На правах рукописи

Осипова Елена Валентиновна

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛИПОКСИГЕНАЗЫ-3 (ZmLOX3) КУКУРУЗЫ

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2010

Работа выполнена в лаборатории оксилипинов и группе молекулярной биологии Учреждения Российской академии наук Казанском институте биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Научные руководители: академик РАН, доктор химических наук, Гречкин Александр Николаевич;

кандидат биологических наук, Гоголев Юрий Викторович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, Минибаева Фарида Вилевна (КИББ КазНЦ РАН, г. Казань)

кандидат биологических наук, Котлова Екатерина Робертовна (Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург)

Ведущая организация: Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (г. Владивосток)

Защита состоится “28” июня 2010 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Учреждении Российской академии наук Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я № 30, тел/факс (843)2927347

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

Автореферат разослан “27” мая 2010 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук А.Б. Иванова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Окисленные производные жирных кислот - оксилипины - выступают в качестве сигнальных молекул, определяющих физиологическое состояние растений, животных и микроорганизмов [Guerrero *et al*., 1997; Hamberg *et al*., 1998; Su, Oliw, 1998; Hornsten *et al*., 2002; Vance *et al*., 2004; Vidal-Mas *et al*., 2005]. Эти вещества участвуют в регуляции роста, развития, ответа на ряд биотических и абиотических стрессоров у растений. Являясь продуктами жизнедеятельности многих микроорганизмов, оксилипины задействованы в процессах коммуникации между патогеном и хозяином.

Ключевым ферментом липоксигеназного пути является липоксигеназа (ЛОГ; линолеат:кислород оксидоредуктаза ЕС 1.13.11.12). Липоксигеназы животных, водорослей, грибов и микроорганизмов используют в качестве субстрата C_{20}-жирные кислоты (например, арахидоновую кислоту), в то время как липоксигеназы растений катализируют превращение C_{18}-жирных кислот (линолевой и α-линоленовой кислоты). У многих видов растений, животных и микроорганизмов определены нуклеотидные последовательности генов липоксигеназ. В то же время лишь некоторые из них клонированы с целью исследования функциональных белковых продуктов.

В зависимости от образуемых региоизомеров продуктов реакции, липоксигеназы растений разделяются на (9*S*)- и (13*S*)-специфичные. Относительно механизмов катализа, определяющих специфичность действия ферментов данного класса, единого мнения у исследователей не существует. Классическим объектом для исследования моделей взаимодействия субстрата с активным центром является (13*S*)-специфичная липоксигеназа-1 сои (GmLOX1), для которой получены данные рентгеноструктурного анализа [Tomchick *et al*., 2001]. Предложено несколько моделей взаимодействия активного центра липоксигеназ с арахидоновой и линолевой кислотами. Эти модели достаточно хорошо описывают каталитические свойства (13*S*)-специфичных липоксигеназ, однако не согласуются с экспериментальными данными, полученными при изучении (9*S*)-специфичных липоксигеназ. Не исследованным остается вопрос о каталитической активности липоксигеназ растений в отношении других ненасыщенных жирных кислот, кроме линолевой и α-линоленовой, в том числе жирных кислот гексадеканового ряда, составляющих до 20% от общего количества липидов в 16:3 растениях [Jamieson, Reid 1971; Mongrand *et al*., 2005].

У всех изученных видов растений обнаружено несколько изоформ как (9*S*)-, так и (13*S*)-специфичных липоксигеназ. Это затрудняет изучение отдельных ферментов, выделяемых из гомогенатов тканей [Gardner, 1989]. В этой связи, перспективным подходом для изучения каталитических особенностей индивидуальных ферментов является клонирование соответствующих генов с последующей их экспрессией в гетерологичных системах. Данная технология также облегчает проведение направленных модификаций первичной структуры изучаемых белков, что служит эффективным инструментом для проверки предполагаемых моделей катализа.

Цель и задачи исследования. Целью нашего исследования являлось выяснение механизма каталитического действия рекомбинантной (9*S*)-специфичной липоксигеназы-3 (ZmLOX3) кукурузы.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Получение и характеристика рекомбинантного фермента ZmLOX3.
2. Сравнение регио- и стереоспецифичности действия ZmLOX3 и (13*S*)-специфичной (GmLOX1) липоксигеназы-1 сои при использовании в качестве субстратов гомологов линолевой и α-линоленовой кислот с разной длиной углеродной цепи.
3. Выявление особенностей каталитически важных доменов ZmLOX3 и определение вариантов их направленной модификации.
4. Получение мутантных форм ZmLOX3. Сравнение особенностей превращения линолевой кислоты и сложных липидов при участии фермента дикого типа и его мутантной формы.
5. Построение моделей взаимодействия ZmLOX3 и GmLOX1 с субстратами на основании экспериментальных данных и компьютерного моделирования.

Научная новизна работы. Проведенные исследования расширяют представления о теории специфичности действия ферментов липоксигеназ. На основании компьютерного моделирования и полученных экспериментальных данных определены факторы, влияющие на специфичность окисления субстратов при участии (9*S*)- и (13*S*)-липоксигеназ растений (ZmLOX3 и GmLOX1). Показано, что позиционирование субстратов в активном центре GmLOX1 и ZmLOX3 различается, однако, вне зависимости от региоспецифичности фермента проникновение субстрата в активный центр липоксигеназ осуществляется метильным концом вперед. Специфичность действия ZmLOX3 определяется лимитированным объемом активного центра, его пространственной структурой, положением ключевых аминокислотных остатков и атома железа. Выявлено, что проявление специфичности действия ZmLOX3 возможно при использовании жирных кислот октадеканового и гексадеканового ряда, встречающихся в растениях.

Полученные данные открывают перспективы для изучения гексадеканоидного липоксигеназного пути и физиологической роли его продуктов в растениях. Впервые обнаружено, что ZmLOX3 и GmLOX1 диоксигенируют жирные кислоты с укороченной по сравнению с линолевой кислотой углеродной цепью по (n-2) и (n+2) типу в зависимости от специфичности действия ферментов. Показано участие (7*Z*,10*Z*,13*Z*)-гексадекатриеновой кислоты в классическом 9-липоксигеназном пути растений.

Результаты работы могут способствовать разработке алгоритмов направленной модификации белков с целью получения ферментов с заданными свойствами. На основе разработанной модели выявлены консервативные участки полипептидной цепи ZmLOX3 и предложены варианты мутаций, с высокой вероятностью влияющие на каталитические свойства фермента. В результате единичной аминокислотной замены изменена региоспецифичность действия ZmLOX3.

