

Гоголев Юрий Викторович

**ФЕРМЕНТЫ ЛИПОКСИГЕНАЗНОГО КАСКАДА:
СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Казань – 2013

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук (КИББ КазНЦ РАН)

Научный консультант: академик РАН, доктор химических наук,
директор КИББ КазНЦ РАН,
Гречкин Александр Николаевич

Официальные оппоненты: профессор, доктор химических наук,
с.н.с. каф. энзимологии химического факультета
Московского государственного университета
Тишков Владимир Иванович

профессор, доктор биологических наук,
зав. лаб. молекулярных основ внутриклеточной
регуляции Института физиологии растений РАН
Лось Дмитрий Анатольевич

профессор, доктор биологических наук,
зав. лаб. механизмов роста растительных клеток
КИББ КазНЦ РАН
Горшкова Татьяна Анатольевна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биохимии и
физиологии растений и микроорганизмов РАН

Защита состоится 2013 г. в ⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета
Д002.005.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на со-
искание ученой степени доктора наук при КИББ КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань,
ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я № 30, тел/факс (843)2927347, e-mail: gogolev.yuri@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского на-
учного центра РАН.

Автореферат разослан «___» _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Пономарева Анастасия Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Липоксигеназный каскад является источником физиологически активных соединений – оксипинов. У высших растений оксипины отвечают за регуляцию роста, морфогенез, участвуют в формировании системной устойчивости к экстремальным факторам и патогенам [Тарчевский, 2002]. Помимо высших растений, оксипины и ферменты их биосинтеза обнаружены у бактерий, бурых и красных водорослей, кораллов, хордовых и пластинчатых [Lee *et al.*, 2008].

Ключевыми ферментами липоксигеназного каскада являются липоксигеназы и цитохромы семейства CYP74 суперсемейства P450. В зависимости от региоспецифичности действия липоксигеназы растений в основном разделяют на 9- и 13-специфичные, а также обладающие дуалистичными свойствами. Продукты липоксигеназной реакции – гидроперекиси жирных кислот – преобразуются при участии ферментов CYP74: алленоксидсинтаз (АОС), гидропероксидлиаз (ГПЛ), дивинилэфирсинтаз (ДЭС). Алленоксидсинтазы и дивинилэфирсинтазы являются дегидразами, в то время как гидропероксидлиазы – изомеразы. Разнообразие генов семейства CYP74 в геномах различных организмов предполагает и другие типы катализа. К настоящему времени охарактеризовано несколько десятков ГПЛ и АОС, а также несколько ДЭС разных видов растений. Существует мнение, что ферменты последнего класса не имеют широкого распространения в природе.

Интерес к оксипинам 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. Оксипины ответственны за многие свойства растений, характеризующие их в качестве сырья и пищевых продуктов. В этой связи изучение первичных детерминантов катализа ферментов липоксигеназного каскада, исследование их молекулярной эволюции и систематики, разработка моделей катализа представляются актуальными.

Объем экспериментальных и теоретических данных, накопленный в разных лабораториях мира, существенно расширил представления о механизмах ферментативного катализа. Во многих случаях удалось создать термодинамические модели протекания ферментативных реакций. В то же время, ферментативный катализ липоксигеназ и ферментов CYP74 остается недостаточно охарактеризованным. Предложенные модели взаимодействия активного центра некоторых липоксигеназ с различными жирными кислотами объясняют каталитические свойства 13-липоксигеназ, однако не согласуются с экспериментальными данными, полученными при изучении 9-липоксигеназ. Несмотря на большое разнообразие оксипинов, в значительной степени изученными можно считать биосинтез и функции жасмоновой кислоты и ее производных, являющихся продуктами превращения 13-гидроперекисей жирных кислот. В отношении других оксипинов, в частности, производных 9-гидроперекисей жирных кислот, объем знаний остается недостаточным.

Особый интерес представляет молекулярная эволюция ферментов липоксигеназного каскада. Широкое распространение липоксигеназ позволяет предположить их возникновение до цитохромов. Однако отсутствие функциональной значимости гидроперекисей жирных кислот ставит вопрос о возможном включении липоксигеназ в уже существующий метаболический процесс, в котором поступление данного субстрата происходило из других источников, отличных от липоксигеназной реакции.

Филогения и систематика ферментов CYP74 до сих пор остается на стадии разработки. Использование стандартных алгоритмов классификации приводит к объединению в систематические группы функционально не связанных ферментов. Некоторые типичные представители CYP74 по биохимическим характеристикам не удовлетворяют принятым критериям принадлежности к семейству, в связи с чем их предложено включить в одноименный «клан» [Nelson, Werck-Reichhart, 2011]. При этом данный клан рассматривается как продукт поздней эволюции растений, связанной с их выходом на сушу. Однако открытия липоксигеназного каскада у животных, бурых водорослей и прокариот, свидетельствуют о древнем происхождении этого ферментативного пути и его фундаментальном физиологическом значении на ранних этапах развития жизни.

Данные противоречия могут быть следствием малой изученности ферментов CYP74. Так, у классического объекта – льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.), с которого началось изучение ферментов данного семейства, недавно были выявлены новые оксипилены – необычные изомеры дивиниловых эфиров и их производные – линолипины [Chechetkin *et al.*, 2008]. Однако фермент, ответственный за синтез дивиниловых эфиров, до настоящего времени оставался неизученным.

Выяснение процессов, обуславливающих возникновение сложных реакционных комплексов, является одним из фундаментальных вопросов эволюции живых систем. С точки зрения молекулярной филогении ферменты липоксигеназного каскада представляют удобную модель, которая позволяет проследить коэволюцию двух типов ферментов, осуществляющих цепь сопряженных реакций. Детерминированность липоксигеназного каскада в небольшом количестве направлений биосинтеза оксипиленов при одновременной пластичности ферментов, способных к конверсии при минорных модификациях первичной структуры, дает возможность экспериментальной реконструкции эволюционных процессов.

Цель и задачи исследования. Целью исследования является выяснение механизмов каталитического действия ферментов липоксигеназного каскада и построение филогенетической модели, описывающей эволюционное развитие этих механизмов. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Структурно-функциональная характеристика рекомбинантной липоксигеназы ZmLOX3 кукурузы (*Zea mays*).
2. Получение мутантных форм ZmLOX3; сравнение реакций превращения линолевой кислоты и других субстратов при участии фермента дикого типа и его мутантных форм.

3. Построение моделей взаимодействия ZmLOX3 и липоксигеназы GmLOX1 сои (*Glycine max*) с субстратами на основании экспериментальных данных и компьютерного моделирования.

4. Выявление особенностей механизма катализа рекомбинантной алленоксидсинтазы LeAOS3 (CYP74C3) томата (*Lycopersicon esculentum*) в сравнении с алленоксидсинтазами подсемейства CYP74A.

5. Выявление, характеристика и клонирование открытой рамки считывания гена, кодирующего фермент, ответственный за биосинтез (ω 5Z)-этероленовой кислоты у льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.); получение рекомбинантного фермента, его структурно-функциональная характеристика.

6. Получение мутантных форм LeAOS3 и фермента, ответственного за биосинтез (ω 5Z)-этероленовой кислоты у льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.), с модификациями каталитически важных доменов. Сравнение особенностей каталитического действия фермента дикого типа и его мутантных форм.

7. Получение мутантных форм гидропероксидлиазы MtHPL люцерны (*Medicago truncatula*); сравнение особенностей каталитического действия фермента дикого типа и его мутантных форм.

8. Проведение эволюционного анализа генетической информации, накопленной в отношении ферментов липоксигеназного каскада.

9. Построение филогенетических моделей, отражающих молекулярную эволюцию ферментов липоксигеназного каскада высших растений и их таксономическое положение.

Научная новизна работы. На основании экспериментальных данных и результатов компьютерного моделирования определены факторы, влияющие на специфичность окисления субстратов при участии (9S)- и (13S)-липоксигеназ растений (ZmLOX3 и GmLOX1, соответственно). Показано, что позиционирование субстратов в активном центре GmLOX1 и ZmLOX3 различается, однако в обоих случаях субстрат погружается в активный центр метильной концевой группой; инверсии субстрата под действием внешних факторов не происходит. Специфичность действия ZmLOX3 не определяется ориентацией субстрата в активном центре, а детерминируется объемом активного центра, его пространственной структурой, положением ключевых аминокислотных остатков и атома железа.

Выявлены консервативные участки полипептидной цепи ZmLOX3 и предложены варианты мутаций, с высокой вероятностью влияющие на каталитические свойства фермента. В результате единичной аминокислотной замены получена мутантная форма ZmLOX3 с измененной региоспецифичностью.

Впервые показано, что алленоксидсинтаза LeAOS3 подсемейства CYP74C цитохромов P450 является многофункциональным ферментом и катализирует синтез, гидролиз и циклизацию окиси аллена. Показано, что продуктами LeAOS3 являются (9S)- α -кетол и рацемическая смесь *цис*-10-оксо-11-фитоеновой кислоты.

Выявлен ген дивинилэфирсинтазы LuDES льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.), клонирована его открытая рамка считывания. LuDES идентифицирована как первый фермент подсемейства CYP74В, гомологичный 13-гидропероксидлиазам, входящим в состав данного подсемейства, и, вместе с тем, являющийся дивинилэфирсинтазой. На сегодняшний день LuDES единственная известная 13-гидропероксид-специфичная дивинилэфирсинтаза.

Проведен сравнительный анализ первичных и третичных структур монооксигеназ P450 и представителей семейства CYP74; выявлены гипотетические детерминанты катализа – сайты, находящиеся в каталитически важных доменах, имеющих консервативные последовательности у ферментов с разным типом катализа – алленоксидсинтаз, гидропероксидлиаз и дивинилэфирсинтаз. Смоделированы модификации первичной структуры алленоксидсинтазы LeAOS3 томата, гидропероксидлиазы MtHPL люцерны, дивинилэфирсинтазы LuDES льна; проведен сайт-направленный мутагенез соответствующих генов, изучены каталитические свойства мутантных форм ферментов. Впервые показано изменение механизмов каталитического действия ферментов семейства CYP74 в результате замены аминокислотных остатков, находящихся вблизи гема. Получены мутантные формы алленоксидсинтазы LeAOS3, обладающие гидропероксидлиазной активностью, что означает конверсию дегидразного типа реакции в изомеразный. Впервые дивинилэфирсинтаза LuDES превращена в алленоксидсинтазу, которая катализирует преобразование 13-гидроперекиси α -линоленовой кислоты в 12-оксо-10,15-фитодиеновую кислоту и α -кетол. Проведенные превращения ферментов CYP74 могут служить подтверждением дивергенции генов CYP74 в ходе их эволюции от единого гипотетического предка с гидропероксидлиазной активностью, существовавшего у примитивных аэробов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Липоксигеназа ZmLOX3 кукурузы проявляет (9S)-специфичность при окислении линолевой кислоты в нейтральных и щелочных условиях в диапазоне pH 6,5-9,5. Анализ моделей взаимодействия липоксигеназ с субстратами показал, что для ZmLOX3 характерен единственный способ позиционирования субстрата в активном центре, обусловленный проникновением жирной кислоты в субстрат-связывающий карман метильной концевой группой. Аминокислотный остаток Ala562, расположенный в активном центре ZmLOX3, важен для проявления региоспецифичности действия; замена аланина на меньший по размерам глицин приводит к частичному проявлению (13R)-региоспецифичности.

2. Специфичность действия липоксигеназ высших растений не обнаруживает строгой взаимосвязи с общей первичной структурой, что характерно для липоксигеназ животных, грибов и прокариот.

3. 13-специфичные липоксигеназы являются анцесторной группой по отношению к 9-специфичным липоксигеназам, которые образовались монофилетически до дивергенции однодольных и двудольных растений.

4. В отличие от алленоксидсинтаз подсемейства CYP74А, фермент LeAOS3, принадлежащий подсемейству CYP74С, является многофункциональным. LeAOS3 катализирует

синтез, гидролиз и циклизацию окиси аллена. Первичный продукт LeAOS3, окись аллена, после высвобождения из активного центра захватывается тем же ферментом, катализирующим ее вторичные превращения, а именно – стереоспецифический гидролиз с образованием (9*R*)- α -кетола и циклизацию с образованием рацемической *cis*-10-оксо-11-фитоеновой кислоты.

5. Фермент LuDES льна является единственной дивинилэфирсинтазой, классифицируемой по общей первичной структуре как член подсемейства CYP74В цитохромов P450, до сих пор включавшего только 13-гидропероксид-специфичные гидропероксидлиазы. Дивинилэфирсинтаза LuDES льна обладает строгой 13-региоспецифичностью к субстрату; предпочтительным субстратом для нее является 13-гидроперекись α -линоленовой кислоты, основным продуктом является (ω 5*Z*)-этероленовая кислота.

6. В формировании определенного типа катализа ферментов семейства CYP74 принципиальная роль принадлежит центральному домену I-спирали и ERR-триаде.

7. Все ферменты семейства CYP74 относятся к одной близкородственной филогенетической группе, несмотря на широкий спектр каталитических функций. Семейство CYP74 сформировалось на ранних этапах эволюции цитохромов P450 до дивергенции эукариот от последнего общего предка. Предковая форма ферментов CYP74 высших растений дала начало трем большим группам. Первая включала 13-ГПЛ, вторая – 13-АОС, третья – 9/13-АОС, 9-АОС и 9/13-ГПЛ. Дивинилэфирсинтазы являются эволюционно наиболее молодыми ферментами, имеющими полифилетическое происхождение, не завершившееся формированием таксономически обособленных единиц. Субстратная специфичность наряду с типом катализируемой реакции является существенным таксономическим признаком представителей семейства CYP74; дивинилэфирсинтазы связаны с родственными группами общей субстратной специфичностью.

Научно-практическая значимость работы. Результаты работы вносят вклад в понимание функционирования одной из ключевых сигнальных систем растения, способствующей его адаптации к неблагоприятным условиям. Изучены механизмы образования продуктов липоксигеназной сигнальной системы – оксипинов, участвующих в процессах онтогенеза растений, а также в формировании ответа на стрессовые факторы. Многие оксипины являются физиологически активными, бактерицидными соединениями.

В экономическом аспекте актуальными являются исследования липоксигеназного каскада масличных, зерновых и технических культур, а также лекарственных растений. Оксипины во многом определяют ценные технологические, органолептические и лечебные свойства растений, которые могут быть востребованы в медицинской, пищевой и парфюмерной промышленности.

Разработаны системы получения и препаративной очистки липоксигеназ и цитохромов растений, способные найти применение в промышленности. Ферменты с измененными каталитическими свойствами могут быть использованы для создания генетически модифицированных растений, удовлетворяющих требованиям современного сельскохо-

зайственного производства, и стать основой инновационных технологий переработки сырья с использованием биокатализаторов, в том числе иммобилизованных ферментов.

Качественное изменение ферментативного катализа при сайт-направленном мутагенезе представляет потенциальный интерес для практического использования в биоинженерии. Результаты работы могут способствовать разработке алгоритмов направленной модификации белков с целью получения ферментов с заданными свойствами.

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в учреждениях медицинского, сельскохозяйственного, биологического и биотехнологического профилей, занимающихся получением рекомбинантных ферментов, исследованием взаимосвязи структуры и функций белков, а также в учебном процессе при чтении курсов лекций по биохимии, физиологии растений и молекулярной биологии в ВУЗах.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование. Работа проводилась с 2004 по 2013 гг. в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Липоксигеназы и цитохромы семейства CYP74: структура и роль в катализе биосинтеза оксипинов – эндогенных биорегуляторов растений» (гос. рег. №: 01200901959). Исследования поддержаны грантами РФФИ № 09-04-00915-а, 09-04-12222-офи_м, программой президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», грантом ведущей научной школы НШ № 6992.2010.4, Федеральной целевой программой «Проведение научных исследований коллективами научно-образовательных центров» (ГК № 14.740.11.0797 от 30.10.2010). Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Результаты работы доложены на конференции «Современные достижения в биохимии и клеточной биологии растительных липидов» (Солт-Лейк-Сити, США, 2007); на 2-ом Международном семинаре по липидным медиаторам (Вальядолид, Испания, 2008); на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008); на Международном симпозиуме «Регуляторные оксипиновы» (Лозанна, Швейцария, 2009); на 35-ом и 36-ом конгрессах FEBS (Прага, Чешская республика, 2009; Турин, Италия, 2011); на VII Съезде общества физиологов растений России (Нижний Новгород, 2011); на 3-ем Международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2011); на 4-ом Съезде ЕМВО (Ницца, Франция, 2012); на 18-ой Международной конференции «Цитохромы P450: биохимия, биофизика и биотехнология» (Сиэтл, США, 2013); на итоговых конференциях КИББ КазНЦ РАН (2006-2013 гг.).

Публикации. По результатам работы опубликовано семь статей в отечественных и семь в зарубежных рецензируемых изданиях. По докладам на научных мероприятиях опубликовано 50 тезисов.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 345 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы и приложения. В работе представлено 13 таблиц и 92 рисунка. Список литературы включает 395 источников.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методы биоинформатики. Поиск аминокислотных последовательностей липоксигеназы и цитохромов P450 проводили с помощью программы PSI-BLAST в базе данных NCBI и банке данных д-ра Нельсона [<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>]. Множественные выравнивания проводили с применением программы Clustal Omega [Sievers *et al.*, 2011]. Для филогенетического анализа использовали пакет программ MEGA 5 [Tamura *et al.*, 2011]. Трехмерные модели белков строили с помощью пакета программ EzyPred3D [Lambert *et al.*, 2002]. Позиционирование субстрата в активном центре исследовали с помощью программ Autodock 4.2 и AutodockTools 1.5.4 (The Scripps Research Institute). Модели лигандов получали с помощью программы ChemOffice (CambridgeSoft), визуализацию данных проводили с помощью программы PyMol APBS Tool (Carlson Group, University of Michigan). Праймеры конструировали с помощью программы Vector NTI 9 (Invitrogen, США).

Подготовка материала. Рекомбинантные плазмиды, содержащие открытые рамки считывания (ОРС) генов *LeAOS3* [Howe *et al.*, 2000] и *ZmLOX3* [Wilson *et al.*, 2001], были любезно предоставлены доктором Г. Хоу (Университет штата Мичиган, США) и Н. Кэллер (Университет штата Висконсин, США), соответственно. Для клонирования генов ферментов CYP74 льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L., сорт Новоторжский) их экспрессию индуцировали инокуляцией клетками штамма *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 растений, выращенных в течение 35 дней в открытом грунте.

Тотальную ДНК экстрагировали фенольным методом [Георгиев, 1959]; РНК выделяли с помощью коммерческого набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия). Для получения двуцепочечной кДНК использовали коммерческий набор MINT (Евроген, Россия). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в стандартном температурном режиме, от 14 до 40 циклов. Праймеры синтезировали в НПО «Синтол» (Россия). Качество нуклеиновых кислот оценивали после их электрофоретического разделения в агарозном геле; количество определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США). Для выделения ДНК из агарозного геля использовали наборы MiniElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Клонирование амплифицированных фрагментов ДНК проводили с помощью вектора pGem-T Easy (Promega, США). Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Для анализа и сопоставления секвенированных последовательностей применяли программы Sequencing Analysis 5.3.1. и SeqScape Software 2.6. (Applied Biosystems, США).

Для определения последовательностей полноразмерных кДНК использовали метод RACE (Rapid Amplification of cDNA End), основанный на гнездовой ПЦР. Мутации в клонированные гены вводили методом полноразмерной амплификации плазмид с модифицированными праймерами с помощью ПЦР с ДНК-полимеразой KOD (Novagen, США) или Pfu Turbo (Stratagen, США). Реакционную смесь обрабатывали рестриктазой *DpnI* (Fermentas, Литва), гидролизующей метилированную ДНК бактерий.

Получение рекомбинантных белков. Рекомбинантные белки нарабатывали в клетках *E. coli* BL21(DE3)pLysS и Rosetta-gami(DE3)pLysS В с использованием векторов pET-30, pET-32 Ek/LIC, pET-23a (Novagen, США). Протокол был составлен на основе общепринятых методик. Клетки продуцентного штамма *E. coli* выращивали в среде Luria-Bertani (LB), разведенной равным объемом минеральной среды M9, до достижения культурой $OD_{600} = 0,8-1,0$. Клеточную культуру охлаждали до 20 °С и добавляли в нее 0,1 мМ ИПТГ. Для синтеза цитохромов добавляли предшественник гема – δ -аминолевулиновую кислоту – из расчета 115 мг/л. Индуцированные клетки инкубировали 18-24 часа при умеренной аэрации и 16-20 °С, после чего собирали центрифугированием, суспендировали и разрушали в лизирующем буфере BugBuster (Invitrogene, США).

Очистку ферментов CYP74 проводили металлоаффинной хроматографией на колонке Bio-Scale Mini Profinity IMAC (Bio-Rad, США). Содержащую белок фракцию подвергали ультрафильтрации через фильтр AmiconUltra 50k (Millipore, США). Рекомбинантную липоксигеназу ZmLOX3 собирали высоливанием ($(NH_4)_2SO_4$, 20-50 % насыщения), диализовали и последовательно подвергали анионообменной (Q-Sepharose) и гидрофобной (Octyl-Sepharose) хроматографии.

