

На правах рукописи

Горина Светлана Сергеевна

**ДИВИНИЛЭФИРСИНТАЗА СУР74В16 ЛИСТЬЕВ ЛЬНА:
ОБНАРУЖЕНИЕ, МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ И СВОЙСТВА**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2013

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

Научный руководитель: академик РАН,
директор института КИББ КазНЦ РАН
Александр Николаевич Гречкин

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, доцент
руководитель группы
ИФР им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
Ирина Васильевна Голденкова-Павлова

доктор биологических наук,
заведующий лабораторией
КИББ КазНЦ РАН, г. Казань
Фарида Вилевна Минибаева

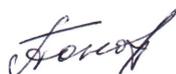
Ведущая организация: Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Казанский
(Приволжский) Федеральный Университет»,
г. Казань

Защита состоится 25 апреля 2013 г. в 11⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д002.005.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание 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, kibmail@mail.knc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН.

Автореферат разослан «___» марта 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Анастасия Анатольевна Пономарева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Липоксигеназный каскад является одной из важных сигнальных систем растений. В результате функционирования этого каскада происходит образование физиологически активных веществ – оксипинов [Тарчевский, 2001]. Оксипины обнаружены у животных, протеобактерий, бурых и красных водорослей, а также у всех наземных растений [Lee *et al.*, 2008]. У высших растений они участвуют в регуляции роста, дифференцировке клеток, морфогенезе, органогенезе, а также в формировании устойчивости растений к различным биотическим и абиотическим стрессорам [Itoh *et al.*, 2002; Stumpe, Feussner, 2006]. Ключевыми ферментами липоксигеназного каскада, обеспечивающими разнообразие оксипинов, являются липоксигеназы, катализирующие первую реакцию каскада – образование гидроперекисей жирных кислот, и ферменты уникального семейства СУР74 цитохромов Р450, ответственные за их дальнейшее превращение. Семейство СУР74 включает три типа ферментов: алленоксидсинтазы (АОС) и дивинилэфирсинтазы (ДЭС), которые являются дегидразами, а также гидропероксидлиазы (ГПЛ), относящиеся к изомеразам. Множество неохарактеризованных генов ферментов СУР74 в геномах различных организмов свидетельствует о вероятности существования в данном семействе ферментов с другими типами катализа.

Ранее было показано, что в листьях льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) содержится значительное количество дивинилового эфира – (9Z,11E,1'Z,3'Z)-12-(1',3'-гексадиенилокси)-9,11-додекадиеновой ((ω 5Z)-этеролоеновой) кислоты. Образование (ω 5Z)-этеролоеновой кислоты наблюдалось также *in vitro* в результате инкубации экзогенной 13-гидроперекиси α -линоленовой кислоты – (9Z,11E,13S,15Z)-13-гидроперокси-(9,11,15)-октадекатриеновой кислоты (13-ГПОТ) – с экстрактом листьев льна [Chechetkin *et al.*, 2008]. Однако до выполнения настоящей работы у льна был известен единственный представитель семейства СУР74 – алленоксидсинтаза LuAOS (GenBank: AAA03353.1), продуктом реакции которого является окись аллена, но не дивиниловый эфир [Song *et al.*, 1993].

К настоящему времени изучено несколько десятков гидропероксидлиаз и алленоксидсинтаз. В то же время, клонировано только четыре гена, кодирующих дивинилэфирсинтазы [Itoh, Howe, 2001; Stumpe *et al.*, 2001; Fammartino *et al.*, 2007; Stumpe *et al.*, 2008; Gullner *et al.*, 2010]. Существует мнение, что ферменты этого класса не имеют широкого распространения в природе. Исследованные до сих пор рекомбинантные ДЭС синтезируют дивиниловые эфиры, имеющие *транс*-двойные связи по обе стороны от эфирного мостика. Ни один из ферментов, синтезирующих дивиниловые эфиры с *цис*-двойной связью по одну сторону от эфирной связи, до сих пор изучен не был.

Цель и задачи исследования. Целью наших исследований явилось выявление и структурно-функциональная характеристика фермента, ответственного за синтез (ω 5Z)-этеролоеновой кислоты в листьях льна-долгунца. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявление, характеристика и клонирование открытой рамки считывания гена, кодирующего фермент, ответственный за биосинтез (ω 5Z)-этеролоеновой кислоты у льна-

долгунца.

2. Получение очищенного препарата функционально активного рекомбинантного фермента, ответственного за биосинтез ($\omega 5Z$)-этеролоеновой кислоты в растениях льна-долгунца.

3. Выяснение особенностей каталитического действия исследуемого фермента льна-долгунца. Определение субстратной специфичности и кинетических параметров катализа для данного фермента.

4. Характеристика структуры каталитически значимых доменов целевого фермента.

5. Определение вклада отдельных аминокислотных остатков в формирование типа катализа целевого фермента методом сайт-направленного мутагенеза: получение мутантных форм фермента и сравнение особенностей каталитического действия фермента дикого типа и его мутантных форм.

Научная новизна работы. Впервые выявлен ген дивинилэфирсинтазы LuDES льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) и клонирована его открытая рамка считывания. Получен очищенный препарат функционально активного рекомбинантного фермента. Предпочтительными субстратами фермента являются 13-гидроперекиси жирных кислот, что отличает его от ранее изученных дивинилэфирсинтаз.

LuDES идентифицирована как первый фермент CYP74B, гомологичный 13-гидропероксидлиазам подсемейства CYP74B и, вместе с тем, являющийся дивинилэфирсинтазой.

Впервые получена мутантная форма дивинилэфирсинтазы LuDES E292G. В отличие от LuDES дикого типа, мутантная форма E292G проявляла активность алленоксидсинтазы, а не дивинилэфирсинтазы. Тем самым продемонстрировано, что для определения типа катализа критически важным является не гомология ферментов CYP74, определяемая по общему сходству аминокислотных последовательностей, а тонкое строение отдельных консервативных доменов.

Научно-практическая значимость работы. Полученные данные расширяют знания о ферментах семейства CYP74 и вносят вклад в понимание функционирования липоксигеназной сигнальной системы растений, способствующей их адаптации к неблагоприятным условиям.

Применение разработанной технологии получения и очистки цитохромов растений, основанной на использовании различных систем экспрессии рекомбинантных генов, дает возможность получения препаративных количеств рекомбинантных белков для последующего использования в промышленности, часто ограниченного низкой доступностью природных ферментов. Новые рекомбинантные ферменты с измененными каталитическими свойствами могут быть использованы для создания генетически модифицированных растений, удовлетворяющих требованиям современного сельскохозяйственного производства и стать основой инновационных технологий переработки сырья с использованием биокатализаторов, в том числе иммобилизованных ферментов.

Расширение сведений о генах и белках одного семейства облегчает идентификацию и

характеристику новых представителей; кроме того, это позволяет усовершенствовать классификацию и проясняет эволюционное происхождение и значение при первоначальном появлении семейств ферментов и структурных белков. Полученные знания приближают нас к ответам на многие фундаментальные вопросы эволюции и экологии.

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут использоваться 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, биотехнологии и молекулярной биологии в ВУЗах.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа проводилась с 2009 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 оксипиринов – эндогенных биорегуляторов растений» (гос. регистрационный номер: 01200901959). Исследования автора частично поддержаны грантами РФФИ № 09-04-00915-а, № 11-04-01601-а, МК-1439.2011.4, АНТ № 14-33/2011, государственными контрактами № 16.740.11.0197 и № 14.740.11.0797, а также грантом ведущей научной школы НШ-825.2012.4. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на 13-ом ежегодном симпозиуме студентов-биологов Европы «SymBioSE 2009» (Казань, 2009); на 13-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2009); на II Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия 2009» (Пермь, 2009); на Российской школе молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань, 2010); на V Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2010); на 36-ом конгрессе FEBS «Biochemistry for Tomorrow's Medicine» (Италия, Турин, 2011); на VII Съезде общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, 2011); на V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 2011); на 3-ем Международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2011); на конгрессе FESPB и EPSO «Plant Biology Congress Freiburg 2012» (Германия, Фрайбург, 2012); а также на итоговых конференциях Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН (2010, 2013).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из них три статьи в отечественных и зарубежных рецензируемых изданиях.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 161 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы, а

также приложения. В работе представлено 10 таблиц, 1 схема и 34 рисунка. Список литературы включает 204 источника; из них 196 – иностранных.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Растительный материал. Объектом исследований служили растения льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) сорта Новоторжский. Растения выращивали в течение 35 дней в открытом грунте при ежедневном поливе и естественном освещении. Для индукции экспрессии генов ферментов CYP74 растения инокулировали клетками штамма *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043, полученного из коллекции Белорусского государственного университета (г. Минск).

1.2. Определение последовательности и клонирование целевого гена. Тотальную РНК из листьев льна выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия). Полноразмерную двуцепочечную кДНК (дц-кДНК) получали с использованием коммерческого набора MINT (Евроген, Москва). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе DNAEngine (Bio-Rad, США). Все праймеры синтезировали в НПО «Синтол» (Москва). Для клонирования амплифицированной ДНК использовали вектор pGem-T Easy (Promega, США). Нуклеотидные последовательности ДНК определяли с помощью ДНК-анализатора 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США).

