

УДК 573.2: 577.15

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ЛИПОКСИГЕНАЗНОГО КАСКАДА

С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

Липоксигеназы (ЛОГ) [ЕС 1.13.11.12] представляют собой обширное семейство негемовых железосодержащих белков, которые широко распространены в аэробных организмах: грибах, растениях и животных [1, 2]. ЛОГ катализируют регио- и стереоспецифическое диоксигенирование полиеновых жирных кислот, содержащих (1Z, 4Z) – пентадиеновую систему в своей структуре [3]. Превращение полиеновых жирных кислот в растениях, происходящее при участии липоксигеназ и последующие реакции, в совокупности получили название липоксигеназного каскада [4, 5]. Основными субстратами для ЛОГ в растениях являются линолевая и альфа-линоленовые кислоты, метаболизирующиеся с образованием соответствующих гидроперекисей (Рис. 1), которые в дальнейшем выступают субстратами, по меньшей мере, для семи различных ферментов (пероксигеназ (ПОГ), редуктаз, алленоксидсинтаз (АОС), гидропероксидлиаз (ГПЛ), дивинилэфирсинтаз (ДЭС), эпоксиалкогольсинтаз (ЭАС)), в том числе самих ЛОГ [6]. Благодаря такому разнообразию ферментов, метаболизирующих гидроперекиси жирных кислот, липоксигеназный каскад распадается на семь различных ветвей, приводящих к образованию различных продуктов. АОС, ГПЛ, ДЭС и ЭАС образуют клан СУР74 неклассических цитохромов Р450.



Рисунок 1. Схема превращений ПНЖК в растениях [10]. Красным цветом обозначены ферменты, черным цветом обозначены синтезируемые метаболиты.

Отличительной особенностью ферментов CYP74 от монооксигеназ является отсутствие необходимости в молекулярном кислороде и восстановительных партнерах для протекания реакции; гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) выступают в качестве субстрата и донора кислорода [7, 8]. Синтезируемый в результате совместного действия ЛОГ и ферментов CYP74 широкий спектр метаболитов (гидроперокси-, гидрокси-, оксо- и эпокси-производные жирных кислот, дивиниловых эфиров, летучих альдегидов) (Рис. 1) задействован в процессах роста и развития растений, в ответных реакциях на механическое повреждение, воздействие патогенов и факторов окружающей среды, таким образом участвуя в поддержании гомеостаза [9, 10].

Долгое время ферменты CYP74 обнаруживались только в высших растениях, однако в 2008 году они были описаны у метиловых бактерий и ланцетника [11]. В ходе наших исследований ферменты клана CYP74 были обнаружены у представителей споровых растений [12], бурых водорослей [13], кишечнорастворимых [8], была проведена характеристика их каталитических свойств. Целью данного исследования является сравнительный биоинформационный анализ представителей ферментов CYP74 растений и не растительных организмов. В качестве объектов исследований выступали представители ферментов CYP74 *Solanum tuberosum*, *Physcomitrella patens*, *Asparagus officinalis*, *Nematostella vectensis*, а также предполагаемые ферменты CYP74 *Dendronephthya gigantea* и *Acropora millepora*.

Для выявления закономерностей доменной организации и последующего филогенетического

анализа было проведено выравнивание первичных последовательностей целевых ферментов. Установлено, что предполагаемый фермент CYP74 *A. officinalis*, наряду с референсными последовательностями ферментов CYP74 *S. tuberosum*, *P. patens*, *N. vectensis*, обладает классическим расположением доменов и аминокислотных мотивов: «F/L toggle», гидропероксид-связывающий домен (ГСД), мотивы ETLR и P(E/D) RF, которые формируют так называемую ERR-триаду, а также аминокислотным остатком цистеина в гем-связывающем кармане. На рисунке 2а представлено Logo, формируемое последовательностями целевых ферментов.

В отличие от фермента *A. officinalis*, ферменты *D. gigantea* и *A. millepora*, не показали наличия структур, характерных для ферментов CYP74 и цитохромов P450. В структуре этих белков обнаружили 3 домена: домен, относящийся к белкам семейства каталаз, PLAT-домен и липоксигеназный домен. Ферменты с подобной организацией белковых молекул были выявлены у представителей коралловых полипов, таких как *Plexaura homomalla* [14]. Их каталитическая активность приводит к биосинтезу соединений подобных продуктам АОС, поэтому данные ферменты были обозначены как каталазо-подобные алленоксидсинтазы.