Биохимическая характеристика ферментов. (9Z,11E,13S)-13-гидроперокси-(9,11)-октадекадиеновую кислоту (13-гидроперекись линолевой кислоты, 13-ГПОД) и (13S)-гидроперокси-(9Z,11E,15Z)-октадекатриеновую кислоту (13-гидроперекись α -линоленовой кислоты, 13-ГПОТ) получали окислением линолевой и α -линоленовой кислот, соответственно, при участии соевой липоксигеназы (Sigma-Aldrich, США). (9S,10E,12Z)-9-гидроперокси-(10,12)-октадекадиеновую кислоту (9-гидроперекись линолевой кислоты, 9-ГПОД) и (9S,10E,12Z,15Z)-гидроперокси-(10,12,15)-октадекатриеновую кислоту получали в результате инкубации линолевой и α -линоленовой кислот, соответственно, с липоксигеназой томата. Гидроперекиси очищали высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на колонке Separon SIX (5 мкм, 3,2×150 мм, Tessek, Чехия).

Реакцию липоксигеназного окисления проводили в насыщенном кислородом 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 7,0 или 9,0), содержавшем 0,3 мМ субстрата. Активность ферментов CYP74 определяли по снижению характерного для гидроперекисей жирных кислот оптического поглощения при 234 нм. Анализ проводили в 0,05 М Na-ацетатном (рН 5,0), Na-фосфатном (рН 6,0-8,0), трис-HCl (рН 7,5-8,5) и глицин-NaOH (рН 9,0) буферах. Для расчета скорости реакций использовали начальные линейные участки кинетических кривых. Кинетические параметры рассчитывали по установке наборов данных для насыщающей модели с одним сайтом связывания простого лиганда с помощью программного обеспечения SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., США).

Продукты реакций экстрагировали смесью этилацетата и гексана (1:1), высушивали, перерастворяли в метаноле и наносили на колонку Nucleosil 5 ODS (250×4,6 мм) (Macherey-Nagel, Германия) с обращенной фазой. Растворитель нужных фракций высушивали. Остаток перерастворяли в ацетоне и наносили на две соединенные колонки Separon SIX с нормальной фазой. Для протонирования жирных кислот в систему растворителей

добавляли ледяную уксусную кислоту (1:1000). Фракции ВЭЖХ на нормальной фазе, соответствующие отдельным пикам продуктов, метилировали диазометаном. Метилловые эфиры анализировали хирально-фазовой ВЭЖХ на колонке Chiralcel OD-H (Daicel Chemical Industries, Япония) в смеси растворителей гексан/изопропанол (97:3 по объему).

Образцы для ГХ-МС готовили по протоколу, разработанному ранее [Grechkin *et al.*, 2007]. Реакционную смесь экстрагировали смесью гексана с этилацетатом (1:1). Продукты высушивали, растворяли в метаноле и восстанавливали в присутствии NaBH_4 . Восстановленные продукты метилировали диазометаном, диазометан выпаривали, продукты растворяли в метаноле и гидрировали водородом над PtO_2 . Продукты силилировали смесью пиридин/гексаметилдисилазан/триметилхлорсилан (2:1:2). После упаривания силилирующей смеси продукты экстрагировали гексаном. Очистку продуктов проводили с помощью ВЭЖХ, после чего проводили их анализ методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) путем полного спектрального сканирования ионов в диапазоне отношений массы к заряду от 50 до 650 с помощью масс-спектрометра QP5050A, соединенного с газовым хроматографом GC-17A (Shimadzu, Япония).

Для определения пространственной структуры оксигенированных жирных кислот и подтверждения данных по геометрической изомерии применяли метод спектроскопии протонного ядерного магнитного резонанса. ^1H -ЯМР спектры исследуемых веществ, растворенных в CDCl_3 , и 2D-COSY регистрировали с помощью спектрометра Avance 600 (Bruker, Германия) при рабочей частоте 600 МГц. Эксперименты по гомоядерному ^1H двойному резонансу проводили с помощью того же инструмента.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Биохимическая характеристика рекомбинантной липоксигеназы ZmLOX3 кукурузы обыкновенной (*Zea mays*). Нарботку рекомбинантного фермента ZmLOX3 проводили в клетках штамма *E.coli* Rosetta-gami(DE3)pLysS В. Оптимизация условий экспрессии гена *ZmLOX3* позволила достичь высокой каталитической активности фермента. Его очистку проводили комбинацией методов ионообменной и гидрофобной хроматографии. В табл. 1 представлены результаты типичного эксперимента.

Табл. 1. Каталитическая активность препаратов рекомбинантной ZmLOX3.

Стадия очистки	Белок, мг	Активность, ед./мг	Выход, %
Клеточный лизат	1570	132	100
Фракция 20-50 % насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	435	390	82
Фракция элюента после Q-Sepharose	22	4180	44
Фракция элюента после Octyl-Sepharose	4,2	9970	20

Согласно теории обратной ориентации, предложенной Гарднером [Gardner, 1989], появление 9-гидропероксипроизводных жирных кислот связано с тем, что в кислых условиях карбоксильная концевая группа жирной кислоты находится в неионизированном со-

стоянии и способна погружаться в субстрат-связывающий карман. При защелачивании реакционной среды ионизация карбоксильной группировки заставляет жирную кислоту переориентироваться; происходит погружение в активный центр метильной концевой группы, что ведет к образованию 13-гидропероксипроизводных жирных кислот.

Скорости и продукты окисления линолевой и α -линоленовой кислот при участии ZmLOX3 исследовали при разных значениях pH. Было установлено, что вне зависимости от pH среды преобладающим продуктом реакции являлись (9S)-гидроперекиси жирных кислот (табл. 2). В отличие от опубликованных данных для (9S)-липоксигеназ, регио- и стереоспецифичность ZmLOX3 не зависела от условий реакции.

Скорость окисления α -линоленовой кислоты была меньше, чем линолевой. Согласно модели, предложенной для ЛОГ млекопитающих [Kuhn *et al.*, 1990], субстрат должен позиционироваться так, чтобы пентадиеновая группировка связалась с определенным ключевым аминокислотным остатком; взаимодействие акцептора с водородом прохирального центра субстрата должно быть энергетически выгодным. Вероятно, взаимодействие пентадиеновой группировки, центром которой является 11-ый атом углерода, с соответствующим аминокислотным остатком активного центра ZmLOX3 происходит как в случае α -линоленовой, и линолевой кислот. Это обеспечивает специфичность реакции. Однако для α -линоленовой кислоты энергетически выгодным является удаление атома водорода от прохирального центра другой пентадиеновой группировки (9-го атома); увеличение расстояния от акцептора водорода до пентадиеновой группировки с прохиральным центром на 11-ом атоме углерода снижает скорость реакции.

2.2. Направленная модификация первичной структуры ZmLOX3. Для выяснения особенностей первичной структуры и филогенетического положения ZmLOX3 проводили множественное выравнивание аминокислотных последовательностей липоксигеназ растений, для которых получены данные о специфичности действия. Кроме того, с помощью методов компьютерного моделирования нами была построена трехмерная модель ZmLOX3. Полученные данные свидетельствуют о том, что разделение липоксигеназ на группы по специфичности не обнаруживает строгого соответствия степени схожести первичных структур. В то же время, согласно сравнительному

	а б
GmLox1 (527)	LLTPHYRNNMNI INALARQ SLINANGI
VLXD (553)	LLYPHYRDTININ GLARQ SLINADGI
GmLox3 (546)	LLHPHYRDTMNIN GLARLS LVNDGGV
VLXB (541)	LLFPHYRDTMNIN SLARKS LVNADGI
ZmLox3 (547)	LLSSHFRDTMT INALARQ TLINGGGI
Consensus (574)	LLPHIRDTMNIN ALARQ SLINAGI

Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей липоксигеназ сои GmLOX1, VLXD, GmLOX3, VLXB и кукурузы ZmLOX3. *a* – Ala560, *б* – Ala562 в последовательности ZmLOX3.

анализу для проявления 13-специфичности действия липоксигеназ необходимо наличие в области 537-580 мотива INGLAR или INALGR (рис. 1). В отличие от 13-специфичных липоксигеназ, в последовательности 9-специфичного фермента ZmLOX3 присутствует мотив INALAR.

В полипептидной цепи рекомбинантного фермента ZmLOX3 были проведены замены аминокислотных остатков A560G и A562G. Было обнаружено, что преобладающим продуктом окисления линолевой кислоты при участии ZmLOX3 A560G была (9*S*)-гидроперекись. Количество минорных продуктов (9*R*)-, (13*S*)-, (13*R*)-гидроперекисей линолевой кислоты составляло не более 3 %, что соответствовало профилю продуктов окисления субстрата при участии ZmLOX3 дикого типа (табл. 2). Полученный результат согласуется с компьютерной моделью, согласно которой боковая группировка Ala560 не участвует в формировании субстрат-связывающего кармана. Продуктами окисления линолевой кислоты при участии ZmLOX3 A562G являлись 9- и 13-гидроперекиси в соотношении 68,5:31,5. С помощью хирально-фазовой ВЭЖХ показано, что среди 9-гидроперекисей линолевой кислоты преобладали (*S*)-энантиомеры (97 %), тогда как среди 13-гидроперекисей преобладали (*R*)-энантиомеры (96 %). Для ZmLOX3 дикого типа константа Михаэлиса для линолевой кислоты составила 20,2 мкМ, тогда как для ZmLOX3 A562G – 3,2 мкМ. Таким образом, в результате мутации A562G липоксигеназы ZmLOX3 кукурузы была изменена региоспецифичность каталитического действия фермента.

Табл. 2. Процентное соотношение продуктов окисления линолевой кислоты при участии ZmLOX3 дикого типа и ее мутантных форм A560G и A562G.

фермент	гидроперекиси линолевой кислоты				суммы продуктов	
	(9 <i>S</i>)-	(9 <i>R</i>)-	(13 <i>S</i>)-	(13 <i>R</i>)-	(9 <i>S</i>)- + (13 <i>R</i>)-	(9 <i>R</i>)- + (13 <i>S</i>)-
ZmLOX3	97,5 %	1 %	0,6 %	0,9 %	98,4 %	1,6 %
ZmLOX3 A560G	97,7 %	0,8 %	0,7 %	0,8 %	98,5 %	1,5 %
ZmLOX3 A562G	66,4 %	2,1 %	1,3 %	30,2 %	96,6 %	3,4 %

Согласно гипотезе Коффа [Coffa, Brash, 2004] для каталитической активности (13*S*)-специфичных липоксигеназ оптимальными являются щелочные условия, когда карбоксильная концевая группа жирной кислоты ионизирована и субстрат входит в активный центр фермента метильной концевой группой. Для образования (9*S*)-гидроперекиси субстрат должен проникнуть в активный центр неионизированной карбоксильной группой при кислых рН. Альтернативная гипотеза заключается в том, что ориентация субстрата всегда соответствует его погружению в активный центр метильной концевой группой. Ключевую роль играет боковая группа аминокислотного остатка Ala542 GmLOX1 (Ala562 ZmLOX3), расположенного у входа в субстрат-связывающий карман. У (13*S*)-специфичных липоксигеназ она закрывает от молекулы кислорода 9-ый атом углеродной цепи субстрата. У (9*S*)-специфичных липоксигеназ боковая группа остатка аланина блокирует 13-ый атом. При замене остатка аланина на менее объемный остаток глицина углерод в 13-ом положении открывается для присоединения кислорода. Поэтому мутантная форма ZmLOX3 A562G катализирует образование не только (9*S*)-, но и (13*R*)-гидроперекиси линолевой кислоты.

Ранее высказано предположение, что у некоторых липоксигеназ, в частности, (8*R*)-ЛОГ коралла *Plexaura homomalla* субстрат-связывающий центр представляет собой не карман, а U-образный канал [Neau *et al.*, 2009]. В этом случае специфичность действия липоксигеназы может зависеть от ориентации субстрата в канале. До настоящего времени мы не располагаем данными о трехмерной структуре (9*S*)-специфичных липоксигеназ. Однако использование методов биоинформатики позволило построить пространственную модель фермента на основании сходства аминокислотных последовательностей с липоксигеназами, для которых данные рентгеноструктурного анализа получены.

2.3. Моделирование механизма ферментативного действия ZmLOX3. Согласно филогенетическим данным специфичность действия липоксигеназ определяется не протяженными последовательностями, а компактными доменами. При этом для липоксигеназ характерны разные спектры специфично окисляемых субстратов. Так, (13*S*)-липоксигеназа GmLOX3 сои, в отличие от ZmLOX3, специфично окисляет полиненасыщенные жирные кислоты длиной 20 и 22 углеродных атома, хотя и с меньшей эффективностью, чем линолевую и α -линоленовую кислоты. При этом как GmLOX3, так и ZmLOX3 способны использовать в качестве субстрата сложные липиды [Чечеткин и соавт., 2009]. Данные о пространственной структуре 13-ЛОГ GmLOX1 и GmLOX3, а также комплекса GmLOX3 с аналогом субстрата были получены методом рентгеноструктурного анализа [Dainese *et al.*, 2005]. Эти данные были использованы нами при конструировании пространственной модели ZmLOX3 (рис. 2).

Полученная модель ZmLOX3 обладает значительным сходством с пространственной структурой соевых липоксигеназ. N-концевой PLAT-домен ZmLOX3 длиной 160 аминокислотных остатков участвует во взаимодействии с мембранами и свободными жирными кислотами. В состав PLAT-домена входят аминокислотные остатки Asp31 и Glu120, необходимые для связывания Ca^{2+} , и Lys114. Благодаря Lys114 обеспечивается ассоциация белка с мембраной, либо липопротеин-связанным субстратом. В состав C-концевого домена входит третий Ca^{2+} -связывающий аминокислотный остаток Glu194.

Для (8*R*)-липоксигеназы коралла, GmLOX1 и ZmLOX3 провели моделирование взаимодействия субстрата и активного центра (рис. 3) и определили следующее. Активный центр GmLOX1 формируется тремя полостями, соединяющимися у атома железа. Жирная кислота в активном центре может располагаться одним из двух способов (рис. 4). В первом случае карбоксильная концевая группа субстрата фиксируется водородными связями с Thr257 (GmLOX1) в полости I (рис. 4B). Углерод, от которого отрывается водород, располагается в непосредственной близости (3 Å) от атома железа. Алифатическая часть субстрата располагается в полости II. Во втором случае часть субстрата находится в полости I в непосредственной близости от аминокислотных остатков Leu255, Glu256, Thr259, Ile538, Ile753, Leu754 и Ile839; остальная часть субстрата располагается в полости III (рис. 4Г). Таким образом, специфичность действия GmLOX1 при использовании в качестве субстратов жирных кислот с разной длиной углеродной цепи объясняется возможностью их разного позиционирования в активном центре.

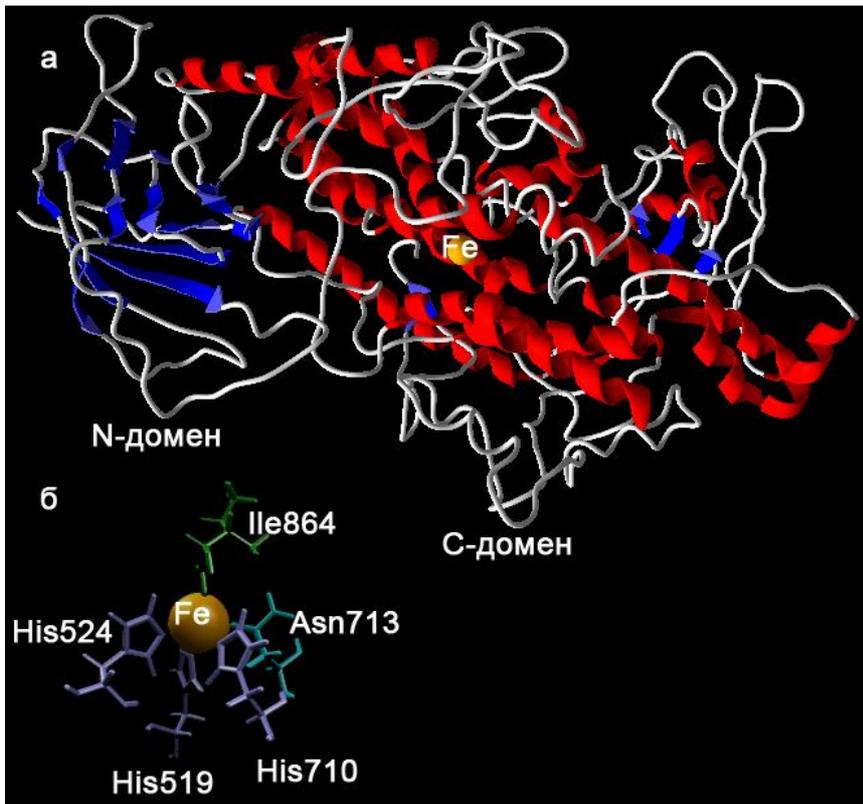


Рис. 2. Модель трехмерной структуры ZmLOX3 кукурузы. **а** – общая структура фермента, **б** – расположение боковых групп аминокислотных остатков лигандов железа. Консервативными лигандами железа ZmLOX3 являются аминокислотные остатки His519, His524, His710, Asn713 и Ile864. Для N-концевого домена характерно наличие β -складчатых областей; большую часть C-концевого домена, составляют α -спирали.

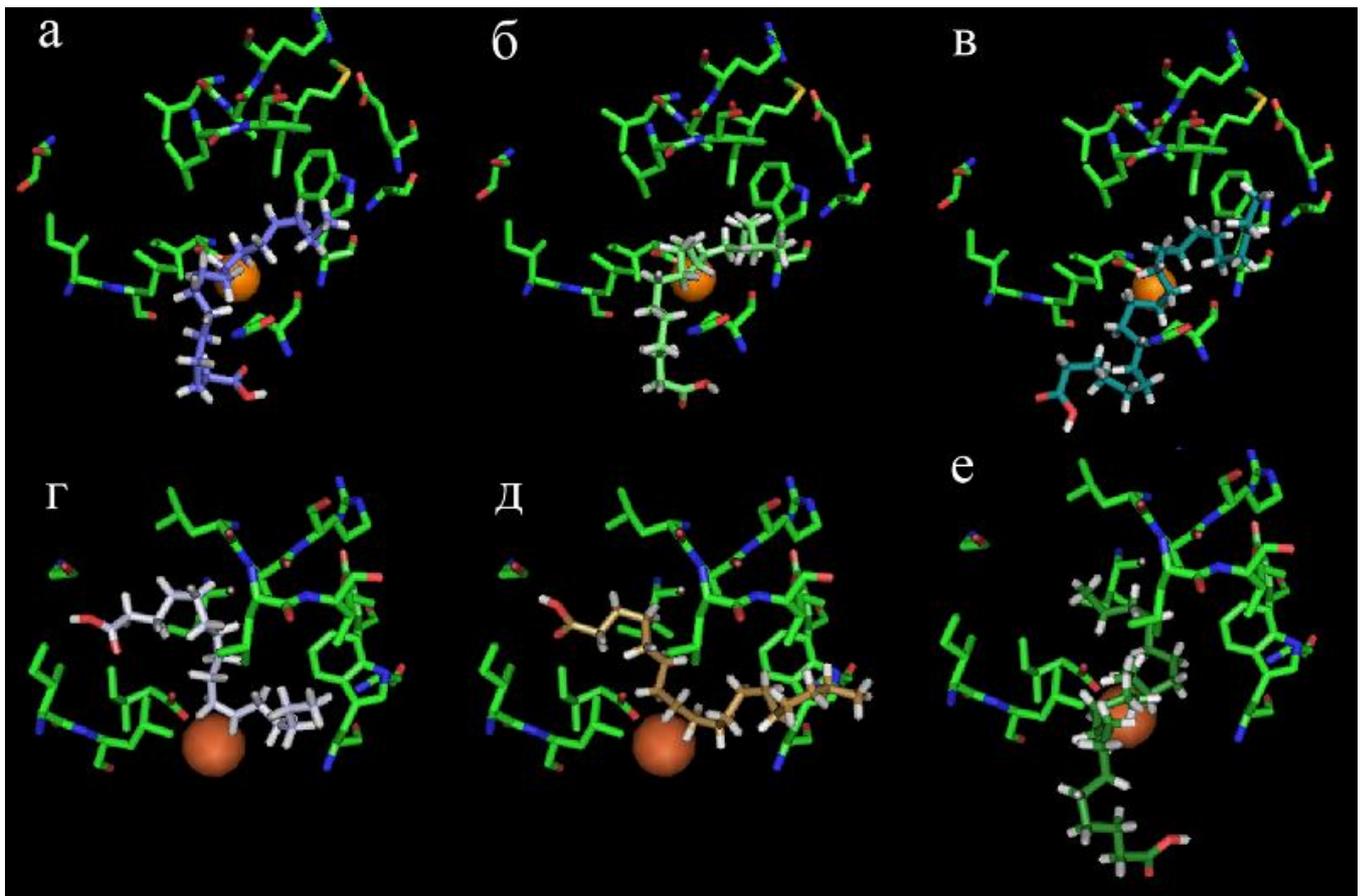


Рис. 3. Положения субстратов в активных центрах ZmLOX3 (**а**, **б**, **в**) и GmLOX1 (**г**, **д**, **е**), рассчитанные с помощью программы Autodock 4.2. Субстраты: **а**, **г** – (7Z,10Z,13Z)-гексадекатриеновая, **б**, **д** – α -линоленовая, **в**, **е** – (13Z,16Z)-докозадиеновая кислоты.