1.3. Модификация первичной структуры целевого фермента. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Axygen, США) согласно протоколу производителя. Предварительный анализ ДНК проводили после ее электрофоретического разделения в агарозных гелях с помощью системы Gel-Doc и пакета программ Quantity One (Bio-Rad, США). Для сайт-направленного мутагенеза целевого гена использовали ПЦР с модифицированными праймерами.

1.4. Получение рекомбинантных ферментов. Для экспрессии рекомбинантного гена использовали вектор pET-32 Ek/LIC (Novagen, США), реципиентами которого служили клетки штаммов *E. coli* NovaBlue и Tuner(DE3)pLysS (Novagen, США). Культуры клеток *E. coli* выращивали в питательных средах M9 [Маниатис и др., 1984], SOC и Luria-Bertani [Гловер, 1988]. Компетентные клетки *E. coli* для трансформации плазмидами получали с использованием ДМСО [Inoue *et al*, 1990]. Нарработку целевого белка индуцировали добавлением в среду 0,5 мМ изопропил-β-тиогаляктозида (ИПТГ).

Клеточные лизаты получали с использованием коммерческого стабилизирующего раствора BugBuster (Invitrogene, США). Очистку рекомбинантного белка проводили металлоаффинной хроматографией на колонках Bio-Scale Mini Profinity IMAC в хроматографической системе BioLogic LP (Bio-Rad, США). Целевой белок элюировали Na-фосфатным буфером (рН 7,5), содержащим 30мМ гистидина и 0,5 % 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний-]-1-пропансульфонат (ХАПС). Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле (ПААГ) по Лэмли [Остерман, 1981] в системе PowerPac Universal MiniProtean (Bio-Rad, США). Гели окрашивали Coomassie R250.

Ферментативную активность очищенных препаратов LuDES определяли по снижению оптического поглощения субстрата при 234 нм, измеряемого с помощью спектрофотометра Lambda 25 (Perkin-Elmer, США). K_m и k_{cat} рассчитывали с использованием пакета программ SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., США).

1.5. Получение субстратов для исследования каталитического действия целевых ферментов. Гидроперекиси жирных кислот получали инкубацией линолевой и α -линоленовой кислот с соевой и томатной липоксигеназами. Полученные в результате реакции гидроперекиси очищали высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на колонках с обращенной фазой Nucleosil 5 ODS (250×4.6 мм) (Macherey-Nagel, Германия), на колонках с нормальной фазой Separon SIX (150×3.2 мм; 5 мкм) (TESSEK Ltd, Чехия), на колонках для хирально-фазовой ВЭЖХ Chiralcel OD-H и Chiralcel OB-H (Daicel Chemical Industries Ltd., Япония).

1.6. Условия проведения и анализ продуктов реакций, катализируемых целевыми ферментами. Гидроперекись (3 мкМ) инкубировали с ферментом 15 мин при 20 °С в 10 мл 100 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7.0). Реакционную смесь экстрагировали смесью гексана с этилацетатом (1:1) при комнатной температуре. Затем растворитель выпаривали, а продукты реакции растворяли в 1,5 мл метанола и восстанавливали, выдерживая в течение 30 минут в присутствии NaBH_4 . Восстановленные продукты метилировали диазометаном, после чего диазометан выпаривали, продукты растворяли в метаноле и гидрировали водородом над PtO_2 . После удаления катализатора продукты высушивали и триметилсилилировали. 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) с помощью масс-спектрометра QP5050A, соединенного с газовым хроматографом GC-17A (Shimadzu, Япония).

1.7. Статистический анализ данных проводили с применением стандартных математических методов (расчет среднеквадратического отклонения, сравнение средних по критерию Стьюдента). Данные представлены в виде средних значений из 4 измерений в трех независимых биологических повторностях.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Выявление и клонирование последовательностей генов ранее не охарактеризованных ферментов СУР74 льна-долгунца

Обнаружение в листьях льна-долгунца дивинилового эфира – (ω 5Z)-этеролоеновой кислоты [Chechetkin *et al.*, 2008] – позволило предположить, что ранее обнаруженная алленоксидсинтаза LuAOS [Song *et al.*, 1993] является не единственным представителем СУР74 у данного растения. Недостаточный объем данных о геноме льна ограничивал возможности выявления гена фермента, отвечающего за синтез дивиниловых эфиров – дивинилэфирсинтазы. В связи с этим, нами была предпринята попытка поиска и идентификации гена, кодирующего предполагаемую дивинилэфирсинтазу льна, по гомологичным последовательностям ДНК других растений.

Ключевым моментом исследования являлся выбор участков кодирующих последовательностей генов ферментов СУР74, которые отличались бы от последовательностей генов других цитохромов Р450, но, вместе с тем, были достаточно консервативными для генов семейства СУР74. 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 СУР74 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 следующим образом. В первую группу (ДЭС) включили охарактеризованные к настоящему времени дивинилэфирсинтазы растений семейства пасленовых (*Solanaceae*). Праймеры LDF (gTCAAAATCAACATggCACCC) и LDR (gTTTCCCTTCCATTAgACC) оказались строго комплементарны выбранным участкам генов данной группы. Вторую группу (ГПЛ) составили гидропероксидлиазы люцерны (*Medicago truncatula*), апельсина (*Citrus sinensis*), гуавы (*Psidium guajava*), дыни (*Cucumis melo*), померанца (*Citrus aurantium*), поскольку по сравнению с другими гидропероксидлиазами эти ферменты обладают наибольшим сходством первичной структуры и субстратной специфичности с известными дивинилэфирсинтазами. На основе последовательностей кодирующих их генов сконструировали вырожденные праймеры LHF (gA(A/g)AAg(C/g)ACAAGAgCAC(g/C)gT(g/T)TTC) и LHR (CA(T/A)Ag(A/C)A(g/A)CTC(C/g/A)CCTTTCTTg). 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. Считается, что у таксономически близких видов аминокислотные последовательности гомологичных белков обладают высокой степенью сходства даже при функциональной дивергенции (в данном случае проявляющейся в предполагаемом различии типов каталитической активности ферментов). На основе нуклеотидных последовательностей генов третьей группы сконструировали праймеры LAF (CCAACATgCC(T/A)CC(T/g/C)ggCCC(C/T/A)TTC) и LAR (gTCTC(A/C)(C/g)gC(T/C)C(A/g)TT(T/C)gACC). Сконструированные праймеры использовали для выявления последовательностей, гомологичных генам семейства СУР74, в библиотеке кДНК.

Тотальную РНК выделяли из листьев льна. За сутки до выделения РНК растения инокулировали суспензией клеток *P. atrosepticum* SCRI1043. На основе выделенной РНК получали библиотеку двуцепочечной кДНК с помощью реакции обратной транскрипции. Смесь кДНК использовали в качестве источника матрицы для гнездовой ПЦР с различными

ми комбинациями праймеров.

При использовании вырожденных праймеров LAF-LAR (группа АОС) и LHF-LHR (группа ГПЛ) происходило образование продуктов реакции размером около 1000 п.н., что соответствует расчетной протяженности центральных областей генов CYP74 при их амплификации с используемыми праймерами. Полученные фрагменты клонировали в векторе pGem-T Easy (Promega, США), после чего определили их нуклеотидную последовательность. При использовании в ПЦР праймеров LDF-LDR (группа ДЭС) образование продуктов амплификации не происходило.

Последовательности фрагментов LHF-LHR имели высокую степень сходства с генами ферментов подсемейства CYP74В многих видов растений. Это подсемейство включает в себя 13-специфичные гидропероксидлиазы. До настоящего времени для льна не было описано ни одного представителя подсемейства CYP74В.

Следующим этапом определения структуры новых генов подсемейства CYP74В льна стала амплификация последовательностей 5'- и 3'-концевых участков их кДНК методом RACE. Амплифицированные концевые участки клонировали и определяли их последовательности.

Известно, что цитохромы P450 растений часто представлены множеством изоформ, кодируемых семействами генов. 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 использованием вектора pGem-T Easy; их последовательности определили. На рис. 1 представлена полная последовательность одного из клонов гена подсемейства CYP74В льна, предварительно обозначенного нами как ген изоформы 1 фермента CYP74В.

Открытая рамка считывания (ОРС) данного гена размером 1419 п.о. ограничена стартовым и терминирующим кодонами ATG и TGA, соответственно. Полученная кДНК, соответствующая полноразмерной мРНК, фланкирована 5'- и 3'-нетранслируемыми областями и полиадениновой последовательностью, что типично для зрелой мРНК растений. Возле стартового кодона расположена последовательность Козака, распознаваемая рибосомами при инициации трансляции у эукариот [Lütcke *et al.*, 1987]. Представленная последовательность содержит гуанин в положении +4, что характерно для мРНК высших растений. В положении -3 от предполагаемой ОРС находится консервативный тимин. Совокупность выявленных особенностей анализируемой последовательности позволила заключить, что полученная кДНК соответствует функциональному гену, кодирующему полипептид размером 473 аминокислотных остатка (рис. 1). Трансляция полученной нуклеотидной последовательности выявила наличие консервативных доменов, характерных для ферментов семейства CYP74, а именно – центрального домена I-спирали (I-helix central domain, IHCD), ERR-триады, PPV-домена и консервативного остатка цистеина.

