

**ОРГАНОСПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ  
ЦИТОХРОМОВ P450 СЕМЕЙСТВА CYP74 ОГУРЦА CUCUMIS SATIVUS**

*Е.К. Аскарова, С.С. Горина, Е.О. Смирнова, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин*

*Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, Россия*

Жирные кислоты являются важными компонентами липидов, они имеют сходное строение в клетках всех живых организмов. В основном, жирные кислоты входят в состав мембран и запасующих липидов. Помимо этого, жирные кислоты и их производные играют роль сигнальных молекул (Xue et al., 2007; Wang et al., 2006). Метаболизм полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), протекающий при участии липоксигеназ (ЛОГ) (Gardner et al., 1988; Hamberg, Gardner, 1992), называется липоксигеназным каскадом. Его продукты, оксипирины являются посредниками в осуществлении реакции ответа на повреждения и воздействие патогенов (Leon et al., 2001; Browse, 2005; Schillmiller, Howe, 2005; Wasternack et al., 2006; Wasternack et al., 2007). Оксипирины разнообразны по структуре и обладают высокой биологической активностью. Оксипирины вовлечены в регуляцию процессов роста, развития, защитных ответов, участвуют в переносе стрессовых сигналов, регулируют экспрессию генов, а также взаимодействуют с многочисленными сигнальными путями в растительных клетках, включая сигнальные пути гормонов – ауксина, гиббереллина, этилена и абсцизовой кислоты (АБК) (Савченко и др., 2014). Гидроперекиси ПНЖК служат важными первичными продуктами каскада реакций образования оксипиринов. Последующие превращения гидроперекисей в различные соединения, принадлежащие к семейству растительных оксипиринов, катализируются ферментами уникального семейства CYP74 цитохромов P450. Ферменты семейства CYP74 широко распространены у наземных растений. Семейство включает 4 типа ферментов: алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС) (Grechkin, 1998; Brash, 2009; Hughes, 2009). По общепринятому правилу в семейство CYP74 входят ферменты, демонстрирующие 40 % гомологию аминокислотных последовательностей, в подсемействе объединены ферменты с 55 % гомологии. ДЭС являются членами подсемейств CYP74B, CYP74D, CYP74H, CYP74M и CYP74Q, АОС являются членами подсемейств CYP74A и CYP74C, ГПЛ являются членами подсемейств CYP74B, CYP74C, CYP74E, CYP74F и CYP74G. Недавнее обнаружение CYP74-связанных ферментов у некоторых протеобактерий, многоклеточных животных (Lee et al., 2008; Toporkova et al., 2017) и у бурых водорослей (Toporkova et al., 2017) расширило множественность CYP74 от семейства до клана. Истинные ЭАС до сих пор были обнаружены только у многоклеточных животных и бурых водорослей, однако, недавно была описана единственная ЭАС растений у плаунка *Selaginella moellendorffii* (Toporkova et al., 2018).

Объектами нашего исследования являются ферменты семейства CYP74 цитохромов P450 огурца *Cucumis sativus*, у которого были обнаружены продукты эпоксиалкогольсинтазной ветви липоксигеназного каскада. Геном огурца был расшифрован в 2009 году, в нем было обнаружено 4 гена, кодирующих ферменты семейства CYP74. Фермент подсемейства CYP74A ранее был определен как 13-гидропероксид-специфичная алленоксидсинтаза. Два фермента CYP74C1\_CS и CYP74B6 были охарактеризованы как 9- и 13-гидропероксид-специфичные гидропероксидлиазы. Первичная структура фермента CYP74C31 содержит ряд нехарактерных для АОС и ГПЛ аминокислотных остатков в каталитически важных сайтах и потенциально может являться эпоксиалкогольсинтазой у огурца *Cucumis sativus*.

Рекомбинантные ферменты были получены в гетерологичных системах экспрессии с использованием клеток *E. coli*. Полноразмерные открытые рамки считывания были клонированы для получения рекомбинантных белков, которые были экспрессированы в бактериальном продуценте, очищены методом металл-аффинной хроматографии, и методом ГХ-МС анализа были исследованы каталитические свойства. Все цитохромы P450 имеют сходную третичную структуру белковой молекулы в комплексе с гемом и имеют определенные консервативные, каталитически важные домены. Выравнивание аминокислотных последовательностей различных ферментов семейства CYP74 выявили корреляцию между заменами отдельных аминокислот в основном «субстрат» распознающих сайтах. Выравнивание последовательностей иллюстрирует сайты, консервативные у всех CYP74.