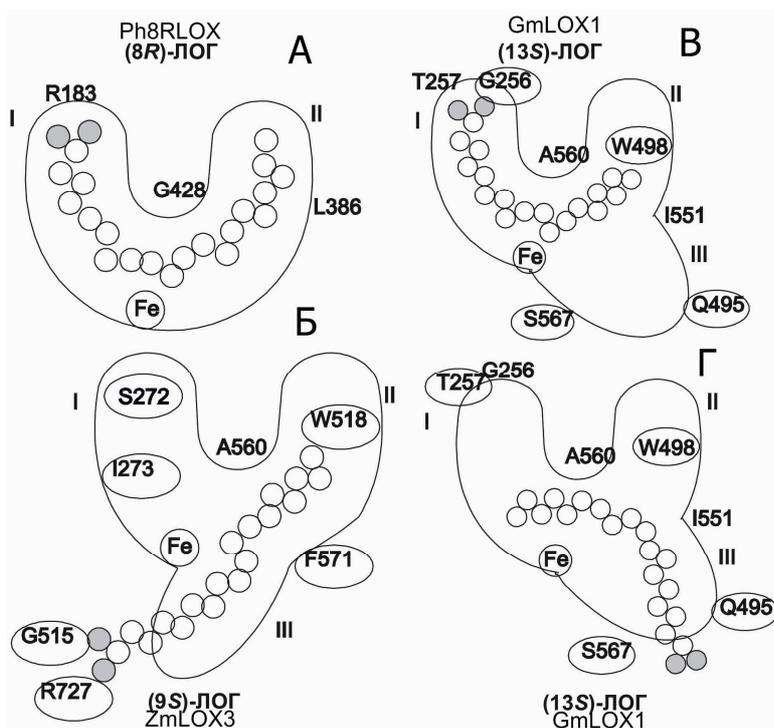


Рис. 4. Модели позиционирования субстрата в активном центре липоксигеназ. А – «U»-образная модель (8*R*)-ЛОГ коралла, Б – ZmLOX3, В – GmLOX1 при взаимодействии с субстратами C<20, Г – GmLOX1 при взаимодействии с субстратами C≥20 и сложными липидами. Римскими цифрами обозначены полости I, II, и III.

ема субстрат-связывающей полости соевой липоксигеназы. В то же время, аминокислотный остаток Trp498 перекрывает доступ к другой части U-образного канала (рис. 4Б-Г). Таким образом, предложенная для (8*R*)-липоксигеназы коралла модель U-образного канала не соответствует структуре GmLOX1. Аналогичный вывод можно сделать для расчетной модели ZmLOX3, поскольку в соответствующих сайтах также находятся остатки аланина и триптофана.

В случае ZmLOX3 объем доступный для субстрата несколько меньше в сравнении с объемом субстрат-связывающей полости GmLOX1. Боковые группы аминокислотных остатков Ser272 и Ile273 ZmLOX3, соответствующих Gly256 и Thr257 у GmLOX1, перегородивают проход в полость I, ограниченную с другой стороны приподнятым по сравнению с GmLOX1 атомом железа (рис. 4Б). Боковая группа Phe571 (Ile551 у GmLOX1) не позволяет алифатической части субстрата проникнуть в полость II. Этот сайт обуславливает различия объема и положения субстрат-связывающей полости III у 9-ЛОГ и 13-ЛОГ. Сайт-направленный мутагенез соответствующего фенилаланина привел к изменению специфичности действия ЛОГ [Hornung *et al.*, 1999]. Полость III частично пе-

Сопоставление пространственных структур GmLOX1 и (8*R*)-липоксигеназы коралла (рис. 4А) [Neau *et al.*, 2009] выявило, что аминокислотные остатки, образующие «U»-образный субстрат-связывающий канал (8*R*)-липоксигеназы, в последовательности GmLOX1 располагаются сходным образом, однако имеется ряд существенных различий. В последовательности GmLOX1 в положении 539 находится лейцин вместо изолейцина в соответствующем положении у липоксигеназы коралла, Ala560 – вместо Gly, Ala503 – вместо Leu, Trp498 – вместо Leu в соответствующих положениях. В случае кораллового фермента карбоксильная группа субстрата фиксируется на Arg183. У GmLOX1 этой позиции соответствует Gly256. Аланин в позиции 503 GmLOX1 вместо лейцина в соответствующем положении фермента коралла дает увеличение объ-

рекрывается с полостью II. Боковые группы аминокислот дна полости III у ZmLOX3 смещены таким образом, что субстрат располагается ближе к атому железа. Меньший объем субстрат-связывающей полости ZmLOX3 накладывает ограничения на конформацию субстрата при его позиционировании возле атома железа. ZmLOX3 имеет единственный канал для проникновения субстрата через полость III, и для нее выявлен только один способ позиционирования субстратов, позволяющий специфично окислять жирные кислоты с длиной углеродной цепи 18 и 16 атомов.

Таким образом, 9- и 13-специфичность липоксигеназных реакций не определяется случайным позиционированием субстрата, зависящим от условий реакции, а детерминруется структурными особенностями соответствующих липоксигеназ.

Представленные результаты позволяют заключить, что 9-липоксигеназный путь не является второстепенным ответвлением липоксигеназного каскада, связанным с образованием побочных продуктов, а представляет собой самостоятельное направление адаптивной эволюции. Эволюционное закрепление 9-липоксигеназного пути у цветковых связано с важной физиологической ролью образуемых оксипинонов для этих растений. Узкий диапазон субстратной специфичности 9-липоксигеназ, а также результаты сайт-направленного мутагенеза, приводящие к частичной конверсии (реверсии) специфичности, свидетельствуют об их происхождении от 13-липоксигеназ.

На следующем этапе липоксигеназного каскада, вслед за липоксигеназами, каталитическую эстафету принимают цитохромы P450 семейства CYP74. Изучению уникальных свойств некоторых из них были посвящены наши дальнейшие исследования.

2.4. Участие (7S)-гидроперекиси гексадекатриеновой кислоты (ГДК) в липоксигенажном каскаде. В липоксигенажном каскаде гидроперекиси линолевой или α -линоленовой кислот преобразуются ферментами семейства CYP74 суперсемейства цитохромов P450. Ранее было показано, что гексадеканоиды также являются нативными субстратами 9- и 13-липоксигеназ [Чечеткин и др., 2009]. Исследование возможности дальнейшего превращения гидроперекисных производных гексадеканоидов в липоксигенажном каскаде представляет значительный интерес. В наших экспериментах мы инкубировали (7S)-гидроперекись гексадекатриеновой кислоты с очищенными рекомбинантными ферментами CYP74: алленоксидсинтазой ZmAOS1 кукурузы и дивинилэфирсинтазой NtDES табака. Субстрат эффективно превращался при участии ZmAOS1 в 7-гидрокси-8-оксо-(10Z,12Z)-гексадекатриеновую, при участии NtDES – динор-колнеленовую кислоты.

Таким образом, (7S)-гидроперекись ГДК может быть использована в качестве субстрата дивинилэфирсинтазами и алленоксидсинтазами. Эффективное и специфичное окисление ГДК при участии липоксигеназ *in vitro* и превращение образуемой гидроперекиси в последующих реакциях, катализируемых ферментами CYP74, указывают на возможность существования у растений наряду с октадеканоидным гексадеканоидного липоксигенажного каскада. Физиологическое значение данного каскада не выявлено.

2.5. Структурные особенности ферментов семейства CYP74. Все цитохромы P450 имеют консервативные «субстрат-распознающие сайты» (CPC), например, I-спираль. Входящий в ее состав «кислород-связывающий домен» участвует в катализе монооксигеназной реакции [Denisov *et al.*, 2005] и имеет консервативную последовательность A/G-G-X-D/E-T-T/S. Поскольку для функционирования ферментов CYP74 не требуется наличие молекулярного кислорода, аминокислотные остатки, участвующие в связывании и активации кислорода, в последовательности ферментов CYP74 отсутствуют. Проведенное сопоставление первичных структур I-спиралей классической монооксигеназы цитохрома P450 2c8 человека (*Homo sapiens*) и алленоксидсинтазы AtAOS *Arabidopsis thaliana* выявило, что абсолютно консервативный и необходимый для катализа монооксигеназной реакции остаток треонина (T) монооксигеназы P450 2c8, входящий в состав «кислород-связывающего домена», соответствует консервативному для всех ферментов CYP74 остатку аспарагина (N) AtAOS:

AVSDLFGAGTE (T)	TSTTLRYSLLLLLLK	P450 2c8
ATHNLLFATCF (N)	TWGGMKILFPNMVK	AtAOS

Согласно результатам сопоставления третичных структур каталитических центров AtAOS, расшифрованной в работе [Lee *et al.*, 2008], и монооксигеназы P450 2c8, расшифрованной в работе [Schoch *et al.*, 2003], в структуре ферментов CYP74 «кислород-связывающему домену» соответствует последовательность, названная нами «центральный домен I-спирали» (IHCD) (рис. 5). Мы предполагаем, что функция этого домена заключается во взаимодействии с гидроперекисной группировкой субстрата и непосредственном участии в катализе ферментов.

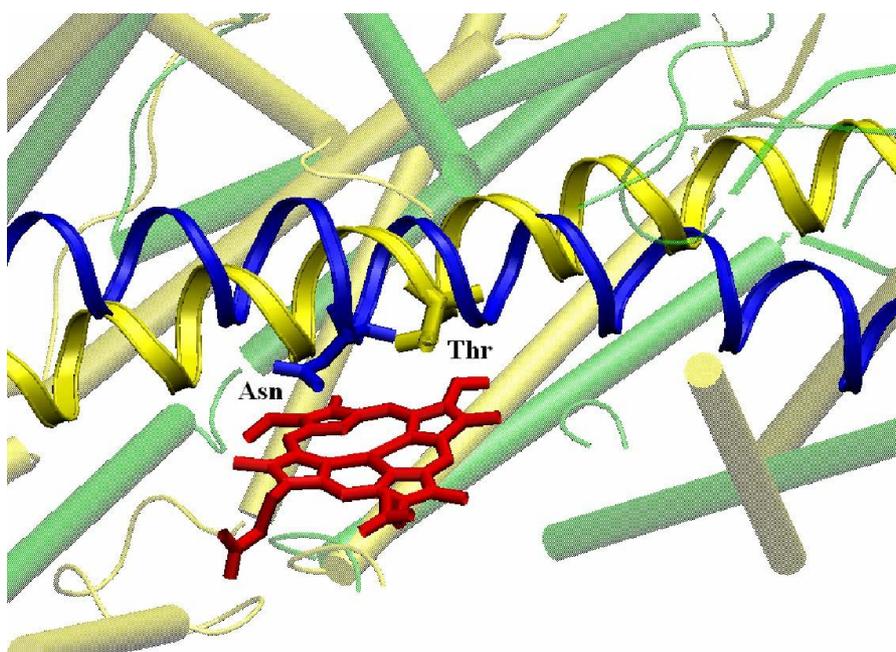


Рис. 5. Результат сопоставления третичных структур каталитических центров монооксигеназы P450 2c8 и AtAOS, проведенного с помощью программы VMD 1.8.6. Красным цветом отмечены гемы обоих ферментов, желтым – I-спираль P450 2c8, синим – I-спираль AtAOS. Желтыми цилиндрами выделены α -спирали P450 2c8, зелеными – α -спирали AtAOS.

2.6. Биохимическая характеристика рекомбинантной алленоксидсинтазы LeAOS3 (CYP74C3) томата (*Lycopersicon esculentum*). В качестве модельного объекта исследования каталитических свойств 9-гидропероксид-специфичных цитохромов CYP74 использовали рекомбинантную алленоксидсинтазу LeAOS3 томата. Для ее наработки был использован бактериальный продуцент на основе штамма *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Очистка фермента методом металлоаффинной хроматографии позволила получить активный препарат LeAOS3 не менее 90 % чистоты.

Все алленоксидсинтазы (подсемейств CYP74A и CYP74C) катализируют синтез короткоживущих окисей аллена. Образующиеся при участии АОС подсемейства CYP74A окиси аллена на следующем этапе циклизируются с образованием циклопентенонов, либо спонтанно гидролизуются с образованием α - или γ -кетолов. Циклизация протекает спонтанно, либо при участии алленоксидциклаз (АОЦ), и зависит от наличия двойной связи в β,γ -положении по отношению к оксирану. Окиси аллена, продуцируемые из линолевой кислоты, спонтанно гидролизуются, но не циклизируются [Grechkin *et al.*, 2000]. В отличие от этого, среди продуктов инкубации 9-ГПОД с LeAOS3 (CYP74C3) наряду с (12Z)-9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовой кислотой (α -кетолом) присутствует циклопентенон – 10-оксо-11-фитоеновая кислота (10-ОФЕК) (рис. 6) [Hamberg, 2000]. Это явление до настоящего времени не получило объяснения.

Для биохимической характеристики LeAOS3 продукты инкубации 9- и 13-гидроперекисей жирных кислот с LeAOS3 анализировали с помощью ГХ-МС в виде метиловых эфиров триметилсилил-производных (Me/TMC) (рис. 7). Для выявления зависимости профиля продуктов реакции от концентрации LeAOS3 9-ГПОД (100 мкг) инкубировали с различными количествами LeAOS3 при 0 °С в течение 10 секунд. Поскольку ожидаемым первичным продуктом каталитического действия LeAOS3 является нестабильная окись аллена (12Z)-9,10-эпоксиоктадека-10,12-диеновая кислота (9,10-ЭОД), продукты инкубации после быстрой экстракции подвергали метанолизу. Эта стадия позволяла регистрировать наличие окиси аллена, эффективно превращая 9,10-ЭОД в рацемический метоксикетон [Hamberg, Hughes, 1989].

В результате инкубации субстрата с 0,5 мкг LeAOS3 (рис. 7А) основным улавливаемым продуктом был метоксикетон **3a** (рис. 6), соответствующий окиси аллена 9,10-ЭОД I. Среди продуктов реакции присутствовал α -кетол **4a** – продукт гидролиза 9,10-ЭОД. Идентификацию соединения **3a** и α -кетола **4** (Me/TMC) подтвердили данные масс-спектров (рис. 8). Кроме того, наблюдалось появление двух дополнительных продуктов, **1a** и **2a** (в виде метиловых эфиров **1** и **2**). Соединения **1** и **2** идентифицировали как циклопентеноны – *транс*- и *цис*-10-оксо-11-фитоеновая кислоты (10-ОФЕК).

При увеличении концентрациями LeAOS3 (2, 5 или 40 мкг/мл) профили продуктов менялись (рис. 7). Регистрируемое количество метоксикетона постепенно снижалось; уменьшение пика сопровождалось увеличением пиков **1** и **2**, а также пика α -кетола. При этом скорость преобразования 9,10-ЭОД в присутствии LeAOS3 была значительно выше, чем ожидаемая скорость спонтанного превращения окиси аллена (время полужизни 30

секунд [Hamberg, 2000]). На основании масс-спектров соединения **1** и **2** идентифицировали как *транс*- и *цис*-изомеры 10-ОФЕК. Присутствие циклопентенона в качестве продукта реакции подтвердили данные ЯМР-спектроскопии. ¹H-ЯМР-спектр был идентичен таковому для *цис*-10-ОФЕК [Hamberg, 2000]. *Цис*-циклопентенон (**2**) являлся первичным продуктом циклизации окиси аллена и основным изомером. Ранее отмечалось, что циклопентенон с *цис*-конфигурацией боковых цепей является ожидаемым продуктом антароповерхностной циклизации окиси аллена в соответствии с правилами сохранения орбитальной симметрии [Grechkin, 1994].

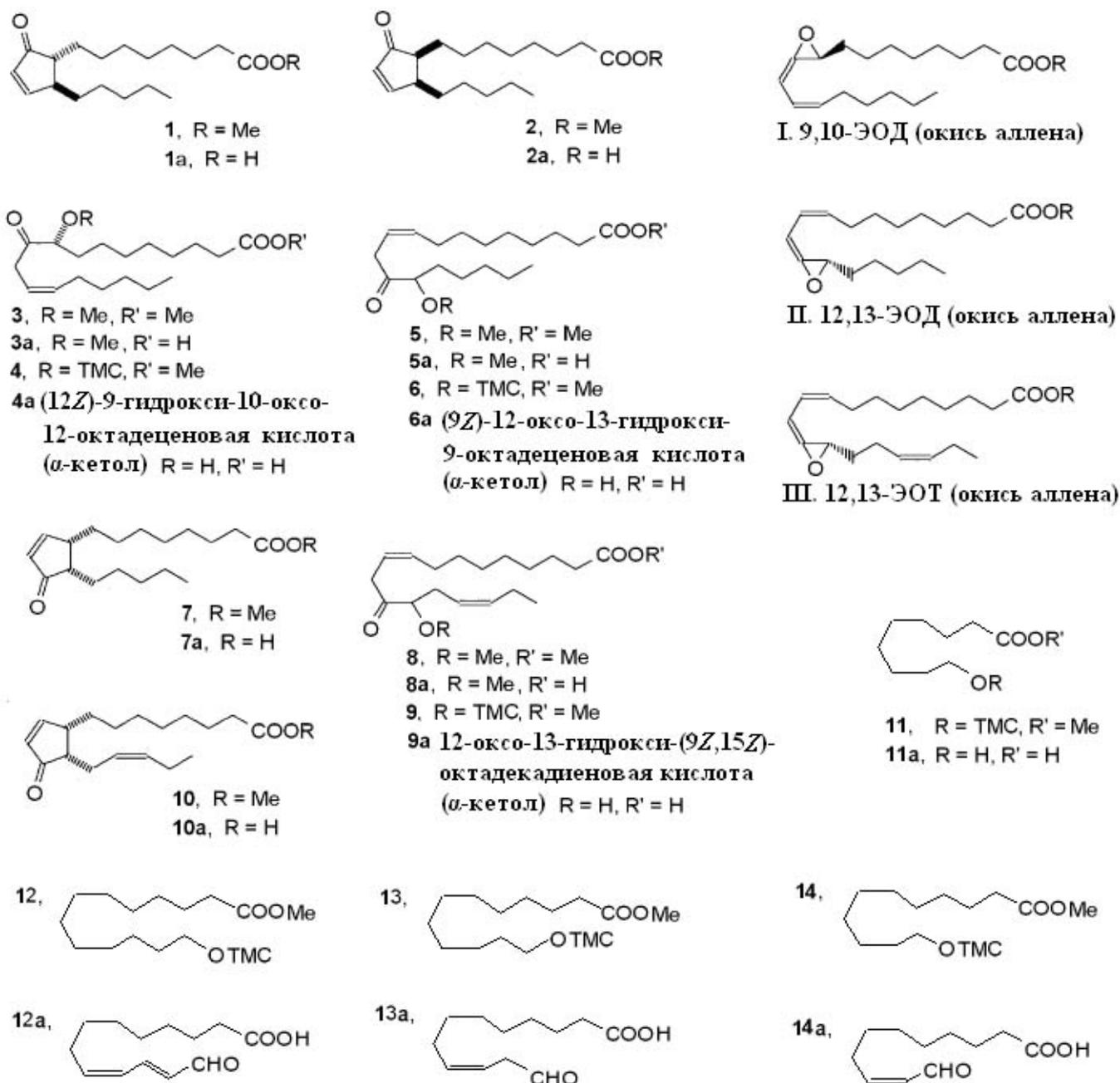


Рис. 6. Химические структуры соединений, полученных в качестве продуктов инкубаций гидроперекисей жирных кислот с рекомбинантной LeAOS3. Номера соединений по тексту выделены полужирным шрифтом.