*

M A H S P P I P P S A A A V P P L R T I P G S Y G W P V V G P I A D R L N
 ACCTCTCCATGGCTCATTACCCACCTATTCTCCGTCAGCCGCGCCCTCCCGCCGTACGGACCATCCCGGGATCCTACGGGTGGCCAGTGGTGGTCCGATAGCGGACAGGCTGAAC
 Y F W F R G P E K F F R K R M E K Y K S P V F R T N V P P T F P F F A G V N P N
 TACTTCTGGTTCGCGGGACCGGAGAAGTTCTTCAGGAAGAGGATGGAGAAGTACAAGTCGCGGTGTTCCGTACCAACGTGCCACCGACGTTCCCGTCTCTCGCGGGAGTGAACCCCAAC
 V V M V L D C K S Y A H L F D T E I A D K K D T L L G D F M P S V G F N G D L R
 GTGGTGATGGTCTGGACTGCAAACTGACGCACACTTGTTCGACACCGAGATCGCCGACAAAGGATACGTTGCTCGGAGACTTCATGCCTAGCGTCCGTTTCAATGGTGATCTTCGG
 M C A Y Q D V L E P K H A Q I K K F I M A I L K R G T K V W T T E L K V N L D E
 ATGTGTGCTTACCAGGATGTTTTGGAGCCTAAGCATGCTCAGATAAAAAAGTTTATAATGGCGATCTTGAACGTGGGACCAAAGTGGACTACGGAGCTGAAAGTCAACCTAGACGAG
 M W T T L E T D I S S K G S A T L F S P L Q H C L L K L L L K S Y V G A D V S E
 ATGTGGACCACTCTCGAAACCGACATCTCATCGAAAGGTAGTGCCACGTTGTTCTCGCCACTTCAACATTGCCTGCTGAAGCTGCTGCTCAAATCTACGTGGGAGCTACGCTGTCTGAA
 T A P D L A K S G P T I I N T W F A L Q V R P T I A I N V I Q P L E E I F V H S
 ACGGCTCCAGACTTGGGGAAGTCCGGCCCCACCATCATCAACAGTGGTTCGCGTCCAGGTCGCGCCGACGATCGTATCAACGTGCTCAGCCCTCTCGAAAGAGATTTCTGCTCCATTCC
 F R Y P S F L A R P G Y N K L A N F I K T Q G H D V V Q L G V T E Y G L T E E E
 TTCGGGTACCCGCTTTCTCCGCGCCGACCCGGATACAACAAGCTCGCTAATTTTCATCAAACTCAAGGACATGACGTGGTACAACCTTGGGGTACCCGAGTACGGACTCACCGAGGAAGAG
 A I H N L L F V L A F N S F E G F T L F I P K L L T R L L S D S T L Q E K L R V
 GCAATCCCAATTTATTTATTTGTTCTGGCATCAACTCGTTGGAAGGATTTACCCTATTTATCCCAATTTATTGACCCGTTACTCAACCTTACAAGAGAAGCTTCGGGTCT
 E A R Q N G G T E L T F T S F K Q M P L I Q S F V Y E T L R L E P P V P T Q F A
 GAAGCGAGCGAARCGTGGGACCGAACTGACATTCACCTCCTTTAAGCAAATGCCGTGTATCCAATCTTTCTGTGTACGAGACCCTCAGGCTTGAACCAACCGGTTCCAAACCGATTTGGC
 R A R K D F T L S S S E A S Y K V K K G E L L C G Y Q P L V M R D P T I F D D P
 CGTGCTAGAAAGGATTTACCGCTTAGCTCGAGCGAGGCATCGTATAAGTCAAGAAGGCGAGCTGTTGTGCGGGTACCAACCGTTGGTGATCGCTGACCTACTATTTTCGACGACCCAA
 E S F K P D R F L G E K G A E L L N Y L Y W S N G P E T G S A S H S N K Q C A G
 GAGATTTCAAACCGGACCGGTTCTGGTGAGAAGGGAGCTGAGTTGCTGAATTACCTGTACTGTTGGAACGGGCGGAACCGGTTTCGGCCAGCCATCAAATAAACAGTCCGCGGGG
 K E Y V T V T G S L F V A H L L R R Y D S I S G E G S T I K A V E K A K *
 AAAGAGTACGTGACCGTAACTGGGTCGTTGTTCTGCGGCCCACTGCTTCGACGCTATGATTCATCAGTGGGGAAGGTTTCGACGATCAAGGCCGTTGAAAAGGCTAAAGTGATTTGTACAGT

Рис. 1. Нуклеотидная и транслированная аминокислотная последовательности изоформы 1 представителя подсемейства CYP74В льна. Стартовый и терминирующий кодоны отмечены звездочками; последовательность Козака подчеркнута; домен IHCD выделен серым фоном; положение ERR-триады обозначено символом ▼; PPV-домен обозначен символом ○; символ ♦ показывает положение консервативного остатка цистеина – гемового лиганда.

Анализ последовательностей, полученных от разных клонов итоговой библиотеки кДНК, подтвердил предположение о существовании нескольких вариантов гена, вероятно, кодирующих несколько изоформ фермента подсемейства CYP74В льна. На рис. 2 представлены варибельные области трех изоформ.

Изоформа 1	(26)	WPVVVGPIADRLNYFWERGP EKFFRK	кДНК, подтвердил предположение о существовании нескольких вариантов гена, вероятно, кодирующих несколько изоформ фермента подсемейства CYP74В льна. На рис. 2 представлены варибельные области трех изоформ.
Изоформа 2	(26)	WPVVVGPIADRLNYSWFQ GP EKFFRK	
Изоформа 3	(26)	WPVVVGPIADRLNYFWFQ GP EKFFRK	
Изоформа 1	(201)	DLAKSGPTIINTWFALQVRPTIAIN	Дальнейшая работа была сосредоточена на изучении гена и белка изоформы 1 фермента подсемейства CYP74В льна. Последовательность гена зарегистрирована в базе данных GenBank под идентификационным номером HQ286277.1 (GI:310687282). Предполагаемому белку было присвоено название CYP74B16 [Nelson, личное сообщение]. Проведенное нами сопоставление аминокислотной последовательности изоформы 1 с описанными ферментами CYP74 с помощью программы BLAST также показало, что новый фермент CYP74B16 льна относится к под-
Изоформа 2	(201)	DLAKSGPTIINTWFALQVHPTIAIN	
Изоформа 3	(201)	DLAKSGPTIINTWFALQVHPTIAIN	
Изоформа 1	(426)	GSASHSNKQCAGKEYVTVTGS SLEVA	Дальнейшая работа была сосредоточена на изучении гена и белка изоформы 1 фермента подсемейства CYP74В льна. Последовательность гена зарегистрирована в базе данных GenBank под идентификационным номером HQ286277.1 (GI:310687282). Предполагаемому белку было присвоено название CYP74B16 [Nelson, личное сообщение]. Проведенное нами сопоставление аминокислотной последовательности изоформы 1 с описанными ферментами CYP74 с помощью программы BLAST также показало, что новый фермент CYP74B16 льна относится к под-
Изоформа 2	(426)	GSASHSNKQCAGKEYVTVTGS SLEVA	
Изоформа 3	(425)	GSASHSNKQCAGKENVTVTGS SLEVA	

Рис. 2. Аминокислотные последовательности варибельных участков полипептидных цепей изоформ 1, 2 и 3 нового фермента CYP74 льна.

предполагаемому белку было присвоено название CYP74B16 [Nelson, личное сообщение]. Проведенное нами сопоставление аминокислотной последовательности изоформы 1 с описанными ферментами CYP74 с помощью программы BLAST также показало, что новый фермент CYP74B16 льна относится к под-

семейству СУР74В и проявляет высокую степень сходства первичной структуры с 13-ГПЛ.

2.2. Получение рекомбинантного белка СУР74В16

Для получения рекомбинантного белка СУР74В16 ОРС соответствующего гена поместили в экспрессирующий вектор рЕТ-32 Ek/LIC (Novagen, США) методом безлигазного клонирования. Для наработки и очистки рекомбинантного фермента разработали оригинальную методику, составленную на основе нескольких протоколов.

Для разрушения ассоциации белка с фрагментами мембран бактерий и предотвращения его агрегации в растворах во всех процедурах выделения и очистки фермента СУР74В16 предусматривалось использование различных детергентов. Были испытаны различные концентрации Тритона X-100 (0.3-1%), полиоксиэтилен-10-тридецил-эфира (ПОЭТЭ) (0.3-1%) и ХАПС (0.1-1%). Наилучшие результаты были достигнуты при использовании ХАПС в концентрации 0.5 %.

С использованием вектора рЕТ-32 Ek/LIC получили рекомбинантный белок, содержащий дополнительную последовательность из шести гистидинов на С-конце, что позволило провести очистку фермента с помощью металлоаффинной хроматографии. Осветленный центрифугированием лизат наносили на колонку Bio-Scale Mini Profinity IMAC (Bio-Rad, США), уравновешенную 10 объемами буфера трис-НСl (рН 7.5, 50 мМ), содержащего 300 мМ NaCl и 0.5 % ХАПС. После нанесения лизата колонку промывали тем же буфером до достижения устойчивого минимума оптической плотности раствора при 280 нм. После этого колонку промывали Na-фосфатным буфером (рН 7.5, 50 мМ), содержащим 100 мМ NaCl и 3 мМ гистидина, для освобождения от неспецифически связанных белков. Целевой белок элюировали с колонки Na-фосфатным буфером (рН 7.5, 50 мМ), содержащим 100 мМ NaCl, 30 мМ гистидина и 0.5 % ХАПС, и концентрировали ультрафильтрацией через центрифужный фильтр AmiconUltra 50k (Millipore, США).