Первый определитель типа катализа СУР74 локализуется на участке распознавания субстрата СРС-1 вблизи N-конца. Этот сайт известен как «F / L тоггль». Все АОС имеют остаток фенилаланина на этом сайте, а все известные ГПЛ и ДЭС имеют лейцин. Наши объекты содержат в этом сайте остаток лейцина, кроме СУР74А, который определен как АОС, следовательно, содержит остаток фенилаланина. Также в катализе непосредственно участвует гидропероксид-связывающий домен (домен ГСД), состоящий из 6 аминокислотных остатков. Наши объекты демонстрируют высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей в этом домене.

Рекомбинантные ферменты были инкубированы 9- и 13-гидроперекисями линолевой и линоленовой кислот – естественными субстратами ферментов семейства СУР74. В зависимости от используемого субстрата, фермент СУР74С31 проявляет различные каталитические свойства. Что касается 9-гидропероксида линолевой кислоты, фермент СУР74С31 проявляет тройную активность – ЭАС, АОС и ГПЛ; по отношению к 9-гидроперекиси  $\alpha$ -линоленовой и 13-гидроперекиси линолевой кислот является ЭАС и ГПЛ; для 13-гидроперекиси  $\alpha$ -линоленовой кислоты свойства ГПЛ. Аналогичные результаты были получены при изучении каталитических свойств рекомбинантного СУР74С1\_CS (Торюкова et al., 2018). Фермент СУР74В6 по отношению к 9- и 13-гидроперекисям линолевой кислоты проявляет свойства ЭАС; по отношению 13-гидроперекиси  $\alpha$ -линоленовой кислоты проявляет свойства ГПЛ. Фермент *Cucumis sativus* СУР74А проявляет свойства АОС. Результаты настоящей работы впервые демонстрируют двойную активность ГПЛ подсемейства СУР74С. В зависимости от субстрата эти ферменты ведут себя в основном как ЭАС или ГПЛ. Один из изученных ферментов, СУР74С31, также обладал третьим типом АОС активности с 9-гидроперекисью линолевой кислоты в качестве субстрата. Синтез эпокиспиртов является неотъемлемым свойством дуалистичных ферментов подсемейств СУР74В и СУР74С.

Помимо исследования каталитических свойств рекомбинантных ферментов, проводились измерения зависимости активности ферментов от pH буферных растворов. Вопрос о внутриклеточной локализации ферментов СУР74 еще не до конца изучен, но предполагается, что большинство ферментов этого семейства локализуется в мембранах (Froehlich et al., 2001). В литературных данных описана локализация АОС и ГПЛ в различных мембранах хлоропластов (Vick, Zimmerman, 1987); первые стадии жасмонатного пути, катализируемого АОС, протекают в пластидах (Feussner et al., 2002); полностью пластидную локализацию имеют 13-специфичные ГПЛ подсемейства СУР74В, так же как и 13-АОС, принадлежащие к подсемейству СУР74А. Локализация в липидных каплях характерна для 9/13-ГПЛ огурца (Hughes et al., 2009). Для ферментов СУР74А, СУР74С1\_CS и СУР74С31 максимальная эффективность превращения субстратов наблюдалась в диапазоне pH 7,5–8. Однако, для фермента СУР74В6 оптимум pH был равен 6. В строме хлоропласта pH достигает 8, в то время как на поверхности тилакоидов значение pH лежит в более кислом диапазоне и равен 6. По полученным результатам можно сделать предположение о клеточной локализации данных ферментов огурца. Ферменты СУР74С1\_CS и СУР74С31 и СУР74А ассоциированы с мембранами и находятся в строме хлоропластов, СУР74В6 локализован на поверхности тилакоидов хлоропластов, где понижение значения pH обусловлено трансмембранным электрохимическим градиентом ионов водорода в ЭТЦ.

Помимо этого, подобные дуалистичные свойства были обнаружены у ферментов ДЭС. В частности, фермент СУР74В16 льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) (LuDES) из подсемейства СУР74В катализировал превращения 13-гидроперексей линолевой и линоленовой кислот в ( $\omega$ 5Z) – этеролевою и ( $\omega$ 5Z) – этероленовою кислоты, продукты ДЭС реакции, соответственно. Однако превращение 13-гидроперексей линолевой кислоты привело к образованию значительного количества дополнительных соединений эпокиспиртов, продуктов ЭАС реакции.

