

УДК 573.6: 577.2

### КОНСТРУИРОВАНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ВЫРОЖДЕННЫХ ПРАЙМЕРОВ

*С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова*

*Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение  
ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия*

Праймеры (или олигонуклеотиды) представляют собой небольшие фрагменты нуклеиновых кислот, комплементарные целевым последовательностям дезоксирибонуклеиновой (ДНК) или рибонуклеиновой (РНК) кислот и ответственные за инициацию репликации ДНК во всех живых организмах. В отличие от живых организмов, которые используют РНК-праймеры, в молекулярной биологии применяются РНК- и ДНК-праймеры, которые являются одними из ключевых компонентов в полимеразной цепной реакции (ПЦР), где так же служат затравками для синтеза комплементарной цепи [1]. Вследствие того, что генетический код является вырожденным, т. е. одна аминокислота кодируется несколькими кодонами, одна аминокислотная последовательность может быть представлена несколькими нуклеотидными последовательностями. В том случае, когда отсутствует информация о нуклеотидной последовательности, а имеются данные только о полной либо частичной аминокислотной последовательности белка, конструируют вырожденные праймеры, с помощью которых проводят амплификацию целевых фрагментов гена. Таким образом, вырожденный праймер представляет собой смесь нуклеотидных последовательностей, каждая из которых представляет собой индивидуальный праймер [2].

Объектом наших исследований являются ферменты клана СУР74, принадлежащие к суперсемейству цитохромов Р450. В состав клана СУР74 входят две дегидразы (алленоксидсинтаза (АОС) и дивинилэфирсинтаза (ДЭС)) и две изомеразы (гидропероксидлиаза (ГПЛ) и эпоксиалкогольсинтаза (ЭАС)). Ферменты СУР74 относятся к неклассическим цитохромам Р450, поскольку не нуждаются ни в молекулярном кислороде, ни в окислительно-восстановительном партнере для протекания реакции. Они используют гидроперекиси жирных кислот, как в качестве субстрата, так и донора кислорода [3]. Ферменты СУР74 принимают участие в биосинтезе важного класса биологически активных молекул – оксипинов. В растениях оксипины принимают участие в ответных реакциях на механическое повреждение, воздействие патогенов и факторов окружающей среды, обеспечивая адекватный ответ организма в условиях стресса. Помимо этого, они участвуют в процессах роста и развития растения, регулируют рост корней и процессы старения.

Несмотря на значительный прогресс в области секвенирования, исследователи зачастую сталкиваются с отсутствием необходимых геномных данных. В связи с этим целью данного исследования была разработка системы поиска и клонирования ферментов СУР74 *de novo* (в отсутствии геномных данных). Ключевым моментом исследований являлось определение участков генов ферментов СУР74, которые не перекрывались бы с последовательностями генов других цитохромов и, вместе с тем, были достаточно консервативны, чтобы служить универсальными праймируемыми участками, обеспечивающими специфичное взаимодействие с олигонуклеотидными праймерами и амплификацию целевых генов в ПЦР.

Для выявления подходящих генных локусов и конструирования праймеров нами был проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей известных ферментов СУР74 различных видов растений. В зависимости от степени сходства полипептидных последовательностей, все ферменты были разделены на три группы. В каждой группе были выделены и подвергнуты сравнению каталитически важные области: гидропероксид-связывающий домен (HBD – “hydroperoxide-binding domain”), который соответствует «кислород-связывающему» домену классических монооксигеназ Р450 [4], В'-спираль, область ERR-триады и гем-связывающий домен. Это сопоставление позволило выявить наиболее консервативные участки ферментов СУР74. Такими участками оказались, в первую очередь, два домена: В'-спираль и ERR-триада (Рис. 1). Их аминокислотные последовательности были транслированы в наиболее вероятные кодирующие нуклеотидные последовательности с учетом частоты встречаемости кодонов у высших растений.

В случае высокой вероятности встречаемости двух или трех кодонов (из четырех максимально возможных) в нуклеотидной последовательности праймера допускалась замена соответствующего нуклеотида.

При этом подходе итоговая (вырожденная) последовательность представляла собой перебор предполагаемых вариантов, а праймер являлся смесью соответствующих олигонуклеотидов. На основе рассчитанных таким образом последовательностей были сконструированы три пары олигонуклеотидных праймеров, соответствующих трем группам ферментов. Схема расположения праймеров приведена на рисунке 2.

