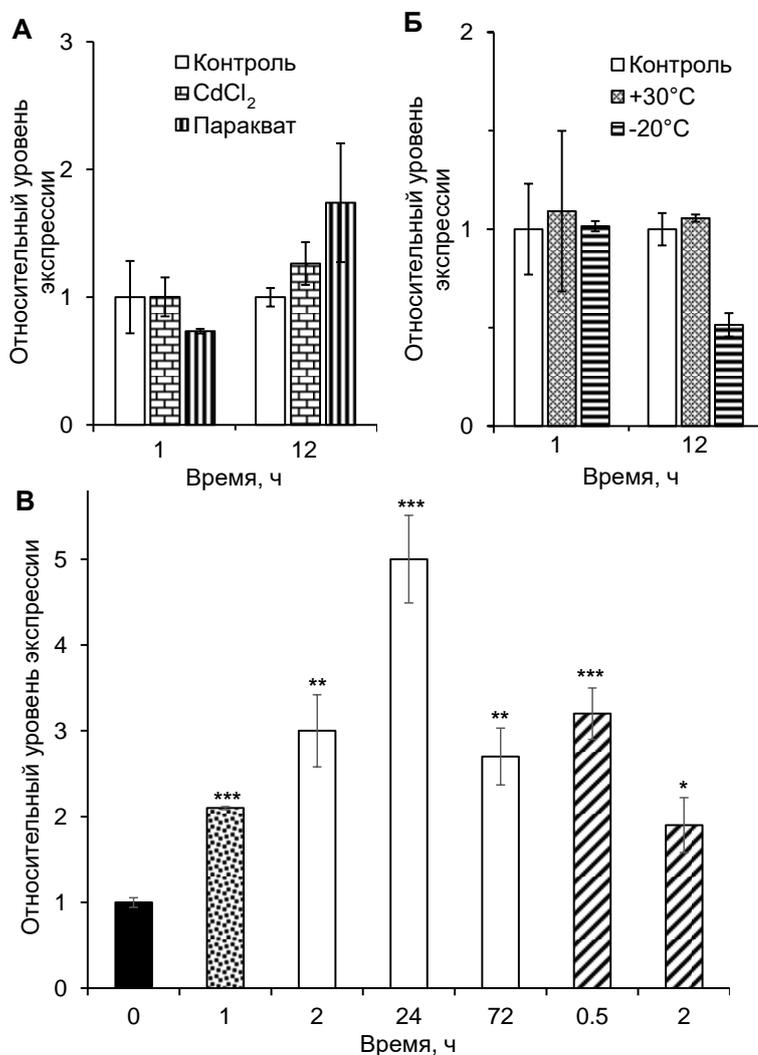


Рис. 16. Относительный уровень экспрессии генов *DsAPX* при выдерживании побегов *D. scoparium* в А – CdCl_2 (100 мкМ) и параквате (100 мкМ) в течение 2 и 12 ч. Белые столбики – контроль, столбики с прямоугольными коробками – мхи обработанные CdCl_2 , столбики с вертикальными линиями – мхи обработанные паракватом. Б – воздействие неблагоприятных температур (-20°C) и ($+30^\circ\text{C}$) в течение 2 и 12 ч. Белые столбики – контроль ($+25^\circ\text{C}$), столбики со звездочками – $+30^\circ\text{C}$, столбики с горизонтальными линиями – (-20°C). В – обезвоживание/регидратация. Черные столбики – сухой мох (контроль), столбики с точками – 1 ч гидратации до обезвоживания, белые столбики – обезвоживание над силикагелем (1 г мха/10 г силикагель), заштрихованные столбики – регидратация.

DsAPX увеличивается при прохождении побегов мха через цикл обезвоживание/регидратация мха *D. scoparium* (рис. 16B), что коррелировало с увеличением активности фермента при обезвоживании над силикагелем с коэффициентом 0,7 (рис. 12Б).