Научно-практическая значимость работы. Полученные данные вносят вклад в понимание функционирования одной из ключевых сигнальных систем растения, способствующей его адаптации к неблагоприятным условиям. Изучены механизмы образования продуктов функционирования липоксигеназной сигнальной системы – оксилипинов, участвующих в процессах онтогенеза растений, таких как созревание плодов, прорастание семян, образование пыльцы, развитие цветков, корней и других органов, а также в формировании ответа на стрессовые факторы.

Разработаны системы получения и очистки препаративных количеств липоксигеназ растений. Использование технологии рекомбинантных ДНК и различных систем экспрессии дало возможность получения рекомбинантных белков данного класса для последующего возможного использования в промышленности, поскольку количество многих белков часто ограничено низкой доступностью в природе.

Возможность направленных превращений ферментов открывает новые способы модификации их каталитических свойств. Качественное изменение ферментативного катализа при сайт-направленном мутагенезе представляет потенциальный интерес для практического использования в области биоинженерии 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 исследования. Работа проводилась с 2006 по 2009 гг. в соответствии с планом научных исследований УРАН КИББ КазНЦ РАН по теме «Липоксигеназы растений. Изучение молекулярных механизмов катализа и поиск новых физиологически активных продуктов» (гос. регистрационный номер 0120.0 603843). Исследования автора, как исполнителя данной тематики, поддержаны грантом РФФИ № 06-04-48430-а «Липоксигеназы растений. От первичного строения – к пониманию молекулярных механизмов действия», и грантом Президиума РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология»), а также грантом ведущей научной школы академика И.А. Тарчевского НШ-5492.2008.4. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на 12-ой Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2008); на I Всероссийском конгрессе студентов и аспирантов «Симбиоз Россия 2008» (Казань, 2008); на Международной школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва-Пущино, 2008); на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008); на II Между-

народной конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2008); на Международном симпозиуме «Растительные липиды и оксилипины» (Казань, 2008); на Международном симпозиуме «Регуляторные оксилипины» (Швейцария, Лозанна, 2009); на Международной конференции «Симбиоз-2009: Биология – расширение границ» (Казань, 2009); на II Всероссийском конгрессе студентов и аспирантов «Симбиоз Россия-2009» (Пермь, 2009); на 13-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2009); на IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009). Работа награждена дипломом I степени I Всероссийского конгресса студентов и аспирантов «Симбиоз Россия-2008» (Казань, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ, из них три статьи в рецензируемых изданиях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 266 источников, из них 259 зарубежных. В работе представлено 6 таблиц и 33 рисунка.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Бактериальная система экспрессии генов рекомбинантных белков. Плазмида pRAW2, содержащая ген липоксигеназы-3 кукурузы (*zmlox3* GeneID: 542495) любезно предоставлена доктором Н. Келлер (Университет Висконсин, США), плазмида, содержащая ген дивинилэфирсинтазы-3 табака (*ntdes1* D:17646110) любезно предоставлена доктором А. Фаммартино (Университет Турина, Италия). Для клонирования и экспрессии генов *zmlox3* и *ntdes1* использовали векторы pET30a и pET32a, хозяевами которых служили штаммы *E. coli* NovaBlue и Rosetta-gami (DE3)pLysS. Индукцию экспрессии и наработку рекомбинантных белков бактериальными продуцентами проводили по стандартным методикам, [http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/ PROT/TB055.pdf] с модификациями. В питательную среду добавляли дополнительный источник железа - Fe_2SO_4. Клеточные лизаты получали механическим разрушением клеток с использованием аппарата French Press Cell Disrupter (Thermo Scientific, США).

1.2. Манипуляции с ДНК. Плазмидную ДНК выделяли, используя коммерческие наборы GeneElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma, США). Концентрацию измеряли флуориметрически, качественные характеристики оценивали по результатам электрофореза в агарозных гелях, регистрируемых с помощью системы Gel-Doc и программы Quantity One (Bio-Rad, США). Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью амплификатора DNAEngine (BioRad). Сайт-направленный мутагенез осуществляли методом ПЦР с модифицированными праймерами с использованием коммерческого набора Quick Change (Invitrogen, США). Олигонуклеотидные праймеры

синтезировали в НПО «Синтол» (Москва). Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили с помощью ДНК-анализатора 3130 Genetic Analyser (ABI, США).

1.3. Очистка рекомбинантных ферментов. Рекомбинантные белки из клеточных лизатов бактериальных продуцентов осаждали в присутствии $(NH_4)_2SO_4$, после чего разделяли с помощью анионообменной хроматографии на Q-Sepharose, с использованием системы BioLogic LP (Bio-Rad). Фракции, содержащие ZmLOX3, наносили на Octyl-Sepharose. Белок элюировали буфером с уменьшающейся концентрацией $(NH_4)_2SO_4$ и концентрировали ультрафильтрацией через мембрану Vivaspin 20 (50000 MWCO). Препарат фермента диализовали против 50%-ного глицерина и хранили при -86 °С. Содержание белка в пробах определяли с помощью Quick Start Bradford Dye Reagent. Полипептидный спектр препаратов контролировали с помощью электрофореза в ПААГ по Лэмли [Остерман, 1981]. Белки окрашивали Coomassie R250. Препараты дивинилэфирсинтазы очищали металлоафинной хроматографией на колонке IMAC (Bio-Rad, США). Препараты нативной алленоксидсинтазы кукурузы получали из ацетонового порошка семян [Grechkin *et al.,* 1991].

1.4. Анализ продуктов реакции липоксигеназ с разными субстратами. Анализ продуктов реакции проводили по следующей схеме: 1) инкубация субстрата с ферментом, 2) экстракция продуктов реакции смесью гексан/этилацетат (1:1), 3) упаривание растворителя, 4) перерастворение в метаноле, 5) метилирование диазометаном, 6) восстановление боргидридом натрия, 7) нормально-фазовая ВЭЖХ с использованием колонки Separon SIX (3,2×150 мм) (Tessek, Чехословакия), 8) хирально-фазовая ВЭЖХ с использованием колонки Chiralcel OD-H column (4,6×250 мм) (Daicel Chemical Industries, Франция). После гидрирования над PtO_2 и триметилсилирование силанизирующей смесью (пиридин:гексаметилдисилазан:триметилхлорсилан (2:1:2)) метиловых эфиров проводили анализ с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС). ТМС-производные метиловых эфиров анализировали с помощью масс-спектрометра QP5050A, соединенного с газовым хроматографом GC-17A. В качестве газа-носителя использовали гелий со скоростью подачи 30 см/с. Образцы вводили при начальной температуре колонки 120 °С. Затем температуру повышали до 240 °С со скоростью 10 °С/мин.

