

УДК 577.15

ФЕРМЕНТЫ БИОСИНТЕЗА ОКСИЛИПИНОВ: ПОЛУЧЕНИЕ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА**С.С. Горина, Л.Ш. Мухтарова, Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин***Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия*

Окислительный метаболизм полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) дает начало обширной и разнообразной группе биологически активных соединений – оксилипинов. Они широко представлены в различных таксономических группах, включая животные, грибы, растения, бактерии, водоросли и др. [1, 2]. Среди оксилипинов млекопитающих наиболее изученной группой являются эйкозаноиды, играющие роль медиаторов воспалительных и инфекционных процессов [3]. Исследования оксилипинов растений в значительной степени сосредоточены на жасмонатах и их роли в регуляции процессов роста и развития, а также защиты при биотическом и абиотическом стрессе [4, 5]. Оксилипины других таксонов менее изучены по сравнению с таковыми растений и млекопитающих. Показано, что у грибов они могут выступать сигнальными молекулами при взаимодействии патоген / хозяин [6], координировать процессы развития, размножения и синтеза вторичных метаболитов [7]. Оксилипины водорослей могут обладать схожими функциями, участвуя в защитных механизмах в качестве сигнальных медиаторов [8] либо воздействуют напрямую на патогенные организмы [9].

Структурное разнообразие оксилипинов, наряду с не ферментативными преобразованиями, обусловлено координированным действием различных ферментов включающих липазы, липоксигеназы, циклооксигеназы, α -диоксигеназы, а также цитохромы P450, пероксигеназы, редуктазы и др. [10]. Наши работы в значительной степени были сосредоточены на изучении растительных цитохромов P450 семейства CYP74 (алленоксидсинтазах (АОС), гидропероксидлиазах (ГПЛ), дивинилэфирсинтазах (ДЭС), эпоксиалкогольсинтазах (ЭАС)) и синтезируемых при их участии оксилипинах. Нами были описаны первые 13-специфичные ДЭС [11, 12], обнаружены первые растительные ЭАС [13,14] и необычные дуалистичные ферменты [15], получены мутантные формы ферментов CYP74 с полной или частичной конверсией катализа [15, 16]. Ферменты CYP74 специализируются на метаболизме гидроперекисей ПНЖК и, в отличие от классических цитохромов P450, не требуют молекулярного кислорода или НАД(Ф)Н-зависимых редуктаз для протекания реакции, поскольку они используют гидроперекись в качестве субстрата и источника кислорода [17]. Интересно, что сходные по своей структуре оксилипины, продуцируемые при участии ферментов CYP74, были обнаружены у представителей беспозвоночных типа стрекающих и ряда патогенных грибов. Однако за их биосинтез отвечают не ферменты CYP74, а каталазы [18, 19], которые в основном известны своим участием в метаболизме перекиси водорода. Таким образом, объектом данного исследования были ферменты CYP74 растений (*Asparagus officinalis*, *Solanum tuberosum*, *Physcomitrella patens*), а также каталаза-подобные белки кораллов (*Dendronephthya gigantea*) и грибов (*Fusarium proliferatum*).

Для наработки соответствующих рекомбинантных белков открытые рамки считывания целевых генов были клонированы в вектор pET-23a (+) (Novagen, USA). Правильность сборки и отсутствие сдвигов рамки считывания полученных генетических конструкций проверяли с помощью ДНК-анализатора ga3130 (Applied Biosystems, США). Для отработки процедуры получения рекомбинантных белков и последующей их очистки, полученные генетические конструкции трансформировали в экспрессирующий штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS, обеспечивающий высокий выход белка при контролируемом уровне экспрессии, что осуществляется за счет делеции в гене *lacY1*, приводящей к ограничению активного транспорта лактозы (и, как следствие, изо-пропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) – аналога лактозы) в клетки с помощью *lac*-пермеазы. Таким образом, в ходе роста клеток в присутствии ИПТГ, обеспечивается его равномерное распределение и, следовательно, концентрационнонезависимый уровень индукции экспрессии целевого гена и синтез целевого белка. При этом наличие дополнительной плазмиды pLysS содержащей ген, кодирующий T7 лизоцим, позволяет подавить возмжность базальной экспрессии T7 РНК-полимеразы до внесения ИПТГ. Гетерологическую экспрессию проводили в смешанной среде содержащей равные части среды LB (1 % пептона, 0.5 % дрожжевого экстракта, 1 % NaCl) и M9 (0.6 % Na_2HPO_4 , 0.3 % KH_2PO_4 , 0.05 % NaCl, 0.1 % NH_4Cl). Наличие целевого белка, а также его количество оценивали по результатам электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле. Поскольку для наработки целевых белков использовался вектор pET-23a (+), то рекомбинантные белки имели на С-концах His-метки, позволяющие проводить очистку методом металл-аффинной хроматографии.