2.3. Исследование кинетики реакций, катализируемых рекомбинантным ферментом СУР74В16, с различными субстратами

На первом этапе исследования каталитических свойств рекомбинантного фермента СУР74В16 подбирали оптимальные условия проведения реакции. Для этого испытывали реакционные смеси с различными значениями рН (рис. 3). В результате установили, что рекомбинантный белок СУР74В16 проявляет каталитическую активность в широком диапазоне рН, с выраженным максимумом активности в слабощелочных условиях, при значениях рН от 7.5 до 8.0 (рис. 3). Дальнейшие исследования проводили при рН 7.5.

Каталитическую активность и субстратную специфичность фермента описывают константа каталитическая и константа Михаэлиса. Для построения графиков зависимостей начальных скоростей реакций от концентраций субстратов (9- и 13-гидроперекисей линолевой (ГПОД) и α -линоленовой (ГПОТ) кислот) измерения проводили по 6-9 точкам. О превращении субстрата свидетельствовало постепенное снижение в ходе реакции характерного для гидроперекисей оптического поглощения при 234 нм в ходе реакции.

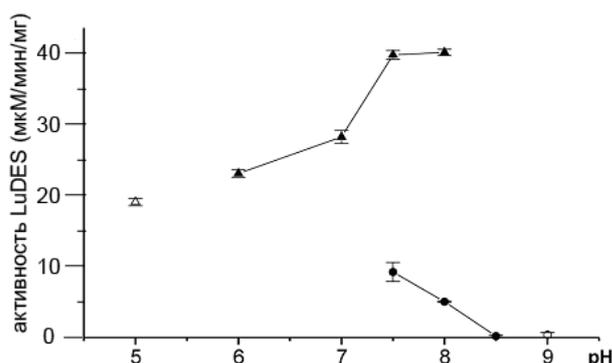


Рис. 3. Зависимость каталитической активности рекомбинантного фермента СУР74В16 от значения pH реакционной смеси. Белый треугольник – Na-ацетатный буфер (pH 5.0); черные треугольники – Na-фосфатный буфер (pH 6.0-8.0); черные кружки – буфер трис-НСl (pH 7.5-8.5); белый кружок – буфер глицин-NaOH (pH 9.0).

Из полученных данных сделали вывод, что сродство рекомбинантного фермента СУР74В16 к (13S)-ГПОТ значительно выше, чем к (13S)-ГПОД, (9S)-ГПОД (табл. 1) и (9S)-ГПОТ (данные не представлены). В то же время, максимальную каталитическую активность рекомбинантный фермент СУР74В16 проявляет по отношению к (13S)-ГПОД. Соотношение k_{cat}/K_m свидетельствует, что 13-гидроперекиси α -линоленовой и линолевой кислот являются предпочтительными субстратами (табл. 1). Такие субстратные предпочтения характерны для большинства ГПЛ, относящихся к подсемейству СУР74В.

Таблица 1. Константы каталитические и константы Михаэлиса рекомбинантного фермента, 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, %
(13S)-ГПОТ	545.8±12.9	28.0±1.9	19.5	100
(13S)-ГПОД	956.4±31.7	132.5±5.8	7.22	37
(9S)-ГПОД	33.7±1.1	122.4±8.6	0.28	1.4

2.4. Идентификация рекомбинантного фермента СУР74В16 льна как дивинилэфирсинтазы нового типа

Для определения типа каталитической активности проводили характеристику продуктов превращения 13-гидроперекисей жирных кислот при участии рекомбинантного фермента СУР74В16. Продукты инкубации (13S)-ГПОТ с рекомбинантным ферментом СУР74В16 переводили в триметилсилильные производные метиловых эфиров (Me/TМС) и подвергали анализу методом ГХ-МС (рис. 4).

Анализ выявил наличие одного преобладающего продукта, в спектре которого имеется молекулярный ион $[M]^+$ при m/z 306. Его масс-спектр был 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 соответствовало 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. 4) – и продукт фрагментации цепи – 12-гидроксидодеканоевую кислоту (Ме/ТМС).

Соотношение 12-гидроксидодеканоевой кислоты к гидрированному дивиниловому эфиру, определенное по интегрированию хроматограмм ГХ-МС, составляло 10:90. Дивиниловый эфир являлся преобладающим продуктом. Каких-либо продуктов алленоксидсинтазной реакции в результате проведенных экспериментов обнаружено не было.

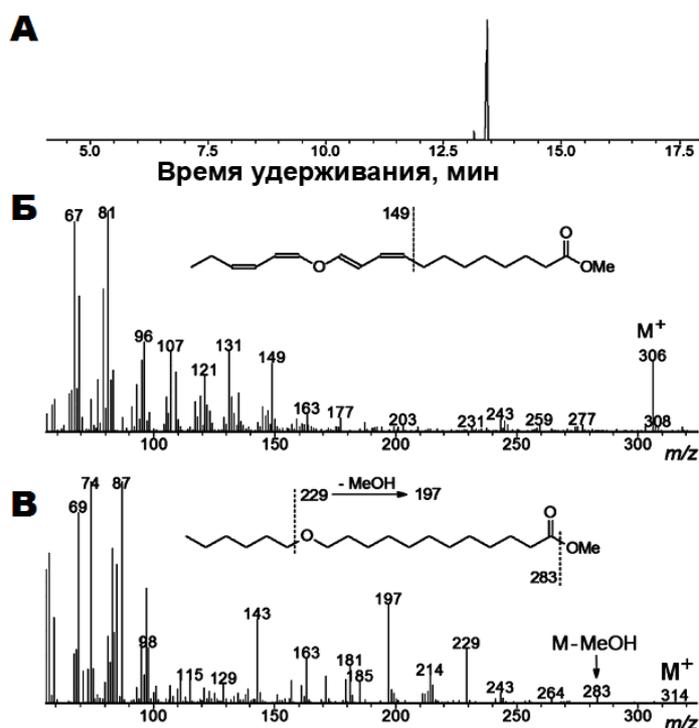


Рис. 4. Результат анализа продуктов инкубации рекомбинантного фермента CYP74B16 с 13-гидроперекисью α -линоленовой кислоты методом ГХ-МС: (А) хроматограмма продуктов инкубации (Ме/ТМС) по полному ионному току (ТIC), (Б) электронный масс-спектр метилового эфира основного продукта, (В) электронный масс-спектр метилового эфира основного продукта после каталитического гидрирования.

Образование C_{12} -фрагмента может происходить двумя различными путями. Во-первых, дивиниловые эфиры могут подвергаться частичному кислотному гидролизу. Во-вторых, нельзя исключать, что фермент CYP74B16 может проявлять минорную гидропероксидлиазную активность наряду с дивинилэфирсинтазной. При участии ДЭС чеснока (*Allium sativum*), алленоксидсинтазы риса (*Oryza sativa*) и резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana*) из (13S)-ГПОТ также образуются небольшие количества 13-гидропероксидлиазных продуктов [Cho *et al.*, 2010].

Метилловые эфиры продуктов реакции анализировали также с помощью ВЭЖХ. Анализ подтвердил присутствие одного основного продукта с максимумом поглощения в метаноле при 267 нм (рис. 5). Данное соединение очищали на обратной и нормальной фазах. Его дальнейшее исследование проводили методом ЯМР-спектроскопии. 1H -ЯМР спектр исследуемого вещества оказался идентичным спектру ($\omega 5Z$)-этероленовой кислоты, полученному ранее [Chechetkin *et al.*, 2008]. Таким образом, полученные данные позволили идентифицировать основной продукт преобразования (13S)-ГПОТ как ($\omega 5Z$)-этероленовую кислоту, а фермент CYP74B16 – как дивинилэфирсинтазу.

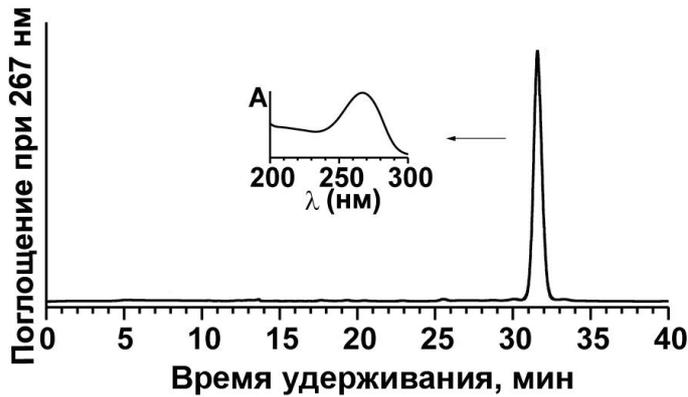


Рис. 5. Анализ продуктов, образующихся в результате инкубации (13S)-ГПОТ с рекомбинантным ферментом СУР74В16, проведенный методом ВЭЖХ на нормальной фазе. УФ спектр выполнен с помощью диодного детектора. Вставка: УФ спектр основного продукта.

В соответствии с принятой номенклатурой ферментов СУР74, новому ферменту присвоили тривиальное название LuDES (дивинилэфирсинтаза *L. Usitatissimum* L), также как и соответствующему гену – *LuDES*.

