

Предсказание функций некоторых пероксидаз *Arabidopsis thaliana* L. на основе биоинформатического поиска

А.С. Тугбаева , А.А. Ермошин, И.С. Киселева

Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

 e-mail: anastasia.tugbaeva@gmail.com

Пероксидазы класса III являются распространенными в разных группах организмов ферментами, участвуют в биосинтезе лигнина, защите растений от патогенов и абиотических стрессоров. Пероксидазы имеют множество изоформ, роль которых в клеточных процессах не всегда ясна. В работе проанализированы аминокислотные последовательности референсных пероксидаз с известными функциями и пероксидаз *Arabidopsis thaliana* L., функции которых неясны, выдвинуто предположение о роли последних в биосинтезе лигнина. Проведен биоинформатический анализ информации о структурно-функциональной организации пероксидаз из открытых интернет-источников. Было выбрано семь референсных пероксидаз из травянистых и древесных растений четырех видов (*Zinnia* sp., *Armoracia rusticana* P.G. Gaertn., *Lycopersicon esculentum* L. и *Populus alba* L.), для которых показано их участие в лигнификации клеточной стенки. С помощью сервиса BLAST были отобраны 24 аминокислотные последовательности гомологичных пероксидаз из *A. thaliana*. Для каждого фермента рассчитаны молекулярная масса и изоэлектрическая точка. Построены множественные выравнивания аминокислотных последовательностей и проведен филогенетический анализ. Для семи пероксидаз *A. thaliana* выявлены сайты связывания с субстратом (синаповый, *para*-кумаровый и конифероловый спирты), их принадлежность к группам S- или G-пероксидаз. Проанализированы аминокислотные замены в первичной структуре белка. Пероксидазы *A. thaliana* кластеризуются с референсными пероксидазами и образуют шесть групп на филогенетическом дереве, три из которых образованы исключительно пероксидазами *A. thaliana*. Пероксидазы, объединенные в общий кластер, характеризуются близким значением молекулярной массы и величиной изоэлектрической точки, имеют общую локализацию экспрессии и выполняют схожие функции. Таким образом, использование биоинформатических методов, анализ литературы и материалов в базах данных позволили предположить не известные ранее функции для некоторых пероксидаз *A. thaliana*, относящихся к классу III. Показано, что пероксидаза AtPrx39 обладает сродством к окислению синапового спирта; AtPrx54 – к окислению *para*-кумарового и кониферолового спиртов, и, предположительно, они могут участвовать в биосинтезе лигнина.

Ключевые слова: пероксидаза; лигнификация; *Arabidopsis thaliana* L.; биоинформатика; множественные выравнивания.

Для цитирования: Тугбаева А.С., Ермошин А.А., Киселева И.С. Предсказание функций некоторых пероксидаз *Arabidopsis thaliana* L. на основе биоинформатического поиска. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(5):615-623. DOI 10.18699/VJ19.533

Prediction of some peroxidase functions in *Arabidopsis thaliana* L. by bioinformatic search

A.S. Tugbaeva , A.A. Ermoshin, I.S. Kiseleva

Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia

 e-mail: anastasia.tugbaeva@gmail.com

Peroxidases of class III are common in various organisms. They are involved in lignin biosynthesis and plant protection against stressors. Peroxidases are presented in many isoforms, whose role is not always clear. The aim of this study is to analyze the amino acid sequences of reference peroxidases with known functions and peroxidases from *Arabidopsis thaliana* L. whose functions are unknown and to consider their putative roles in lignin biosynthesis. The structural and functional organization of peroxidases was analyzed by bioinformatic methods applied to open Internet sources. Seven reference peroxidases were chosen from four plant species: *Zinnia* sp., *Armoracia rusticana* P.G. Gaertn., *Lycopersicon esculentum* L. and *Populus alba* L. Twenty-four amino acid sequences of homologous peroxidases from *A. thaliana* were selected for the analyses with the BLAST service. Their molecular weights and isoelectric points were calculated. Multiple alignments of amino acid sequences and phylogenetic analysis were done. Sites of binding to monolignol substrates were identified in seven peroxidases from *A. thaliana*, and the enzymes were assigned to the groups of S- or G-peroxidases. Amino acid replacements in the primary structures of peroxidases were analyzed. Peroxidases from *A. thaliana* were clustered with reference peroxidases. They formed six clusters on the phylogenetic tree, three of which contained only *A. thaliana* peroxidases. Peroxidases within each cluster had similar molecular weights and isoelectric points, common localization of expression, and similar func-

tions. Thus, the use of bioinformatics, databases, and published data bring us to assumptions as to the functions of several *A. thaliana* class III peroxidases. AtPrx39 peroxidase was shown to be affine to sinapyl alcohol; AtPrx54, to *p*-coumaryl and coniferyl alcohols. They are likely to participate in lignin biosynthesis.

Key words: peroxidase; lignification; *Arabidopsis thaliana* L.; bioinformatics; multiple alignments.

For citation: Tugbaeva A.S., Ermoshin A.A., Kiseleva I.S. Prediction of some peroxidase functions in *Arabidopsis thaliana* L. by bioinformatic search. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(5):615-623. DOI 10.18699/VJ19.533 (in Russian)

Введение

Пероксидазы – ферменты, катализирующие окисление субстрата в присутствии перекиси водорода. Суперсемейство «растительных» пероксидаз (включает пероксидазы растений, грибов и бактерий) делится на три класса на основе их структурных и каталитических свойств. Представители всех трех классов содержат 10 гомологичных α -спиралей. Ферменты I и II классов имеют одну специфичную α -спираль, тогда как пероксидазы III класса – три специфичные α -спирали (Hiraga et al., 2001).