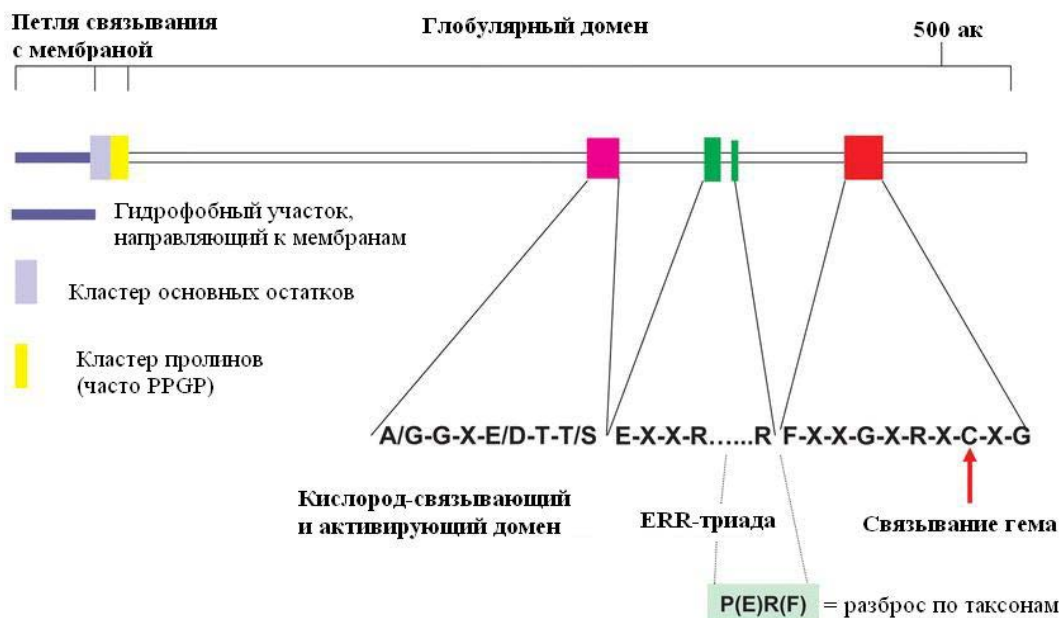


Рисунок 1. Доменная организация цитохромов P450 [5]: пролиновый кластер (Pro-Pro-X-Pro) образующий петлю, которому предшествует кластер основных остатков; гем-связывающая петля, расположенная на внутренней поверхности гема, содержит наиболее характерную для цитохромов P450 консенсусную последовательность (PXXGXRXCXG); I-спираль, включающая консенсусную последовательность (A/G-G-X-D/E-T-T/S), участвующую в связывании и активации кислорода; ERR-триада, включающая аминокислотные остатки (KETLR)

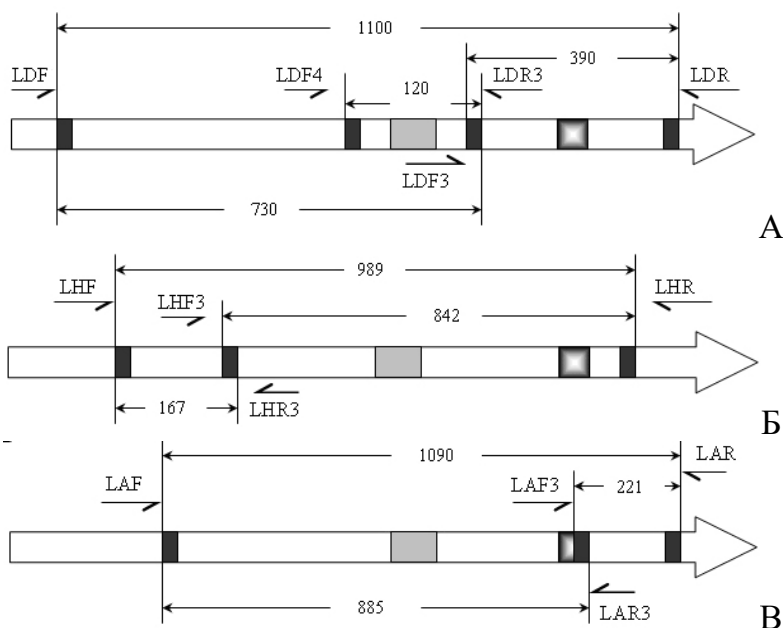


Рисунок 2. Схема расположения праймеров на последовательности мРНК ферментов CYP74: группа ДЭС (А), группа ОГПЛ (Б), группа АОС (В)

Перечисленные три группы ферментов, обозначенные как группы ДЭС, ОПЛ и АОС, были определены следующим образом. В группу ДЭС были включены охарактеризованные дивинилэфирсинтазы растений семейства пасленовых.

Праймеры LDF и LDR оказались строго комплементарны генам этой группы. Праймеры LHF и LHR группы ОПЛ были сконструированы на основе последовательностей гидропероксидазы люцерны (*Medicago truncatula*), апельсина (*Citrus sinensis*), гуавы (*Psidium guajava*), дыни (*Cucumis melo*), помаранца (*Citrus aurantium*), поскольку по сравнению

с другими гидропероксидлиазами эти ферменты обладают большей степенью сходства аминокислотной последовательности и субстратной специфичности с известными дивинилэфирсинтазами. Так, ГПЛ дыни, как и все изученные ДЭС, использует в качестве субстратов 9-гидроперекиси жирных кислот [Stumpe et al., 2001].