Известно, что активация биосинтеза (ω 5Z)-этеролоеновой кислоты в листьях льна происходит в ответ на инфицирование фитопатогенами [Chechetkin *et al.*, 2009]. С этим согласуются результаты наших экспериментов, указывающие на увеличение уровня экспрессии гена *LuDES* в 300 раз через 24 часа после инфицирования растений клетками *P. atrosepticum*.

Ранее было показано, что колнелевая, колнеленовая и этеролоеновая кислоты негативно влияют на скорость роста ряда бактерий, грибов и оомицетов [Prost *et al.*, 2005]. В проведенных нами экспериментах (ω 5Z)-этеролоеновая кислота также негативно влияла на рост микроорганизмов: в присутствии 34 мкмоль (10 мг/л) (ω 5Z)-этеролоеновой кислоты плотность бактериальных культур через сутки после инокуляции составляла $4,4 \times 10^8$ КОЕ/мл, в то время как в контроле она составляла $1,6 \times 10^9$ КОЕ/мл. При этом α -линоленовая кислота в той же концентрации не оказывала влияния на рост бактерий. Эти данные согласуются с представлением об участии ДЭС и дивиниловых эфиров в формировании устойчивости растений к патогенам [Williams *et al.*, 2000; Gobel *et al.*, 2001; Graner *et al.*, 2003; Cowley, Walters, 2005; Fammartino *et al.*, 2010].

Полученные результаты указывают на то, что LuDES является уникальным ферментом, представляющим особый интерес для изучения механизма катализа и филогении как представителей семейства СУР74, так и цитохромов Р450 в целом. По сходству первичной структуры белок относится к подсемейству СУР74В. Однако, в то время как все известные цитохромы подсемейства СУР74В являются гидропероксидлиазами, LuDES проявляет дивинилэфирсинтазную активность. Обнаружение данного фермента открывает новые возможности для выявления особенностей структуры активного центра цитохромов СУР74, определяющих тип катализа.

2.5. Особенности первичной структуры и функции рекомбинантной LuDES

Как указывалось выше, структура LuDES имеет высокую степень сходства со струк-

A

		123456
LuDES	(271)	YGLTEEEAITHNLLFVLAENSFEGEFTLFIKLLTRLLSDST-IT
AsDES	(258)	IGLSREEAIIHLLFTWAINAYLGIKRTCLMRLFKWIVASGPDIT
LeDES	(264)	LGLTKREEAVQNILELVLGNTMFAGLNAFFPHLFRFVGEAGASIT
LeAOS3	(278)	LGVKRDEACHNFEVLAGENSYGGKLVFFPSLIKWIGTSGPST
LeAOS1	(319)	IGLSREEACHNLLFATCFNSFGGKIFFPNMLKWI GRAGAKIT
LuAOS	(321)	SGLSRDEACHNILEAVCFNSWGGKILFPPSLMKWIGRAGLEIT
CmHPL	(265)	QGLDREKACHNLLVLAGENAYGGMKVLFPTLLKVVGTAGEDIT
PgHPL	(287)	FGLTHQEAITHNLLFILLGENAFGGFSIFLPTLLSNILSDTTGIT
MshPL	(278)	FGLSEDEAITHNLLFVLGENSYGGFSIFLPKLIESTTNGPTGIT

B

LuDES	(330)	ELTFTSFKOMPLIQSEFVYETLRLEPPVPTQFARARKDFTLSS
AsDES	(318)	KITFAGIEKMEIVKSVAYESEFREPVPVQVYGTAKDILIIIES
LeDES	(324)	AITLSAINKMSLVKSVVYETLRLEPPVPLQYKAKKEFMVQS
LeAOS3	(338)	GVLTSADKMPVKSVMVYETLRMDPPVPEQVVKARKNTIITN
LeAOS1	(379)	KVTMAAMEKMPVKSVMVYETLRLEPPVASQYGRAKEDMVIES
LuAOS	(381)	KVTMAAMEQMPVKSVMVYETLRLEPPVALQYKAKKDFILES
CmHPL	(325)	GLTFFSALEKMSLLKSVVYEALRIEPPVPEQYKAKKEDIVIQS
PgHPL	(347)	ALSFSASVKEMLVKSVMVYETLRLEPPVPEQYARARKDFQLKS
MshPL	(337)	TLGFDLSLKELELINSVMVYETLRMNPVPLQFGRARKDFQLSS

B

LuDES	(416)	YLYWSNGPETGSASHSNKQCAGKEYVTVTGSLEVAELLRRY
AsDES	(406)	HVLWANGYGTDAKADDTICAGKDLGVLVGRLLIIVMFLRY
LeDES	(412)	HVLWSNGRETESPADNKQCPGKDLVHLLGRLILVVEFFIRY
LeAOS3	(425)	YVYWSNGKEIDNPSVNDKQCPGKDLIVLMGRLLVVEFFMRY
LeAOS1	(468)	HVLWSNGSETENASINNKQAGKDFVVLVSRLLLVLEFLRY
LuAOS	(470)	YVMWSNGPETETPSVANKQAGKDFVVMARLEFVVEFLKRY
CmHPL	(413)	YVYWSNERETVETPTENKQCPGKDLVVLIGRIMVVEFFLRY
PgHPL	(431)	YLYWSNGPOTGTPTESNKQCAAKDYVTLTACLFVAYMFRRY
MshPL	(423)	YLYWSNGPOTGSPFVSNKQAGKDIVTFTAAALIVAEELLRRY

Рис. 6. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей каталитически важных доменов ферментов CYP74: (A) I-спираль с доменом IHCD, пронумерованным 1-6, (B) ERR-триада, обозначенная символом ♦ и включающая PPV-домен, обозначенный символом ●, (B) гем-связывающий домен, включающий консервативный гем-связывающий лиганд – цистеин, обозначенный звездочкой.

У всех алленоксидсинтаз и гидропероксидлиаз (в том числе подсемейства CYP74B) в этом положении находится консервативный остаток глицина (рис. 6а). У всех дивинилэфирсинтаз в данном положении остаток глицина замещен остатком другой аминокислоты (рис. 6а).

Еще одной особенностью LuDES является геометрическая специфичность образуемого дивинилового эфира – (ω 5Z)-этеролоеновой кислоты. Эта особенность объединяет LuDES с дивинилэфирсинтазами растений рода лютик (*Ranunculus*), которые также локализованы в листьях и предпочтительно утилизируют (13S)-ГПОТ в качестве субстрата [Hamberg, 1998; 2002; 2004; 2005]. Синтез (ω 5Z)-этеролоеновой кислоты и других подобных дивиниловых эфиров происходит у бурых водорослей рода ламинария (*Laminaria*) [Proteau, Gerwick, 1993], однако дивинилэфирсинтазы растений родов ламинария и лютик к настоящему моменту не были выделены, а кодирующие их гены не были клонированы и секве-

турами других членов подсемейства CYP74B (рис. 6). Однако ее последовательность имеет несколько уникальных аминокислотных замен, затрагивающих каталитически важные домены и субстрат-распознающие сайты [Gotoh, 1992]. Особое внимание было уделено строению домена IHCD, для которого ранее было показано перво-степенное значение для определения типа катализа [Торопкина *et al.*, 2008]. Как у всех ферментов подсемейства CYP74B, в первом сайте домена IHCD последовательности LuDES находится остаток лейцина (Leu-286) (рис. 6а, домен IHCD, положение 1). В следующем сайте находится остаток аланина, тогда как у всех остальных ферментов CYP74B в данном положении находится остаток глицина (рис. 6а, домен IHCD, положение 2). Непосредственно после домена IHCD, в положении 292, в последовательности LuDES находится остаток глю-

нированы. Нельзя исключать, что данные дивинилэфирсинтазы также принадлежат к подсемейству CYP74B.

2.6. Сайт-направленный мутагенез рекомбинантной LuDES и каталитические свойства мутантной формы LuDES E292G

Для проверки гипотезы о центральной роли домена IHCD в определении типа катализа CYP74 в клонированном гене *LuDES* провели замену остатка глутаминовой кислоты в положении 292 на остаток глицина. Мы предположили, что подобная замена может привести к конверсии дивинилэфирсинтазной активности фермента в гидропероксидлиазную. Получение препарата мутантной формы белка LuDES E292G и характеристику его каталитических свойств проводили, как описано выше для LuDES дикого типа.