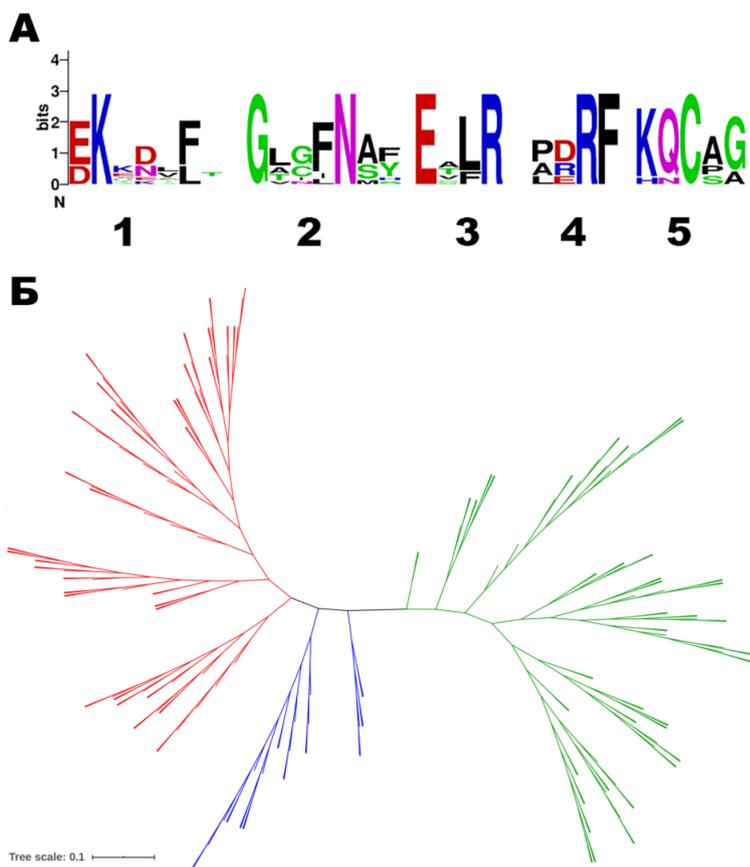


Рисунок 2. А) Logo основных аминокислотных мотивов, формируемое целевыми последовательностями ферментов: 1 – «F/L toggle», 2 – ГСД, 3 – мотив ETLR, 4 – мотив P(E/D) RF, 5 – аминокислотный остаток цистеина в гем-связывающем кармане и его окружение. Б) Филогенетическое древо ферментов CYP74 растений (красные линии), ферментов относящихся к клану CYP74 не растительных организмов (синие линии) и каталазо-подобных АОС (зеленые линии) обнаруженных в базе данных NCBI

Проведенные филогенетические исследования также указывают на принадлежность фермента *A. officinalis* к семейству CYP74, тогда как ферменты *D. gigantea* и *A. milleroga*, группируются с каталазо-подобными ферментами (Рис. 2б).

Для визуализации предполагаемой структуры обнаруженного фермента CYP74 *A. officinalis*, а также ранее охарактеризованного нами фермента CYP74 *N. vectensis* (NvEAS), было проведено гомологичное моделирование на основе установленной кристаллической структуры АОС арабидопсиса (*AtAOS*) [11] (Рис. 3а). Установлено, что общая топология третичной структуры целевых ферментов, относительно расшифрованной структуры *AtAOS*, сохраняется. На рисунке 3б показан результат молекулярного докинга с субстратом – 13-гидроперекисью альфа-линоленовой кислоты (13-ГПОТ). Конформация активного центра целевых белков сохранена, цистеиновая тиолатная группа способна образовывать связь с железом гема; расположение аминокислотных остатков ГСД целевых белков совпадает с таковым расположением у *AtAOS*.