1.5. Анализ аминокислотных последовательностей с помощью методов биоинформатики. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей липоксигеназ растений и животных проводили по стандартному алгоритму [Altschul *et al*., 1997]. Трехмерную компьютерную модель строили с помощью пакета программ EXyPred3D [Lambert *et al*., 2002] на основании 55,6% гомологии аминокислотных последовательностей ZmLOX3 (NCBI GenPept AAG61118) и липоксигеназы-3 сои (NCBI GenPept AAB41272) [Fukushige *et al*., 2005] с использованием рентгеноструктурных данных последней (PDB 1LNH). Позиционирование субстрата в активном центре исследовали с помощью программ Autodock 4.2 и AutodockTools 1.5.4 (The

Scripps Research Institute), трехмерные модели лигандов получали с помощью ChemOffise (CambridgeSoft), визуализацию данных проводили с помощью PyMol APBS Tool (Carlson Group, University of Michigan) .

1.6. Статистическая обработка данных. Данные представлены в виде средних значений не менее, чем 4-х измерений в 3-х биологических повторностях. Анализ данных проводили стандартными методами математической статистики (расчет среднеквадратичного отклонения, сравнение средних по критерию Стьюдента).

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Получение рекомбинантного фермента ZmLOX3

Было установлено, что для получения активной рекомбинантной ZmLOX3 в клетках бактериального продуцента *E. coli* Rosetta-gami (DE3)pLysS критичным фактором является температура инкубации, которая в наших экспериментах составляла 15 °C. Увеличению выхода активного фермента способствовали также введение в ростовую среду железа в доступной форме ($FeSO_4$) и оптимизация процедуры лизиса. Комплекс методов очистки ZmLOX3 из клеточного лизата, включающий ионообменную и гидрофобную хроматографии, позволил достичь высокой степени гомогенности фермента, подтвержденной с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ.

2.2. Специфичность действия рекомбинантной ZmLOX3 при окислении линолевой кислоты (18:2)

Специфичность действия липоксигеназ определяли по соотношению продуктов липоксигеназной реакции. Селективное удалением водорода от прохирального центра пентадиенильного фрагмента ненасыщенной жирной кислоты происходит в соответствие со стереоспецифичностью действия липоксигеназы [Grechkin, 1998]. При отрыве от прохирального центра 11-*pro-R* водорода образуются (9*S*)- и (13*R*)-гидроперекиси, при удалении 11-*pro-S* водорода - (9*R*)- и (13*S*)-гидроперекиси. Место присоединение кислорода (к углероду в позициях 9 ((n-2) тип) или 13 ((n+2) тип)) определяется региоспецифичностью действия фермента. В растениях встречаются (9*S*)-, (13*S*)-липоксигеназы и ферменты, обладающие двойной специфичностью действия.

Согласно ориентационной модели [Gardner, 1989], специфичность действия липоксигеназы зависит от pH среды. При щелочных pH преобладающим продуктом липоксигеназной реакции является (13*S*)-гидроперекись, поскольку ионизация карбоксильной группы субстрата позволяет ему проникать в активный центр только метильным концом вперед. При кислых pH преобладающим продуктом реакции является (9*S*)-гидроперекись, так как карбоксильная группа не ионизирована, и субстрат может проникнуть в активный центр лишь в обратной ориентации. Однако, проведенный нами анализ продуктов окисления линолевой кислоты при участии ZmLOX3 в щелочных и кислых условиях (pH 6,0; 7,5; 9,0) показал отсутствие зависимости регио- и стереоспецифичности действия ZmLOX3 от значений pH.

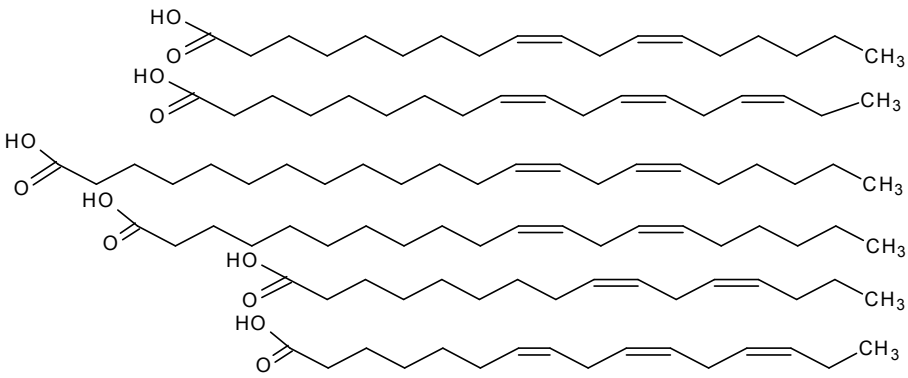

Рис. 1. Структуры свободных жирных кислот (сверху вниз): линолевая (18:2), α-линоленовая (18:3), (13*Z*,16*Z*)-докозадиеновая (22:2), (11*Z*,14*Z*)-эйкозадиеновая (20:2), (9*Z*,12*Z*)-гексадекадиеновая (16:2) и (7*Z*,10*Z*,13*Z*)-гексадекатриеновая кислоты (16:3).

Преобладающим продуктом окисления линолевой кислоты при участии ZmLOX3 была 9-гидроперекись (98,5%). Анализ с помощью хирально-фазовой ВЭЖХ показал, что 99% 9-гидроперекиси линолевой кислоты представлено (*S*)-энантиомером (рис. 8.) Таким образом, при окислении линолевой кислоты при участии ZmLOX3 происходило стереоспецифичное удаление 11-*pro-R* водорода. Присоединение кислорода проходило в соответствии с региоспецифичностью действия ZmLOX3 по 9-му атому углерода субстрата. При этом кислотность среды не изменяла ориентации субстрата в активном центре ZmLOX3. Широкий диапазон pH (5.5-9.0) сохранения ферментативной активности и специфичности (9*S*)-липоксигеназы был установлен нами впервые.

2.3. Специфичность действия ZmLOX3 при окислении высших гомологов линолевой кислоты

Особенности специфичности действия ZmLOX3 исследовали используя в качестве субстратов (13*Z*,16*Z*)-докозадиеновой (22:2) и (11*Z*,14*Z*)-эйкозадиеновой (20:2) кислот. Структурные формулы субстратов представлены на рис. 1.