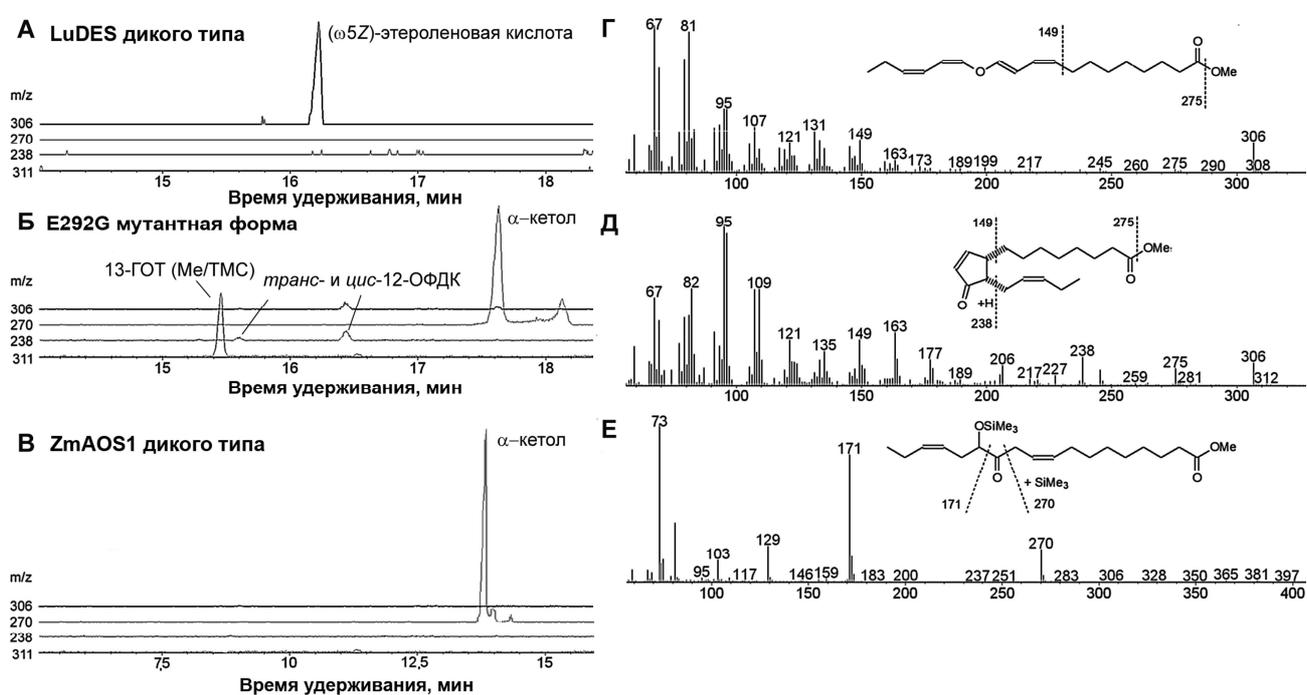


Рис. 7. Хроматограммы продуктов инкубации (13*S*)-ГПОТ с LuDES дикого типа (А), мутантной формой LuDES E292G (Б) и ZmAOS1 дикого типа (В) в виде Me/TMC и электронные масс-спектры производных продуктов, образуемых в результате инкубации фермента дикого типа (Г) и его мутантной формы LuDES E292G (Д,Е) с (13*S*)-ГПОТ: (Г) (ω 5*Z*)-этероленовая кислота (Me); (Д) 12-ОФДК (Me); (Е) α -кетол (Me/TMC).

Селективные ионные токи: m/z 306 – молекулярная масса (ω 5*Z*)-этероленовой кислоты; m/z 171 – базовый пик в спектре α -кетола (Me/TMC), m/z 311 – характеристический пик (13*S*)-ГОТ (Me/TMC), m/z 238 – характеристический пик 12-ОФДК (Me/TMC).

Для сравнения каталитического действия LuDES дикого типа и ее мутантную форму LuDES E292G инкубировали со специфичным субстратом – (13*S*)-ГПОТ. Продукты реакции анализировали с помощью ГХ-МС в виде Me/TMC (рис. 7). Результаты эксперимента указывают на то, что мутант LuDES E292G сохранил способность утилизировать (13*S*)-ГПОТ. Однако анализ продуктов превращения гидроперекиси, катализируемого LuDES

E292G, продемонстрировал кардинальные изменения в типе катализа модифицированного фермента. Основным продуктом дивинилэфирсинтазной реакции – ($\omega 5Z$)-этероленовая кислота – не был обнаружен. На рисунке 8Б приведен масс-спектр основного продукта реакции, катализируемой LuDES E292G, идентифицированного как α -кетол – (9Z,15Z)-12-оксо-13-гидрокси-(9,15)-октадекадиеновая кислота (Me/TMC). Кроме того, в реакции образуются *цис*- и *транс*-изомеры 12-оксо-10,15-фитодиеновой кислоты (рис. 8Б). В качестве контроля (13S)-ГПОТ инкубировали с рекомбинантной алленоксидсинтазой ZmAOS1 (CYP74A19) кукурузы (*Zea mays*) (рис. 7В). Преобладающим продуктом превращения (13S)-ГПОТ при участии ZmAOS1 был тот же самый α -кетол, что полностью подтверждает алленоксидсинтазную активность мутантной формы LuDES E292G.

Среди продуктов реакции, катализируемой LuDES E292G, обнаруживался продукт термического распада гидроперекиси – (9Z,12Z,15Z)-13-гидрокси-9,12,15-октадекатриеновая кислота (13-ГОТ) (рис. 7Б), что указывает на более низкую каталитическую активность по сравнению с ферментом дикого типа: активность мутантной формы составляла около 10 % от активности LuDES дикого типа.

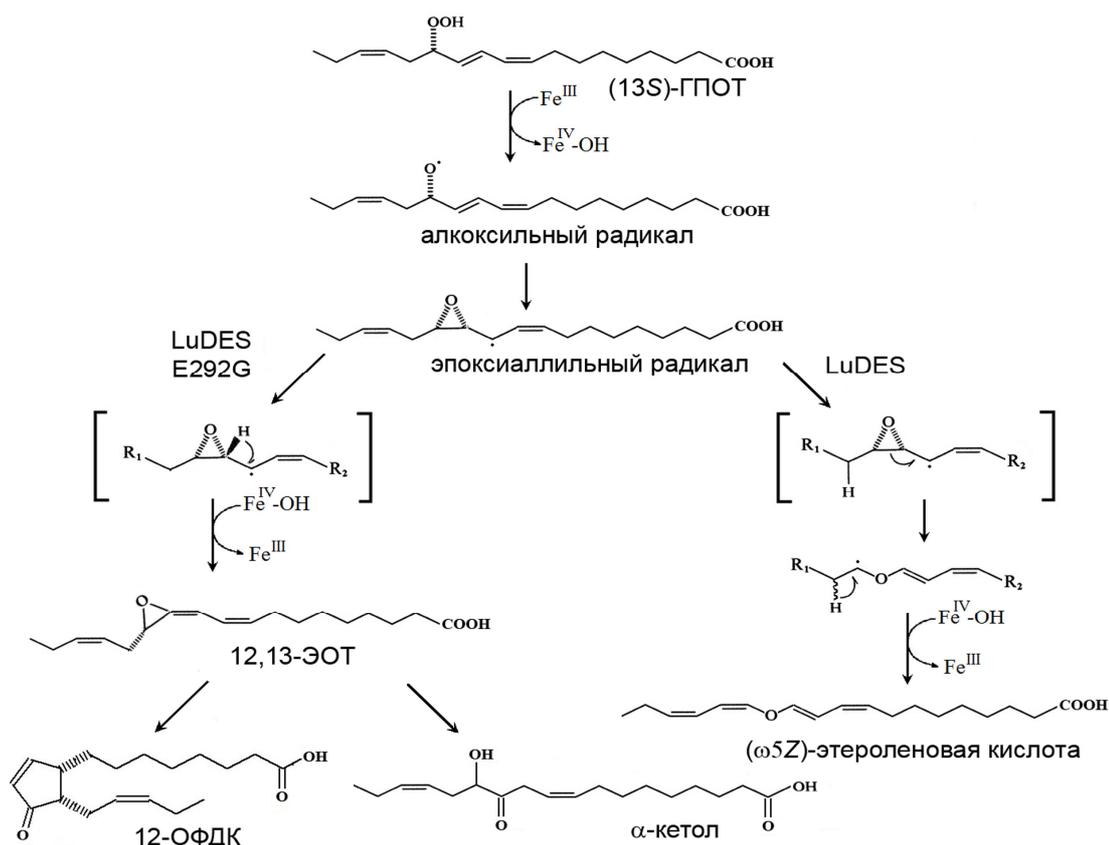


Схема 1. Предполагаемые механизмы реакций, катализируемых LuDES дикого типа и мутантной формы LuDES E292G.

Алленоксидсинтаза (ЕС 4.2.1.92) и дивинилэфирсинтаза (ЕС 4.2.1.121) являются гидропероксид-дегидратазами. Что отличает механизм действия этих двух ферментов? Первой стадией катализа у всех ферментов CYP74 является гомолиз гидроперокси-группы (Схема 1) с образованием эпоксиаллильного радикала и соединения II ($\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-OH}$, комплекс гидро-

ксийного радикала с гемовым железом). Второй стадией у АОС является отщепление атома водорода с образованием экзо-двойной связи при оксирани, т.о. синтезируется окись аллена. У ДЭС вторая стадия иная – гомолиз углерод-углеродной связи в оксирани с образованием винил-эфирного радикала. Третьим и заключительным этапом катализа является отщепление атома водорода от радикала с образованием второй двойной связи дивинилового эфира. Переключение между этими механизмами и является последствием мутации E292G (Схема 1).

Полученные результаты позволяют заключить, что сделанное нами предположение о роли домена HCD в определении типа катализа CYP74 оказалось верным. Кроме того, подтвердились результаты сравнительного анализа первичной структуры цитохромов CYP74, выявившие существенные аминокислотные остатки в определенных позициях.