С другой стороны, ГПЛ люцерны, гуавы и цитрусовых обладают 13-гидропероксид-специфичностью, но при этом участок, выбранный нами для праймирования, у этих ферментов и дивинилэфирсинтаз обладает наибольшим сходством первичной структуры. Пара праймеров LAF/LAR группы АОС была сконструирована с использованием нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих гидропероксидлиазу тополя (*Populus trichocarpa*, GenBank ID: EF145878) и алленоксидсинтазу льна (GenBank ID: U00428.1). Выбор этой пары основывался на том, что ферменты одного и того же вида, либо филогенетически близких видов, могут иметь сходную нуклеотидную последовательность кодирующих генов. На момент начала исследований среди растений с расшифрованным геномом именно тополь оказался таксономически наиболее близким видом для льна. В базах данных среди охарактеризованных генов тополя присутствовал полный набор последовательностей ферментов CYP74, среди которого, к сожалению, не оказалось ни одной дивинилэфирсинтазы.

С помощью этой системы были клонированы первые 13-специфичные дивинилэфирсинтазы LuDES (*Linum usitatissimum* L., cv. Novotorzhski) [6] и RaDES (*Ranunculus acris*) [7], а также была клонирована одна из первых растительных эпоксиалкогольсинтаз RjEAS (*Ranunculus japonicus*) [8]. Продукты реакции идентифицировались с помощью ЯМР и УФ-спектроскопии. Предпочтительными субстратами LuDES и RaDES являются 13-гидроперекиси линолевой (13-ГПОД) и альфа-линоеновой (13-ГПОТ) кислот, преобразующиеся в дивиниловый эфир – (омега5Z) – этеролевую и (омега5Z) – этероленовую кислоты, соответственно. Основными продуктами реакции SmDES1 и SmDES2 с 13-ГПОТ является (11Z) – этероленовая и (омега5Z) – этероленовая кислоты, соответственно. Предпочтительными субстратами для RjEAS являются 9- и 13-гидроперекиси линолевой кислоты, преобразующиеся в эпокси спирты – 9,10 – эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовую и 11-гидрокси – 12,13 – эпокси-9-октадеценовую кислоты, соответственно. Таким образом, была разработана успешно функционирующая система вырожденных праймеров, с применением которой были идентифицированы новые представители семейства CYP74: LuDES – идентифицированный как первая ДЭС принадлежащая к подсемейству CYP74B; RaDES – ДЭС нового типа открывающая новое подсемейство CYP74Q; RjEAS – вторая растительная ЭАС и первая ЭАС входящая в подсемейство CYP74A.

*Исследования функционирования системы вырожденных праймеров проводились при поддержке гранта МК-5989.2018.4. Кинетические исследования ферментов проводились при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр РАН".*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Lilit Garibyan and Nidhi Avashia. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol.* 2013. 133 (3). P.1–4.
2. Compton T (1990). Degenerate primers for DNA amplification. pp. 39–45 in: PCR Protocols (Innis, Gelfand, Sninsky and White, eds.); Academic Press, New York.
3. Brash AR. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry.* 2009 Sep; 70(13–14) : 1522–31. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.08.005. Epub 2009 Sep 9. Review.
4. Toporkova YY, Gorina SS, Bessolitsyna EK, Smirnova EO, Fatykhova VS, Brühlmann F, Ilyina TM, Mukhtarova LS, Grechkin AN. Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018 Apr; 1863(4) : 369–378. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.01.002. Epub 2018 Jan 8.
5. Bak S, Beisson F, Bishop G, Hamberger B, Höfer R, Paquette S, Werck-Reichhart D. Cytochromes P450. *Arabidopsis Book.* 2011; 9:e0144. doi: 10.1199/tab.0144. Epub 2011 Oct 6.
6. Gogolev YV, Gorina SS, Gogoleva NE, Toporkova YY, Chechetkin IR, Grechkin AN. Green leaf divinyl ether synthase: gene detection, molecular cloning and identification of a unique CYP74B subfamily member. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Feb; 1821(2) : 287–94. doi: 10.1016/j.bbalip.2011.11.003. Epub 2011 Nov 23.
7. Gorina SS, Toporkova YY, Mukhtarova LS, Chechetkin IR, Khairutdinov BI, Gogolev YV, Grechkin AN. Detection and molecular cloning of CYP74Q1 gene: identification of *Ranunculus acris* leaf divinyl ether synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Sep; 1841(9) : 1227–33. doi: 10.1016/j.bbalip.2014.05.005. Epub 2014 May 24.
8. Toporkova YY, Fatykhova VS, Gorina SS, Mukhtarova LS, Grechkin AN. Epoxyalcohol Synthase RjEAS (CYP74A88) from the Japanese Buttercup (*Ranunculus japonicus*): Cloning and Characterization of Catalytic Properties. *Biochemistry (Mosc).* 2019 Feb; 84(2) : 171–180. doi: 10.1134/S0006297919020081.