

**ОСОБЕННОСТИ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМОВ P450 СЕМЕЙСТВА CYP74**

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

*Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение  
ФИЦ "Казанский научный центр Российской академии наук", Казань, Россия*

В процессе жизнедеятельности растения постоянно подвергаются воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как поранение, поражение патогенными микроорганизмами, засуха, холод, чрезмерное воздействие света или ограниченное питание. Чтобы выжить в условиях неблагоприятной окружающей среды, растения используют широкий спектр физиологических механизмов, позволяющий распознавать стрессовое воздействие или атаку патогена и вызывать множественные быстрые защитные реакции (Leon et al., 2001; Noordermeer et al., 2001).

Важное место в осуществлении процессов ответа на неблагоприятные факторы окружающей среды занимает липоксигеназный каскад. Липоксигеназный каскад представляет собой совокупность ферментативных реакций, в ходе которых мембранные липиды преобразуются в ряд оксипинов при участии липоксигеназ и цитохромов P450 семейства CYP74 (Grechkin, 1998; Brash 2009). Оксипины являются мощными липидными медиаторами, которые играют важную роль в различных биологических процессах. Будучи важными регуляторами и маркерами широкого спектра нормальных и патологических процессов, оксипины являются популярным предметом изучения. Среди ферментов семейства CYP74, катализирующих образование оксипинов у растений в рамках липоксигеназного каскада, принято выделять следующие: алленоксидсинтаза (АОС) – участвует в образовании сигнальных молекул – жасмонатов и циклопентенонов (Browse, 2005), гидропероксидлиаза (ГПЛ) – отвечает за синтез альдокислот и летучих защитных соединений, составляющих «запах зеленых листьев» (Savchenko et al., 2014), дивинилэфирсинтаза (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтаза (ЭАС) – генерируют ряд антимикробных и фунгицидных оксипинов (Prost et al., 2005).

АОС и ГПЛ являются широко распространенными и изученными растительными ферментами, тогда как ДЭС и ЭАС менее распространены и соответственно менее изучены. АОС входят в подсемейства CYP74A и CYP74C. ДЭС являются членами подсемейства CYP74B, CYP74D, CYP74H, CYP74M и CYP74Q. ЭАС входят в состав подсемейств CYP74A и CYP74M (Gorina et al., 2016; Toporkova et al., 2018 (1); Toporkova et al., 2019), и ГПЛ являются представителями подсемейств CYP74B, CYP74C, CYP74E, CYP74F и CYP74G.

В 2018 году было показано, что предполагаемые 9/13-специфичные ГПЛ подсемейства CYP74C проявляют дополнительную эпоксиалкогольсинтазную активность (Toporkova et al., 2018 (2)). Первоначально было обнаружено, что рекомбинантный фермент CYP74C13\_MT люцерны (*Medicago truncatula*) ведет себя преимущественно как ЭАС в отношении 9(S) – гидроперекиси линолевой кислоты (9-ГПОД). В то же время данный фермент проявляет ГПЛ активность в отношении 13(S) – гидроперекисей линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот (13-ГПОД и 13-ГПОТ соответственно). Чтобы проверить, является ли этот феномен случайностью или закономерностью, было исследовано еще пять ГПЛ подсемейства CYP74C (CYP74C4\_ST (*Solanum tuberosum*), CYP74C2 (*Cucumis melo*), CYP74C1\_CS и CYP74C31 (*Cucumis sativus*), CYP74C13\_GM (*Glycine max*). Все проанализированные ферменты ведут себя преимущественно как ЭАС в отношении 9-ГПОД. Кроме того, фермент CYP74C31 обладает дополнительной алленоксидсинтазной активностью в отношении данного субстрата. Таким образом, был продемонстрирован дуалистичный характер каталитического действия данных ферментов (Toporkova et al., 2018 (2)). Результаты описанной работы позволили по-новому взглянуть на характер каталитического действия ферментов CYP74.

К настоящему времени дуалистичный характер каталитического действия был продемонстрирован для ряда ферментов CYP74 из различных подсемейств. Так, в продуктах превращения 9-ГПОД при участии эпоксиалкогольсинтазы плаунка *Selaginella moellendorffii* (CYP74M2) в минорных количествах были обнаружены  $\alpha$ -кетол и 9-оксононановая кислота (АОС и ГПЛ продукты соответственно).