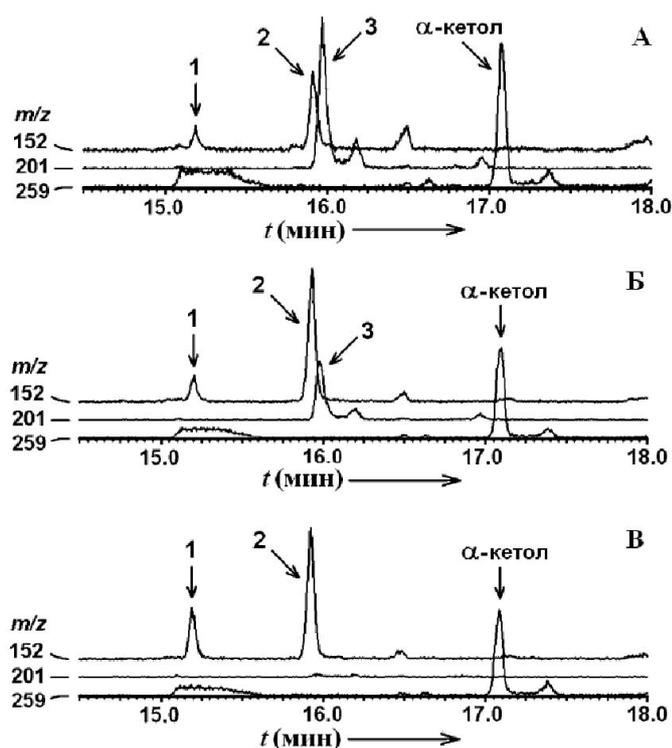


Рис. 7. Хроматограмма продуктов инкубации 9-ГПОД с LeAOS3 в концентрациях: А – 0,5, Б – 5, В – 40 мкг/мл. 1 и 2 – *транс*- и *цис*-изомеры 10-оксо-11-фитоеновой кислоты, 3 – метоксикетон. Селективные ионные токи соответствуют: 152 – метилому эфиру циклопентенона, 201 – продукту метанолиза окиси аллена, 259 – α -кетолу **4a** в виде метилового эфира ТМС-производного (**4**).

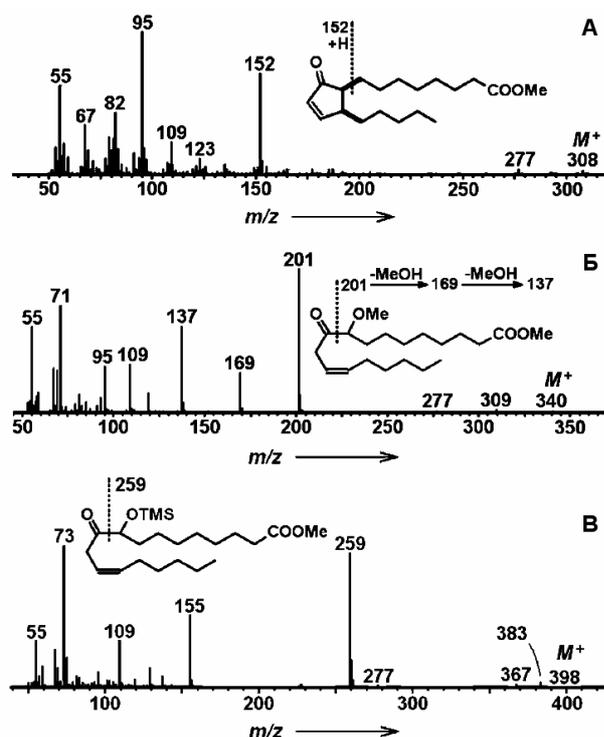


Рис. 8. Электронные масс-спектры продуктов инкубации 9-ГПОД с разными концентрациями LeAOS3:

А – метиловый эфир рацемического *цис*-циклопентенона;

Б – продукт метанолиза окиси аллена в виде метилового эфира **3**;

В – α -кетол **4a** в виде метилового эфира ТМС-производного (**4**).

2.6. Анализ энантиомерного состава продуктов инкубации 9-ГПОД с рекомбинантной LeAOS3. Очистку соединения **2** проводили с помощью ВЭЖХ на нормальной фазе, после чего его нанесли на колонку Chiralcel OD-H и выяснили, что энантиомеры соединения **2** не разделяются на этой колонке. Повторный анализ проводили после щелочной изомеризации *цис*-циклопентенона **2** в соответствующий *транс*-изомер **1**. Результаты анализа указывают на то, что исследуемый продукт является рацемическим и состоит из равных частей (*9R,13R*)- и (*9S,13S*)-энантиомеров.

Стерический анализ α -кетола, полученного в результате инкубации 9-ГПОД с LeAOS3 (**4a**), выявил преимущественно (*9R*)-энантиомер (92%). В то же время, α -кетол, образуемый при участии ZmAOS1, представлял собой смесь (*9R*)- и (*9S*)-энантиомеров. Избирательное образование (*9R*)- α -кетола при участии LeAOS3 означает, что окись аллена гидролизуется по S_N2 механизму. При спонтанном гидролизе значительный вклад вно-

сит S_N1 механизм, в результате чего образуется рацемический α-кетол, как в случае реакции, катализируемой ZmAOS1. Таким образом, гидролиз окиси аллена в присутствии LeAOS3 не является спонтанным.

2.7. Механизм реакции, катализируемой рекомбинантной LeAOS3. Результаты наших экспериментов согласуются с данными, указывающими на то, что короткоживущая окись аллена является первичным продуктом LeAOS3 [Itoh *et al.*, 2002]. Это означает, что синтез окиси аллена является общей функцией алленоксидсинтаз подсемейств CYP74A и CYP74C. Однако характер дальнейших превращений окиси аллена при участии LeAOS3 отличается от такового при участии ферментов CYP74A. Время полужизни окиси аллена зависит от концентрации LeAOS3, тогда как в реакциях, катализируемых AOC подсемейства CYP74A, время полужизни окисей аллена постоянно (27-44 с) [Tijet, Brash, 2002]. Когда концентрация LeAOS3 достигает насыщения, происходит полное превращение 9-ГПОД через 9,10-ЭОД в 10-ОФЕК и α-кетол за 20 секунд. Кроме того, в реакции стереоспецифично образуется (9*R*)-изомер α-кетола.

Таким образом, LeAOS3 является мультифункциональным ферментом, который катализирует три превращения (рис. 9). Продуктом первой реакции является короткоживущее промежуточное соединение окись аллена – 9,10-ЭОД (рис. 9, реакция 1), –

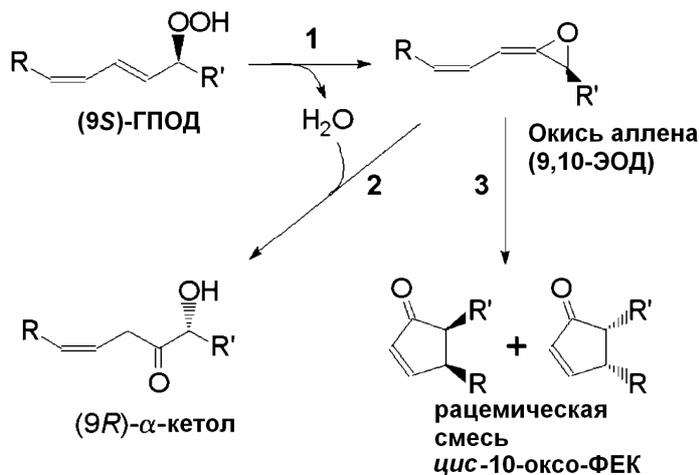


Рис. 9. Предполагаемая схема механизма реакции с участием LeAOS3. R=(CH₂)₇CO₂Me; R'=(CH₂)₄Me.

синтезируемая и высвобождаемая из каталитического центра LeAOS3. Затем LeAOS3 вновь захватывает 9,10-ЭОД для катализа двух последующих конкурирующих превращений, а именно гидролиза и циклизации (рис. 9, реакции 2 и 3, соответственно). Гидролиз, но не циклизация, протекает стереоспецифично. Окончательными продуктами LeAOS3 являются (9*R*)-α-кетол **4a** и рацемическая *цис*-10-оксо-11-фитоевая кислота **2a**.

Полученные результаты позволяют дополнить существующую схему метаболизма оксилпинов (рис. 10).

Результаты работы свидетельствуют о том, что, LeAOS3 и аналогичные 9-АОС подсемейства CYP74C контролируют новый метаболический путь от линолевой кислоты до циклопентенонов. Физиологическое значение данного пути еще предстоит выяснить.

Циклопентеноны – производные 9-гидроперекисей линолевой и α-линоленовой кислот – обнаружены в корнях имбиря, ландыша и подсолнечника [Grechkin *et al.*, 2007]. Тканеспецифичное образование этих соединений указывает на их участие в сигнальных цепях, альтернативных образованию жасмоновой кислоты в 13-ЛОГ/АОС пути.

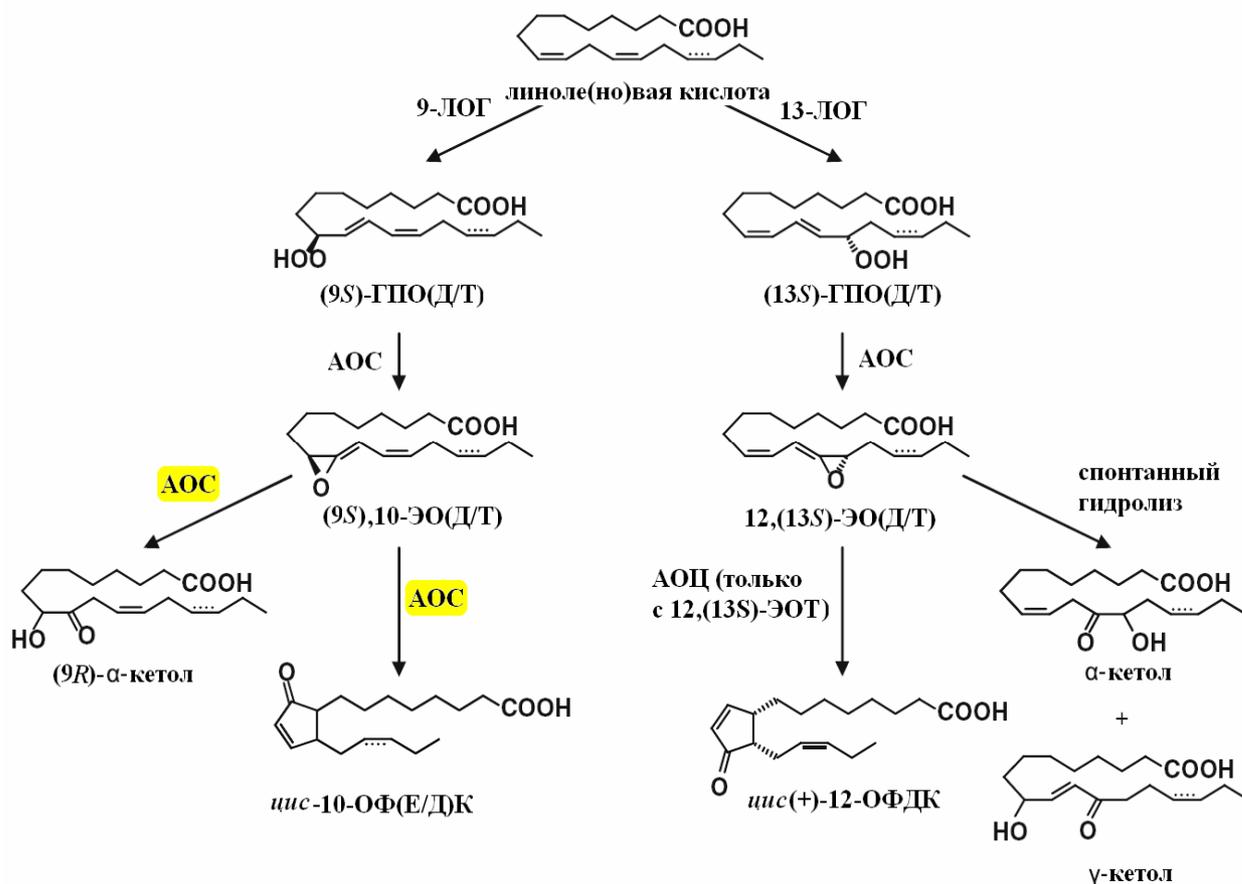


Рис. 10. Схема превращения линолевой и α -линоленовой кислот. Выделены реакции гидролиза и циклизации окисей аллена с образованием (9R)- α -кетола и *cis*-циклопентенонов при участии LeAOS3.

2.8. Обнаружение новых генов ферментов CYP74 льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.). Лен был первым растением, в котором удалось выявить и охарактеризовать цитохром P450 семейства CYP74 – алленоксидсинтазу LuAOS [Song *et al.*, 1993]. Долгое время считалось, что LuAOS является единственным представителем данного семейства у льна, и его активность необходима только в семенах. Обнаружение в листьях льна дивинилового эфира – (ω 5Z)-этероленовой кислоты и новых соединений – линолипинов [Chetkin *et al.*, 2008] – поставило вопрос о ферментативных основах их метаболизма. Однако соотношение предполагаемой ферментативной активности с каким-либо ферментом у малоизученных организмов представляет собой крайне сложную задачу. Одно из ее решений может быть связано с поиском и идентификацией соответствующих мРНК. Поиск мРНК предполагаемой дивинилэфирсинтазы льна провели благодаря наличию в первичной структуре цитохромов CYP74 консервативных участков, что позволяет с некоторой вероятностью предсказать варианты последовательностей генов, кодирующих данные области.

Для выявления молекул кДНК, полученных в результате обратной транскрипции целевых мРНК, использовали различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Ключевым моментом исследования являлся выбор участков кодирующих последовательностей генов ферментов CYP74, которые отличались бы от последовательностей генов других цитохромов P450, но, вместе с тем, были достаточно консервативными для генов семейства CYP74. В дальнейшем эти последовательности использовали при конструировании вырожденных праймеров для амплификации фрагментов целевых генов в ПЦР. Для выбора праймируемых участков проводили сравнительный анализ аминокислотных последовательностей известных ферментов CYP74 разных видов растений. В зависимости от степени сходства аминокислотных последовательностей все ферменты разделили на три группы. В каждой группе выделяли и сравнивали каталитически важные домены, из которых наиболее консервативными оказались В'-спираль и ERR-триада. По их аминокислотным последовательностям с учетом частоты встречаемости кодонов у высших растений определили наиболее вероятные кодирующие нуклеотидные последовательности, на основе которых сконструировали три пары олигонуклеотидных праймеров.

Ферменты разделили на группы. В первую группу (ДЭС) включили охарактеризованные к настоящему времени дивинилэфирсинтазы растений семейства пасленовых (*Solanaceae*). Праймеры LDF и LDR оказались строго комплементарны выбранным участкам генов данной группы. Вторую группу (ГПЛ) составили гидропероксидлиазы, которые обладали наибольшим сходством первичной структуры и субстратной специфичности с известными дивинилэфирсинтазами. На основе последовательностей кодирующих их генов сконструировали вырожденные праймеры LHF и LHR. Третья группа (АОС) включала алленоксидсинтазу льна (*Linum usitatissimum*, GenBank ID: U00428.1) и гидропероксидлиазу тополя (*Populus trichocarpa*, GenBank ID: EF145878), который среди растений с расшифрованным геномом оказался таксономически наиболее близким видом для льна. На основе нуклеотидных последовательностей генов третьей группы сконструировали праймеры LAF и LAR. Сконструированные праймеры использовали для выявления последовательностей, гомологичных генам семейства CYP74, в библиотеке кДНК.

Содержание галактолипидов, включающих этерифицированные дивиниловые эфиры, увеличивается после инфицирования растений льна-долгунца клетками фитопатогенных бактерий *Pectobacterium atrosepticum* [Chechetkin *et al.*, 2009]. Исходя из этого, тотальную РНК выделяли из листьев 35-дневных растений через сутки после инокулирования их суспензией клеток возбудителя мягких гнилей *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*). На основе выделенной РНК получали библиотеку двуцепочечной кДНК с помощью реакции обратной транскрипции. Смесь кДНК использовали в качестве источника матрицы для гнездовой ПЦР с тремя парами праймеров. Полученные фрагменты клонировали с помощью бактериального вектора pGem-T Easy (Promega, США), после чего определили их нуклеотидную последовательность. Последовательности фрагментов LHF-LHR имели высокую степень сходства с генами ферментов подсемейства CYP74В многих видов растений.

Следующим этапом определения структуры новых генов подсемейства CYP74В льна стала амплификация последовательностей 5'- и 3'-концевых участков их кДНК мето-

дом RACE. Амплифицированные концевые участки клонировали; их последовательности определили. Поскольку клонированные нами 5'- и 3'-фрагменты могли соответствовать генам разных изоформ, проводили дополнительный раунд амплификации полноразмерных кДНК, соответствующих транскриптам генов подсемейства CYP74В льна. Для этого использовали праймеры, комплементарные 5'- и 3'-концевым участкам. Полученные ампликоны также клонировали с помощью вектора pGem-T Easy и секвенировали.

Дальнейшая работа была сосредоточена на изучении гена и белка изоформы 1 фермента подсемейства CYP74В льна. Открытая рамка считывания (ОРС) данного гена содержит 1419 нуклеотидов и соответствует полипептиду размером 473 аминокислотных остатка. Последовательность гена зарегистрирована в базе данных GenBank NCBI под идентификационным номером HQ286277.1 (GI:310687282). Предполагаемому белку было присвоено название CYP74В16 [Nelson, личное сообщение].

Проведенное нами сопоставление аминокислотной последовательности изоформы 1 с описанными ферментами CYP74 с помощью программы BLAST также показало, что новый фермент CYP74В16 льна относится к подсемейству CYP74В и проявляет высокую степень сходства первичной структуры с 13-ГПЛ. Однако его последовательность имеет несколько уникальных аминокислотных замен, затрагивающих каталитически важные домены и, в первую очередь, центральный домен I-спирали (IHCD) (рис. 11). Как у всех ферментов CYP74В, в начале домена IHCD в положении 286 фермента CYP74В16 находится лейцин (рис. 11, положение 1). В следующем положении у CYP74В16 находится остаток аланина, тогда как у всех известных ферментов CYP74В в этом месте располагается остаток глицина (рис. 11, положение 2). Из всех ферментов CYP74 в этом участке остаток аланина находится только у дивинилэфирсинтазы чеснока *AsDES* [Stumpe *et al.*, 2008]. Непосредственно после домена IHCD в последовательности CYP74В16 находится остаток глутаминовой кислоты. У всех членов подсемейства CYP74В, также как у большинства ферментов CYP74, в этом положении находится консервативный остаток глицина. Исключение составляют ДЭС пасленовых растений, у которых в этом положении остаток глицина также замещен остатком другой аминокислоты (рис. 11). В связи с этими структурными особенностями, была проведена биохимическая характеристика рекомбинантного фермента CYP74В16.

		123456	
CYP74В16	(271)	YGLTEEEA	IHNLLFVLA
CmHPL	(265)	QGIDREK	ACHNLVFL
PgHPL	(287)	FGLTHQE	AIHNLLEF
MshPL	(278)	FGLSEDE	AIHNLLEF
LeAOS3	(278)	LGVKRDE	ACHNEVFL
LeAOS1	(319)	IGISRRE	EACHNLLF
LuAOS	(321)	SGISRDE	ACHNLLF
AsDES	(258)	IGLSREE	AIEHLIF
LeDES	(264)	LGIKREE	AVQNILFL

Рис. 11. Результаты множественного выравнивания последовательностей I-спирали ферментов CYP74 (домен IHCD обозначен 1-6).

2.9. Характеристика рекомбинантного фермента CYP74В16 льна. Для получения рекомбинантного белка CYP74В16 ОРС соответствующего гена поместили в экспрессирующий вектор pET-32 Ek/LIC (Novagen, США) методом безлигазного клонирования. На-

работку и очистку рекомбинантного фермента проводили с использованием штамма *E. coli* Tuner(DE3)pLysS по методике, разработанной ранее для LeAOS3.

Очищенный препарат СУР74В16 обладал ферментативной активностью в отношении гидроперекисей жирных кислот в широком диапазоне рН, с максимумом при значениях рН от 7.5 до 8.0. Снижение оптического поглощения реакционной смеси при длине волны 234 нм сопровождалось возрастанием поглощения в области 267 нм, что характерно для дивиниловых эфиров.

Для определения константы Михаэлиса и константы каталитической были измерены начальные скорости реакций с разными субстратами в концентрациях от минимальной до насыщающей. Из полученных данных сделали вывод, что сродство рекомбинантного фермента СУР74В16 к (13S)-ГПОТ значительно выше, чем к (13S)-ГПОД, (9S)-ГПОД (табл. 3) и (9S)-ГПОТ (данные не представлены). В то же время, максимальную каталитическую активность рекомбинантный фермент СУР74В16 проявлял по отношению к (13S)-ГПОД. Соотношение k_{cat}/K_m свидетельствует, что 13-гидроперекиси α -линоленовой и линолевой кислот являются предпочтительными субстратами (табл. 3). Такие субстратные предпочтения характерны для большинства ГПЛ подсемейства СУР74В.

Табл. 3. Константы каталитические и константы Михаэлиса рекомбинантного фермента СУР74В16, рассчитанные для каждого субстрата с помощью пакета программ SigmaPlot 11 software (Systat Software Inc., USA).