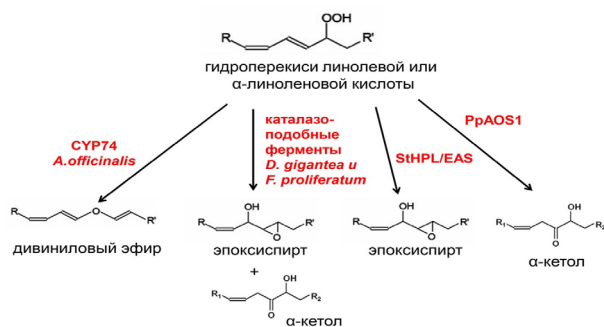


Рисунок. Схематическое изображение реакций, катализируемых целевыми ферментами *A. officinalis*, *D. gigantea*, *F. proliferatum*, а также StHPL/EAS и PpAOS1.

Синтезированные продукты были аналогичны оксипипинам, синтезируемым при участии рекомбинантных ферментов AOC *P. patens* (PpAOS1) и ГПЛ/ЭАС *S. tuberosum* (StHPL/EAS).

Работы по изучению каталазо-подобных ферментов выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-04-01069-а. Работы по сравнительной биохимической характеристике ферментов *P. patens* и *S. tuberosum* проводились при финансовой поддержке гранта МК-903.2020.4. Биоинформационный анализ и моделирование праймеров для клонирования проводилось при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр Российской академии наук".

Литература

- [1] Andreou A., Brodhun F., Feussner I. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog Lipid Res.* 2009. 48, 148–170.
- [2] Griffiths G. Biosynthesis and analysis of plant oxylipins. *Free Radic Res.* 2015. 49(5), 565–82.
- [3] Funk C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001. 294, 1871–1875.
- [4] Wasternack C., Hause J. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany.* Ann Bot. 2013. 111, 1021–58.
- [5] Griffiths G. Jasmonates: biosynthesis, perception and signal transduction. *Essays Biochem.* 2020. 23, 501–512.
- [6] Christensen S.A., Kolomiets M.V. The lipid language of plant-fungal interactions. *Fungal Genet Biol.* 2011. 48(1), 4–14.
- [7] Gessler N.N., Filippovich S.Y., Bachurina G.P., Kharchenko E.A., Groza N.V., Belozerskaya T.A. Oxylipins and oxylipin synthesis pathways in fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2017. 53, 628–639.
- [8] Bouarab K., Adas F., Gaquerel E., Kloareg B., Salaün J.P., Potin P. The Innate Immunity of a Marine Red Alga Involves Oxylipins from Both the Eicosanoid and Octadecanoid Pathways. *Plant Physiol.* 2004. 135(3), 1838–48.
- [9] Meyer N., Rettner J., Werner M., Werz O., Pohnert G. Algal Oxylipins Mediate the Resistance of Diatoms against Algicidal Bacteria. *Mar Drugs.* 2018. 16(12), 486.
- [10] Feussner I., Wasternack C. The Lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology.* 2002. 53, 275–297.
- [11] Gorina S.S., Toporkova Y.Y., Mukhtarova L.S., Chechetkin I.R., Khairutdinov B.I., Gogolev Y.V., Grechkin A.N. Detection and molecular cloning of CYP74Q1 gene: identification of *Ranunculus acris* leaf divinyl ether synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2014. 1841(9), 1227–33.
- [12] Gorina S.S., Toporkova Y.Y., Mukhtarova L.S., Smirnova E.O., Chechetkin I.R., Khairutdinov B.I., Gogolev Y.V., Grechkin A.N. Oxylipin biosynthesis in spikemoss *Selaginella moellendorffii*: Molecular cloning and identification of divinyl ether synthases CYP74M1 and CYP74M3. *Biochim Biophys Acta.* 2016. 1861(4), 301–309.
- [13] Toporkova Y.Y., Fatykhova V.S., Gorina S.S., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Epoxycalcohol Synthase RjEAS (CYP74A88) from the Japanese Buttercup (*Ranunculus japonicus*): Cloning and Characterization of Catalytic Properties. *Biochemistry (Mosc).* 2019. 84(2), 171–180.
- [14] Toporkova Y.Y., Smirnova E.O., Gorina S.S., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Detection of the first higher plant epoxycalcohol synthase: Molecular cloning and characterisation of the CYP74M2 enzyme of spikemoss *Selaginella moellendorffii*. *Phytochemistry.* 2018. 156, 73–82.
- [15] Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Bessolitsyna E.K., Smirnova E.O., Fatykhova V.S., Brühlmann F., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Double function hydroperoxide lyases / epoxycalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2018. 1863(4), 369–378.
- [16] Toporkova Y.Y., Ermilova V.S., Gorina S.S., Mukhtarova L.S., Osipova E.V., Gogolev Y.V., Grechkin A.N. Structure-function relationship in the CYP74 family: conversion of divinyl ether synthases into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 2013. 587(16), 2552–2558.
- [17] Brash A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry.* 2009. 70, 1522–1531.
- [18] Boeglin W.E., Brash A.R. Cytochrome P450-type Hydroxylation and Epoxidation in a Tyrosine-liganded Hemoprotein, Catalase-related Allene Oxide Synthase *J Biol Chem.* 2012. 287, 24139–24147.
- [19] Oliu E.H., Hamberg M. An allene oxide and 12-oxophytodienoic acid are key intermediates in jasmonic acid biosynthesis by *Fusarium oxysporum* *J Lipid Res.* 2017. 58(8), 1670–1680.