Аналогичные результаты были получены для мха *G. pilifera*, где обезвоживание активировало экспрессию *GpAPX* (Song et al., 2012). Корреляция между содержанием H_2O_2 (рис. 2А), активностью APX (рис. 12Б) и экспрессией гена *DsAPX* (рис. 16B) в наших экспериментах в цикле обезвоживание/регидратация у *D. scoparium* свидетельствует о вовлечении аскорбатпероксидазы в контроль уровня АФК, накапливаемых при стрессе соответственно. Возможно, что изменение активности фермента при быстром обезвоживании связано с синтезом фермента *de novo*, поскольку на протяжении всего эксперимента активность APX коррелировала с экспрессией *DsAPX* (рис. 12Б, 16B). Изменения уровня экспрессии *DsAPX* при обезвоживании и тепловом стрессе подтверждают нашу гипотезу о том, что APX участвует в защите мха *D. scoparium* от стресс-индуцируемого окислительного стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что пероксидазы высших несосудистых растений, таких как мхи, обладают функциями и свойствами, подобными таковым у пероксидаз высших сосудистых растений. Мох *D. scoparium* характеризуется наивысшей пероксидазной активностью среди совместно произрастающих лесных мхов. Можно полагать, что пероксидазы являются ключевыми факторами ответа *D. scoparium* на действие абиотических стрессоров. Наши данные демонстрируют, что высокая конститутивная активность пероксидазы может еще больше повышаться при абиотическом стрессе, в том числе, индуцированном обезвоживанием, регидратацией и неблагоприятными температурами. Обнаружено, что пероксидазы класса III в *D. scoparium* представлены множеством изоформ, проявляющих как анти-, так и прооксидантную активность. Прооксидантная активность некоторых пероксидаз класса III была ранее показана и для высших сосудистых растений (Bolwell et al., 2002; Minibayeva et al., 2009). Таким образом, образование АФК пероксидазами – эволюционно древний защитный механизм, способствующий повышению адаптации высших растений, их приспособлению к изменяющимся условиям внешней среды и, как следствие, успешной колонизации различных экологических ниш.

В настоящей работе с помощью биоинформатического анализа впервые идентифицированы 22 гена *DsPOD*, кодирующих пероксидазы III класса в *D. scoparium*. Показано, что два клонированных и секвенированных гена *DsPOD*, высокоомологичных по отношению к генам *P. patens*, характеризовались наибольшей стресс-индуцированной экспрессией. Биоинформатический анализ показал, что все белки DsPOD имеют классическую структуру пероксидазного домена. Увеличение активности фермента и повышение уровня экспрессии *DsPOD* в ответ на действие различных стрессоров предполагает, что пероксидазы III класса играют одну из ключевых ролей в формировании устойчивости мха *D. scoparium* к абиотическим стрессам. Нами впервые идентифицирована и секвенирована кодирующая последовательность цитозольной аскорбатпероксидазы *DsAPX* из мха *D. scoparium*, имеющая высокую гомологию с нуклеотидными последовательностями APX других растений. Изменение экспрессии гена *DsAPX* и уровня активности DsAPX, коррелирующее с

содержанием H_2O_2 при абиотических воздействиях, свидетельствует о вовлечении аскорбатпероксидазы в контроль уровня АФК, накапливаемых при стрессе. Стресс-индуцируемая активность ферментов и обнаруженные в результате *in silico* анализа консервативные элементы в структуре генов и белков пероксидаз I и III класса *D. scoparium*, а также филогенетический анализ свидетельствуют о сохранении этих последовательностей в геноме растений в ходе эволюции ввиду важности пероксидаз в поддержании окислительно-восстановительного статуса в клетках растений.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено образование гидроксильного радикала, супероксидного анион-радикала и перекиси водорода в побегах мха *Dicranum scoparium*. Впервые показано, что в *D. scoparium* в образовании супероксидного анион-радикала принимают участие изопероксидазы класса III. Установлено, что пероксидазы класса III мха проявляют как анти-, так и прооксидантные свойства.
2. Показано, что *D. scoparium* обладает наивысшей пероксидазной активностью среди совместно произрастающих лесных мхов. Обнаружено, что пероксидазы III класса и аскорбатпероксидазы вовлечены в стрессовые ответы *D. scoparium* после воздействия обезвоживания/регидратации и неблагоприятных температур, что предполагает важные роли пероксидаз в формировании устойчивости мха дикранума к абиотическому стрессу.
3. Впервые идентифицированы гены пероксидаз III класса *DsPOD* дикранума. С использованием биоинформатического анализа в *DsPOD* кодируемых белках обнаружено наличие консервативных доменов, характерных для типичных пероксидаз III класса.
4. Впервые в *D. scoparium* идентифицирован ген аскорбатпероксидазы *DsAPX*, имеющий высокую степень гомологии с *APX G. pilifera* и *P. patens*. С помощью *in silico* анализа показано, что белок аскорбатпероксидазы *D. scoparium* содержит несколько высококонсервативных сайтов, важных для ферментативной активности. На основании биоинформатического анализа *DsAPX* выявлено, что идентифицированный ген *APX* кодирует типичную цитоплазматическую аскорбатпероксидазу.
5. Изменение уровня экспрессии генов *DsPOD* и *DsAPX* при воздействии обезвоживания/регидратации, $CdCl_2$, параквата и неблагоприятных температур предполагает, что эти белки могут играть защитную роль для предотвращения окислительных повреждений в дикрануме при стрессе. Стресс-индуцируемая активность и наличие консервативных элементов в структуре генов и белков пероксидаз *D. scoparium* свидетельствуют о сохранении этих последовательностей в геноме растений в ходе эволюции ввиду важности пероксидаз в поддержании окислительно-восстановительного статуса в клетках растений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. **Onele, A.O.** Biochemical characterization of peroxidases from the moss *Dicranum scoparium* [Text] / A.O. Onele, A. Chasov, L. Viktorova, R.P. Beckett, T. Trifonova, F. Minibayeva // South African Journal of Botany. – 2018. – V. 119. – P. 132–141.
2. **Онеле, А.О.** Аскорбатпероксидаза мха *Dicranum scoparium*: идентификация гена, активность фермента [Текст] / А.О. Онеле, А.В. Часов, Т.В. Трифонова, Ф.В. Минибаева // Доклады академии наук. Биохимия, биофизика, молекулярная биология. – 2019. – Т. 489. – С. 92–96.
3. **Onele, A.O.** Characterization and expression analysis of ascorbate peroxidase from the moss *Dicranum scoparium* during abiotic stresses [Text] / A.O. Onele, A.V. Chasov, L.V. Viktorova, F.V. Minibayeva, R.P. Beckett // Bryologist. – 2021. – V. 124. – P. 68–84.