Продукты реакции анализировали с помощью ГХ/МС. Полученные данные сопоставляли с результатами окисления субстратов коммерческим препаратом липоксигеназы-1 (GmLOX1) сои. Под действием ZmLOX3 (pH 7,0) докозадиеновая кислота не окислялась, тогда как эйкозадиеновая кислота окислялась с низкой скоростью (5% от скорости окисления линолевой кислоты). Окисление докозадиеновой и эйкозадиеновой кислот при участии ZmLOX3 при pH 9,0 происходило со скоростями, соответствующими 9,5% и 1,8% от скорости окисления линолевой кислоты. Преобладающими продуктами окисления докозадиеновой кислоты под действием ZmLOX3 были 13- и 17-гидроперекиси; минорным продуктом была 18-гидроперекись 22:2 (рис. 2). Образование этих продуктов могло происходить при удалении водорода от 15-го и 16-го углерода докозадиеновой кислоты. Продуктами окисления эйкозадиеновой кислоты при участии ZmLOX3 были 11- и 12-гидроперекиси 20:2, которые не полностью разделялись с помощью нормально-фазовой ВЭЖХ, а также 14- и 15-гидроперекиси 20:2 (рис. 3). Подобные продукты могли образоваться при удалении водорода от 10-го, 13-го и 16-го атомов углеродной цепи (рис. 2). Анализ с помощью хирально-фазовой

ВЭЖХ показал, что все продукты реакций представлены рацемическими смесями (*S*)- и (*R*)-стереоизомеров.

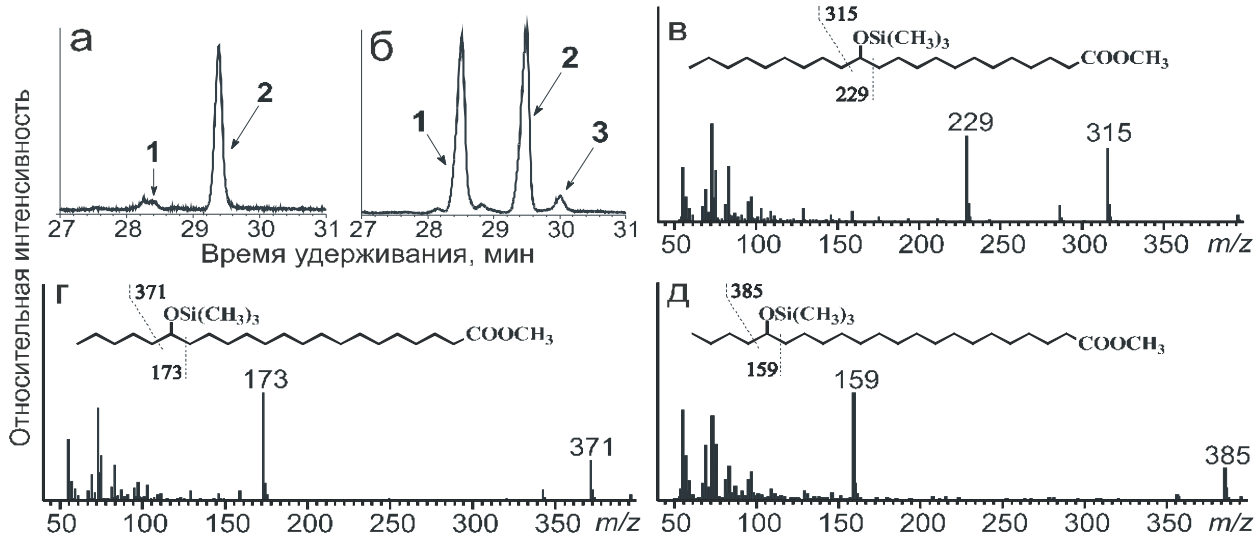

Рис. 2. Результаты ГХ/МС анализа продуктов инкубации (13*Z*,16*Z*)-докозадиеновой кислоты с GmLOX1 (**а**) и ZmLOX3 (**б**). а, б – хроматограммы по полному ионному току. **в**, **г**, **д** – масс-спектры метиловых эфиров ТМС-производных 13- (**1**), 17- (**2**) и 18- (**3**) гидроксидодекановой кислоты.

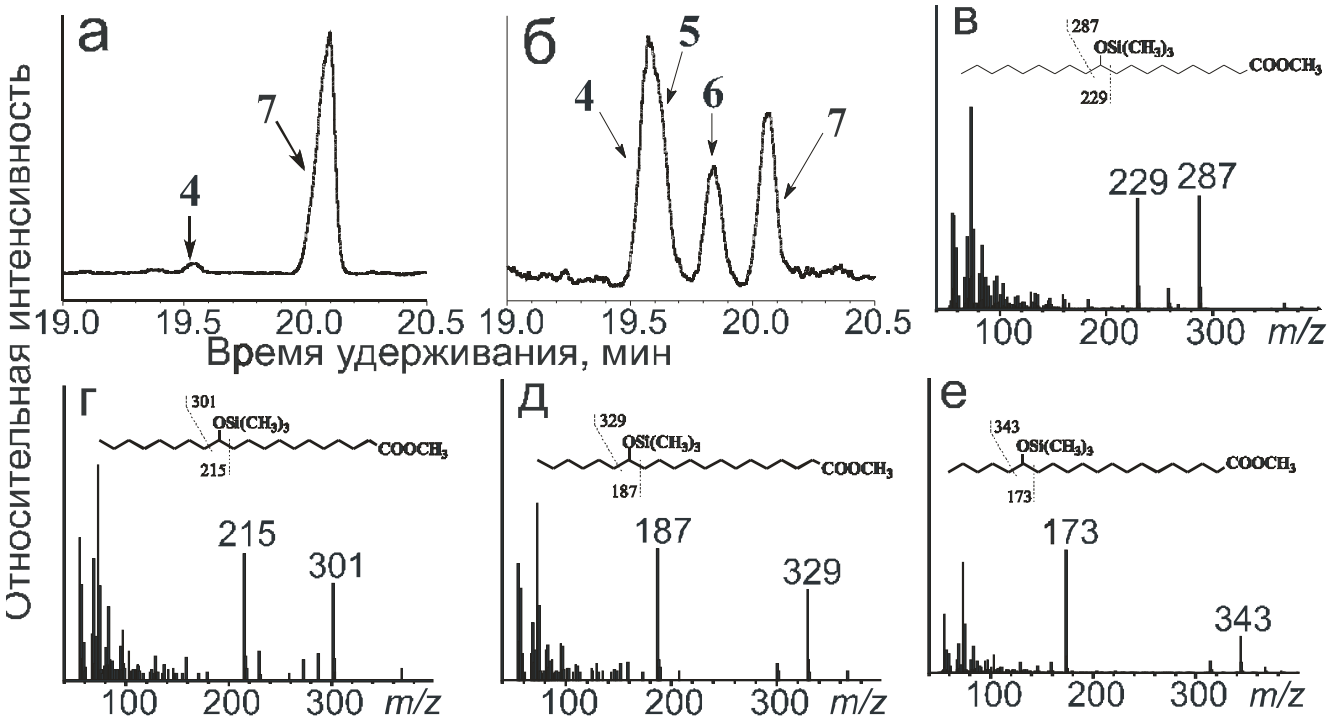

Рис. 3. Результаты ГХ/МС анализа продуктов инкубации (11*Z*,14*Z*)-эйкозадиеновой кислоты с GmLOX1 (**а**) и ZmLOX3 (**б**). **а**, **б** – хроматограммы по полному ионному току. **в**, **г**, **д**, **е** – масс-спектры метиловых эфиров ТМС-производных 11- (**4**), 12- (**5**), 14- (**6**) и 15- (**7**) гидроксиэйкозановой кислоты.