*Работы по клонированию рекомбинантных ферментов поддержаны грантом МК-5989.2018.4. Кинетические исследования рекомбинантных ферментов проводились при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр Российской академии наук". Работа по получению и исследованию фермента СУР74В16 льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) (LuDES) выполнена при поддержке гранта 18-34-01012 мол\_а.*

ЛИТЕРАТУРА

- Brash A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes // *Phytochemistry*. Т.70. 2009. С. 1522–1531.
- Browse, J. Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants / *Vitam Horm*. 2005. V. 72. P. 431–456.
- Feussner, I. The Lipoxygenase pathway / I. Feussner, C. Wasternack // *Annual Review of Plant Biology*. 2002. V. 53. P. 275–297.
- Froehlich, J.E. Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope / J.E. Froehlich, A. Itoh, G.A. Howe // *Plant Physiol*. 2001. V. 125. P. 306–317.
- Gardner, H.W. Lipoxygenase pathway in cereals. *Advances in Cereal Science and Technology* / H.W. Gardner Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, MN, 1988. P. 161–215.
- Grechkin A.N. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway // *Prog. Lipid Res*. Т.37. 1998. С. 317–352.
- Hamberg, M. Oxylipin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance / Hamberg M., Gardner H.W. // *Biochim Biophys Acta*. 1992. V. 1165. P. 1–18.
- Hughes R.K., De Domenico S., Santino A. Plant cytochrome CYP74 family: biochemical features, endocellular localisation, activation mechanism in plant defence and improvements for industrial applications // *ChemBioChem*. Т. 10. -2009. С. 1122–1133.
- Lee D. S., Nioche P., Hamberg M. Raman C.S. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthesis enzymes // *Nature*. Т. 455. 2008. С. 363–370.
- Leon, J. Wound signalling in plants / J. Leon, E. Rojo, J.J. Sanchez-Serrano // *J Exp Bot*. 2001. V. 52. P. 1–9.
- Schilmiller, A.L. Systemic signalling in the wound response / A.L. Schilmiller, G.A. Howe // *Curr Opin Plant Biol*. 2005. V. 8. P. 369–377.
- Toporkova Y.Y. Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis / 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. // *BBA Molecular and Cell Biology of Lipids*. Т. 1863. -2018. С. 369–378.
- Toporkova Y.Y. Epoxyalcohol synthase of *Ectocarpus siliculosus*. First CYP74-related enzyme of oxylipin biosynthesis in brown algae / Toporkova Y.Y., Fatykhova V.S., Gogolev Y.V., Khairutdinov B.I., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2017. Т. 1862. С. 167–175.
- Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Mukhitova F.K., Hamberg M., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Identification of CYP443D1 (CYP74 clan) of *Nematostella vectensis* as a first cnidarian epoxyalcohol synthase and insights into its catalytic mechanism / Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Mukhitova F.K., Hamberg M., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. // *Biochim. Biophys. Acta*. Т. 1862. 2017. С. 1099–1109.
- Toporkova, Y.Y. Detection of the first higher plant epoxyalcohol synthase: Molecular cloning and characterisation of the CYP74M2 enzyme of spikemoss *Selaginella moellendorffii* / Toporkova Y.Y., Smirnova E.O., Gorina S.S., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. // *Phytochemistry*. -2018. V. 156. P. 73–82.
- Vick, B.A. Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts / B.A. Vick, D.C. Zimmerman // *Plant Physiology*. 1987. V. 85. P. 1073–1078.
- Wang, X. Signaling functions of phosphatidic acid / X. Wang, S.P. Devaiah, W. Zhang, R. Welti // *Prog Lipid Res*. 2006. V. 45. P. 250–78.
- Wasternack, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development / *Ann Bot*. 2007. V. 100. P. 681–697.
- Wasternack, C. The wound response in tomato—role of jasmonic acid / C. Wasternack, I. Stenzel, B. Hause, G. Hause, C. Kutter, H. Maucher, J. Neumerkel, I. Feussner, O. Miersch // *J Plant Physiol*. 2006. V. 163. P. 297–306.
- Xue, H. Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects / H. Xue, X. Chen, G. Li // *Curr Opin Plant Biol*. 2007. V. 10. P. 483–9.
- Савченко Т.В., Застрижная О.М., Климов В.В. Оксипилены и устойчивость растений к абиотическим стрессам // *Биохимия*. Т.79. 2014. С. 458–475.