Субстрат	Константа каталитическая, k_{cat} (сек ⁻¹)	Константа Михаэлиса, K_m (мкмоль)	k_{cat}/K_m (сек ⁻¹ мкмоль ⁻¹)	Субстратная специфичность, %
13(S)-ГПОТ	545,8±12,9	28,0±1,9	19,5	100
13(S)-ГПОД	956,4±31,7	132,5±5,8	7,22	37
9(S)-ГПОД	33,7±1,1	122,4±8,6	0,28	1,4

Анализ выявил наличие одного преобладающего продукта, в спектре которого имеется молекулярный ион $[M]^+$ при m/z 306 (рис. 12А). Его масс-спектр (рис. 12Б) идентичен спектру, описанному ранее для метилового эфира (ω 5Z)-этеролоеновой кислоты [Hamberg, 1998; Chechetkin *et al.*, 2008] и этеролоеновой кислоты [Grechkin *et al.*, 1995]. Время удерживания основного продукта соответствует таковому для (ω 5Z)-этеролоеновой кислоты. Анализ продуктов реакции в виде Ме/ТМС после восстановления боргидридом натрия и каталитического гидрирования выявил полностью гидрированный дивиниловый эфир – 13-оксанадекановую кислоту (рис. 12В) – и продукт фрагментации цепи – 12-гидрокси-додекановую кислоту (Ме/ТМС).

Основное соединение очищали с помощью ВЭЖХ на обратной и нормальной фазах и исследовали методом ЯМР-спектроскопии. ¹H-ЯМР спектр оказался идентичен спектру (ω 5Z)-этеролоеновой кислоты, полученному ранее [Chechetkin *et al.*, 2008]. Значения

констант спин-спинового взаимодействия $J_{11,12} = 12,0$ Гц и $J_{1',2'} = 6,2$ Гц свидетельствуют о *транс*- и *цис*-конфигурации двойных связей.

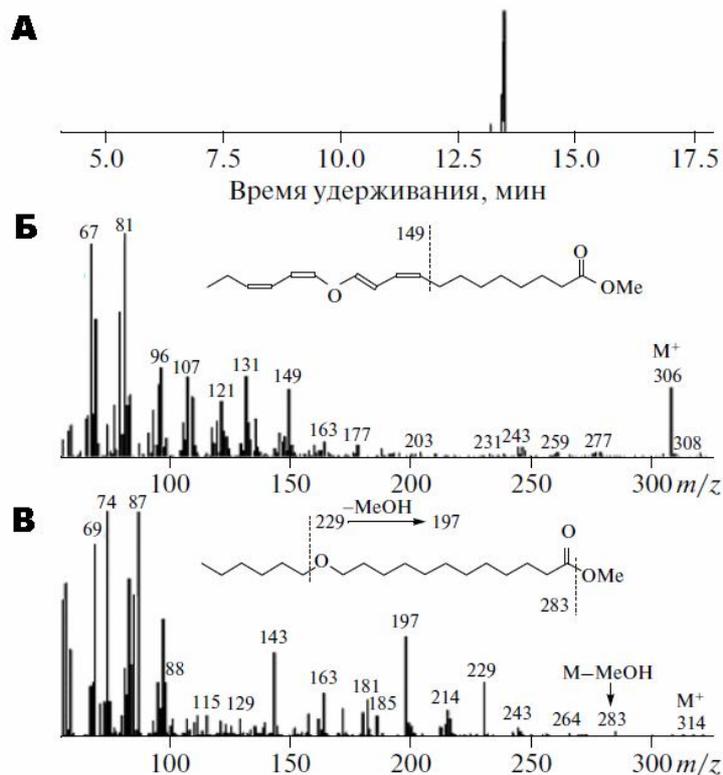


Рис. 12. Результат анализа продуктов инкубации рекомбинантного фермента CYP74B16 с 13-гидроперекисью α -линоленовой кислоты методом ГХ-МС: (А) хроматограмма продуктов инкубации (Me/TMS) по полному ионному току (TIC), (Б) электронный масс-спектр метилового эфира основного продукта, (В) электронный масс-спектр метилового эфира основного продукта после каталитического гидрирования.

(13*S*)-ГПОД. В листьях льна преобладающей жирной кислотой является α -линоленовая. По всей вероятности, превращение (13*S*)-ГПОТ в (ω 5*Z*)-этеролоновую кислоту является основной функцией LuDES.

Еще одной особенностью LuDES является геометрическая специфичность образуемого дивинилового эфира – (ω 5*Z*)-этеролоновой кислоты. Эта особенность объединяет LuDES с дивинилэфирсинтазами растений рода лютик (*Ranunculus*), которые также локализованы в листьях и предпочтительно утилизируют (13*S*)-ГПОТ [Hamberg, 1998; 2002; 2004; 2005]. Синтез (ω 5*Z*)-этеролоновой кислоты и других подобных дивиниловых эфиров происходит у бурых водорослей рода ламинария (*Laminaria*) [Proteau, Gerwick, 1993].

Полученные данные позволили идентифицировать основной продукт преобразования (13*S*)-ГПОТ как (ω 5*Z*)-этеролоновую кислоту, а фермент CYP74B16 – как дивинилэфирсинтазу. В соответствии с принятой номенклатурой ферментов CYP74, новому ферменту присвоили тривиальное название LuDES (дивинилэфирсинтаза *L. usitatis-simum* L), также как и соответствующему гену – *LuDES* [Gogolev *et al.*, 2012].

Как указывалось выше, структура LuDES имеет высокую степень сходства со структурами других членов подсемейства CYP74B. Кроме того, ген *LuDES*, также как и гены ГПЛ подсемейства CYP74B, экспрессируется в листьях; фермент утилизирует в качестве субстрата преимущественно (13*S*)-ГПОТ. Превращение (13*S*)-ГПОТ приводит к образованию дивинилового эфира, тогда как продуктами превращения (13*S*)-ГПОД являются сопоставимые количества дивинилового эфира и (9*Z*)-12-оксо-9-додеценовой кислоты. Продукты фрагментации, вероятно, образуются благодаря дополнительной гидропероксидазной активности, проявляемой LuDES по отношению к

Дивинилэфирсинтазы бурых водорослей и растений рода и лютик, как и кодирующие их гены, до сих пор не изучены; систематическое положение ферментов не определено.

Полученные результаты указывают на то, что LuDES является уникальным ферментом, представляющим особый интерес для изучения механизма катализа и филогении как представителей семейства CYP74, так и цитохромов P450 в целом. По сходству первичной структуры белок относится к подсемейству CYP74B. Однако в то время как все известные цитохромы подсемейства CYP74B являются гидропероксидлиазами, LuDES проявляет дивинилэфирсинтазную активность. Обнаружение данного фермента открывает новые возможности для выявления особенностей структуры активного центра цитохромов CYP74, определяющих тип катализа. Кроме того, полученные результаты вносят вклад в понимание молекулярной эволюции семейства CYP74.

2.10. Выявление значения доменов HCD и ERR для формирования типа катализа ферментов CYP74. Практически все цитохромы суперсемейства P450 являются монооксигеназами, и для них характерно использование двух субстратов: непосредственно окисляемого соединения и молекулярного кислорода. Уникальным свойством ферментов семейства CYP74 является отсутствие необходимости во втором субстрате, а именно – молекулярном кислороде. В реакции участвует кислород гидроперокси-группы окисленной жирной кислоты. В связи с этим, домен HCD ферментов CYP74 отличается от соответствующего ему «кислород-связывающего домена» монооксигеназ отсутствием аминокислотных остатков, участвующих в связывании и активации кислорода и переносе электронов. С противоположной стороны к гему примыкает другой консервативный для всех цитохромов P450 домен, названный ERR-триада. Исходя из сопоставления первичных и третичных структур представителей разных семейств цитохромов P450, мы предположили, что функция некоторых аминокислотных остатков, входящих в состав этих доменов, заключается в непосредственном участии в каталитическом действии ферментов CYP74. Для проверки результатов анализа мы провели замены аминокислотных остатков, входящих в состав домена HCD и ERR-триады алленоксидсинтазы LeAOS3 (CYP74C3) томата, гидропероксидлиазы MtHPL (CYP74C3) люцерны и дивинилэфирсинтазы LuDES (CYP74B16) льна, получили и проанализировали следующие мутантные формы: LeAOS3 F295I, S297A, K302S, D359R и T366Y, MtHPL F284I и N285T и LuDES E292G. Кроме того, три мутантные формы MtHPL F287V, N285A и G288I были любезно предоставлены доктором Р. Хьюзом из Великобритании.

Выбор сайтов для замен в последовательностях АОС, ГПЛ и ДЭС основан на сопоставлении последовательностей изученных ферментов CYP74 и наличии в каталитически важных доменах несинонимических аминокислотных остатков, консервативных для ферментов с разным типом катализа. Например, фермент LuDES является единственной дивинилэфирсинтазой, проявляющей сходство первичной структуры с 13-гидропероксидлиазами. Эта особенность предоставляет возможность выявления минорных различий в аминокислотных последовательностях, определяющих разницу в каталитических свойствах, что представляет интерес для энзимологии. В последовательностях

всех алленоксидсинтаз и гидропероксидлиаз после домена IHCD находится два остатка глицина подряд; у всех исследованных к настоящему времени дивинилэфирсинтаз первый остаток глицина заменен на остаток аланина (ДЭС пасленовых) или лейцина (ДЭС чеснока). В данном сайте LuDES содержит остаток глутаминовой кислоты. В клонированном гене *LuDES* провели мутацию, обеспечивающую замену остатка глутаминовой кислоты в положении 292 на остаток глицина. С некоторой вероятностью можно было ожидать приобретение новым ферментом гидропероксидлиазной активности.

2.11. Анализ продуктов реакций, катализируемых ферментами дикого типа и их мутантными формами. В результате инкубации LeAOS3 дикого типа с 9-ГПОД основным регистрируемым продуктом был α -кетол – (12*Z*)-9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовая кислота **4a** в виде Me/TMC **4** (рис. 13A). Этот продукт образуется в результате гидролиза окиси аллена. В ничтожно малых количествах регистрировали также гидропероксидлиазный продукт – 9-оксононановая кислота **11a** в виде метилового эфира **11** (рис. 13A). Дивиниловые эфиры обнаружены не были.

Все полученные нами мутантные формы LeAOS3 сохранили способность утилизировать 9-гидроперекись линолевой кислоты. Мутантные формы F295I (рис. 13B), S297A (рис. 13B), K302S (рис. 13Г) и T366Y (рис. 13Д) проявляли 13, 52, 36 и 72 %, соответственно, тотальной активности LeAOS3 дикого типа. Анализ продуктов превращений субстрата при участии этих мутантных форм, продемонстрировал кардинальные изменения в типе катализа. Все четыре мутанта проявляли активность гидропероксидлиазы (изомеразы), продуцируя значительно большее количество 9-оксононановой кислоты **11a**, чем фермент дикого типа. В то же время алленоксидсинтазная (дегидразная) активность мутантных форм LeAOS3 была сильно снижена (S297A, K302S и T366Y) или отсутствовала (F295I). С другой стороны, замена аспарагиновой кислоты на аргинин в ERR-триаде (D359R) не привела к изменениям в характере катализа (данные не представлены).

В качестве субстрата для MtHPL дикого типа и ее мутантных форм использовали 13-ГПОТ. Продукты анализировали в виде Me/TMC после восстановления NaBH_4 и гидрирования над PtO_2 . Все мутантные формы сохранили способность утилизировать 13-ГПОТ. Однако помимо основного продукта реакции 12-оксо-(9*Z*)-додеценовой кислоты (12-ОДДК, Me/TMC), характерной для MtHPL дикого типа, выявлялись дополнительные продукты, а именно – (9*Z*,11*E*)-13-оксотридекадиеновая (13-ОТДК) и (9*Z*)-11-оксоундеценовая (11-ОУДК) кислоты (Me/TMC). Относительное количество этих продуктов в некоторых случаях превышало количество специфического продукта (рис. 14).

Появление 13-оксотридекадиеновой и 11-оксоундеценовой кислот свидетельствует о нарушениях в ферментативном катализе. Эти соединения являются результатом спонтанного α - или β -разрезания. В обоих вариантах происходит задержка катализа после перегруппировки эпоксиаллильного радикала. В случае образования 13-ОТДК происходит разрыв C_{13} - C_{14} связи. В случае образования 11-ОУДК, как мы предполагаем, происходит окисление эпоксиаллильного радикала с последующим разрывом C_{11} - C_{12} связи.

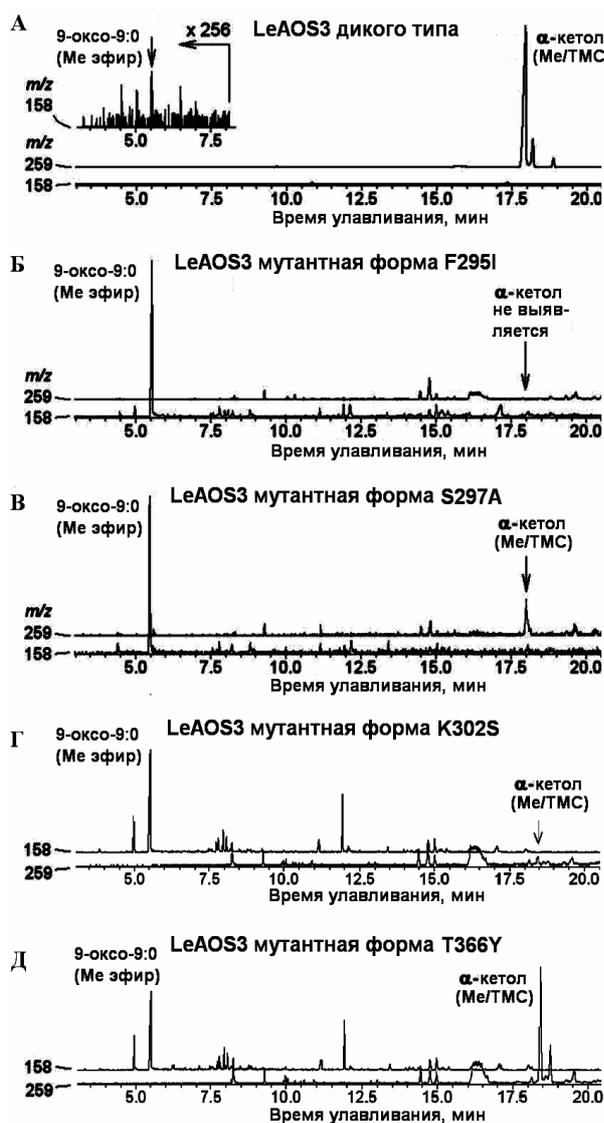


Рис. 13. Хроматограмма продуктов инкубации 9-ГПОД с LeAOS3 (А) и ее мутантных форм: F295I (Б), S297A (В), K302S (Г), T366Y (Д).

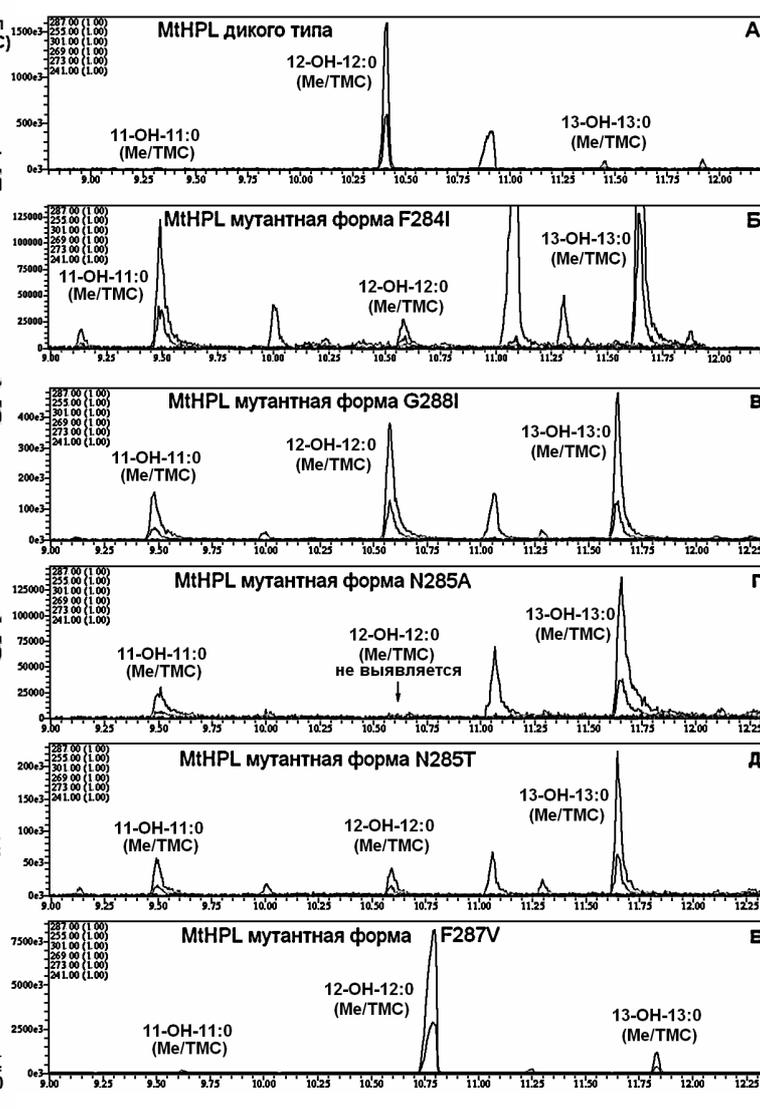


Рис. 14. Хроматограмма продуктов инкубации 13-ГПОТ с MtHPL дикого типа (А) и ее мутантными формами: F284I (Б), G288I (В), N285A (Г), N285T (Д) и F287V (Е).

Полученные данные демонстрируют возможность конверсии ферментов CYP74 в результате точечных мутаций. Четыре мутации LeAOS3 – F295I, K302S, T366Y и S297A превратили АОС в ГПЛ. Это свидетельствует об определяющей роли данных аминокислотных остатков в специфичной функции фермента. Гидропероксидлиазная активность обнаруживается у мутантов LeAOS3 F295I и D359R, не смотря на то, что у этих форм можно было ожидать появления дивинилэфирсинтазной активности. С другой стороны, ни одна мутация MtHPL не привела к приобретению нового типа катализа. Таким образом, можно предположить, что гидропероксидлиазная реакция является базовой по механизму, а алленоксидсинтазная и дивинилэфирсинтазная реакции формируются в процессе ее видоизменения под влиянием боковых групп ключевых аминокислот.

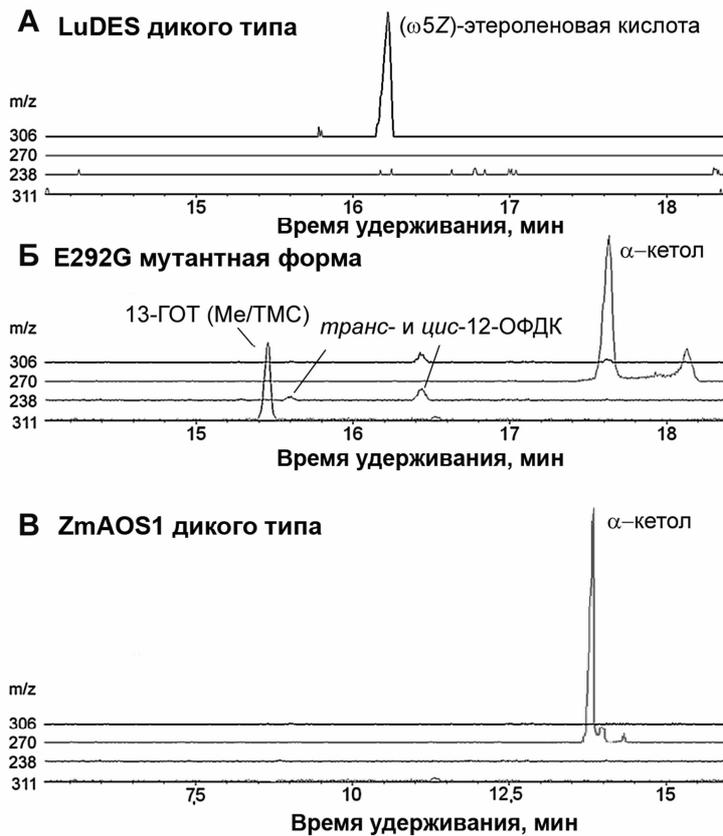


Рис. 15. Хроматограммы продуктов инкубации (13*S*)-ГППОТ с LuDES дикого типа (А), мутантной формой LuDES E292G (Б) и ZmAOS1 (В).

обнаружен не был (рис. 15Б). Таким образом, в результате мутации E292G LuDES полностью утратила активность дивинилэфирсинтазы и приобрела активность алленоксидсинтазы.

При выборе сайта модификации LuDES отсутствие глицина в позиции 292 представлялось наиболее существенной особенностью, отличающей LuDES (CYP74B) от гидропероксидлиаз подсемейства CYP74B. Результат мутации – превращение ДЭС в АОС, а не ГПЛ – может представляться неожиданным. Вместе с тем, результат подтверждает ключевое значение сайта в каталитическом действии ферментов CYP74. В целом, структуры домена IHCD и ERR-триады во многом определяют тип катализа ферментов CYP74. Последовательности этих доменов можно использовать в качестве «отпечатков пальцев» ферментов CYP74, предсказывая, как правило, тип катализа по первичной структуре.