Окисление докозадиеновой и эйкозадиеновой кислот при участии GmLOX1 (pH 9,0) проходило с высокой регио- и стереоспецифичностью. Преобладающие продукты реакций – (17*S*)-гидроперекись докозадиеновой кислоты и (15*S*)-гидроперекись эйко-

задиеновой кислоты – соответствовали региоспецифичности фермента по (n+2) типу. Скорости реакций сопоставимы со скоростью окисления линолевой кислоты.

Окисление жирных кислот с удлиненной по сравнению с линолевой кислотой углеродной цепью (докозадиеновая и эйкозадиеновая) при участии ZmLOX3 происходило эффективнее в щелочной среде, то есть в условиях диссоциации карбоксильной группы субстрата. ZmLOX3 катализировала окисление этих субстратов без проявления регио- и стереоспецифичности действия. По-видимому, в отличии от GmLOX1, для ZmLOX3 наличие отрицательно заряженной карбоксильной группы необходимо для заякоривания субстрата на положительно заряженном аминокислотном остатке, как ранее было продемонстрировано для соевой липоксигеназы-3 [Skrypczak-Jankun, 2001]. Возможно, отсутствие специфичности действия при окислении этих субстратов объясняется большим расстоянием от карбоксильной группы до прохирального центра докозадиеновой и эйкозадиеновой кислот по сравнению с линолевой кислотой. Вследствие этого, заякорившийся субстрат позиционировался таким образом, что взаимодействия атома железа и каталитически важных аминокислотных остатков с прохиральным центром субстрата было затруднено.

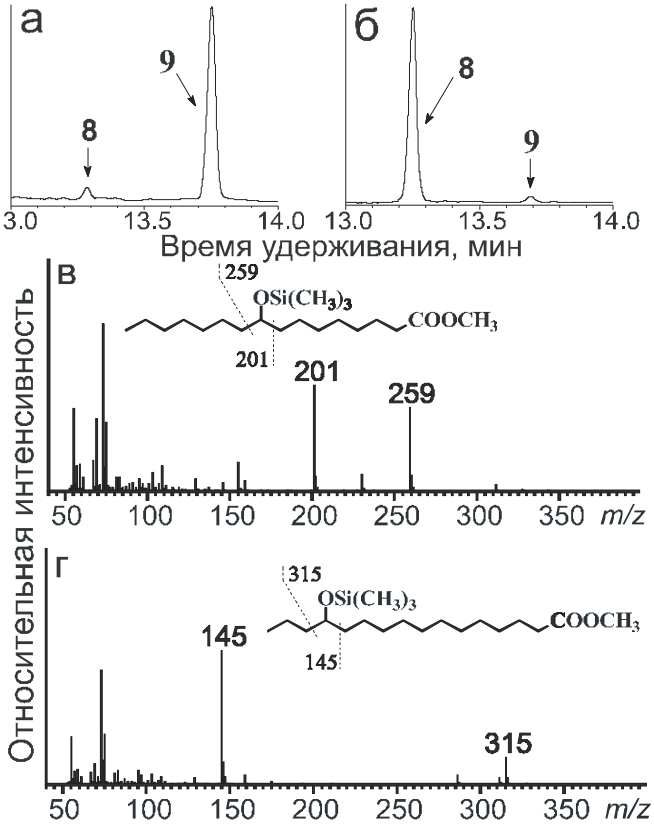

Рис. 4. Результаты ГХ/МС анализа продуктов реакции 16:2 с GmLOX1 (**а**) и ZmLOX3 (**б**). **а**, **б** – хроматограммы по полному ионному току. **в**, **г** – масс-спектры метиловых эфиров ТМС-производных 9- (**8**) и 13- (**9**) гидроксигексадекановой кислоты.

2.4. Специфичность действия ZmLOX3 при окислении жирных кислот гексадеканового ряда

Особенности специфичности действия ZmLOX3 исследовали, используя в качестве субстрата жирные кислоты, содержащие 16 атомов углерода: (9Z,12Z)-гексадекадиеновую (16:2) и (7Z,10Z,13Z)-гексадекатриеновую кислоты (16:3), структурные формулы которых представлены на рис. 1. Скорость окисления гексадекадиеновой кислоты при участии ZmLOX3 была сопоставима со скоростью окисления ли-

нолевой кислоты. ГХ/МС анализ показал, что продуктами реакции являлись 9-гидроперекись (97%) и 13-гидроперекись (3%) 16:2 (рис. 4). Преобладающим продуктом окисления 16:2 при участии GmLOX1 являлась 13-гидроперекись (95%), минорным - 9-гидроперекись (5%). Основные продукты описанных реакций (13-гидроперекись, образованная при участии GmLOX1, а также 9-гидроперекись, образованная при участии ZmLOX3) являлись (*S*)-энантиомерами. Скорость окисления гексадекатриеновой кислоты при участии ZmLOX3 соответствовала 8,8% от скорости окисления линолевой кислоты.