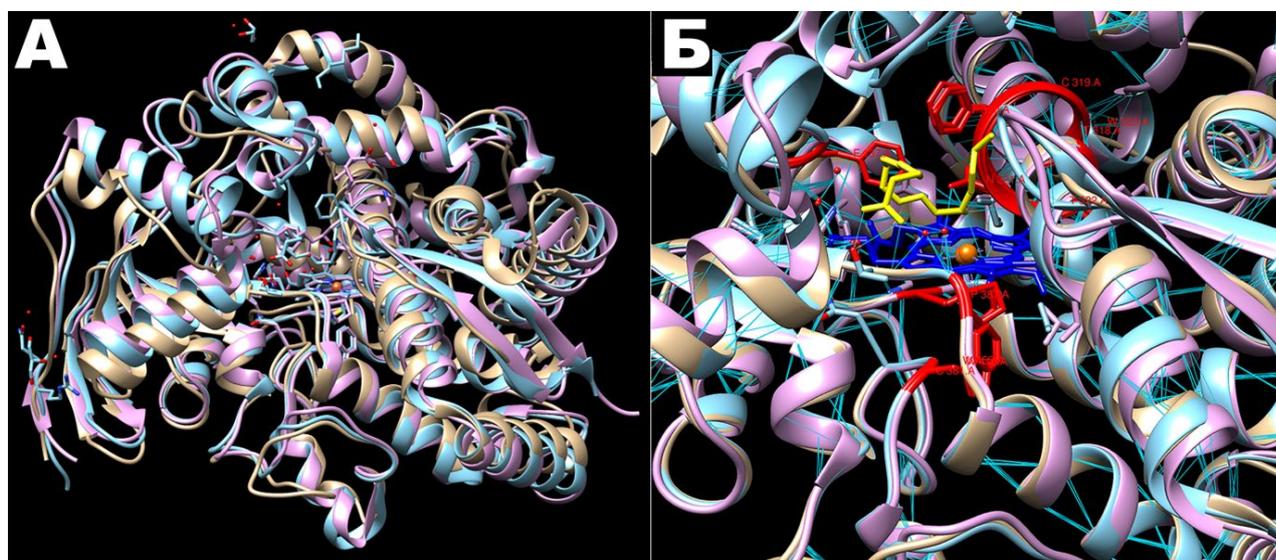


Рисунок 3. А) Результат наложения третичных структур фермента CYP74 *A. officinalis* (сиреневый) и NvEAS (светло-коричневый) относительно расшифрованной структуры *AtAOS* (голубой), Б) Активный центр после молекулярного докинга с субстратом 13-ГПОТ. Желтым цветом обозначен субстрат, синем цветом обозначен гем, красным окрашены основные аминокислотные остатки, взаимодействующие с субстратом и гемом, голубыми линиями указаны водородные связи.

Таким образом, в результате биоинформационного анализа проведенного на основе ферментов CYP74 *S. tuberosum*, *P. patens*, *N. vectensis* с ранее установленными каталитическими свойствами, было показано, что анализируемый фермент *A. officinalis* также принадлежит к представителям ферментов CYP74, тогда как анализируемые ферменты *D. gigantea* и *A. milleroga* обладают структурой, характерной для каталазо-подобных алленоксидсинтаз.

Работы по поиску первичных последовательностей ферментов, в том числе ферментов CYP74 S. tuberosum, P. patens, а также по созданию аминокислотной базы данных проводились при финансовой поддержке гранта МК-903.2020.4. Эксперименты по фолдингу белковых молекул и молекулярному докингу проводились при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-04-01069-а. Филогенетические исследования ферментов CYP74 проводились при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр Российской академии наук".

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Brash A.R. J Biol Chem. 1999 Aug 20; 274(34):23679–82. doi: 10.1074/jbc.274.34.23679.
- [2] Grechkin A.N. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. Prog Lipid Res. 1998 Nov; 37(5):317–52. doi: 10.1016/s0163-7827(98)00014-9.
- [3] Feussner I., Kühn H. Application of lipoxygenases and related enzymes for the preparation of oxygenated lipids. In Enzymes in Lipid Modification, ed. U.T. Bornscheuer. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2000, pp. 309–336.
- [4] Andre E., Hou K. 1932. Sur la présence d'une oxydase des lipides ou lipoxydase dans la graine de soja, Glycine soja Lieb. Compt. Rend. Acad. Sci. 194: 645–647.
- [5] Gardner H.W. Lipoxygenase pathway in cereals, in: Advances in Cereal Science and Technology, Y. Pomeranz, ed., 1988. Vol. 9, pp 161–215.
- [6] Feussner I., Wasternack C. The Lipoxygenase pathway. Annual Review of Plant Biology. 2002. V. 53. P. 275–297.
- [7] Brash A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes. Phytochemistry. 2009. V. 70. P. 1522–1531.
- [8] Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Mukhitova .FK., 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 Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2017 Oct; 1862 (10 Pt A):1099–1109. doi: 10.1016/j.bbalip.2017.07.015.
- [9] Wasternack C., Feussner I. The Oxylin Pathways: Biochemistry and Function Annu Rev Plant Biol. 2018 Apr 29; 69:363–386. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040440.
- [10] Vincenti S., Mariani M., Alberti J. – C., Jacopini S., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Berti L., Maury J. Biocatalytic Synthesis of Natural Green Leaf Volatiles Using the Lipoxygenase Metabolic Pathway. Catalysts 2019, 9, 873.
- [11] Lee D.S., Nioche P., Hamberg M., Raman C.S. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes Nature. 2008 Sep 18; 455(7211):363–8. doi: 10.1038/nature07307.
- [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. Oxylin biosynthesis in spikemoss *Selaginella moellendorffii*: Molecular cloning and identification of divinyl ether synthases CYP74M1 and CYP74M3. Biochim Biophys Acta. 2016 Apr; 1861(4):301–9. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.01.001.
- [13] Toporkova Y.Y., Fatykhova V.S., Gogolev Y.V., Khairutdinov B.I., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Epoxyalcohol synthase of *Ectocarpus siliculosus*. First CYP74-related enzyme of oxylipin biosynthesis in brown algae Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2017 Feb; 1862(2):167–175. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.11.007.
- [14] 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 Jul 13; 287(29):24139–47. doi: 10.1074/jbc. M112.364216.