Результаты работы показывают, что все ферменты CYP74 обладают сходными механизмами катализа. Ранее гидропероксидлиазы были идентифицированы как изомеразы, катализирующие гомолитическую перегруппировку с промежуточными продуктами – алкоксирадикалом и эпоксиаллильным радикалом [Grechkin *et al.*, 2006]. Результаты сайт направленного мутагенеза указывают на то, что эпоксиаллильный радикал является ключевой точкой катализа всех ферментов CYP74 (рис. 16).

Для проверки выдвинутого предположения мы получили мутантную форму LuDES E292G и проанализировали ее свойства. Модифицированный фермент сохранил способность утилизировать (13*S*)-ГППОТ. В то же время, анализ продуктов превращения гидроперекиси продемонстрировал кардинальные изменения в типе катализа (рис. 15Б). Основным продуктом реакции, катализируемой LuDES E292G, было соединение, идентифицированное как α -кетол. В качестве контроля (13*S*)-ГППОТ инкубировали с рекомбинантной алленоксидсинтазой ZmAOS1 (CYP74 A19) кукурузы (*Zea mays*) (рис. 15В). Сравнение продуктов подтвердило правильность идентификации. Масс-спектр минорного продукта превращения (13*S*)-ГППОТ модифицированным ферментом соответствует *цис*-12-оксо-10,15-фитодиеновой кислоте. Дивинилэфирсинтазный продукт LuDES – (ω 5*Z*)-этеролоновая кислота – обнару-

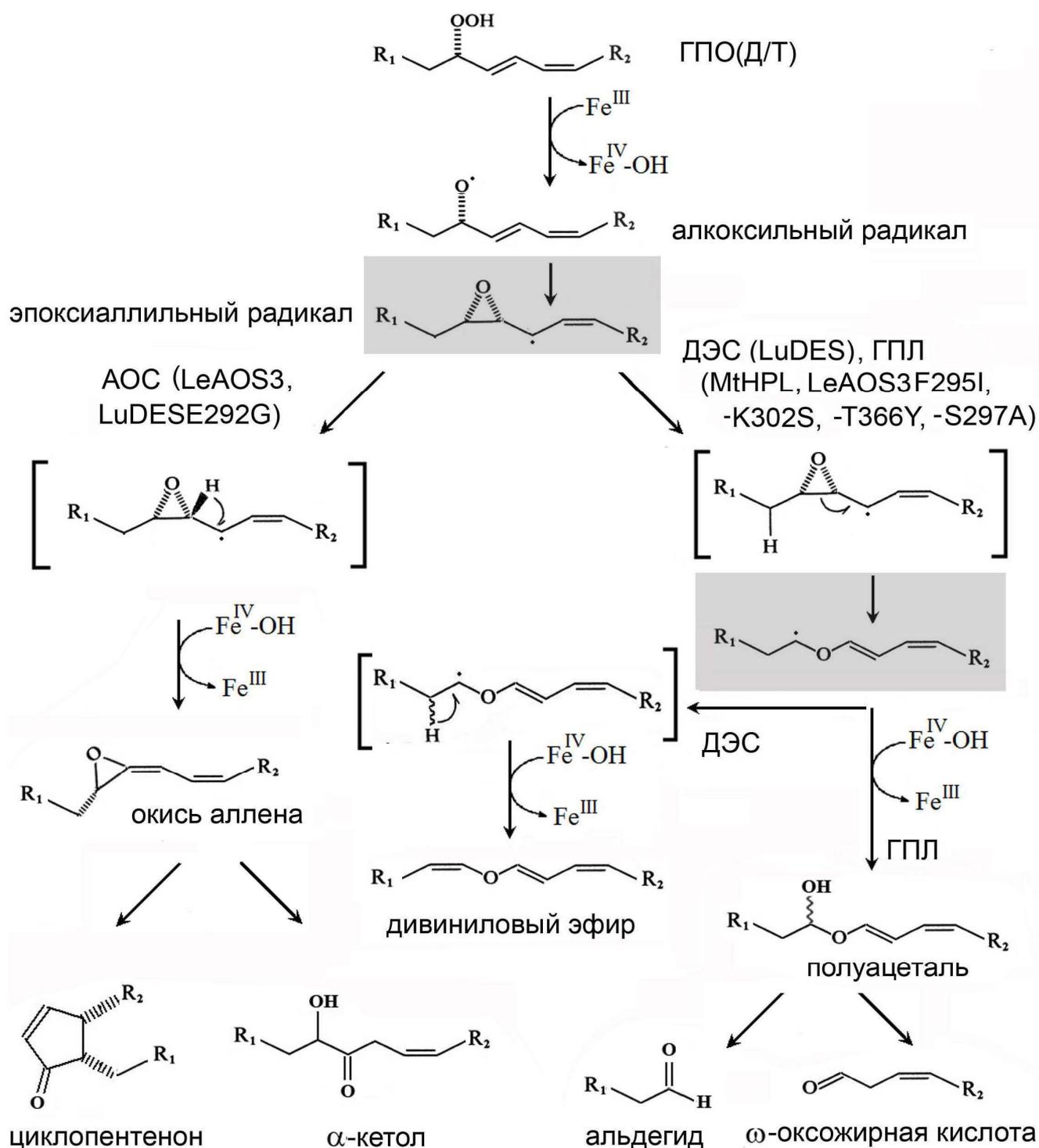


Рис. 16. Общая схема реакций, катализируемых ферментами CYP74 и их мутантными формами. Выделены стадии реакций, в которых происходит переключение типа катализа в результате единичных аминокислотных замен. LeAOS3 и ее мутантные формы инкубировали с (9S)-ГПОД; $\text{R}_1 = \text{-(CH}_2\text{)}_6\text{COOH}$, $\text{R}_2 = \text{-(CH}_2\text{)}_4\text{CH}_3$. LuDES и MthPL и их мутантные формы инкубировали с (13S)-ГПОТ; $\text{R}_1 = \text{-CH=CHCH}_2\text{CH}_3$, $\text{R}_2 = \text{-(CH}_2\text{)}_7\text{COOH}$.

Алленоксидсинтазы, как и дивинилэфирсинтазы, являются гидропероксиддегидратазами. Несмотря на это, механизм каталитического действия ДЭС имеет больше общего с механизмом каталитического действия ГПЛ, которые являются изомеразы.

Первой стадией катализа у всех ферментов CYP74 является гомолиз гидроперокси-группы (рис. 16) с образованием эпоксиаллильного радикала и соединения II ($\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-OH}$ комплекс). В зависимости от структуры домена IHCD и ERR-триады эпоксиаллильный радикал претерпевает различные превращения. Второй стадией у АОС является отщепление атома водорода с образованием *экзо*-двойной связи при окисране, что приводит к образованию окиси аллена. У гидропероксидлиаз и дивинилэфирсинтаз вторая стадия иная – гомолиз углерод-углеродной связи в окисране с образованием винилоксикарбинильного радикала. Заключительным этапом катализа ДЭС является отщепление атома водорода от радикала с образованием второй двойной связи дивинилового эфира. Заключительным этапом катализа ГПЛ является рекомбинация винилоксикарбинильного радикала с гидроксильным радикалом с образованием полуацетала.

Насколько нам известно, до нашей работы [Toporkova *et al.*, 2008] и независимо выполненной работы группы проф. Рамана [Lee *et al.*, 2008], в литературе не было примеров направленного изменения первичной структуры ферментов, приводивших к превращению фермента с одним типом катализа в фермент с другим типом в результате единичной замены аминокислотного остатка.

Экспериментальные данные согласуются с результатами компьютерного анализа структуры цитохромов CYP74, выявившими домены и аминокислотные остатки, определяющие тип катализа CYP74, в частности, домен IHCD. Полученные результаты вносят вклад в представление об эволюции ферментов CYP74 и цитохромов P450 в целом.

2.19. Филогенетический анализ и классификация ферментов липоксигеназного каскада. Непротиворечивая модель молекулярной эволюции ферментов липоксигеназного каскада до сих пор не построена. Долгое время липоксигеназный каскад считался эволюционным приобретением высших растений. Последние данные о присутствии цитохромов семейства CYP74 и оксипинонов у прокариот, водорослей и животных заставляют разрабатывать альтернативные гипотезы. На рис. 17 представлено филогенетическое дерево липоксигеназ, построенное с помощью алгоритма «присоединения ближайших соседей» [Saitou, Nei, 1987]. Для построения было отобрано 438 последовательностей липоксигеназ организмов разного таксономического положения.

Молекулярно-филогенетический анализ аминокислотных последовательностей липоксигеназ позволил выявить относительную взаимосвязь между первичной структурой и функциональными характеристиками ферментов, в частности субстратной и каталитической специфичностью. Так, липоксигеназы млекопитающих разделяются на 5 групп. В группу А входят липоксигеназы, проявляющие 12*R*-специфичность действия. Группа В объединяет в себе эпителиальные липоксигеназы с дуалистичной 12/15-активностью. Ферменты, имеющие 15*S*-специфичность действия (*n*+2 тип катализа), включены в группу С. Липоксигеназы, обладающие 12-специфичной активностью, составляют большую часть группы Е. Обособленная группа F включает исключительно 5-липоксигеназы (*n*-2 тип катализа). Липоксигеназы высших растений разделились на четыре группы. Две из них принадлежат, споровым и голосеменным. Группа J представляет ферменты мхов

(*Physcomitrella patens*) и печеночников (*Marchantia polymorpha*), у которых обнаружены 15- и 13-специфичные ЛОГ. Единственный охарактеризованный 13-специфичный фермент плауновидных (*Selaginella moellendorffii*, сектор L) имеет менее 45 % идентичности с известными последовательностями ЛОГ. В секторе К находятся ферменты однодольных и двудольных, проявляющие 13-специфичную активность. Хотя 9-липоксигеназы составляют монофилетическую группу, значимых различий первичной структуры этих ферментов с последовательностями 13-ЛОГ выявить не удастся (сектор М).

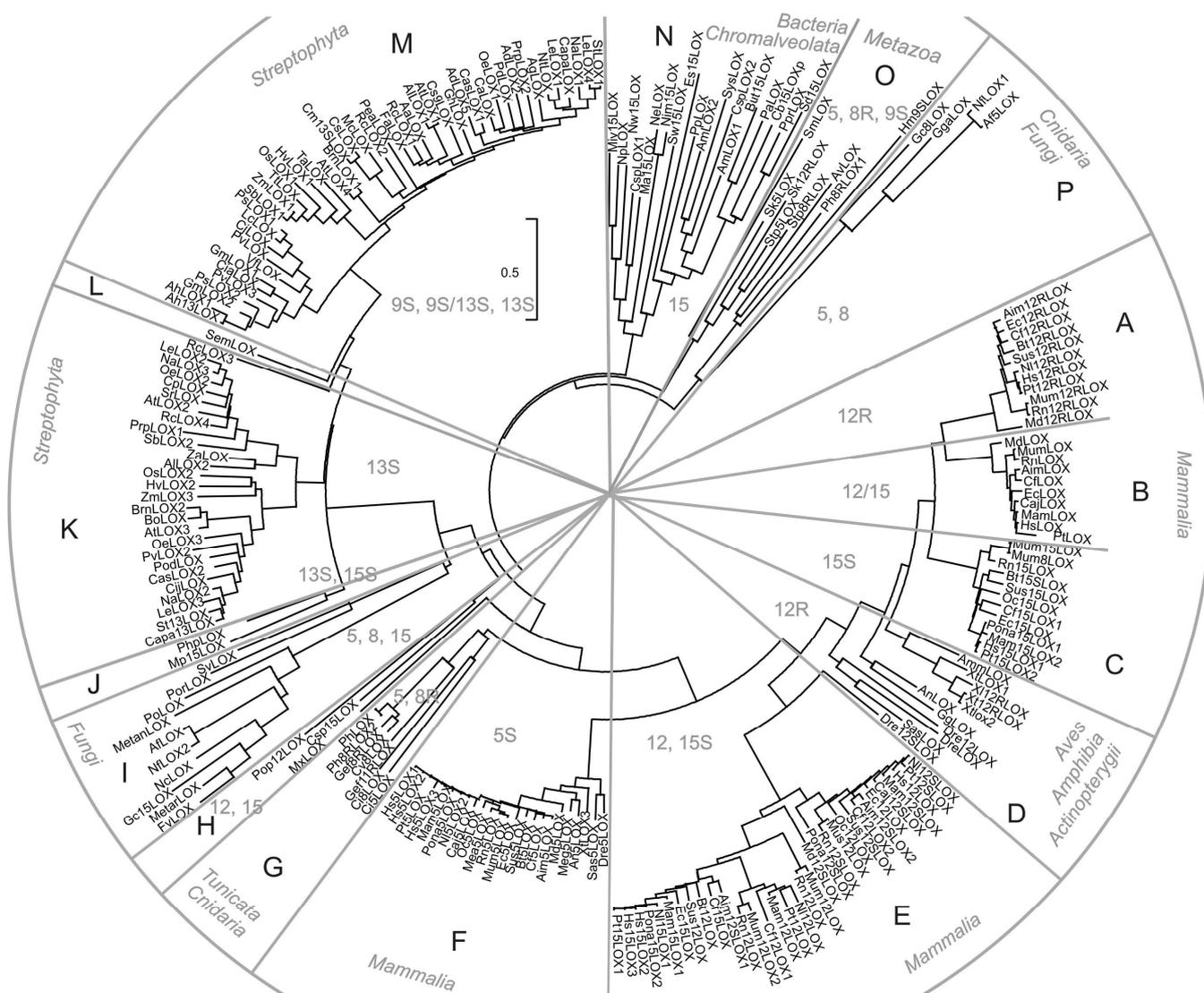


Рис. 17. Филогенетическое дерево липоксигеназ. Группа Н включает ферменты *Polysphondylium pallidum* и *Cyanothece* sp.; J – *Physcomitrella patens* и *Marchantia polymorpha*; L – *Selaginella moellendorffii*. Дерево построено методом «присоединения соседей».

По всей видимости, эволюционное развитие липоксигеназ происходило в соответствии с эволюцией основных таксонов. Вероятно, 13-специфичные ЛОГ возникли монофилетически у растений одновременно с группой ЛОГ грибов, образующих широкий спектр продуктов (5-, 8-, 15-гидроперекиси, рис. 17, группа I); эти группы, также как липоксиге-

назы животных, протеобактерий, цианобактерий имели общего предка. Первые этапы эволюции группы липоксигеназ, вероятно, совпали с появлением эукариотических организмов или непосредственно предшествовали этому событию.

Возникновение 9-специфичных липоксигеназ в результате минорных модификаций 13-липоксигеназ произошло, вероятно, незадолго до расхождения однодольных и двудольных растений. Это предположение подтверждается экспериментами по сайт-направленному мутагенезу. В результате мутации A562G проведено частичное изменение специфичности ZmLOX3, по-видимому, представляющее собой реверсию к 13-специфичной активности у 9-специфичного фермента. Для уточнения времени возникновения 9-липоксигеназного пути необходимо получить данные о липоксигеназах споровых и разработать непротиворечивую филогенетическую модель цитохромов CYP74.

Разработку филогении и таксономии семейства CYP74 нельзя считать завершённой. В работе Д. Нельсона, посвященной филогении цитохромов суперсемейства P450 растений [Nelson, Werck-Reichhart, 2011] описание семейства CYP74 содержит серьезные противоречия. В связи с низкой степенью сходства последовательностей внутри семейства CYP74 было сочтено целесообразным ввести новую таксономическую единицу – клан, состоящий из одного семейства. При этом сделано заключение, что в эволюционной истории данные ферменты впервые появляются у печеночников (*Marchantiophyta*) в связи с выходом растений на сушу. Предполагается, что возникновение клана CYP74 было связано с развитием жасмонатной сигнальной системы, присутствующей у всех наземных растений. Ферменты CYP74 прокариот, морских кишечнорастворимых и хордовых распространились в результате горизонтального переноса генов от наземных растений посредством метилотрофных бактерий [Nelson, Werck-Reichhart, 2011].

Противоречивость приведенного представления об эволюции семейства CYP74 может быть дополнена тем фактом, что дивиниловые эфиры обнаружены не только у наземных растений, но также у бурых водорослей. Кроме того, алленоксидсинтазная активность обнаружена в клетках цианобактерий *Acaryochloris marina* [Gao *et al.*, 2009]. Согласно альтернативной точке зрения клан CYP74 не имеет общих предков с другими группами цитохромов P450; он возник на ранних этапах эволюции суперсемейства до дивергенции животных и растений от их последнего общего предка [Lee *et al.*, 2008].

Для выяснения причин возникшего противоречия мы провели филогенетический анализ 493 аминокислотных последовательностей цитохромов P450 не только высших растений, но и представителей следующих таксонов: *Archaea*, *Bacteria*, *Amoebozoa*, *Alveolata*, *Euglenozoa*, *Fungi*, *Metazoa* (рис. 18).

Полученные данные позволяют сделать вывод, что клан CYP74 не является производным других семейств P450 высших растений, а представляет собой монофилетическую группу ферментов, гомологичных представителям других групп цитохромов P450 широкого спектра организмов, включающего цианобактерии (*Nostoc punctiforme*), грамположительные бактерии (*Bacillus subtilis*) и нитчатые грибы (*Neurospora crassa*). Ферменты CYP74 проявляют сходство с представителями семейств CYP7 и CYP51 (рис. 18).

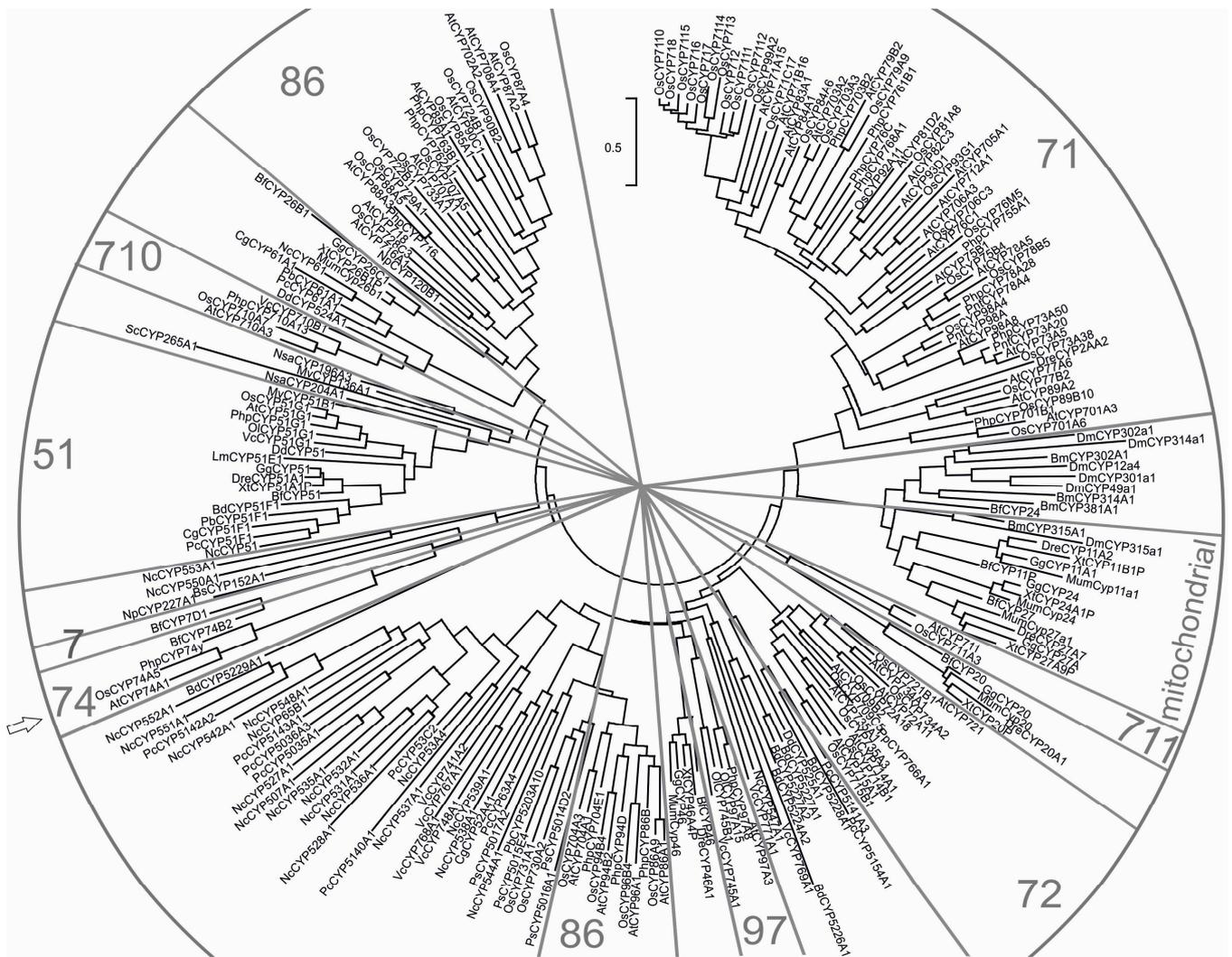


Рис. 18. Филогенетическое дерево суперсемейства P450. Цифрами обозначены семейства и кланы цитохромов P450 согласно [Nelson, Werck-Reichhart, 2011]. Построение выполнено методом «максимального правдоподобия».