В живых организмах содержится большое количество изоформ пероксидаз, идентичность аминокислотных последовательностей которых составляет менее 20 %. Высоким уровнем гомологии характеризуются пять аминокислотных позиций, необходимых для фолдинга α -спиралей, сборки субъединиц и проявления каталитических свойств ферментов (Hiraga et al., 2001).

Высшие растения содержат пероксидазы I и III классов, которые отличаются по структуре, функциям и локализации в растительной клетке. Аскорбат-пероксидаза (КФ 1.11.1.11) и глутатион-пероксидаза (КФ 1.11.1.9) принадлежат к I классу и содержатся в хлоропластах, пероксисомах и цитоплазме. Пероксидазы I класса отличаются высокой специфичностью к окисляемому субстрату. Пероксидазы III класса окисляют различные субстраты. К III классу пероксидаз (КФ 1.11.1.7) относятся ферменты, которые локализируются в вакуолях, секретируются в апопласт. Растительные пероксидазы III класса кодируются большим семейством генов (73 идентифицированы в *Arabidopsis thaliana* L., 138 – в *Oryza sativa* L.) (Welinder et al., 2002; Passardi et al., 2004a). Пероксидазы III класса выступают в качестве компонентов антиоксидантной системы растений, при этом способны образовывать активные формы кислорода (Passardi et al., 2004a). Двойственная функция пероксидаз позволяет им принимать участие во многих физиологических процессах: защите от патогенов (Passardi et al., 2004b), заживлении раневых поверхностей, катаболизме ауксина и антоцианов, метаболизме порфирина (Cosio, Dunand, 2009; Jovanovic et al., 2018).

Апопластные пероксидазы участвуют в биосинтезе компонентов клеточной стенки – лигнина и суберина. Лигнин – ароматический гетерополимер фенольной природы с неупорядоченной структурой, ковалентно связанный с полисахаридами вторичной клеточной стенки и обеспечивающий ее прочность и гидрофобность. Состав лигнина и его содержание изменяются в ходе онтогенеза растений (Voerjan et al., 2003), а также в ответ на действие стрессовых факторов (Liu et al., 2018).

В образовании предшественников лигнина – радикалов *пара*-кумарового, кониферилового и синапового спиртов – участвуют пероксидазы и лакказы. Лакказы (КФ 1.10.3.2)

катализируют образование гваяколовых (G) единиц, тогда как пероксидазы участвуют в генерации синриголовых (S), *пара*-гидроксифениловых (H) и гваяколовых единиц лигнина (Berthet et al., 2012).

Несмотря на большое число работ по исследованию пероксидаз III класса, лишь для некоторых изоформ показано участие в биосинтезе лигнина на примере травянистых (*Zinnia* sp., *Armoracia rusticana* P.G. Gaertn., *Lycopersicon esculentum* L.) и древесных растений (*Populus alba* L.) (Quiroga et al., 2000; Aoyama et al., 2002; Sasaki et al., 2004; Sato et al., 2006; Marjamaa et al., 2009). Как правило, они способны окислять три монолигнола, однако в условиях *in vitro* большинство изоформ окисляет конифероловый и *пара*-кумаровый спирты и только некоторые используют синаповый спирт в качестве субстрата (Barcelo et al., 2007).

Хорошо изучены структуры пероксидаз ZePrx34, ZPO-C, CWPO-C, HRP, HRP-A2A, HRP-C1C и TPX1, которые можно считать референсными (Quiroga et al., 2000; Aoyama et al., 2002; Sasaki et al., 2004; Gabaldon et al., 2005; Sato et al., 2006). Интерес к пероксидазам обусловлен их ролью в формировании устойчивости растений к окислительному стрессу, вызванному как абиотическими, так и биотическими факторами, а также участия в процессах биосинтеза лигнина и роста растений. Биоинформатический анализ пероксидаз с неизвестными функциями имеет фундаментальное (установление функций ферментов) и прикладное (получение генетических конструкций для создания устойчивых растений или растений с модифицированной клеточной стенкой) значение. Цель настоящей работы – анализ функций пероксидаз *A. thaliana* на основе гомологии с аминокислотными последовательностями референсных пероксидаз растений, для которых известно участие в процессе лигнификации клеточной стенки.

Материалы и методы

Поиск аминокислотных последовательностей пероксидаз растений *Zinnia elegans* Jacq. (ZePrx34.70, идентификатор в NCBI – Q4W118.1), *Zinnia violacea* Cav. (ZPO-C, BAD93164.1), *P. alba* (CWPO-C, BAE16616.1), *A. rusticana* (HRP, CCJ34837.1; HRP-A2A, CCJ34825.1; HRP-C1C, P15233.1) и *L. esculentum* (TPX1, NP_001289850.1) осуществляли в базе данных Protein NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Сравнение с аминокислотными последовательностями белков *A. thaliana* проводили с помощью инструмента Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Параметры поиска: база данных – model organism (landmark), организм – *A. thaliana* (taxid:3702), алгоритм PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST). Была сформирована библиотека (Приложение 1)¹ из 24 аминокислот-

¹ Приложения 1–3 см. по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx11.pdf>

ных последовательностей пероксидаз *A. thaliana* с высоким уровнем гомологии с референсными пероксидазами (E-value меньше, чем $1e^{-80}$). С использованием on-line программы EMBoss Pepstats (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/) были вычислены молекулярная масса и изоэлектрическая точка белков.

Филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей строили по алгоритму присоединения соседа (Sanou, Nei, 1981) с использованием метода расчета *p*-дистанций (Nei, Kumar, 2000) в программе MEGA 7 с бутстреп-анализом 1000 повторов (Kumar et al., 2016).