На основании проведенных расчетов впервые была проведена конверсия дивинилэфирсинтазы в алленоксидсинтазу в результате единичной замены аминокислотного остатка. Этот результат вносит существенный вклад в представление об эволюции ферментов CYP74 и цитохромов P450 в целом.

В то же время, следует признать, что наши знания о механизмах детерминации того или иного типа реакции являются неполными и исследования в этом направлении нуждаются в дальнейшем развитии. С учетом аналогичных данных, полученных ранее [Lee *et al.*, 2008; Toporkova *et al.*, 2008], существенной корректировке может быть подвергнута также классификация цитохромов P450.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количество исследованных ферментов CYP74 неуклонно возрастает. По мере накопления результатов структурно-функциональной характеристики ферментов CYP74 все явственнее становятся противоречия в существующей классификации семейства. Первоначально все описанные ферменты CYP74 четко разделяли на четыре подсемейства: CYP74A, CYP74B, CYP74C и CYP74D [Itoh, Howe, 2001]. В последнее время появляется все большее количество ферментов CYP74, которые, согласно принятому критерию 55 % идентичности, не могут быть отнесены к описанным подсемействам. Примерами таких ферментов являются ДЭС чеснока, 9/13-ГПЛ однодольных, ферменты CYP74 фискомитреллы (*Physcomitrella patens*) и растений семейства сосновые (*Pinaceae*). Обнаруженные недавно [Lee *et al.*, 2008] ферменты коралла (*Acropora palmate*), ланцетника (*Branchiostoma floridae*) и трихоплакса (*Trichoplax adhaerens*), а также представителей рода метилобактерий (*Methylobacterium*), согласно принятому критерию 40 % идентичности, не являются членами семейства CYP74. В связи с этим Д. Нельсон счел целесообразным ввести понятие клана CYP74 [Nelson, Werck-Reichhart, 2011]. По данной классификации CYP74 являлся кланом, состоящим из единственного семейства [Nelson, Werck-Reichhart, 2011]. Однако недавно Д. Нельсон для ферментов протеобактерий и животных создал новые семейства (CYP440 – CYP444) [Nelson, 2013]. Автор отводит клану CYP74 одно из центральных мест в эволюции цитохромов P450. При этом он полагает, что, возникнув у животных, гены

этих ферментов были перенесены в растения посредством метиловобактерий. Соответственно разной эволюционной истории ферменты животных и растений отнесены к разным семействам. С такой позицией не согласны некоторые исследователи [Lee *et al.*, 2008]. В своей работе они идентифицировали рекомбинантные ферменты коралла, ланцетника и представителей рода метиловобактерия, как алленоксидсинтазу, эпоксиалкогольсинтазу и гидропероксидлиазу, соответственно. Ли с сотр. считают, что функциональное сходство не менее важно для классификации, чем идентичность последовательности. Эти авторы также ссылаются на прецедент обширного семейства CYP51, члены которого, принадлежащие представителям различных царств, имеют идентичность значительно менее 40 %. Таким образом, в настоящее время нет единства мнений относительно классификации CYP74.

Результаты настоящей работы показывают, что среди хорошо изученных подсемейств CYP74 могут появляться новые члены, гомологичные другим членам подсемейства и при этом радикально отличающиеся от них по типу катализа. Так, LuDES, относящаяся к подсемейству CYP74В по сходству первичной структуры, является ДЭС, в отличие от всех остальных изученных ферментов CYP74В, обладающих активностью 13-ГПЛ. Также как гены других представителей CYP74В, ген *LuDES* экспрессируется в листьях, и фермент предпочтительно использует 13-ГПОТ в качестве субстрата. Однако в отличие от ГПЛ, LuDES катализирует превращение 13-ГПОТ не в полуацеталь, а в (ω 5Z)-этероленовую кислоту.

В соответствии с имеющимися в нашем распоряжении данными, нами было предпринято построение одного из возможных вариантов филогенетического древа клана CYP74. Первоначальный отбор последовательностей был проведен с помощью программы BLAST. В качестве референсной (внешней) последовательности использовали первичную структуру фермента CYP74 (GI:170743950) метилотрофной бактерии (*Methylobacterium* sp. 4-46). Этот подход «наиболее удаленного предка» позволил нам построить филогенетическое древо, которое включало не только известные ферменты CYP74 растений, но и последовательности клана CYP74 протеобактерий и животных (рис. 9). Филогенетический анализ клана CYP74 показал, что члены подсемейства CYP74В наиболее близки к ферментам CYP74 голосеменных и членам клана CYP74 протеобактерий (Рис. 9). Этот результат в некоторой степени согласуется с тем фактом, что недавно описанный рекомбинантный фермент метилотрофной бактерии (*Methylobacterium nodulans*) – член клана CYP74 – был идентифицирован как 13-ГПЛ [Lee *et al.*, 2008].

Недавние работы по сайт-направленному мутагенезу [Lee *et al.*, 2008; Toporkova *et al.*, 2008] показали, что единичные аминокислотные замены в некоторых каталитически важных сайтах могут привести к превращению АОС в ГПЛ, но не в ДЭС. В то же время, все проведенные замены в последовательности ГПЛ приводили исключительно к нарушению катализа. Исходя из этого, было сделано предположение, что гипотетический предковый фермент CYP74 мог обладать активностью ГПЛ.

Предполагалось, что с точки зрения молекулярной эволюции гидропероксидлиазная реакция для ферментов CYP74 является базовой, а алленоксидсинтазная и дивинилэфир-

синтазная реакции формировались в процессе видоизменения этой базовой реакции в результате дополнительного влияния боковых групп новых аминокислот, появляющихся в результате мутаций. Исходя из этого, в результате сайт-направленного мутагенеза наиболее вероятно превращение ДЭС и АОС в ГПЛ, как результат реверсии. Конверсия дивинилэфирсинтазы LuDES в алленоксидсинтазу в результате единичной замены E292G может означать, что эволюция семейства состояла в последовательном превращении ГПЛ → АОС → ДЭС. В то же время, нельзя исключать, что у разных групп CYP74 был единый предковый фермент с неизвестной каталитической функцией.

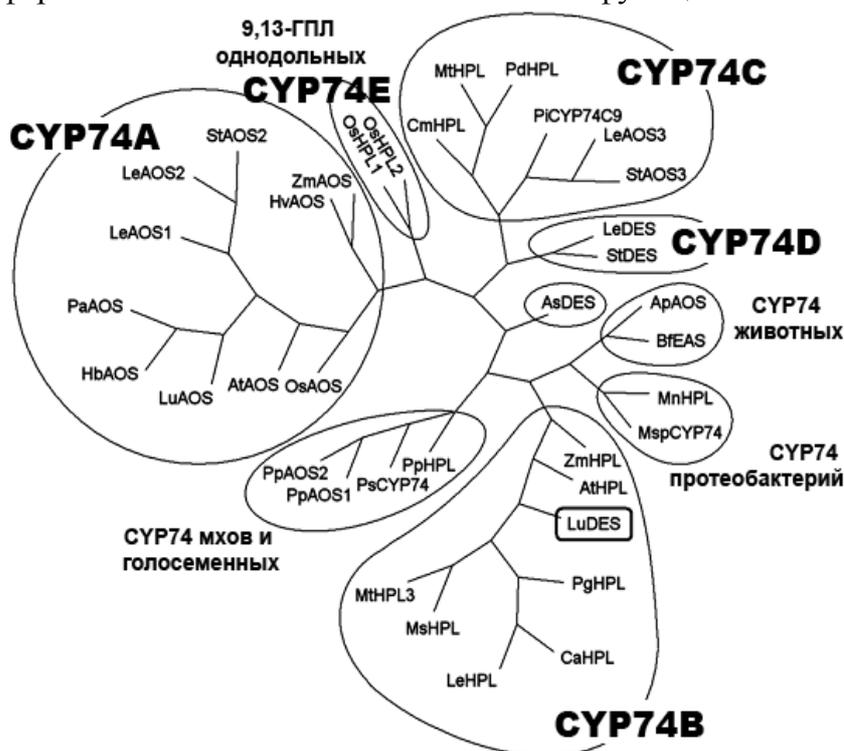


Рис. 9. Филогенетическое древо клана CYP74 цитохромов P450. Обведены различные таксономические группы, в которых члены клана были обнаружены. Древо было построено с использованием программ ClustalX и TreeView. Предварительный анализ проводили относительно последовательности фермента CYP74 (GI:170743950) метиловобактерии (*Methylobacterium* sp. 4-46) с использованием программы NCBI BLAST.

Несмотря на то, что в систематике ферментов часто тип каталитической реакции принято ассоциировать с определенным подсемейством, результаты, представленные в данной работе, показывают, что в случае семейства CYP74 это соответствие не соблюдается. Так, подсемейство CYP74C содержит и АОС, и ГПЛ, подсемейство CYP74B включает ГПЛ и ДЭС (Рис. 9). В то же время, члены подсемейства CYP74D имеют более 55 % сходства

В предыдущих исследованиях разными авторами было охарактеризовано несколько десятков ГПЛ и АОС. В то же время до настоящей работы было изучено только четыре ДЭС. Три из них относятся к растениям семейства пасленовых (томат (*Lycopersicon esculentum*) [Itoh, Howe, 2001], картофель (*Solanum tuberosum*) [Stumpe *et al.*, 2001] табак (*Nicotiana tabacum*) [Fam-martino *et al.*, 2007]) и одна – к растению семейства лилейных (*Liliaceae*) (чеснок [Stumpe *et al.*, 2008]). Некоторые исследователи полагают, что дивинилэфирсинтазы не получили широкого распространения в растениях.