Еще одно построение было выполнено с использованием в качестве оперативных таксономических единиц (ОТЕ) последовательностей всех цитохромов трех организмов – *A. thaliana*, *Ph. patens*, *Branchiostoma floridae*. Обе модели подтверждают предположение о древнем эволюционном происхождении семейства CYP74. Воспроизводимое объединение эпоксиалкогольсинтазы CYP74B2 хордового животного, гидропероксиддиазы CYP74Y мха и алленоксидсинтазы CYP74A1 двудольного растения в монофилетичную группу указывает на высокую консервативность первичной структуры ферментов CYP74.

Принятые алгоритмы молекулярно-филогенетического анализа учитывают только аминокислотные замещения (нуклеотидные замены). В то же время, характерной особенностью ферментов CYP74, отличающей их от других цитохромов P450, является наличие дополнительной консервативной последовательности из 9 аминокислотных остатков в гем-связывающей петле. Ранее высказывалось предположение, что эта последовательность возникла у семейства CYP74 после инсерции в соответствующую часть гена [Brash, 2009]. Однако в этом случае следует признать, что в одни и те же локусы генов CYP74

животных, растений и бактерий независимо были встроены фрагменты одинаковой последовательности. Данное событие в эволюции цитохромов P450 является менее вероятным, чем делеция 9 кодонов у одного из анцесторных генов суперсемейства.

В отличие от ферментов CYP74, остальные цитохромы P450 являются монооксигеназами или оксигеназами и используют молекулярный кислород в качестве субстрата. Отсутствие цитохромов P450 у облигатных анаэробов указывает на то, что начало эволюции этих ферментов связано с возникновением фотосинтеза и последующей сменой восстанавливающей атмосферы на окислительную. Накопление кислорода в атмосфере началось 850 млн. лет назад [Konhauser et al., 2009] и совпало с появлением последнего эукариотического общего предка [Cavalier-Smith, 2010]. При последующем изменении условий существования основным направлением эволюции являлась адаптация клеточного метаболизма, связанная с выработкой механизмов защиты от повреждения биополимеров активными формами кислорода (АФК) и способов ликвидации последствий этих повреждений. Использование молекулярного кислорода эукариотами началось позднее благодаря приобретению митохондрий [Di Giulio, 2007]. Переход эукариот к аэробному образу жизни произошел за 150 млн. лет до дивергенции животных и растений, связанной с приобретением последними хлоропластов. Сопоставление событий с геологической шкалой выявляет резкое ускорение эволюции в этот период. Длительное (более 1 млрд. лет) существование древних организмов в условиях низких концентраций кислорода после появления первых цианобактерий 2,1 млрд. лет назад [Javaux et al., 2004] создавало предпосылки для первичной адаптации к образованию перекисных продуктов.

Одним из последствий повреждения мембран АФК является образование гидроперекисей жирных кислот. Вероятно, эти соединения, как субстрат для образования оксипинов, существовали до появления липоксигеназ. В то же время, нельзя исключать, что эволюция многих железосодержащих белков, в том числе липоксигеназ, десатураз и цитохромов CYP74, обеспечивающих липоксигеназный каскад, протекала параллельно. В результате перехватываемый ими кислород передавался различным субстратам, которые затем претерпевали превращения во все более сложных и разветвленных цепях реакций. При этом некоторые компоненты могли включаться в существующие цепи на определенных этапах. Так, например, ненасыщенные жирные кислоты могли синтезироваться первоначально в анаэробных условиях без участия десатураз, как в настоящее время происходит у некоторых бактерий, у которых синтазы жирных кислот способны образовывать двойную связь в процессе синтеза ацильной цепи [Heath, Rock, 1996; Лось, 2001].

Еще до радикального изменения состава атмосферы локальные концентрации кислорода в фотосинтезирующих клетках и непосредственном их окружении (матах и биопленках) могли быть выше средних значений. Это означает, что для фотосинтетиков и организмов, входящих в сообщества с ними, развитие защиты от перекисных продуктов было актуально уже около двух млрд. лет назад. Это создавало предпосылки для длительной эволюции антиоксидантных ферментов и цитохромов до формирования кислородной атмосферы. При этом предковые формы цитохромов P450 могли обходиться

одним субстратом – продуктом спонтанного окисления биополимеров. Возможно, ферменты СУР74, осуществляющие подобную реакцию в отношении гидроперекисей жирных кислот, являются рудиментарными представителями этой древней группы цитохромов. Удаление поврежденных молекул могло происходить в результате превращения их в диффундирующие и летучие соединения, в том числе, оксипирины. Когда в результате эволюции развились более эффективные способы антиоксидантной защиты, данная группа могла быть элиминирована. Сохранению семейства СУР74 способствовало переключение с репаративных функций на сигнальные. Кроме того, ферменты СУР74 непосредственно участвовали в эволюции антиоксидантной системы. Показано, что АОС кораллов [Koljak *et al.*, 1997] и цианобактерий [Schneider *et al.*, 1997] имеют сходство с каталазами. Например, белок *Mycobacterium avium*, проявляющий сходство структуры с каталазами и ферментами СУР74, с высокой эффективностью метаболизирует перекись водорода в присутствии как (13*S*)- так и (9*S*)-гидроперекисей линолевой, либо (15*S*)-, (8*R*)-гидроперекисей арахидоновой кислот, необходимых в качестве ко субстрата в пероксидазной реакции [Pakhomova *et al.*, 2009].

Гипотезу о древнем происхождении СУР74 подтверждают следующие факты. Во-первых, локализация современных ферментов семейства в значительной степени связана с хлоропластами, являющимися потомками первых фотосинтезирующих организмов. Во-вторых, регрессивная эволюция белков путем утраты фрагментов аминокислотных цепей и связанных с ними функций требует меньше времени по сравнению с усложнением структуры путем приобретения новых функциональных последовательностей; в этом смысле делеция фрагмента из 9 аминокислотных остатков более вероятна, чем их случайная вставка с появлением новой функции. В-третьих, отсутствие кислорода предшествовало его появлению в атмосфере в качестве доступного субстрата. В-четвертых, на независимо построенных филогенетических деревьях представители семейства (клана) СУР74 собраны в отдельную монофилетическую ветвь. В-пятых, данная модель не требует привлечения дополнительных эволюционных механизмов, эффективность которых не может быть подтверждена; так, для объяснения присутствия представителей СУР74 у таксономически отдаленных организмов было выдвинуто предположение о горизонтальном переносе соответствующих генов между растениями, протеобактериями и животными [Nelson, Werck-Reichhart, 2011; Nelson *et al.*, 2013]. В качестве еще одного аргумента можно привести тот факт, что по сравнению с монооксигеназной реакцией реакция превращения гидроперекиси с участием ферментов СУР74 является простой, не требующей переносчиков электронов; предположение о поступательном развитии от двухкомпонентной системы к сложному реакционному комплексу представляется оправданным.

Современное распространение ферментов СУР74, в основном, связано с сосудистыми растениями. Это обстоятельство послужило основой концепции позднего происхождения семейства. Новые данные о присутствии АОС, ГПЛ и ЭАС у бактерий и животных дают основания для пересмотра этих представлений. Тем не менее, предположение о том, что ферменты СУР74 могли передаваться и растениям и животным от общего предка отвер-

гается на том основании, что эти ферменты не обнаружены у одноклеточных простейших и зеленых водорослей [Nelson, Werck-Reichhart, 2011]. Однако отсутствие той или иной группы ферментов на том или ином отрезке филогенетической линии может быть следствием редуктивной эволюции, часто встречающейся в природе.

Существующая классификация ферментов СУР74 была заложена с использованием ограниченного объема данных, и в настоящее время нуждается в реорганизации. Согласно ранней классификации семейство было разделено на четыре подсемейства: СУР74А, СУР74В, СУР74С и СУР74D [Itoh, Howe 2001]. Однако появляется все больше ферментов СУР74, которые, согласно критерию сходства первичной структуры, не могут быть отнесены к этим подсемействам. Примерами служат ферменты СУР74 споровых и голосеменных, протеобактерий, хордовых и кишечнополостных. По обновленной классификации [Nelson, 2013] ферменты протеобактерий и животных не входят в новообразованный таксон клан СУР74, а относятся к новым семействам. С такой классификацией не согласны некоторые исследователи, по мнению которых функциональное сходство не менее важно для классификации, чем сходство последовательностей [Lee *et al.*, 2008].

Результаты нашей работы показывают, что среди изученных подсемейств СУР74 могут появляться новые члены, гомологичные по степени сходства первичной структуры и при этом отличающиеся по типу катализа от ферментов, образующих подсемейство. Так, LuDES, гомологичная ферментам СУР74В, является ДЭС, в отличие от изученных членов подсемейства, обладающих активностью 13-ГПЛ.

Нами было предпринято построение филогенетического дерева клана СУР74, включающего новые ферменты, в том числе, охарактеризованные в данной работе (рис. 19). Кроме ферментов высших растений дерево позволяет включить в семейство (клан) СУР74 последовательности АОС коралла *A. palmata* (ApAOS) и плаунка *Selaginella moellendorffii* (SemAOS), эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС) ланцетника *B. floridae* (BfEAS). Хотя экстраполяция на дальние эволюционные дистанции связана со значительной ошибкой, полученный результат воспроизводился с применением разных алгоритмов построения эволюционных моделей и при использовании разных критериев выборки ОТЕ.

Согласно полученной модели ферменты СУР74 плауновидных (SemAOS) и мхов (СУР74G, рис. 19) наиболее близки к ферментам СУР74 животных, что согласуется с общими представлениями об эволюции живых существ.

Общепризнанного критерия отнесения последовательности фермента к тому или иному подсемейству СУР74 не выработано. По нашим оценкам, степень идентичности между представителями признанных подсемейств не выходит за пределы 50 %. При обозначении подсемейств мы руководствовались этим пороговым значением.

Разделение на филогенетическом дереве двух основных типов ферментов СУР74 – ГПЛ и АОС – указывает на то, что эта дивергенция произошла на ранних этапах эволюции семейства. В пользу такого вывода также свидетельствует тот факт, что оба типа ферментов представлены у филогенетически отдаленных организмов. Разделение на 9- и 13-гидропероксид-специфичные ферменты также закономерно отражает эволюцию се-

мейства. Две удаленные терминальные монофилетические группы – ГПЛ (подсемейства CYP74B, CYP74F) и АОС (подсемейство CYP74A) включают ферменты, обладающие исключительно 13-гидропероксид-специфичностью. В то же время, ферменты эволюционно более молодой группы CYP74C/CYP74D/CYP74A* обладают 9-гидропероксид-специфичной или смешанной активностью. До настоящего времени 9-гидропероксид-специфичные ферменты CYP74 обнаружены только у растений отдела покрытосеменных.

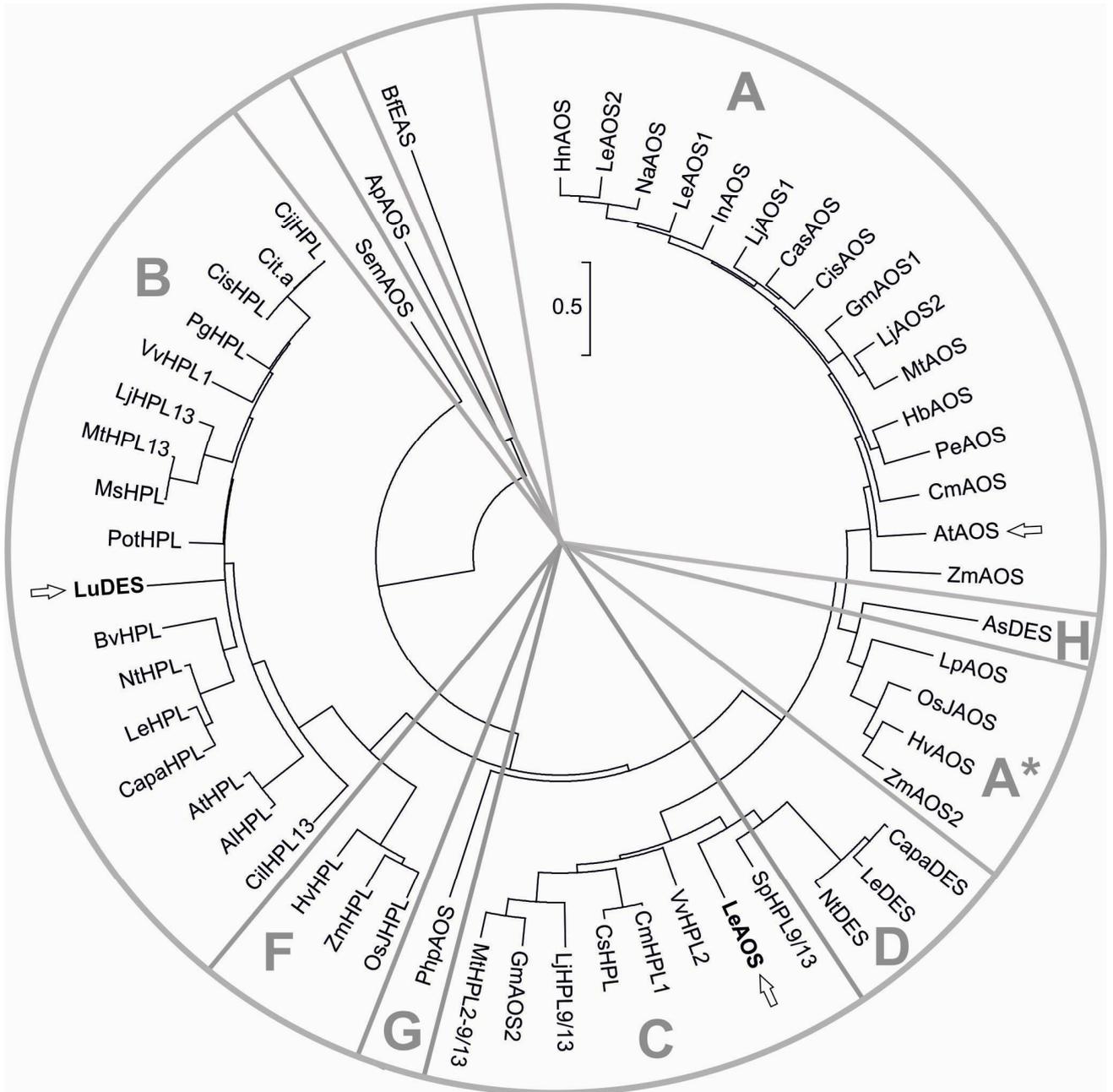


Рис. 19. Филогенетическое дерево цитохромов CYP74, построенное методом «присоединения соседей». Предполагаемые подсемейства обозначены символами, предложенными Д. Нельсоном для соответствующих групп [<http://drnelson.uthsc.edu>]. Стрелками указаны ферменты, в отношении которых проведена конверсия ферментативной активности, в том числе в данной работе (выделено шрифтом).

Проведенный анализ не позволил определить филогенетические отношения ГПЛ и АОС. Результаты работ по сайт-направленному мутагенезу [Toporkova *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008] показали, что единичные аминокислотные замены могут привести к превращению АОС в ГПЛ. Дивинилэфирсинтаза LuDES была превращена в алленоксидсинтазу. Учитывая то, что реверсии более вероятны, чем приобретение функций *de novo*, можно предположить, что эволюция семейства CYP74 состояла в последовательном превращении ферментов ГПЛ → АОС → ДЭС. В то же время, нельзя исключать, что у разных групп CYP74 был единый предковый фермент с собственной каталитической функцией. Исходя из механизма реакций, катализируемых ферментами CYP74, наиболее вероятным кандидатом на предковую форму является эпоксиалкогольсинтаза (ЭАС). Этот фермент был обнаружен у *B. floridae* [Lee *et al.*, 2008]. Выявление ЭАС у высших растений могло бы дать ценную информацию для уточнения эволюционной модели семейства CYP74.

Дивинилэфирсинтаза LuDES не единственное функциональное исключение из своей филогенетической группы. Дивинилэфирсинтаза чеснока (AsDES) также не соответствует группе 9/13-АОС и помещена в отдельное подсемейство. Таким образом, одним из результатов нашей работы является заключение о полифилетическом эволюционном происхождении дивинилэфирсинтаз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря прогрессу геномных технологий, база данных первичной структуры белков увеличивается лавинообразно. В то же время, работы по характеристике ферментов часто завершаются поверхностным описанием белка. Так, субстратные предпочтения липоксигеназ растений, регио- и стереоспецифичность их действия не достаточно изучены, что препятствует выяснению общих закономерностей 9- и 13-липоксигеназных путей. Экспериментальные данные подтверждают построенную нами модель позиционирования субстрата в активном центре липоксигеназ, согласно которой расположение пентадиеновой группировки определяется объемом субстрат-связывающей полости фермента. Показано [Чечеткин и др., 2009], что для ZmLOX3 определяющим фактором соответствия субстрата является расстояние от карбоксильного конца до центра пентадиеновой группировки. Скорость и специфичность реакции сохраняются, если это расстояние такое же, как у линолевой кислоты, что наблюдается в случае гексадекадиеновой кислоты. Стерические препятствия для позиционирования 20:2 и 22:2 в активном центре фермента могут быть причиной потери регио- и стереоспецифичности диоксигенирования.

Ранее сообщалось, что замена аминокислотного остатка приводила к смене регио- и стереоспецифичности действия 13-ЛОГ [Coffa, Brash, 2004]. Нами показано, что мутация A562G 9-специфичной липоксигеназы ZmLOX3 изменяет лишь региоспецифичность фермента. Таким образом, результаты нашего исследования указывают на ограниченность теории, объясняющей специфичность липоксигеназ ориентацией субстрата в активном центре, и необходимость разработки новой модели, основанной на признании того, что субстрат погружается в активный центр только метильной концевой группой.

Согласно полученным нами результатам, 7-гидроперекись гексадекатриеновой кислоты может вовлекаться в последующие реакции липоксигеназного каскада. Дивинилэфирсинтаза табака *in vitro* преобразует данный субстрат в динор-колнеленовую кислоту, алленоксидсинтаза кукурузы в α -кетол – 7-гидрокси-8-оксо-(10Z,12Z)-гексадекадиеновую кислоту. Это открывает новые возможности исследования гексадеканоидного липоксигеназного пути и механизмов регуляции специфичности действия липоксигеназ.

В липоксигенажном каскаде липоксигеназы и цитохромы P450 семейства CYP74 действуют координировано. Продолжением исследования, посвященного 9-специфичному направлению каскада, явилось изучение алленоксидсинтазы LeAOS3 томата, обладающей необычными свойствами. Известно, что большинство АОС катализируют образование из гидроперекисей жирных кислот окисей аллена, которые претерпевают спонтанный гидролиз и, в гораздо меньшей степени, спонтанную циклизацию [Tijet, Brash, 2002]. В то же время, характер дальнейших превращений окиси аллена в присутствии LeAOS3 необычен. Во-первых, время полужизни окиси аллена зависит от концентрации фермента. Во-вторых, LeAOS3 в насыщающей концентрации полностью превращает субстрат через окись аллена в циклопентенон и α -кетол за 20 секунд при 0 °С. В-третьих, α -кетол образуется стереоспецифично. Конечными продуктами являются (9R)- α -кетол и рацемическая смесь *цис*-10-оксо-11-фитоеновой кислоты.

Приведенный путь метаболизма жирных кислот характерен не только для томата. Ранее показано, что аналогичные пути превращения жирных кислот в циклопентеноны и кетоны характерны для имбиря, ландыша и подсолнечника [Ogorodnikova *et al.*, 2008].

Практически все ферменты суперсемейства P450 являются монооксигеназами, и для них характерно использование двух субстратов: окисляемого соединения и молекулярного кислорода. В реакции, катализируемой ферментами CYP74, участвует кислород гидроперокси-группы окисленной жирной кислоты. Соответственно, аминокислотные остатки, участвующие в связывании и активации кислорода и переносе электронов у монооксигеназ, в последовательностях CYP74 отсутствуют. Было высказано предположение, что функция центрального домена I-спирали CYP74 (HCD), соответствующего «кислород-связывающему домену» монооксигеназ, заключается во взаимодействии с гидроперекисной группировкой субстрата. Сделанные заключения были проверены с помощью сайт-направленного мутагенеза. Результатом этих экспериментов послужили конверсии ферментов CYP74. Четыре единичные мутации LeAOS3 F295I, K302S, T366Y и S297A превратили АОС (дегидразу) в ГПЛ (изомеразу). Это свидетельствует о роли данных аминокислотных остатков домена HCD в специфичной функции фермента.

