

**РЕКОМБИНАНТНЫЕ ДИВИНИЛЭФИРСИНТАЗЫ (ДЭС): ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА, АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ**

**Е.О. Смирнова, М.Е. Воробьева, С.С. Горина, Е.К. Аскарлова, Т.М. Ильина, Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин**

*Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение  
Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр РАН, Казань, Россия.*

Дивинилэфирсинтазы (ДЭС) принадлежат к цитохромам P450 семейства CYP74. Помимо ДЭС, в это семейство ферментов входят алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). Ферменты CYP74 являются нетипичными представителями P450, так как им для каталитического действия не нужен кислород. Субстратами ферментов CYP74 у растений являются 9- и 13-гидроперекиси линолевой и альфа-линоленовой кислот.

Ферменты семейства CYP74 играют важную роль в липоксигеназном каскаде, продуктами функционирования которого являются оксипирины. Эти соединения широко распространены в организмах, принадлежащих к разным таксонам. Интерес к механизмам биосинтеза оксипиринов обусловлен высокой практической значимостью веществ этого класса. Они являются сигнальными соединениями, обеспечивающими защитный ответ растений на клеточном, организменном, популяционном и межвидовом уровне, что может быть использовано в агропромышленном производстве и биотехнологии. Оксипирины ответственны за многие свойства растений, характеризующие их в качестве сырья и пищевых продуктов.

Продуктами дивинилэфирсинтазной ветви липоксигеназного каскада являются дивиниловые эфиры. Данные соединения обладают ярко выраженными антимикробными свойствами (Топоркова et al., 2018). ДЭС были обнаружены у небольшого числа видов растений из разных таксонов. Так, например, 9-специфичные ДЭС были обнаружены в растениях табака (Fammartino et al., 2007), томата (Song et al., 1993), картофеля (Stumpe et al., 2001), перца (Gullner et al., 2010). ДЭС, утилизирующие 13-гидроперекиси жирных кислот, были выявлены в растениях льна-долгунца (Gogolev et al., 2012), лютика едкого (Gorina et al., 2014) и древнейшего сосудистого растения *Selaginella moellendorffii* (Gorina et al., 2016). ДЭС, утилизирующая 9/13-гидроперекиси жирных кислот, была найдена в луковицах чеснока (Itoh, Howe, 2001).

К настоящему времени имеются данные о том, что ряд ферментов CYP74 из разных подсемейств могут обладать двойным типом катализа. Так, для АОС томата (CYP74C3) была показана минорная активность типа ГПЛ в реакциях с 9-гидроперекисью линолевой кислоты (Топоркова et al., 2008). У ряда ферментов подсемейства CYP74C, ранее описанных как ГПЛ, была обнаружена дополнительная ЭАС активность; следует отметить, что с некоторыми субстратами данная активность преобладала (Топоркова et al., 2018 (2)). У ДЭС подобного поведения зафиксировано не было. Однако на возможный дуалистичный характер ДЭС указывают спектрофотометрические данные. Активность ДЭС можно наблюдать не только по уменьшению субстрата, но и по увеличению продукта (длина волны дивиниловых эфиров 250 нм – для производных линолевой кислоты и 267 нм – для производных альфа-линоленовой кислоты). Кривая Михаэлиса-Мэнтена некоторых ДЭС указывает на возможный аллостерический эффект. Однако для ферментов CYP74 такая кинетика не описана. И, как правило, данное поведение принимают за наличие артефактов. Никто не анализировал продукты реакции в случае, когда по спектрофотометрическим данным субстрат расходуется, но дивиниловых эфиров не образуется. В связи с этим изучение ДЭС представляет особый интерес для исследователей.