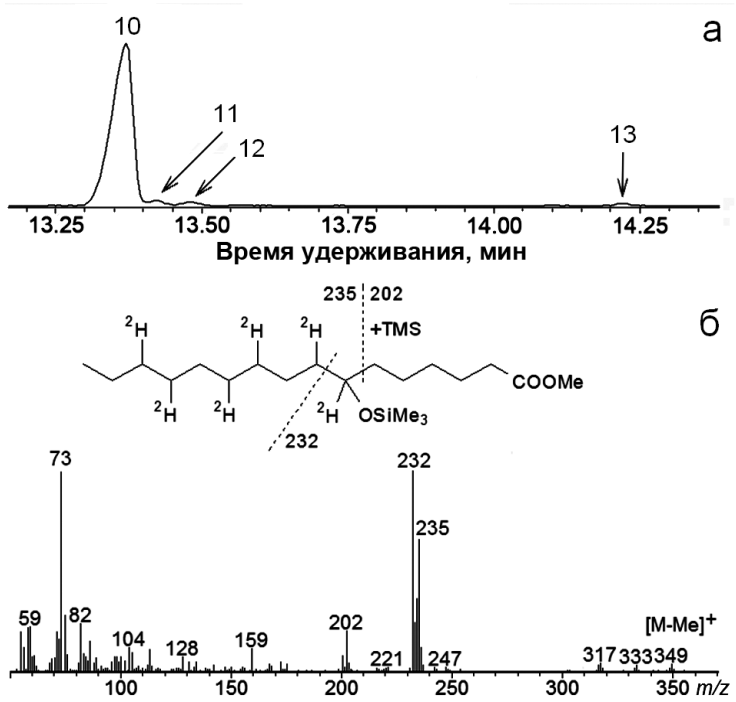

Рис. 5. Результаты ГХ/МС анализа продуктов окисления в виде ТМС производных метиловых эфиров насыщенных жирных гидроксикислот [7,8,10,11,13,14-$^2H_6$]16:3 с ZmLOX3. **а** - хроматограммы по полному ионному току 7- (**10**), 10- (**11**), 11- (**12**), 14- (**13**) гидроксигексадекановой кислоты. **б** – масс-спектр 7- гидроксигексадекановой кислоты.

Мажорным продуктом реакции являлась 7-гидроперекись 16:3 (93,3%) (рис. 5). Структура данного соединения была исследована методами ^{1}H-ЯМР и 2D-COSY. Преобладающим продуктом реакции 16:3 с GmLOX1 являлась 11-гидроперекись. Согласно результатам хирально-фазовой ВЭЖХ основные продукты реакций при участии ZmLOX3 и GmLOX1 были представлены (*S*)-энантиомерами. Окисление гексадекадиеновой и гексадекатриеновой кислот при участии ZmLOX3 и GmLOX1 происходило с высокой стерео- и региоспецифичностью, не смотря на укороченную по сравнению с линолевой кислотой, углеродную цепь. Скорость реакции, катализируемой ZmLOX3, зависила от расстояния между карбоксильной группой и прохиральным центром субстрата. В случае гексадекадиеновой и линолевой кислот эти расстояния совпадали, сопоставимы и скорости окисления данных субстратов. Удаление водорода при участии ZmLOX3 происходило из молекулы гексадекатриеновой кислоты в ближайшем к карбоксильному концу прохиральном центре. Это расстояние меньше, чем у линолевой кислоты, ниже и скорость окисления гексадекатриеновой кислоты.

Образование (7*S*)- и (11*S*)-гидроперекисей гексадекатриеновой кислоты при участии липоксигеназ *in vitro* было показано впервые. Ранее сообщалось о присутствии

этерифицированных (11*S*)- и 7-гидро(перо)кси-производных гексадекатриеновой кислоты в сложных липидах арабидопсиса, относящегося к 16:3 растениям [Montillet *et al*., 2004, Anderson *et al*., 2006]. Следующим этапом исследования стал поиск гидрокси-производных гексадеканоидов в 16:3 и 18:3 растениях.

2.5. Идентификация гексадеканоидов в растениях

В 18:3 растениях содержание гексадекатриеновой кислоты незначительно, в то время как в 16:3 растениях оно составляет до 20% от всех жирных кислот [Jamieson, Reid 1971; Mongrand *et al*., 2005]. В корнях капусты (16:3 растение) были обнаружены 7-, 9- и 11-гидрокси-производные гексадеканоидов (рис. 6). Кроме того, был обнаружен этиловый эфир 7-гидрокси-производного, который встречался примерно в 20 раз чаще, чем свободные гидрокси-производные. В корнях картофеля, помимо 7-, 9- и 11-гидрокси-производных гексадеканоидов были обнаружены 8-, 10-, 12-, 13- и 14-изомеры, в то время как их этиловые эфиры отсутствовали.