Информацию о локализации экспрессии генов пероксидаз *A. thaliana* на разных стадиях развития получали из базы данных The Bio-Array Resource for Plant Functional Genomics (<http://bar.utoronto.ca>). Функции пероксидаз анализировали на основе информации, размещенной в базе данных Arabidopsis Information Resource (www.arabidopsis.org), по идентификатору гена в TAIR. Обсуждали информацию из раздела Annotations, GO Biological Process об участии пероксидаз в стрессовых реакциях, росте и лигнификации клеточной стенки. Выравнивания аминокислотных последовательностей строили с использованием алгоритма CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE 3.8 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>). Были определены высоко- и полуконсервативные участки, структурные мотивы.

Результаты

В процессе биоинформатического поиска с использованием программы Protein BLAST было выявлено, что пероксидазы растений *Z. elegans* (ZePrx34.70, ZPO-C), *P. alba* (CWPO-C), *A. rusticana* (HRP, HRP-A2A, HRP-C1C) и *L. esculentum* L. (TPX1) имеют высокий уровень гомологии с 24 пероксидазами *A. thaliana*. Для этих ферментов были вычислены молекулярные массы и значения изоэлектрических точек (табл. 1).

У *A. thaliana* при сравнении с референсными белками были обнаружены пероксидазы, отличающиеся по величине изоэлектрической точки (pI) и молекулярной массе. Так, значение pI пероксидазы AtPrx36 лежит в кислом диапазоне pH по сравнению с ZePrx34.70, белок имеет большую молекулярную массу (38.24 против 34.24 кДа соответственно). Пероксидаза AtPrx13 характеризуется кислым значением pI (4.74), тогда как у HRP эта величина составляет 8.35. Значения pI пероксидаз AtPrx32, 37 и 23 находятся в диапазоне величин pH 6.62–7.97, молекулярная масса варьирует от 38.10 до 38.85 кДа, тогда как pI и молекулярная масса белка HRP_A2A составляет 4.62 и 35.03 кДа соответственно.

Вероятно, пероксидазы *A. thaliana*, отличающиеся от референсных ферментов по величине pI и молекулярной массе, должны различаться по сродству к субстрату и выполняемым в растениях функциям. Известно, что основные пероксидазы (изоэлектрическая точка > 7.0) способны окислять *para*-кумаровый, конифероловый и синаповый спирты (Kukavica et al., 2012), тогда как кислые пероксидазы (изоэлектрическая точка < 7.0) имеют низкое сродство к окислению синапового спирта (Barcelo et al., 2004). Поэтому роль основных и кислых пероксидаз в лигнификации клеточной стенки может быть не-

одинаковой. В настоящее время описаны растительные пероксидазы, имеющие высокое сродство к окислению кониферолового спирта (CWPO-A, HRP-C1C и AtPrx53) либо синапового спирта (CWPO-C из *P. alba*, ZePrx из *Z. elegans*, AtPrx4).

Филогенетическое дерево, построенное на основании выравнивания аминокислотных последовательностей, показано на рисунке. Референсные пероксидазы и ферменты *A. thaliana* образуют шесть кластеров. Первый представлен пероксидазами HRP-C1C, AtPrx33, 34 и 32 с высоким значением бутстреп-поддержки: 72–100 %. Во второй кластер объединяются пероксидазы, гомологичные HRP_A2A: AtPrx2 и 54 (бутстреп-поддержка 100 %). Пероксидазы AtPrx52 и 4, гомологичные ZePrx34.70, формируют третий кластер с бутстреп-поддержкой 98–99 %. Пероксидазы AtPrx47, 64 и 66 образуют четвертый кластер вместе с пероксидазой ZPO-C (бутстреп-поддержка 92–100 %). Пятый кластер на филогенетическом дереве объединяет пероксидазы TPX1 и AtPrx3 и 39 с бутстреп-поддержкой 100 %. Шестой кластер состоит из пероксидаз HRP, CWPO-C, AtPrx71, 62 и 69 со значением бутстреп-поддержки 72–100 %.

Отдельные кластеры на филогенетическом дереве образуют пероксидазы *A. thaliana*: AtPrx38 и AtPrx37 (кластер А), AtPrx22 и AtPrx23 (кластер В), AtPrx36 и AtPrx72 (кластер С) с бутстреп-поддержкой 100 %.

С использованием материалов базы данных BAR и TAIR были проанализированы функции и локализация экспрессии пероксидаз, объединенных в кластеры 1–6 на филогенетическом дереве (табл. 2). В табл. 2 не включены кластеры А, В и С, образованные гомологичными белками *A. thaliana*.

Среди анализируемых пероксидаз *A. thaliana* есть белки, функции которых изучены в мутантах с нокаутированными генами и трансгенных растениях. Согласно экспериментальным исследованиям, пероксидаза HRP-C1C из *A. rusticana* наиболее эффективно окисляет конифероловый спирт в условиях *in vitro* (Sasaki et al., 2004). Гомологичные HRP-C1C пероксидазы AtPrx33 и AtPrx34 вовлечены в процессы роста корней и элонгации клеток (Irshad et al., 2008) и развитие окислительного взрыва при проникновении патогенов в клетку (Bindschedler et al., 2006). Пероксидаза AtPrx32 участвует в элонгации клеток (Irshad et al., 2008). Таким образом, для пероксидаз кластера 1 нет данных об их участии в лигнификации клеточных стенок.

Очищенная пероксидаза HRP_A2A из *A. rusticana* имеет высокое сродство к окислению гваякола *in vitro* (Krainer et al., 2014). По материалам базы данных BAR, гены AtPRX2 и AtPRX54 экспрессируются в корнях и гипокотиле проростка и корнях ювенильного растения (см. табл. 2). Мутанты *A. thaliana atprx2* характеризуются снижением общего содержания лигнина и изменением его состава, уменьшением массы растения (Shigeto et al., 2013).