Учитывая, что реверсии к исходному фенотипу встречаются чаще, чем образование нового, можно предположить, что предковый фермент CYP74 обладал гидропероксидлиазной каталитической активностью, в то время как алленоксидсинтазная и дивинилэфирсинтазная активности являются ее производными.

Дивинилэфирсинтазы наименее изучены из ферментов липоксигеназного каскада (за исключением эпоксиалкогольсинтаз, включение которых в клан CYP74 еще окончательно

не признано). В настоящей работе впервые описана рекомбинантная 13-гидропероксид-специфичная ДЭС – LuDES (CYP74B16), – которая обладает высокой степенью сходства по отношению к 13-ГПЛ (CYP74B) и отличается от всех ранее описанных ДЭС по субстратной специфичности, продуктам реакции и органоспецифичности экспрессии гена [Гоголев и др., 2011]. В то же время, LuDES, вероятно, не единственная ДЭС, катализирующая образование (ω 5Z)-этероленовой кислоты или родственных соединений. Такие дивиниловые эфиры были обнаружены в растениях рода лютик (*Ranunculus*) и у бурых водорослей рода ламинария (*Laminaria*) [Proteau, Gerwick, 1993]. Сходный дивиниловый эфир с (Z,Z)-бутадиеновым фрагментом был обнаружен ранее в красной водоросли полинейра (*Polyneura latissima*) [Grechkin, 2002]. Соответствующие ДЭС остаются совершенно неизученными. Они могут оказаться либо ортологами LuDES, либо представителями других, в том числе, новых подсемейств CYP74.

В молекулярной филогении, связанной с систематикой ферментов, тип каталитической реакции принято ассоциировать с определенным подсемейством. В случае семейства CYP74 это соответствие не соблюдается. Так, подсемейство CYP74C содержит АОС и ГПЛ, подсемейство CYP74B – ГПЛ и ДЭС, CYP74A – АОС и ДЭС (рис. 19). В то же время, подсемейства CYP74D и CYP74H выделены лишь по функциональному признаку.

Исходя из анализа первичной структуры LuDES, можно было бы предположить, что этот фермент является природным мутантом 13-ГПЛ. В связи с этим, нами была предпринята попытка направленной модификации LuDES путем замены E292G, моделирующей реверсию данной мутации. Однако фермент полностью утратил активность дивинилэфирсинтазы и приобрел активность алленоксидсинтазы. Полученный результат кажется неожиданным, хотя он подтверждает важную роль домена IHCD в определении типа катализа CYP74. Кроме того, не отрицая базовой роли гидропероксидлиазной реакции для ферментов CYP74, он вписывается в модель эволюции семейства CYP74, предполагающей последовательное превращение ферментов ГПЛ \rightarrow АОС \rightarrow ДЭС.

Насколько нам известно, до настоящей работы [Toporkova *et al.*, 2008] и одновременно выполненного исследования [Lee *et al.*, 2008], в литературе не было примеров принципиального изменения катализа ферментов в результате единичных замен аминокислотных остатков. Полученная серия превращений ферментов CYP74 позволяет заключить, что разработан алгоритм направленных модификаций первичной структуры белков данного семейства, с высокой вероятностью изменяющих их каталитические свойства. Алгоритм включает построение филогенетических моделей, анализ третичной структуры белков, изучение механизма катализа. Промежуточным результатом служит определение консервативных, каталитически важных доменов, положения субстрата относительно активного центра, выявление роли отдельных аминокислотных остатков в зависимости от их свойств и пространственного расположения. На завершающем этапе должно быть осуществлено моделирование предполагаемых каталитических свойств белка с измененной структурой. Результаты проведенных экспериментов подтверждают эффективность

используемого алгоритма и открывают возможности для целенаправленного изменения каталитического действия ферментов СУР74.

Полученные данные подтверждают эволюционное происхождение семейства СУР74 от единого предкового гена. Обнаружение представителей семейства у прокариот и животных дают основание отнести время образования такого предкового гена ко времени существования последнего общего предка эукариот. Результаты расчета эволюционных дистанций также свидетельствуют о древнем происхождении семейства и соответствии его филогенетической модели общей эволюции организмов, у которых обнаружены ферменты СУР74. Таким образом, предположение о существенной роли горизонтального переноса генов в эволюционной истории семейства СУР74 не является обоснованным.

Несмотря на то, что в настоящее время липоксигеназы представлены широко, их эволюционная история связана, в основном, с эукариотическими организмами (рис. 17). Вероятно, распространение липоксигеназ не являлось обязательным условием возникновения ферментов СУР74. Не нуждаясь в молекулярном кислороде, эти ферменты могли появиться в период восстанавливающей атмосферы, выполняя репаративные функции, связанные с элиминацией гидроперекисей. Протекторная функция могла принадлежать и первыми липоксигеназам, способным перехватывать кислород и передавать его цитохромам в виде гидроперекисей. В этом случае, два железосодержащих белка могли пройти путь коэволюции, на протяжении которого их протекторная функция трансформировалась в метаболическую и сигнальную; в итоге был сформирован липоксигеназный каскад. Другое направление эволюции цитохромов Р450 определилось кооперацией с переносчиками электронов и усложнением реакции за счет формирования серии промежуточных комплексов в процессах поэтапного восстановления и окисления железа.

Проверить высказанные предположения экспериментально не представляется возможным. Однако можно отметить, что у современных растений липоксигеназный сигнальный каскад является частью фитоиммунитета и активизируется при повреждениях клеток, связанных с последующими окислительными событиями, в том числе такими драматичными, как окислительный взрыв [Тарчевский, 2002].

С точки зрения общей молекулярной филогении на примере липоксигеназ и цитохромов СУР74 можно сделать заключение, что высокий потенциал структурной и функциональной (фенотипической) изменчивости не всегда определяет темпы молекулярной эволюции. Поворотным пунктом в эволюции ферментов следует считать события, обеспечивающие выбор партнеров по коэволюции. Это обуславливает дивергенцию ферментов в связи с их принадлежностью к новым биохимическим процессам и одновременно расширяет спектр каскадов реакций, свойственных клеткам данного вида, увеличивая его физиологические возможности. При этих событиях возрастает вероятность скачкообразных изменений скорости эволюции, вызывающих сбои молекулярных часов, что часто обнаруживается при филогенетических построениях.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что ферменты ZmLOX3 кукурузы и GmLOX1 сои являются специфичными (9*S*)- и (13*S*)-липоксигеназами; условия реакции не оказывают влияния на специфичность действия данных ферментов.
2. Показано, что мутантная форма ZmLOX3 A562G при окислении линолевой кислоты проявляет измененную региоспецифичность действия, образуя (13*R*)-гидроперекиси наряду с (9*S*)-гидроперекисями, что связано с изменением объема полости активного центра.
3. Созданы трехмерные модели взаимодействия субстратов (жирных кислот и сложных липидов) с активными центрами липоксигеназ ZmLOX3 и GmLOX1, согласно которым 9- и 13-специфичность липоксигеназных реакций определяется не позиционированием субстрата, а архитектурой ферментов.
4. Выявлено, что первичная структура большинства липоксигеназ определяет специфичность ферментативной активности; исключения составляют липоксигеназы высших растений, у которых взаимосвязь между аминокислотной последовательностью и региоспецифичностью действия не выявляется. Липоксигеназы, обладающие 9-специфичностью, являются монофилетической группой, произошедшей от 13-специфичных липоксигеназ у цветковых растений перед дивергенцией однодольных и двудольных.
5. Показано участие (7*S*)-гидроперекиси гексадекатриеновой кислоты в липоксигеназном каскаде растений: при участии дивинилэфирсинтазы NtDES табака и алленоксидсинтазы ZmAOS1 кукурузы (7*S*)-гидроперекись превращается в дивиниловый эфир (динор-колнеленовую кислоту) и α -кетол, соответственно.
6. Установлено, что алленоксидсинтаза LeAOS3 томата, принадлежащая подсемейству CYP74C, является мультифункциональным ферментом и, в отличие от алленоксидсинтаз подсемейства CYP74A, катализирует не только синтез, но также гидролиз и циклизацию окиси аллена. Гидролиз протекает стереоспецифично с образованием (9*R*)- α -кетола; циклизация приводит к образованию рацемической смеси *цис*-10-оксо-11-фитоеновой кислоты.
7. Клонированы нуклеотидные последовательности, соответствующие трем полноразмерным мРНК генов подсемейства CYP74B, обнаруженным в транскриптоме листьев льна (*Linum usitatissimum* L.), инокулированных клетками фитопатогенного штамма *Pectobacterium atrosepticum*SCRI1043. Получен очищенный препарат функционально активного рекомбинантного фермента CYP74B16 (GenBank ID: HQ286277.1).
8. Определены кинетические параметры фермента CYP74B16, в соответствии с которыми новый фермент является строго 13-гидропероксид-специфичным; предпочтительным субстратом является 13-гидроперекись α -линоленовой кислоты, основным продуктом катализируемой реакции – (ω 5*Z*)-этеролоновая кислота. Фермент CYP74B16 идентифицирован как 13-специфичная дивинилэфирсинтаза, которой присвоено тривиальное название LuDES. По критериям молекулярной филогении LuDES относится к под-

семейству CYP74B, включавшему до настоящего времени исключительно 13-гидропероксид-специфичные гидропероксидазы.

9. Выявлены сайты, определяющие механизм каталитического действия ферментов CYP74. На основе анализа первичной и третичной структуры белков впервые проведены конверсии ферментов разных функциональных групп. В результате аминокислотной замены E292G в центральном домене I-спирали LuDES проведена конверсия дивинилэфирсинтазы в алленоксидсинтазу. Замены аминокислотных остатков F295I, K302S, S297A и T366Y в полипептидной цепи LeAOS3 привели к превращению алленоксидсинтазы (дегидразы) в гидропероксидазу (изомеразу). Мутации MtHPL F284I и N285T привели к появлению продуктов гомолитической фрагментации углеродного остова – (9Z,11E)-13-оксотридекадиеновой и (9Z)-11-оксоундеценовой кислот.

10. В результате объединения ферментов CYP74 животных, споровых и цветковых растений в отдельную монофилетическую группу, гомологичную цитохромам P450 прокариот и нитчатых грибов, показано древнее происхождение семейства CYP74, имевшее место до дивергенции последнего общего предка эукариот. Данное семейство могло участвовать в начальных этапах эволюции цитохромов P450.

11. Показано, что в эволюции ферментов CYP74 высших растений появление монофилетической группы 13-ГПЛ (подсемейства CYP74B, CYP74F) происходило одновременно с появлением 13-АОС споровых (подсемейство CYP74G). Следующим этапом явилось образование группы, включающей 13-АОС цветковых (CYP74A), 9/13-АОС (подсемейство CYP74A*), 9-АОС и 9/13-ГПЛ (подсемейство CYP74C).

12. Дивинилэфирсинтазы имеют полифилетическое происхождение на поздних этапах эволюции семейства CYP74 и не образуют таксономически обособленной единицы; выделение данных ферментов в отдельные подсемейства (CYP74D, CYP74H) является условным.

13. Субстратная специфичность и тип катализа являются существенными таксономическими признаками представителей семейства CYP74, отражающими распределение по филогенетическим группам; дивинилэфирсинтазы связаны с близкородственными группами общей субстратной специфичностью.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Grechkin, A.N. Hydroperoxide lyases (CYP74C and CYP74B) catalyze the homolytic isomerization of fatty acid hydroperoxides into hemiacetals / A.N. Grechkin, F. Bruhlmann, L.S. Mukhtarova, Y.V. Gogolev, M. Hamberg // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2006. – V. 1761. – P. 1419-1428.
2. Чечеткин, И.Р. Регио- и стереоспецифичность рекомбинантной липоксигеназы-2 сои / И.Р. Чечеткин, Ф.К. Мухитова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // *Доклады Академии наук*. – 2007. – Т. 415, № 6. – С. 829-831.
3. Grechkin, A.N. Tomato CYP74C3 is a multifunctional enzyme not only synthesizing allene oxide but also catalyzing its hydrolysis and cyclization / A.N. Grechkin, L.S. Mukhtarova,

- L.R. Latypova, **Y.V. Gogolev**, Y.Y. Toporkova, M. Hamberg // *Chembiochem* – 2008. – V. 9. – P. 2498-2505.
4. Toporkova, Y.Y. Determinants governing the CYP74 catalysis: Conversion of allene oxide synthase into hydroperoxide lyase by site-directed mutagenesis / Y.Y. Toporkova, **Y.V. Gogolev**, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin // *FEBS Letters*. – 2008. – V. 582. – P. 3423-3428.
5. Чечеткин, И.Р. Специфичность окисления гомологов линолевой кислоты липоксигеназами растений / И.Р. Чечеткин, Е.В. Осипова, Н.Б. Тарасова, Ф.К. Мухитова, М. Хамберг, **Ю.В. Гоголев**, А.Н. Гречкин // *Биохимия*. – 2009. – Т. 74. – С. 1052-1059.
6. Осипова, Е.В. Рекомбинантная 9-липоксигеназа кукурузы: экспрессия, очистка и свойства / Е.В. Осипова, Р.И. Чечеткин, **Ю.В. Гоголев**, Н.Б. Тарасова // *Биохимия*. – 2010. – Т. 75. – С. 968-983.
7. Топоркова, Я.Ю. Изменение катализа ферментов подсемейства CYP74C в результате сайт-направленного мутагенеза / Я.Ю. Топоркова, Е.В. Осипова, Л.Ш. Мухтарова, **Ю.В. Гоголев**, А.Н. Гречкин // *Доклады Академии наук*. – 2010а. – Т. 435. – С. 117-120.
8. Топоркова, Я.Ю. Происхождение разнообразия семейства CYP74 цитохромов P450 по результатам сайт-направленного мутагенеза / Я. Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, **Ю.В. Гоголев**, А.Н. Гречкин // *Вестник Московского университета. Сер. 16, Биология*. – 2010б. – N 4. – С. 29–32
9. Chechetkin, I.R. Oxidation of glycerolipids by maize 9-lipoxygenase and its A562G mutant / I.R. Chechetkin, E.V. Osipova, L.L. Antsygina, **Y.V. Gogolev**, A.N. Grechkin // *Chem. Phys. Lipids* – 2011. – V. 164. – P. 216-220.
10. Mukhtarova, L.S. Hydroperoxide lyase cascade in pea seedlings: Non-volatile oxylipins and their age and stress dependent alterations / L.S. Mukhtarova, F.K. Mukhitova, **Y.V. Gogolev**, A.N. Grechkin // *Phytochemistry*. – 2011. – V. 72. – P. 356-364.
11. **Гоголев, Ю.В.** Выявление и первичная характеристика нового цитохрома CYP74B1 льна (*Linum usitatissimum*) / **Ю.В. Гоголев**, С.С. Горина, Н.Е. Гоголева, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, И.Р. Чечеткин, А.Н. Гречкин // *Доклады Академии наук*. – 2011. – Т. 440. – С. 540-543.
12. **Gogolev, Y.V.** Green leaf divinyl ether synthase: Gene detection, molecular cloning and identification of a unique CYP74B subfamily member / **Y.V. Gogolev**, S.S. Gorina, N.E. Gogoleva, Y.Y. Toporkova, I.R. Chechetkin, A.N. Grechkin // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – V. 1821. – P. 287-294.
13. Ермилова, В.С. Изменение каталитических свойств дивинилэфирсинтаз в результате единичных аминокислотных замен / Ермилова В.С., Горина С.С., Топоркова Я.Ю., Мухтарова Л.Ш., **Гоголев Ю.В.**, Гречкин А.Н. // *ДАН*. – 2013. – С. 1-4. – В печати.
14. Toporkova Y.Y. Structure-function relationship in CYP74 family: conversion of divinyl ether synthases into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis / Y.Y. Toporkova, V.S. Ermilova, S.S. Gorina, L.S. Mukhtarova, E.V. Osipova, **Y.V. Gogolev**, A.N. Grechkin // *FEBS Letters*. – 2013. – P. 1-7. – In press. DOI 10.1016/j.febslet.2013.06.030.

ТЕЗИСЫ МАТЕРИАЛОВ НАУЧНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ

1. Осипова Е.В. Получение и свойства рекомбинантного белка 9-липоксигеназы кукурузы и его мутантной формы / Е.В. Осипова, И.Р. Чечеткин, А.Ю. Ярин, Ф.К. Мухитова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сб. тезисов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. – 2008. – Новосибирск: «Арта». – С. 42.
2. Toporkova Y.Y. Characterization of tomato allene oxide synthase LeAOS3 catalysis and its alteration by site-directed mutagenesis / Y.Y. Toporkova, Y.V. Gogolev, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin // FEBS Journal. – 2009. – V. 276, Supp. 1 "34-th FEBS congress "life's Molecular Interactions". – Prague: Wiley-Blackwell. – P. 14.
3. Toporkova Ya.Yu. Origin of the CYP74 family of cytochromes P450 diversity based on results of site-directed mutagenesis / Ya.Yu. Toporkova, L.Sh. Mukhtarova, Yu.V. Gogolev, A.N. Grechkin // Abstracts of the 2nd Moscow International Conference "Molecular Phylogenetics". – 2010. – Moscow: Torus press. – P. 169.
4. Toporkova Ya.Yu. Alteration of catalytic mechanism of tomato allene oxide synthase LeAOS3 and alfalfa hydroperoxide lyase MtHPL by site-directed mutagenesis / Ya.Yu. Toporkova, L.Sh. Mukhtarova, Yu.V. Gogolev, A.N. Grechkin // 35th FEBS Congress Abstracts Book. – 2010. – Gothenburg: Wiley-Blackwell. – P. 260.
5. Горина С.С. Дивинилэфирсинтаза LuDES льна – новый фермент подсемейства CYP74B / С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова, Н.Е. Гоголева, Л.Ш. Мухтарова, И.Р. Чечеткин, Ю.В. Гоголев // Сб. тезисов VII Съезда общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий». – 2011. Н. Новгород: Изд. НГУ. – С. 196–197.
6. Gorina S.S. The unique enzyme of the CYP74B subfamily from flax (*Linum usitatissimum* L.) / S.S. Gorina, Y.Y. Toporkova, N.E. Gogoleva, L.S. Mukhtarova, I.R. Chechetkin, Y.V. Gogolev and A.N. Grechkin // 36th FEBS Congress Abstracts Book. – 2011. – Torino: Wiley-Blackwell. – P. 211.
7. Топоркова Я.Ю. Исследование структуры комплекса мини- фермента, моделирующего каталитический центр цитохрома P450 (CYP74), с субстратом / Я.Ю. Топоркова, С.С. Горина, Л.Ш. Мухтарова, Е.А. Ермакова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сб. тезисов 4 съезда биофизиков России. – 2012. – Н. Новгород: Изд. НГУ. – стр. 219.
8. Toporkova Y.Y. Mini-enzyme modeling catalytic center of cytochrome P450 (CYP74) as a model for enzyme-substrate complex study / Y.Y. Toporkova, S.S. Gorina, E.A. Ermakova, L.S. Mukhtarova, Y.V. Gogolev, Y.F. Zuev, A.N. Grechkin // 4th EMBO meeting Abstracts Book. – 2012. – Nice: Wiley-Blackwell. – P. 88.
9. Gorina S.S. Structural and functional characteristics of new divinyl ether synthase (CYP74B16) from flax (*Linum usitatissimum* L.) / S.S. Gorina, Y.Y. Toporkova, L.S. Mukhtarova, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // Plant Biology Congress. Book of abstracts. – 2012. – Freiburg. – P. 14.
10. Toporkova Y.Y. Interconversions of the enzymes within the CYP74 family by site-directed mutagenesis / Y.Y. Toporkova, S.S. Gorina, V.S. Ermilova, L.S. Mukhtarova, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // 18th International conference on cytochrome P450: biochemistry, biophysics, biotechnology. Book of abstracts. – 2013. – Seattle. – P. 106.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую признательность моему научному консультанту академику А.Н. Гречкину за неоценимую помощь в работе. Выражаю искреннюю благодарность профессору Н. Келлер (Университет Висконсин) и доктору А. Фаммартини (Университет Турина) за предоставленные препараты рекомбинантных плазмид. Благодарю сотрудников лаборатории оксипептинов Казанского института биохимии и биофизики Л.Ш. Мухтарову, Ф.К. Мухитову, Н.В. Ланцову, И.Р. Чечеткина, А.Ю. Ярина за помощь в подготовке растительного материала и проведение биохимических исследований. Выражаю признательность профессору Ю.Ф. Зуеву и Б.И. Хайрутдинову за проведение ЯМР-исследований. Выражаю особую благодарность Н.Е. Гоголевой, Я.Ю. Топорковой, С.С. Гориной, Е.В. Осиповой и всем аспирантам и сотрудникам лаборатории молекулярной биологии, без чьих знаний, таланта и увлеченности данная работа не могла бы состояться.

Выражаю глубокую благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований, Президиуму РАН и Министерству образования РФ за финансовую поддержку исследований.