В настоящей работе впервые описана рекомбинантная 13-специфичная дивинилэфирсинтаза LuDES (CYP74B16), которая гомологична 13-ГПЛ (CYP74B) и отличается от всех ранее описанных ДЭС по субстратной специфичности, продуктам реакции и органоспецифичности экспрессии гена.

аминокислотной последовательности с представителями подсемейства CYP74C. Таким образом, подсемейство CYP74D выделено лишь по функциональному признаку. Формально, CYP74C и CYP74D следовало бы рассматривать как единое подсемейство.

Круг секвенированных геномных последовательностей продолжает стремительно расширяться. При этом темп молекулярного клонирования и функционального изучения рекомбинантных белков все более отстает от темпа геномных исследований. Появляются новые подсемейства и даже семейства. Опыт настоящей работы показывает, что даже среди совершенно однородных подсемейств появляются ферменты (такие как LuDES (CYP74B16)) с каталитической функцией, принципиально отличной от той, которая может быть предсказана на основании сходства первичной структуры и другим формальным критериям классификации.

Можно было бы предположить, что LuDES является природным мутантом 13-ГПЛ. Хотя 13-ГПЛ льна до сих пор не изучена, проведенный нами анализ геномной базы данных льна выявил частичную последовательность (около 45 % полноразмерного представителя CYP74), которая по всем особенностям первичной структуры, в том числе каталитически важных сайтов, является типичной 13-ГПЛ (CYP74B). Эта последовательность имеет не более 76 % идентичности по отношению к LuDES. Таким образом, очевидно, LuDES является не мутантом, а паралогом до сих пор не изученной и не полностью секвенированной гидропероксидлиазы LuHPL льна. Таким образом, если превращение ГПЛ в ДЭС имело место, начавшись с дубликации гена и единичной мутации, оно продолжилось значительной модификацией первичной структуры, приведшей к закреплению приобретенного типа катализа.

LuDES – не единственная ДЭС, катализирующая образование (ω 5Z)-этеролоеновой кислоты или родственных (ω 5Z)-дивиниловых эфиров. Такие дивиниловые эфиры выявлены у трех видов бурых водорослей, а также двух видов рода лютик (*Ranunculus*). Сходный дивиниловый эфир с (Z,Z)-бутадиеновым фрагментом был обнаружен также в красной водоросли полинейра (*Polyneura latissima*) [Grechkin, 2002]. Соответствующие дивинилэфирсинтазы остаются совершенно неизученными. Они могут оказаться либо ортологами LuDES, либо представителями других (возможно, новых) подсемейств CYP74.

ВЫВОДЫ

1. Методами биоинформатики выявлены консервативные последовательности генов семейства CYP74 цитохромов P450 и разработаны универсальные праймеры для амплификации кДНК, соответствующих транскриптам данных генов.
2. Клонированы нуклеотидные последовательности, соответствующие трем полноразмерным мРНК генов подсемейства CYP74B, обнаруженным в транскриптоме растений льна (*Linum usitatissimum* L.), инокулированных клетками фитопатогенного штамма *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043. Получен очищенный препарат функционально активного рекомбинантного фермента CYP74B16 (GenBank ID: HQ286277.1).
3. Установлено, что предпочтительными субстратами рекомбинантного фермента

CYP74B16 являются 13-гидроперекиси α -линоленовой и линолевой кислот, продуктами превращения которых являются дивиниловые эфиры (ω 5Z)-этероленовая и (ω 5Z)-этеролеваая кислоты, соответственно. Фермент CYP74B16 идентифицирован как 13-специфичная дивинилэфирсинтаза, которой присвоено тривиальное название LuDES.

4. По критериям молекулярной филогении дивинилэфирсинтаза LuDES льна отнесена к подсемейству CYP74B, включавшему до настоящего времени исключительно 13-специфичные гидропероксидлиазы.

5. Впервые осуществлено превращение дивинилэфирсинтазы в алленоксидсинтазу в результате сайт-направленного мутагенеза. Получена мутантная форма LuDES с заменой E292G, у которой необычный для этого сайта остаток глутаминовой кислоты замещен на консервативный для алленоксидсинтаз и гидропероксидлиаз остаток глицина. Мутантная форма E292G, в отличие от дикой формы, превращает 13-гидроперекись α -линоленовой кислоты в алленоксидсинтазные продукты (α -кетол и 12-оксо-10,15-фитодиеновую кислоту), но не в дивиниловый эфир.

6. Продемонстрировано участие LuDES в ответных реакциях растений на патогены (*Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043): после инфицирования растений клетками патогенного микроорганизма происходит активация экспрессии гена *LuDES* в листьях льна; а продукт реакции, катализируемой LuDES – (ω 5Z)-этероленовая кислота – сдерживает рост клеток бактерий в культурах *in vitro*.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. 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.
2. Novel allene oxide synthase product formed via Favorskii rearrangement: mechanistic implications for 12-oxo-10,15-phytodienoic acid biosynthesis / A.N. Grechkin, N.V. Lantsova, Y.Y. Toporkova, S.S. Gorina, F.K. Mukhitova, B.I. Khairutdinov// Chembiochem. – 2011. – V. 12. – P.2511-2517.
3. Green leaf divinyl ether synthase: gene detection, molecular cloning and identification of the unique CYP74B subfamily member / Y.V. Gogolev, S.S. Gorina, N.E. Gogoleva, Y.Y. Toporkova, I.R. Chechetkin, A.N. Grechkin // BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2012. – V. 1821. – P. 287-294.

Работы, опубликованные в материалах научных мероприятий

1. Gorina, S.S. Detection and characterization of a new CYP74 transcript in flax (*Linum usitatissimum*) leaves / S.S. Gorina, N.E. Mukhametshina, Yu.V. Gogolev // Abstracts / Изд-во КГУ. – Kazan, 2009. – P. 54.
2. Горина, С.С. Обнаружение и характеристика гена CYP74 льна-долгунца (*Linum usita-*

- tissimum*) / **С.С. Горина**, Н.Е. Мухаметшина, Ю.В. Гоголев // Сб. тезисов / Изд-во Пушкинского НЦ РАН. – Пушкино, 2009. – С. 12-13.
3. Характеристика транскриптома представителей семейства CYP74 льна-долгунца (*Linum usitatissimum*) / **С.С. Горина**, Р.Т. Габбасов, Н.Е. Мухаметшина, Ю.В. Гоголев // Материалы конгресса / РИО ПГУ. – Пермь, 2009. – С.207-208.
4. Молекулярное клонирование гена дивинилэфирсинтазы льна-долгунца (*Linum usitatissimum*) / **С.С. Горина**, Н.Е. Гоголева, Ю.В. Гоголев, И.Р. Чечеткин, А.Н. Гречкин // Сб. Тезисов / Изд-во: Каз.ун-т. – 2010. – С. 17.
5. Клонирование гена дивинилэфирсинтазы льна-долгунца (*Linum usitatissimum*) / **С.С. Горина**, Н.Е. Гоголева, Ю.В. Гоголев, И.Р. Чечеткин, А.Н. Гречкин // Материалы конференции / Научная книга. – Саратов, 2010. – С. 45.
6. 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 // Abstracts / Wiley Blackwell, FEBS. – Torino, Italy, 2011. – P. 314.
7. Characterization of cytochromes P450 of the CYP74 family by the example of maize / Y.Y. Toporkova, **S.S. Gorina**, L.S. Mukhtarova, Y.V. Gogolev and A.N. Grechkin. // Abstracts / Wiley Blackwell, FEBS. – Torino, Italy, 2011. – P.319.
8. 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, А.Н. Гречкин // Тезисы докладов / Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского. – Нижний Новгород, 2011. – С. 196.
9. Характеристика семейства CYP74 цитохромов P450 кукурузы (*Zea mays*) / Я.Ю. Топоркова, **С.С. Горина**, Л.Ш. Мухтарова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Тезисы докладов / Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского. – Нижний Новгород, 2011. – С. 702.
10. Характеристика дивинилэфирсинтазы LuDES льна – нового представителя неклассических цитохромов P450 подсемейства CYP74B / **С.С. Горина**, Я.Ю. Топоркова, Н.Е. Гоголева, Л.Ш. Мухтарова, И.Р. Чечеткин, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Тезисы докладов / Карельского НЦ РАН. – Петрозаводск, 2011. – С. 364.
11. Цитохромы P450 семейства CYP74 кукурузы / Я.Ю. Топоркова, **С.С. Горина**, Л.Ш. Мухтарова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Тезисы докладов / Карельского НЦ РАН. – Петрозаводск, 2011. – С. 292.
12. Дивинилэфирсинтаза LuDES льна (*Linum usitatissimum* L.) уникальный фермент подсемейства CYP74B цитохромов P450 / **С.С. Горина**, Топоркова Я.Ю., Гоголева Н.Е., Мухтарова Л.Ш., Чечеткин И.Р., Гоголев Ю.В., Гречкин А.Н. // Тезисы докладов / «Клеточная сигнализация у растений». – Казань, 2011. – С.42.
13. 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 // Abstracts / Plant Biology Congress. – Freiburg, Germany. – 2012. – P. 14.