Изоформа пероксидазы ZePrx34.70 из *Z. elegans* катализирует окисление синапового спирта, экспрессируется в корнях и гипокотиле, предположительно, участвует в лигнификации (Gabaldon et al., 2005). Среди анализируемых пероксидаз гомологом ZePrx34.70 в *A. thaliana* являются AtPrx4 и AtPrx52, что согласуется с ранее опубли-

Таблица 1. Аннотация пероксидаз III класса *A. thaliana* с высоким уровнем гомологии (параметры Score и E-value) к референсным пероксидазам. Указаны идентификаторы из баз данных TAIR и NCBI, изоэлектрическая точка и молекулярная масса

Референсная пероксидаза, вид растения, ID белка, изоэлектрическая точка, молекулярная масса, кДа	Пероксидаза <i>A. thaliana</i> , ID белка, изоэлектрическая точка, молекулярная масса, кДа	Идентификатор гена в TAIR	Score	E-value
ZePrx34.70, <i>Zinnia elegans</i> Q4W118.1 8.22 34.24	AtPrx4 NP_172906.1 7.74 34.41	AT1G14540	342	1e ⁻¹¹⁷
	AtPrx52 NP_196153.1 8.30 34.21	AT5G05340	327	3e ⁻¹¹¹
	AtPrx36 NP_190668.2 4.66 38.24	AT3G50990	262	1e ⁻⁸⁵
ZPO-C, <i>Zinnia violacea</i> BAD93164.1 8.64 34.79	AtPrx66 NP_200002.3 9.76 35.56	AT5G51890	452	5e ⁻¹⁶¹
	AtPrx64 NP_199033.1 9.04 34.71	AT5G42180	328	5e ⁻¹¹²
	AtPrx47 NP_001320124.1 8.29 35.97	AT4G33420	283	2e ⁻⁹⁴
CWPO-C, <i>Populus alba</i> BAE16616.1 8.30 34.63	AtPrx71 NP_201217.1 8.18 34.89	AT5G64120	425	8e ⁻¹⁵⁰
	AtPrx25 NP_181679.4 7.53 35.89	AT2G41480	417	6e ⁻¹⁴⁷
TPX1, <i>Lycopersicon esculentum</i> NP_001289850.1 7.51 35.99	AtPrx3 NP_172018.1 8.41 34.91	At1G05260	449	2e ⁻¹⁵⁹
	AtPrx39 NP_192868.1 6.92 35.60	AT4G11290	430	9e ⁻¹⁵²
	AtPrx72 NP_201440.1 8.47 37.43	AT5G66390	261	3e ⁻⁸⁵
HRP, <i>Armoracia rusticana</i> CCJ34837.1 8.35 34.79	AtPrx62 NP_198774.1 8.42 34.13	AT5G39580	459	2e ⁻¹⁶³
	AtPrx69 NP_201215.1 9.71 35.68	AT5G64100	326	8e ⁻¹¹¹
	AtPrx13 NP_177835.3 4.74 34.76	AT1G77100	278	3e ⁻⁹²

Окончание табл. 1

Референсная пероксидаза, вид растения, ID белка, изоэлектрическая точка, молекулярная масса, кДа	Пероксидаза <i>A. thaliana</i> , ID белка, изоэлектрическая точка, молекулярная масса, кДа	Идентификатор гена в TAIR	Score	E-value	
HRP_A2A, <i>Armoracia rusticana</i> CCJ34825.1 4.62 35.03	AtPrx2 NP_196290.1 4.52 34.99	AT5G06720	635	0.0	
	AtPrx54 NP_196291.1 4.27 37.29	AT5G06730	578	0.0	
	AtPrx22 NP_181372.1 5.76 38.11	AT2G38380	380	1e ⁻¹³¹	
	AtPrx58 NP_197488.1 4.92 35.43	AT5G19880	363	2e ⁻¹²⁵	
	AtPrx37 OAP01113.1 7.85 38.20	AT4G09970	357	8e ⁻¹²³	
	AtPrx23 NP_181373.1 7.97 38.10	AT2G38390	356	3e ⁻¹²²	
	AtPrx32 NP_850652.1 6.62 38.85	AT3G32980	354	2e ⁻¹²¹	
	HRP-C1C, <i>Armoracia rusticana</i> P15233.1 6.62 36.54	AtPrx33 NP_190480.1 6.80 38.94	AT3G49110	629	0.0
		AtPrx34 NP_190481.1 7.56 38.83	AT3G49120	624	0.0
AtPrx38 NP_192618.1 7.57 38.09		AT4G08780	526	0.0	