Получение и характеристика рекомбинантных ДЭС будет рассмотрено на примере ДЭС табака (NtDES, CYP74D3). Для получения рекомбинантного фермента NtDES (CYP74D3) использовали бактериальный плазмидный вектор pET-32 Ek/LIC (для клонирования использовали метод безлигазного клонирования) и клетки *E. coli* штамма Rosetta-gami(DE3)pLysS B (Novagen, США). Образующийся рекомбинантный белок содержит концевую последовательности His×Tag, позволяющую проводить очистку с помощью металлоаффинной хроматографии. Процедура наработки целевого белка была разработана на основе нескольких общепринятых протоколов. Ночную культуру клеток *E. coli* (10 мл) выращивали в среде LB, разведенной 1 объемом минеральной среды M9 и содержащей 500 мг/л ампициллина, 35 мг/л хлорамфеникола, 12,5 мг/л тетрациклина и 15 мг/л канамицина при 37° С и умеренной аэрации (180 об/мин) в течение 6 ч, после чего культуру выдерживали при 4° С в течение 14 ч.

Затем ночную культуру добавляли в 1 л свежей среды LB, разведенной 1 объемом среды M9, добавив вышеупомянутые антибиотики в тех же концентрациях. Полученную культуру клеток выращивали при 37° С и интенсивной аэрации (250 об/мин) до достижения культурой значения оптической плотности  $OD_{600} = 0,6$ . Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра Lambda 25 (Perkin-Elmer, США). Клеточную суспензию быстро охлаждали до 18° С на ледяной бане, немедленно добавляли индуктор ИПТГ в конечной концентрации 0,5 мМ и предшественник гема – 5-аминолевулиновую кислоту – из расчета 115 мг/л. Кроме того, в среду вносили дополнительное количество ампициллина из расчета 100 мг/л для компенсации его разрушения бета-лактамазой бактерий в ходе роста культуры. Индуцированную культуру инкубировали в течение 8–14 ч при умеренной аэрации (180 об/мин) и пониженной температуре

(18° С), после чего собирали центрифугированием (4500 об/мин, 15 мин, 4° С) и лизировали с помощью реагента для экстракции белков BugBuster (Novagen, США). Количество целевого белка в клетках оценивали по результатам электрофоретического разделения тотальных белков лизатов в полиакриламидном геле (SDS-PAGE, окрашивание геля красителем Coomassie Brilliant Blue R-250) с использованием системы PowerPac Universal MiniProtein (Bio-Rad, США) по прилагаемой инструкции. Полученные рекомбинантные белки очищали методом металлоаффинной хроматографии с использованием картриджей Bio-Scale Mini Profinity IMAC и хроматографической системы BioLogic LP (Bio-Rad, США). Рекомбинантный фермент элюировали из картриджей с использованием 100 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7,5), содержащим 50 мМ гистидина. Концентрации рекомбинантного белка определяли с использованием набора для анализа белка Quant-iT™ HS (Invitrogen, США). Концентрацию гемопroteина оценивали с помощью анализа гемохромогена (Schenkman et al., 2006).

Каталитическую активность очищенных ферментативных препаратов определяли по снижению оптической плотности в минуту при 234 нм. Измерения проводили с использованием спектрофотометра РВ 2201 В (ЗАО «СОЛАР», Беларусь). Концентрация субстрата составляла 40 мкмоль. Анализ проводили при 25 °С в 100 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,5). Для расчета скорости реакций использовали первоначальные линейные участки кинетических кривых. Коэффициент молярной экстинкции для 9- и 13-гидроперекисей жирных кислот при 234 нм равен 25000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. Для каждого варианта проводили не менее пяти измерений.

В результате данной работы было показано, что фермент NtDES утилизировал 9-гидроперекиси жирных кислот (9-ГПОД и 9-ГПОТ) и не проявлял активности в отношении 13-гидроперекисей жирных кислот. При участии данного фермента 9-ГПОД превращалась в колнелевую кислоту – продукт, характерный для 9-специфичных дивинилэфирсинтаз. Но в реакциях с 9-ГПОТ образовывались в равных количествах продукты дивинилэфирсинтазной (колнеленовая кислота) и гидропероксидлиазной (9-оксоноановая кислота) активности. Таким образом, было показано, что фермент NtDES обладал двойной ДЭС/ГПЛ активностью в зависимости от используемого субстрата. Описанная методика подходит для получения и характеристики и других ферментов CYP74.