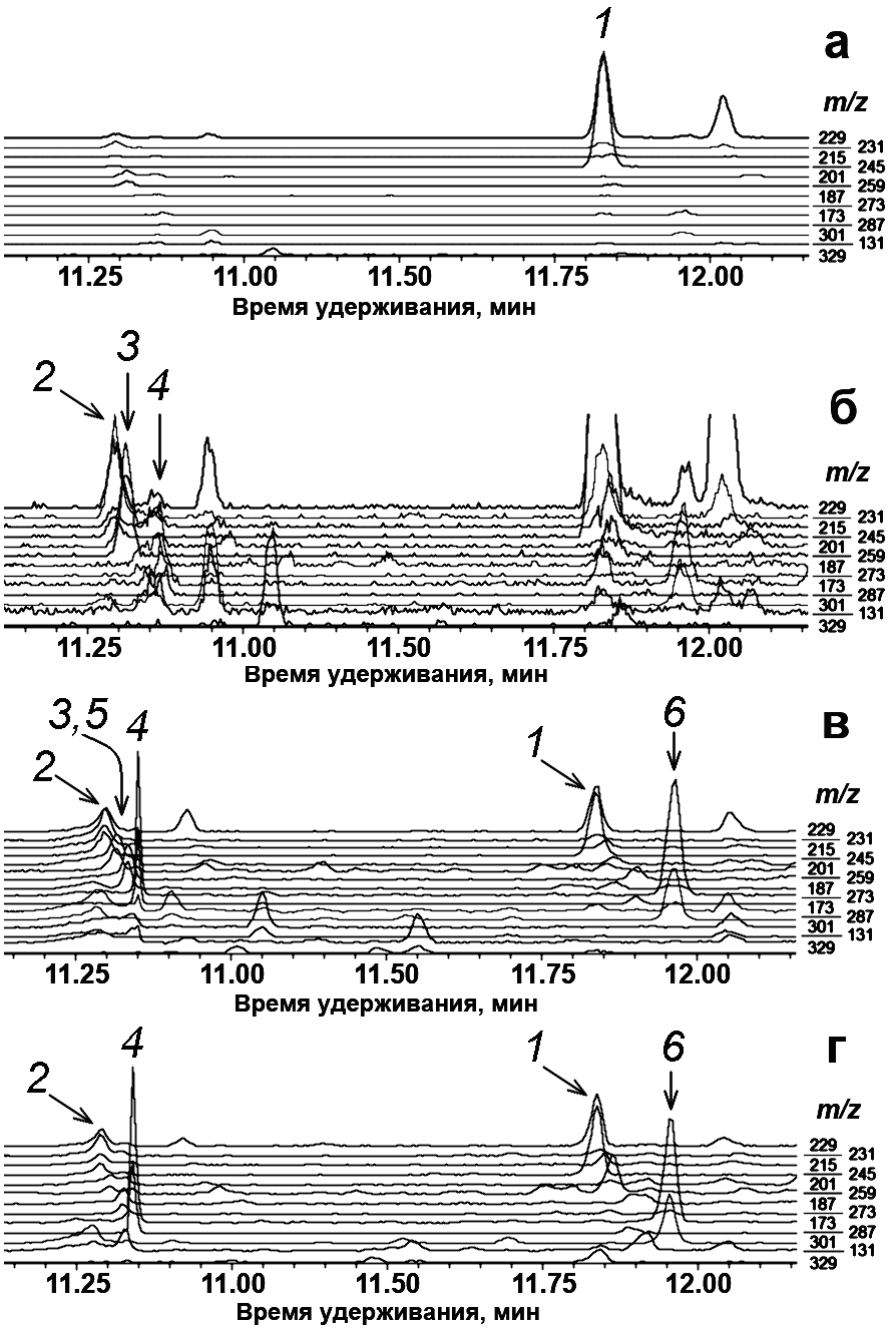

Рис. 6. Присутствие гексадеканоидов (ГД) в растениях. Анализ ТМС-производных восстановленных метиловых эфиров ГД выявляемых в корнях капусты (*Brassica oleraceae L.)* (**а**), та же хроматограмма с развернутой осью Y (**б**), листьях сои (*Glycine max L.*) (**в**), листьях гороха (*Pisum sativum L.*) (**г**). **1** –ТМС-производное этилового эфира эндогенной 7-ГГТ, **2** – 7-ГГТ, **3** – 9-ГГТ, **4** – 11-ГГТ, 5 – 10-ГГТ, **6** –ТМС-производные этиловых эфиров эндогенной 11-ГГТ. Данные представлены в виде хроматограмм по избранным ионным токам.

В листьях и семенах 18:3 растений, таких как соя и горох, были обнаружены 11-гидрокси-производное и в значительно меньших количествах 8-, 9-, 10-, 14-гидрокси-производные гексадеканоидов. В листьях гороха, листьях и корнях сои были обнаружены этиловые эфиры 7- и 11-гидрокси-производных. Корни подсолнечника содержали, в основном, 7-изомеры, тогда как 8- и 10-гидрокси-производные гексадеканоиды содержались в следовых количествах.

Содержание гексадекатриеновой кислоты в липидоме 18:3 растений крайне незначительно. В связи с этим, можно предположить два пути образования гидроперекисей 16:3: в результате β-окислении 18:3 с последующим окислением до гидроперекисей 16:3 или при β-окислении гидроперекисей 18:3 (рис. 7). Отсутствие ожидаемых при β-окислении продуктов в виде гидрокси-производных 18:3 с длиной цепи в 14, 12 и менее атомов углерода свидетельствует в пользу первого пути.

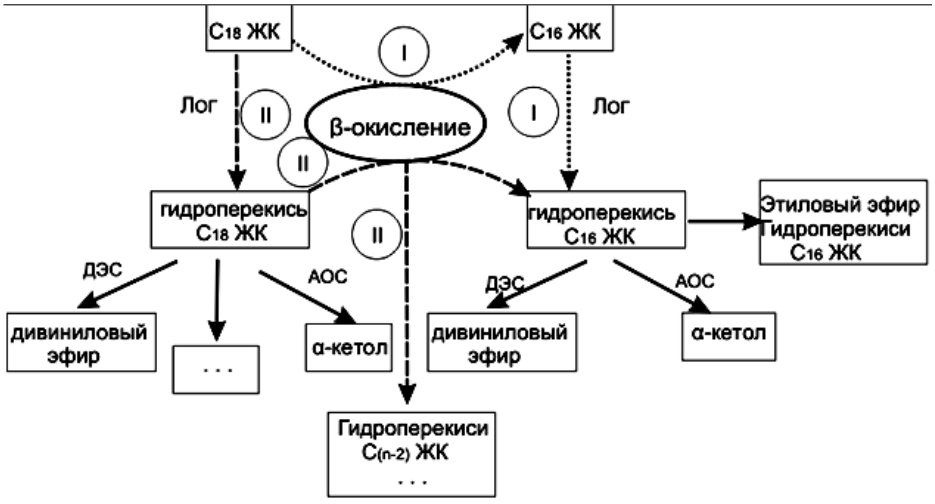

Рис. 7. Пути образования гидроперекисей гексадекатриеновой кислоты и их метаболизма в растениях (ЖК – жирная кислота).

Образование гидрокси-производных гексадеканоидов в корнях картофеля, по-видимому, происходило в результате автоокисления. Об этом свидетельствовало присутствие широкого набора (7-, 8-, 9- 10-, 11-, 12-, 13- и 14-) гидрокси-производных гексадеканоидов. Образование гидрокси-производных гексадеканоидов в корнях капусты, растениях гороха и сои могло происходить с участием липоксигеназ. Возможно, образование этиловых эфиров 7- и 11-гидрокси-производных происходило в растении для создания пула этих гексадеканоидов, так как этиловые эфиры отличаются стабильностью. Одним из путей дальнейшего использования этиловых эфиров 7- и 11-гидрокси-производных может являться включение их в галактолипиды и диацилглицериды.

Образовавшиеся при липоксигеназном окислении линолевой кислоты (9*S*)- или (13*S*)-гидроперекиси становятся субстратами для каталитического действия ферментов семейства CYP74 (цитохромов P450): алленоксидсинтаз, гидропероксидлиаз, дивинилэфирсинтаз [Grechkin, 1998]. Ранее в составе сложных липидов были описаны такие гексадеканоиды, как динор-12-оксо-фитодиеновая [Weber *et al*., 1997] и динор-этероленовая кислоты [Hamberg, 1998]. Предполагалось, что они могут являться продуктами дивинилэфирсинтазной реакции. Однако экспериментально образование

гексадеканоидов, аналогичных октадеканоидным оксилипинам, до настоящего времени показано не было. Исследованию возможности каталитического преобразования 7-гидроперекиси 16:3 при участии ферментами CYP74 была посвящена следующая часть нашей работы.