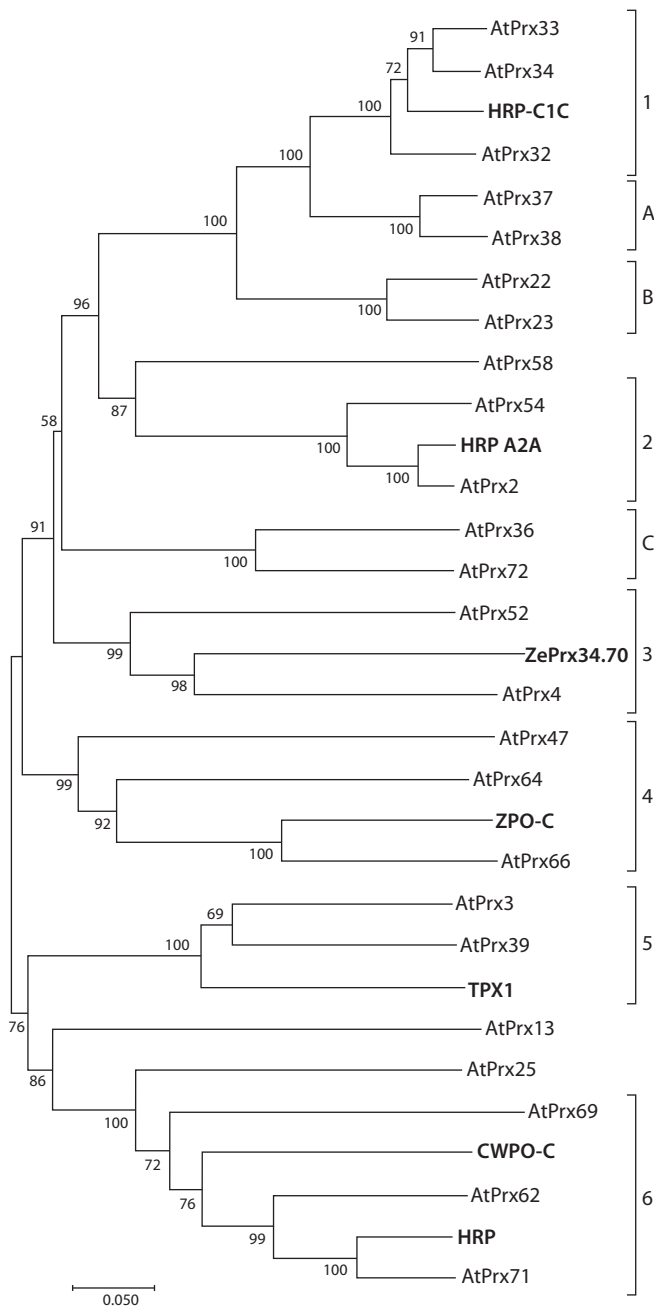
ликованными исследованиями (Herrero et al., 2013a). Согласно исследованиям (Fernandez-Pereza et al., 2015), ген *AtPrx4* экспрессируется в корнях, стеблях и листьях, влияет на рост растений на длинном дне, а продукт его экспрессии участвует в полимеризации сиригнола.

Очищенная пероксидаза ZPO-C из *Z. violacea* в условиях *in vitro* использует в качестве субстрата как синаповый, так и кониферилловый спирт (Sato et al., 2006). Гомологичная ей пероксидаза AtPrx66 участвует в процессах лигнификации клеточной стенки формирующихся сосудов (Sato et al., 2006). Показано, что близкий ей гомолог AtPrx64 также играет роль в лигнификации ксилемы (Yokoyma, Nishitani, 2006).

Ген основной пероксидазы TPX1 *L. esculentum* специфически экспрессируется в корнях и сосудах ксилемы, а

кодируемый им фермент задействован в процессах лигнификации и суберинизации (Quiroga et al., 2000). В трансгенных растениях *L. esculentum* со сверхэкспрессией TPX1 показано увеличение содержания лигнина (Mansouri et al., 1999). Гомологичная ей пероксидаза AtPrx3 участвует в лигнификации (см. табл. 2). Транскрипты катионной пероксидазы AtPrx3 были обнаружены в проростках и корнях, показана их роль в стрессовой реакции растений при засолении и засухе (Llorente et al., 2002). Роль пероксидазы AtPrx39 в процессе лигнификации клеточной стенки не изучена. Однако ген *AtPRX39* экспрессируется в зоне проведения корня и влияет на развитие корневой системы (Tsukagoshi et al., 2010).

Пероксидаза CWPO-C из *P. alba* является катионной изоформой фермента с высоким сродством к полимеризации



Филогенетическое дерево пероксидаз *A. thaliana*, построенное с помощью метода соединения соседей (Sano, Nei, 1981).

Показано оптимальное дерево с суммой длин ветви 5.06962574, бутстреп-оценка составляет 1000 повторов. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода *p*-расстояния (Nei, Kumar, 2000). Филогенетический анализ проведен в MEGA7 (Kumar et al., 2016). Номера доступа из базы данных The Protein NCBI для аминокислотных последовательностей указаны в табл. 1, последовательности приведены в Приложении 1. Кластеры 1–6 объединяют референсные пероксидазы и ферменты *A. thaliana*, кластеры А, В и С – исключительно пероксидазы *A. thaliana*.

ции синапового спирта в условиях *in vitro* (Aoyama et al., 2002). HRP – катионная изоформа с высоким родством к полимеризации кониферилового спирта. Показано, что изоферменты пероксидаз, такие как HRP и CWPO-C, могут катализировать одноэлектронное окисление синапового спирта с использованием кониферилового спирта в качестве радикального медиатора (Aoyama et al., 2002).

Наиболее близкий гомолог HRP в *A. thaliana* – пероксидаза AtPrx71. Показано ее участие в образовании вторичной ксилемы (Yokooyama, Nishitani, 2006) и ответе на воздействие биотических факторов (Chassot et al., 2007). Экспрессия пероксидазы AtPrx62 увеличивается в ответ на действие ионов тяжелых металлов и фитопатогенов (Cosio, Dunand, 2009).

Гены, кодирующие пероксидазы AtPrx32 и 37, экспрессируются в корне и гипокотиле, вовлечены в процессы лигнификации (см. табл. 2). Избыточная экспрессия *AtPRX37* в трансгенных растениях *A. thaliana* снижает темпы роста растений, влияет на развитие ксилемы и в итоге приводит к образованию карликового фенотипа. Возможно, пероксидаза AtPrx37 участвует в регуляции роста растений через процесс лигнификации клеточной стенки (Pedreira et al., 2011). Пероксидазы AtPrx72 и 36 отличаются по локализации в тканях растений и выполняемым функциям. Ген *AtPRX72* экспрессируется в корнях и стеблях (Valerio et al., 2004), а ген *AtPRX36* – в гипокотиле, принимает участие в элонгации клеток (Irshad et al., 2008), а также в эндосперме и семенной кожуре (Kunieda et al., 2013). Анализ мутантов *A. thaliana* по гену *AtPRX72* показал снижение содержания лигнина, уменьшение количества сириголовых монолигнолов. Кроме того, мутанты характеризовались медленным ростом, уменьшением диаметра розетки, количества побегов и листьев (Herrego et al., 2013b). Таким образом, ряд пероксидаз, объединенных в кластеры 2–6, обладает способностью к окислению монолигнолов и может участвовать в лигнификации клеточных стенок.