Работы, опубликованные в журналах РИНЦ и материалах научных мероприятий

1. **Часов, А.В.** Биохимические особенности пероксидаз *Dicranum scoparium* Hedw. [Текст] / А.В. Часов, А.О. Онеле, Л.В. Викторова, Ф.В. Минибаева // IV Российского симпозиума с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений», 20-23 сентября 2016 г., Казань: тезисы докладов. – Казань, 2016. – С. 159–160.
2. **Onele, A.O.** Peroxidase isoforms from *Dicranum scoparium* Hedw.: pro- and anioxidative activities [Text] / A.O. Onele, A.V. Chasov, L.V. Viktorova, F.V. Minibayeva // Мат-лы II Межд. симп. «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и Межд. науч. школы «Роль активных форм кислорода в жизни растений», 26 июня – 1 июля 2017 г., Уфа / ред. И.В. Максимов [и др.]. – Уфа: ООО «Первая типография», 2017. – С. 307-309.
3. **Onele, A.O.** Peroxidase-mediated formation of superoxide radical in *Dicranum scoparium* Hedw. [Electronic resource] / A.O. Onele, A.V. Chasov, L.V. Viktorova, F.V. Minibayeva // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты: Годичное собрание ОФР, науч. конф. и школа для мол. уч., 18–24 сент. 2017 г., Судак: сб. мат. докл. / Отв. ред. Вл.В. Кузнецов – М: Изд-во АНО «Центр содействия научной, образовательной и просветительской деятельности «Соцветие», 2017. – С. 257. – Режим доступа: http://ofr.su/assets/files/annual/crimea2017/OFR2017_sbornik_thesis.pdf – Дата доступа: 12. 02. 2018.
4. **Онеле А.О.** Пероксидазы *Dicranum scoparium* Hedw. [Текст] / А.О. Онеле, А.В. Часов, Ф.В. Минибаева, Л.В. Викторова // Симбиоз – 2017: X Всерос. конгр. мол. уч.-биол., 25–28 окт. 2017 г., Казань: сб. тез. / под общ. ред. Т.В. Балтиной, Г.Г. Яфаровой. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2017. – С. 291–292.
5. **Часов, А.В.** Вовлечение пероксидаз в стрессовые ответы бриофитов. [Текст] / А.В. Часов, А.О. Онеле, Т.В. Трифонова, Ф.В. Минибаева // Регуляция роста, развития и продуктивности растений. IX Международная научная конференция, 24-26 октября 2018 г., Минск: материалы докладов. – Минск, Колорград, 2018. – С. 138.
6. **Onele, A.O.** Molecular cloning and characterization of stress responsive genes in *Dicranum scoparium* Hedw. [Text] / A.O. Onele, A.V. Mazina, A.G. Renkova, A.V. Chasov, F.V. Minibayeva // III Международная школа-конференция студ., асп. и мол. уч. «Материалы и технологии XXI века», 29-31 октября 2018 г., Казань: сб. тезисов – Казань, 2018. – С. 67.