Ферменты из подсемейства CYP74B, включающие в себя 13-гидропероксидлиазы, а также ДЭС льна-долгунца (CYP74B16, LuDES), в зависимости от субстрата проявляют ГПЛ либо ЭАС активность. Подобными свойствами обладает и ДЭС лютика едкого (CYP74Q1, RaDES). При участии ДЭС табака (CYP74D3, NtDES) 9-ГПОД превращается в продукт, характерный для 9-специфичных ДЭС. Но в реакциях с 9-ГПОТ образуются в равных количествах продукты ДЭС и ГПЛ, таким образом, 9-специфичный фермент табака обладает ДЭС/ГПЛ активностью. Эти данные расширяют знания о функционировании одной из важнейших сигнальных систем растений – липоксигеназного каскада.

*Исследования ферментов CYP74B16 и CYP74D3 поддержаны грантом РФФИ 18-34-01012 мол. а. Исследования ферментов подсемейства CYP74B проводились при поддержке гранта МК-5989.2018.4. Работы по очистке рекомбинантных ферментов проводились при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр Российской академии наук".*

#### ЛИТЕРАТУРА

- Leon, J. Wound signalling in plants / J. Leon, E. Rojo, J.J. Sanchez-Serrano // J Exp Bot. 2001. Vol. 52. N.354. P. 1–9.
- Noordermeer, M.A. Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance / M.A. Noordermeer, G.A. Veldink, J.F. Vliegthart // Chem Bio Chem. 2001. Vol. 2. N.7–8. P. 494–504.
- Grechkin, A.N. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway / Prog Lipid Res. 1998. Vol. 37. N.5. P. 317–352.
- Brash, A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes / Phytochemistry. 2009. Vol. 70. N.13–14. P. 1522–1531.
- Browse, J. Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants / Vitam Horm. 2005. Vol. 72. P. 431–456.
- Savchenko T.V. Oxylipins and plant abiotic stress resistance / T.V. Savchenko, O.M. Zastrijnaja, V.V. Klimov // Biochemistry (Mosc) 2014. Vol. 79(4). P. 362–375.
- Prost, I. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens / I. Prost, S. Dhondt, G. Rothe, J. Vi 164 cente, M.J. Rodriguez, N. Kift, F. Carbonne, G. Giffiths, M. T. Esquerre-Tugay, S. Rosahl, C. Castresana, M. Hamberg, J. Fournier // Plant Physiol. 2005. Vol. 139. N. 4. P. 1902–1913.
- Gorina, S.S. Oxylipin biosynthesis in spike moss *Selaginella moellendorffii*: Molecular cloning and identification of divinyl ether synthases CYP74M1 and CYP74M3. / S.S. Gorina, Y.Y. Toporkova, L.S. Mukhtarova, E.O. Smirnova, I.R. Chechetkin, B.I. Khairutdinov, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // BiochimBiophysActa. (BBA). 2016. V.1861(4). P. 301–309.
- Toporkova Y.Y. Epoxyalcohol synthase RjEAS (CYP74A88) from the japanese buttercup (*Ranunculus japonicus*): Cloning and characterization of catalytic properties / Y.Y. Toporkova, V.S. Fatykhova, S.S. Gorina, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin.
- Toporkova Y.Y. Detection of the first higher plant epoxyalcohol synthase: Molecular cloning and characterisation of the CYP74M2 enzyme of spike moss *Selaginella moellendorffii* / Y.Y. Toporkova, E.O. Smirnova, S.S. Gorina, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin // Phytochemistry 2018. Vol. 156. P.73–82.
- Toporkova Y.Y. Double function hydroperoxidelyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis / Y.Y. Toporkova, S.S. Gorina, E.K. Bessolitsyna, E.O. Smirnova, V.S. Fatykhova, F. Brühlmann, T.M. Ilyina, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin // BiochimBiophysActaMol Cell Biol Lipids. 2018. Vol. 1863(4). P. 369–378.
- Schaller A. Enzymes in jasmonate biosynthesis: structure, function, regulation / A. Schaller, A. Stintzi // Phytochemistry 2009. Vol. 70. P. 1532–1538.
- 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. Vol. 163. N.3. P. 297–306.