Мы предполагаем, что пероксидазы, объединенные в один кластер на филогенетическом дереве, преимущественно экспрессируются в одних и тех же органах растений, выполняют сходные функции (см. табл. 2). Среди пероксидаз наименее изучены с точки зрения их роли в физиологических процессах AtPrx54 и 39. По результатам анализа данных пероксидаза AtPrx54 выполняет схожие функции с AtPrx2 – участвует в лигнификации, росте и ответе на неблагоприятные абиотические условия. Пероксидаза AtPrx39 также вовлечена в процесс лигнификации и работу антиоксидантных систем при биотическом и абиотическом стрессах. В соответствии с представлениями об эволюционном происхождении белков (Gabaldon, Koonin, 2013), вероятным представляется участие пероксидаз AtPrx54 и 39 в процессах лигнификации клеточной стенки, поскольку они являются ортологами HRA2A и TPX1 соответственно. Пероксидазы AtPrx69 и 62, объединенные в общий кластер с пероксидазой AtPrx71, вероятно, также могут участвовать в лигнификации клеточной стенки.

Функции гомологичных белков могут быть определены исходя из их доменной структуры, сайтов связывания с субстратом. Предварительно было сделано множественное выравнивание аминокислотных последовательностей (данные не представлены), куда включили референсные ферменты и пероксидазы *A. thaliana*, объединенные в общий кластер (кластеры 1–6 на филогенетическом дереве, см. рисунок). Было показано, что пероксидаза AtPrx54 имеет структуры, схожие с AtPrx4 и HRP_A2A, а пероксидаза AtPrx39 высокогомологична белкам TPX1, CWPO-C

Таблица 2. Функции пероксидаз III класса *A. thaliana*

Кластер	Пероксидаза	Функция	Локализация экспрессии
1 Гомологи HRP-C1C	AtPrx33	Растяжение клеток, биотический стресс	Корень, гипокотиль, 2-е междоузлие, листья, цветок в 15-й стадии, чашелистики
	AtPrx34	Растяжение клеток, биотический и абиотический стрессы	Корень, гипокотиль, 2-е междоузлие, листья, цветок в 15-й стадии, чашелистики
	AtPrx32	Растяжение клеток	Корень на стадии однодневного проростка
2 Гомологи HRP A2A	AtPrx54	Нет данных	Корень, гипокотиль
	AtPrx2	Лигнификация, растяжение клеток, абиотический стресс	Корень, гипокотиль, 1-й узел, плодолистки, чашелистики, тычинка
3 Гомологи ZePrx34.70	AtPrx52	Лигнификация, абиотический и биотический стрессы	Цветки, чашелистики
	AtPrx4	Лигнификация, растяжение клеток	Корень, семядоли, гипокотиль, 2-е междоузлие, листья, цветки на стадии развития 10–15, чашелистики, пестик
4 Гомологи ZPO-C	AtPrx47	Лигнификация	Корень, лепесток, цветки в стадии развития 15
	AtPrx64	Лигнификация, абиотический стресс	Семена, 1-й узел, 2-е междоузлие
	AtPrx66	Лигнификация	Листья, семена на 3–4-й стадии, чашелистики, лепесток, пестик
5 Гомологи TPX1	AtPrx3	Лигнификация, абиотический и биотический стрессы	Корень, гипокотиль, семена на стадии 4–7
	AtPrx39	Нет данных	Корень, гипокотиль, плодолистки
6 Гомологи CWPO-C и HPR	AtPrx69	Растяжение клеток, абиотический и биотический стрессы	Корень, гипокотиль
	AtPrx62	Абиотический и биотический стрессы	Корень, гипокотиль, семена, инкубированные 24 ч
	AtPrx71	Лигнификация, абиотический и биотический стрессы	Листья, гипокотиль, чашелистики, лепестки, плодолистки, семена на стадии развития 3

Примечание. Информация о функциях пероксидаз указана в соответствии с ресурсом Arabidopsis Information Resource (www.arabidopsis.org), а сведения о локализации экспрессии на разных стадиях развития растений – The Bio-Array Resource for Plant Functional Genomics (<http://bar.utoronto.ca>).

и HRP. Затем были определены высококонсервативные и полуконсервативные участки, структурные мотивы, характерные для анализируемых пероксидаз III класса (см. Приложения 2 и 3).

Таким образом, пероксидазы отличаются структурными мотивами и, соответственно, сродством к окисляемым субстратам. Структурные мотивы, на основании которых можно судить о способности к полимеризации G-монолигнолов, – V78, 95-VSCSD, S98, 105-SEA, F185, N281. Для S-пероксидаз характерны отличные от G-пероксидаз участки: I80, 95-VSCAD, A98, 105-ARD, Y178, K268. Мотив 95-VSCAD определяет способность пероксидаз к полимеризации как сингалдазина, так и синапового спирта (Barcelo et al., 2007). Кроме того, на сродство пероксидазы к субстрату влияют гидрофобные взаимодействия между субстратом и ферментом, в которые вовлечены аминокислоты в положениях P69, I138, P139, S140, R175 и V178 (Barcelo et al., 2007). Исследования структуры пероксидазы ATP A2 из *A. thaliana* показали, что гидрофобные взаимодействия между атомами синапового спирта и остатками аминокислот белка в положениях I138 и P139 не позволяют ферменту использовать синаповый спирт в качестве субстрата (Ostergaard et al., 2000).