7. **Онеле, А.О.** Биоинформационный анализ стресс индуцируемых генов *Dicranum scoparium* Hedw., *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. и *Pylaisia polyantha* (Hedw.) Bruch et al. [Текст] / Онеле А.О., Часов А.В., Мазина А.Б., Ренкова А.Г., Минибаева Ф.В // Научно-техническая конференция по итогам совместного конкурса фундаментальных исследований РФФИ – РТ: сборник докладов. – Казань: Изд-во АН РТ, 2018. – С. 603–607.
8. **Onele, A.O.** Identification of ascorbate peroxidase gene in the moss *Dicranum scoparium* (Hedw) [Electronic resource] / A.O. Onele, A.V. Chasov, F.V. Minibayeva // Abstr. 14th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants July 10 - 12, 2019, Munich, Germany. – P. 123. – Режим доступа: https://pog2019.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/POG/PDF/POG2019_Abstract_Book.pdf – Дата доступа: 09.09.2019.
9. **Onele, A.** Биохимические и молекулярные характеристики аскорбатпероксидазы мха *Dicranum scoparium* [Электронный ресурс] / А. Onele, А. Часов, Ф. Минибаева // IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего», 18–24 сентября 2019 г., Казань: тезисы докладов. – Казань: Изд-во Казанского университета, 2019. – С. 325. – Режим доступа: <https://doi.org/10.26907/978-5-00130-204-9-2019> – Дата доступа: 29.11.2019.
10. **Часов, А.В.** Роль пероксидазы в стрессовом ответе бриофитов [Электронный ресурс] / А.В. Часов, А.О. Онеле, Т.В. Трифонова, Л.В. Викторова, Ф.В. Минибаева // IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего», 18–24 сентября 2019 г., Казань: тезисы докладов. – Казань: Изд-во Казанского университета, 2019. – С. 466. – Режим доступа: <https://doi.org/10.26907/978-5-00130-204-9-2019> – Дата доступа: 29.11.2019.
11. **Onele, A.O.** Troubleshooting of class III peroxidase gene from the moss *Dicranum scoparium* [Electronic resource] / A.O. Onele, A.V. Chasov, F.V. Minibayeva // Ecobiotech journal. – 2020. – Т. 3 – № 2. – P. 174–180. – Режим доступа: <http://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-2-174-180> – Дата доступа: 10.01.2022.
12. **Onele, A.O.** Class III peroxidase genes in the moss *Dicranum scoparium*: identification and expression analysis under abiotic stresses [Electronic resource] / A.O. Onele, A. B. Mazina, I. Y. Leksin, A.V. Chasov, F.V. Minibayeva // The 6th International Scientific Conference – Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2021): Abstracts / Eds. A.V. Kochetov, E.A. Salina. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2021. – P. 164. – Режим доступа: <https://doi.org/10.18699/PlantGen2021-000> – Дата доступа: 10.01.2022.
13. **Onele, A.O.** Class III peroxidase genes in the moss *Dicranum scoparium*: identification and expression analysis under abiotic stresses [Text] / A.O. Onele, A. B. Mazina, I. Y. Leksin, A.V. Chasov, F.V. Minibayeva // III Международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений». Школа молодых учёных «Роль активных форм кислорода в жизни растений», 22–28 августа 2021 г., Екатеринбург: материалы докладов / под ред. М.Г. Малевой. – Екатеринбург: ИЗДАТЕЛЬСТВО АМБ, 2021 – С. 58–59.
14. **Onele, A.O.** Expression analysis of class I and III peroxidase genes in the moss *Dicranum scoparium* under abiotic stresses [Text] / A.O. Onele, A. B. Mazina, I. Y. Leksin, A.V. Chasov, F.V. Minibayeva // V Российский симпозиум с международным участием. Клеточная сигнализация: итоги и перспективы, 14-17 сентября 2021 г. Казань: тезисы докладов / отв. ред. И.Ю. Карпилова. – Казань: Изд-во ФИЦ КазНЦ РАН, 2021. – С. 81–82.