*Работы по получению фермента CYP74D3 (NtDES) поддержаны грантом РФФИ 18-34-01012-мол. а.*

*Работы по очистке рекомбинантного фермента CYP74D3 (NtDES) проводились при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр Российской академии наук".*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Stumpe, M., Kandzia, R., Gobel, C., Rosahl, S., and Feussner I. (2001) A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells, FEBS Letters. 507, 371–376.
2. Toporkova, Y.Y., Bessolitsyna, E.K., Smirnova, E.O., Gorina, S.S., Petrova O.E., Mukhtarova, L.S., and Grechkin, A.N. (2018) Antimicrobial activity of geometric isomers of etherolenic acid – the products of plant lipoxygenase cascade, Dokl. Biochem. Biophys. 480, 139–142.
3. Toporkova, Y.Y., Gorina, S.S., Bessolitsyna, E.K., Smirnova, E.O., Fatykhova, V.S., Brühlmann, F., Plyina, T.M., Mukhtarova, L.S., and Grechkin, A.N. (2018) Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis, Biochim. Biophys. Acta. 1863(4), 369–378 (2).
4. Gorina, S.S., Toporkova, Y.Y., Mukhtarova, L.S., Chechetkin, I.R., Khairutdinov, B.I., Gogolev, Y.V., and Grechkin, A.N. (2014) Detection and molecular cloning of CYP74Q1 gene: identification of Ranunculus acris leaf divinyl ether synthase, Biochim Biophys Acta. 1841, 1227–1233.
5. Gorina, S.S., Toporkova, Y.Y., Mukhtarova, L.S., Smirnova, E.O., Chechetkin, I.R., Khairutdinov, B.I., Gogolev, Y.V., Grechkin A.N. (2016) Oxylipin biosynthesis in spikemoss Selaginella moellendorffii: Molecular cloning and identification of divinyl ether synthases CYP74M1 and CYP74M3, Biochim Biophys Acta. 1861, 301–309.
6. Schenkman, J.B., and Jansson, I. (2006) Spectral analyses of cytochromes P450, Meth. Mol. Biol. 320, 11–18.
7. Gogolev, Y.V., Gorina, S.S., Gogoleva, N.E., Toporkova, Y.Y., Chechetkin, I.R., and Grechkin, A.N. (2012) Green leaf divinyl ether synthase: gene detection, molecular cloning and identification of a unique CYP74B subfamily member, Biochim. Biophys. Acta 1821, 287–294.
8. Song, W.C., Funk, C.D., and Brash, A.R. (1993) Molecular cloning of an allene oxide synthase – a cytochrome-P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides, Proc. Natl Acad. Sci USA 90, 8519–8523.
9. Fammartino, A., Cardinale, F., Göbel, C., Mène-Saffrané, L., Fournier, J., Feussner, I., and Esquerré-Tugayé M.T. (2007) Characterisation of a divinyl ether biosynthetic pathway specifically associated with pathogenesis in Nicotiana tabacum, Plant Physiol 143, 378–388.
10. Toporkova, Y.Y., Gogolev, Y.V., Mukhtarova, L.S., and Grechkin, A.N. (2008) Determinants governing the CYP74 catalysis: conversion of allene oxide synthase into hydroperoxide lyase by site-directed mutagenesis, FEBS Letters 582, 3423–3428.
11. Itoh, A., Howe, G.A. (2001) Molecular cloning of a divinyl ether synthase. Identification as a CYP74 cytochrome P-450, J. Biol. Chem 276, 3620–3627.
12. Gullner, G., Künstler, A., Király, L., Pogány, M., and Tóbiás, I. (2010) Up-regulated expression of lipoxygenase and divinyl ether synthase genes in pepper leaves inoculated with Tobamoviruses, Physiological and Molecular Plant Pathology 74, 387–393.