Из анализируемых аминокислотных последовательностей к G-пероксидазам можно отнести AtPrx2 и 54, HRP_A2A. Для них характерны структурные мотивы V78, 95-VSCSD, S98, 105-SEA, F186, N281. Гидрофобные свойства в сайте связывания с субстратом обеспечиваются за счет аминокислотных замен с гидрофобными свойствами: пролина на аланин в положении 96, изолейцина на лейцин в положении 138, изолейцина на фенилаланин в положении 142. Замены в сайтах с гидрофильными аминокислотами (глицин на пролин в положении 68, изолейцин на лейцин в положении 138, аргинин на глутамин в положении 175, глицин на валин в положении 177, валин на треонин в положении 178) не изменили свойства сайтов связывания субстратов. Гидрофобный мотив 138-IPS определяет конформацию белка и гидрофобность сайта связывания с субстратом. Таким образом, пероксидаза AtPrx54 характеризуется наличием сайтов, обеспечивающих способность к полимеризации *nara*-кумарового и кониферилового спиртов.

К S-пероксидазам относятся референсные ферменты CWPO-C, TPX1, HPR, а также AtPrx3, 39, 62, 69 и 71 из *A. thaliana*. Их каталитические свойства определяются мотивами I78, 92-VSCAD, A96, 103-ARD, Y182, K282.

Аминокислотные замены изолейцина на лейцин в положении 135 и фенилаланина на тирозин в положении 231 обеспечивают их гидрофобные свойства в участках сайта связывания субстрата. Предположительно, пероксидазы AtPrx39, 69 и 62 участвуют в полимеризации синапового спирта.

Заключение

Пероксидазы III класса растений разных семейств характеризуются высокой гомологией, сходной локализацией в тканях и могут выполнять одинаковые функции. На основе оценки гомологии аминокислотных последовательностей были выявлены структурно-функциональные участки, которые позволяют судить о родстве пероксидаз к субстрату. Полученные результаты показывают, что AtPrx39 окисляют синаповый спирт и относятся к S-пероксидазам; AtPrx54 окисляет *para*-кумаровый и кониферилловый спирты и относится к G-пероксидазам. Следовательно, пероксидазы арабидопсиса AtPrx39 и 54 могут участвовать в полимеризации монолигнолов в процессе биосинтеза лигнина. Таким образом, использование биоинформатических методов, анализ литературы и материалов в базах данных позволили предположить не известные ранее функции ряда пероксидаз *A. thaliana*, относящихся к III классу.

Список литературы / References

- Aoyama W., Sasaki S., Matsumura S., Mitsunaga T., Hirai H., Tsumi Y., Nishida T. Sinapyl alcohol-specific peroxidase isoenzyme catalyzes the formation of the dehydrogenative polymer from sinapyl alcohol. *J. Wood Sci.* 2002;6(48):497-504. DOI 10.1007/BF00766646/.
- Barcelo A.R., Gomez Ros L.V., Carrasco A.E. Looking for syringyl peroxidases. *Trends Plant Sci.* 2007;12(1):486-491. DOI 10.1016/j.tplants.2007.09.002.
- Barcelo A.R., Gomez Ros L.V., Gabaldon C., Lopez-Serrano M., Pomar F., Carrion J.S., Pedreño M.A. Basic peroxidases: the gateway for lignin evolution? *Phytochem. Rev.* 2004;3:61-78. DOI 10.1023/B:PHYT.0000047803.49815.1a/.
- Berthet S., Thevenin J., Baratiny D., Demont-Caulet N., Debeaujon I., Bidzinski P., Leple J.C., Huis R., Hawkins S., Gomez L.D., Lapiere C., Jouanin L. Role of plant laccases in lignin polymerization. *Adv. Bot. Res.* 2012;61:145-172. DOI 10.1016/B978-0-12-416023-1.00005-7.
- Bindschedler L.V., Dewdney J., Blee K.A., Stone J.M., Asai T., Plotnikov J., Denoux C., Hayes T., Gerrish C., Davies D.R., Ausubel F.M., Bolwell G.P. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant J.* 2006;47:851-863. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2006.02837.x.
- Boerjan W., Ralph J., Baucher M. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003;54:519-546. DOI 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938.
- Chassot C., Nawrath C., Metraux J.P. Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant J.* 2007;49:972-980. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2006.03017.x.
- Cosio C., Dunand C. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J. Exp. Bot.* 2009;2(60):391-408. DOI 10.1093/jxb/ern318.
- Fernandez-Pereza F., Vivara T., Pomar F., Pedreño M.A., Novo-Uzal E. Peroxidase 4 is involved in syringyl lignin formation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* 2015;175:86-94. DOI 10.1016/j.jplph.2014.11.006.
- Gabaldon C., Lopez-Serrano M., Pedreño M.A., Barcelo A.R. Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *Plant Physiol.* 2005;3(139):1138-1154. DOI 10.1104/pp.105.069674.
- Gabaldon T., Koonin E.V. Functional and evolutionary implications of gene orthology. *Nat. Rev. Genet.* 2013;14(5):360-366. DOI 10.1038/nrg3456.
- Herrero J., Esteban-Carrasco A., Zapata J.M. Looking for *Arabidopsis thaliana* peroxidases involved in lignin biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* 2013a;67:77-86. DOI 10.1016/j.plaphy.2013.02.019.
- Herrero J., Fernandez-Perez F., Yebra T., Novo-Uzal E., Pomar F., Pedreño M.A., Cuello J., Guera A., Esteban-Carrasco A., Zapata J.M. Bioinformatic and functional characterization of the basic peroxidase 72 from *Arabidopsis thaliana* involved in lignin biosynthesis. *Planta.* 2013b;6(237):1599-1612. DOI 10.1007/s00425-013-1865-5.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 2001;5(42):462-468. DOI 10.1093/pcp/pce061.
- Irshad M., Canut H., Borderies G., Pont-Lezica R., Jamet E. A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biol.* 2008;8:94. DOI 10.1186/1471-2229-8-94.
- Jovanovic S.V., Kukavica B., Vidovic M., Morina F., Menckhoff L. Class III peroxidases: functions, localization and redox regulation of isoenzymes. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants.* 2018;269-300. DOI 10.1007/978-3-319-75088-0_13.
- Krainer F.W., Pletzenauer R., Rossetti L., Herwig C., Glieder A., Spadiut O. Purification and basic biochemical characterization of 19 recombinant plant peroxidase isoenzymes produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 2014;100(95):104-112. DOI 10.1016/j.pep.2013.12.003.
- Kukavica B., Veljovic-Jovanovic S., Menckhoff L., Luthje S. Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth. *J. Exp. Bot.* 2012;63:4631-4645. DOI 10.1093/jxb/ers139.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016;33(7):1870-1874. DOI 10.1093/molbev/msw054.
- Kunieda T., Shimada T., Kondo M., Nishimura M., Nishitani K., Hara-Nishimura I. Spatiotemporal secretion of PEROXIDASE36 is required for seed coat mucilage extrusion in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2013;4(25):1355-1367. DOI 10.1105/tpc.113.110072.
- Liu Q., Luo L., Zheng L. Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(2):335. DOI 10.3390/ijms19020335.
- Llorente F., Lopez-Cobollo R.M., Catala R., Martinez-Zapater J.M., Salinas J. A novel cold-inducible gene from *Arabidopsis*, RCI3, encodes a peroxidase that constitutes a component for stress tolerance. *Plant J.* 2002;32:13-24. DOI 10.1046/j.1365-3113X.2002.01398.x.
- Mansouri I.E., Mercado J.A., Santiago-Domenech N., Pliego-Alfaro F., Valpuesta V., Quesada M.A. Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiol. Plant.* 1999;106:355-362. DOI 10.1034/j.1399-3054.1999.106401.x.
- Marjamaa K., Kukkola E.M., Fagerstedt K.V. The role of xylem class III peroxidases in lignification. *J. Exp. Bot.* 2009;60(2):367-376. DOI 10.1093/jxb/ern278.
- Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* New York: Oxford University Press, 2000.
- Ostergaard L., Teillum K., Mirza O., Mattsson O., Petersen M., Welinder K.G., Mundy J., Gajhede M., Henriksen A. *Arabidopsis* ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. *Plant Mol. Biol.* 2000;44:231-243. DOI 10.1023/A:1006442618860.
- Passardi F., Longet D., Penel C., Dunand C. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry.* 2004a;65:1879-1893. DOI 10.1016/j.phytochem.2004.06.023.

- Passardi F., Penel C., Dunand C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* 2004b;9:534-540. DOI 10.1016/j.tplants.2004.09.002.
- Pedreira J., Herrera M.T., Zarra I., Revilla G. The overexpression of *AtPrx37*, an apoplastic peroxidase, reduces growth in *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* 2011;141:177-187. DOI 10.1111/j.1399-3054.2010.01427.x.
- Quiroga M., Guerrero C., Botella M.A., Barcelo A., Amaya I., Medina M.I., Alonso F.J., Milrad de Forchetti S., Tigier H., Valpuesta V. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* 2000;122:1119-1127. DOI 10.1104/pp.122.4.1119.
- Sanou N., Nei M. The Neighbor-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1981;4:406-425. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Sasaki S., Nishida T., Tsutsumi Y., Kondo R. Lignin dehydrogenative polymerization mechanism: a poplar cell wall peroxidase directly oxidizes polymer lignin and produces *in vitro* dehydrogenative polymer rich in beta-O-4 linkage. *FEBS Lett.* 2004;562:197-201. DOI 10.1016/S0014-5793(04)00224-8.
- Sato Y., Demura T., Yamawaki K., Inoue Y., Sato S., Sugiyama M., Fukuda H. Isolation and characterization of a novel peroxidase gene *ZPO-C* whose expression and function are closely associated with lignification during tracheary element differentiation. *Plant Cell Physiol.* 2006;4(47):493-503. DOI 10.1093/pcp/pcj016.
- Shigeto J., Kiyonaga Y., Fujita K., Kondo R., Tsutsumi Y. Putative cationic cell-wall-bound peroxidase homologues in *Arabidopsis*, *AtPrx2*, *AtPrx25*, and *AtPrx71*, are involved in lignification. *J. Agric. Food Chem.* 2013;16(61):3781-3788. DOI 10.1021/jf400426g.
- Tsukagoshi H., Busch W., Benfey P.N. Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell.* 2010;4(143):606-616. DOI 10.1016/j.cell.2010.10.020.
- Valerio L., De Meyer M., Penel C., Dunand C. Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family. *Phytochemistry.* 2004;65:1331-1342. DOI 10.1016/j.phytochem.2004.04.017.
- Welinder K.G., Justesen A.F., Kjaersgard I.V.H., Jensen R.B., Rasmussen S.K., Jespersen H.M., Duroux L. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* 2002;269:6063-6081. DOI 10.1046/j.1432-1033.2002.03311.x.
- Yokoyama R., Nishitani K. Identification and characterization of *Arabidopsis thaliana* genes involved in xylem secondary cell walls. *J. Plant Res.* 2006;119:189-194. DOI 10.1007/s10265-006-0261-7.

ORCID ID

A.S. Tugbaeva orcid.org/0000-0001-9231-3650

A.A. Ermoshin orcid.org/0000-0003-2784-4898

I.S. Kiseleva orcid.org/0000-0002-8709-5203

Благодарности. Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-02-2019-980).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.03.2019. После доработки 13.05.2019. Принята к публикации 15.05.2019.