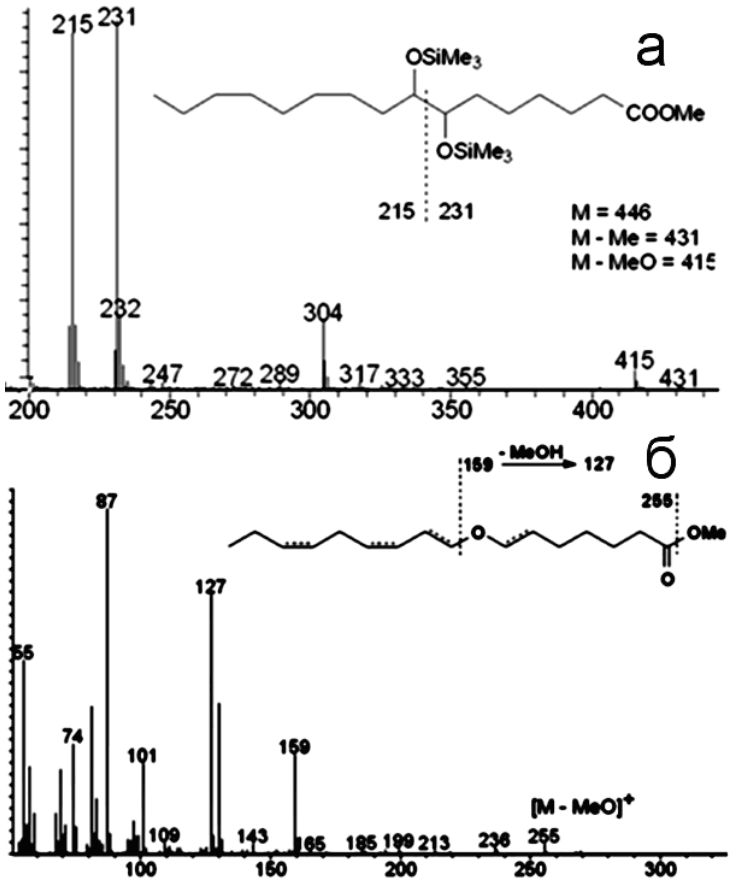

Рис. 8. Результаты ГХ/МС анализа метиловых эфиров ТМС-производных продуктов инкубации (7*S*)-гидроперекиси 16:3 с АОС (**а**) и ДЭС (**б**).

2.6. Превращение (7*S*)-гидроперекиси гексадекатриеновой кислоты при участии ферментов семейства CYP74 цитохромов P450

В результате проведенных нами экспериментов *in vitro* было установлено, что (7*S*)-гидроперекись гексадекатриеновой кислоты превращалась при участии 9-алленоксидсинтазы кукурузы в 7-гидрокси-8-оксо-10(*Z*),12(*Z*)-гексадекатриеновую кислоту – α-кетол (рис. 8). Продуктом превращения (7*S*)-гидроперекиси гексадекатриеновой кислоты при участии рекомбинантной 9-дивинилэфирсинтазы табака *in vitro* являлась динор-колнеленовая кислота. Таким образом, можно предположить участие гексадекатриеновой кислоты в липоксигеназном каскаде растений.

2.7. Получение и исследование специфичности действия мутантной формы ZmLOX3 Ala562Gly

Согласно существующей модели инверсии субстрата [Coffa *et al*., 2004] образование (9*S*)- либо (13*S*)-гидроперекиси зависит от пространственной ориентации липидной молекулы в активном центре фермента (метильным или карбоксильным концом вперед). Для GmLOX1 показано, что преобладающим продуктом при окислении линолевой кислоты являлась (13*S*)-гидроперекись, вследствие проникновения субстрата в активный центр метильным концом [Coffa *et al*., 2005]. Кроме того, для определения специфичности действия липоксигеназ в инверсной модели особое

значение придается остатку аланина 542. В результате замены Ala542Gly региоспецифичность действия фермента изменяется, в продуктах обнаруживается (9*R*)-гидроперекись. Специфичность действия (9*S*)-липоксигеназ, содержащих аланин в том же сайте, объясняется изменением ориентации субстрата (карбоксильной группой вперед). Согласно этой же модели, (9*S*)-липоксигеназы не способны катализировать окисление жирных кислот в составе сложных липидов, в отличие от (13*S*)-липоксигеназ, поскольку глицерин, связанный с карбоксильной группой жирной кислоты, препятствует проникновению субстрата карбоксильной группой вперед. При этом изменения специфичности действия (9*S*)-липоксигеназ при аналогичных мутациях показано не было. Нами была получена мутантная форма ZmLOX3 Ala562Gly. Модифицированный рекомбинантный фермент был выделен, очищен и исследован по аналогии с ферментом дикого типа.

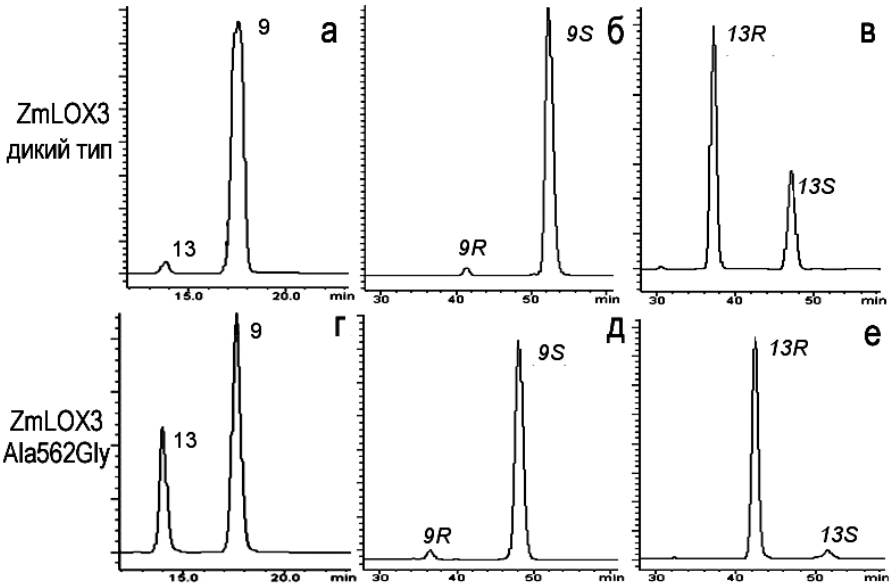

Рис. 9. Анализ нормально-фазовой ВЭЖХ гидроперекисей, полученных в результате окисления линолевой кислоты ZmLOX3 дикого типа (**а**) и ее мутантной формой Ala562Gly (**г**). Энантиомерный анализ продуктов окисления при участии ZmLOX3 дикого типа (**б**), (**в**) и мутантной формы Ala562Gly (**д**), (**е**).

Согласно результатам анализа с помощью нормально-фазовой ВЭЖХ, продуктами окисления линолевой кислоты при участии мутантной формы Ala562Gly являлись 9-гидроперекись (68,5%) и 13-гидроперекись (31,5%) линолевой кислоты (рис. 9). С помощью хирально-фазовой ВЭЖХ было показано, что у 9-гидроперекиси линолевой кислоты преобладал (*S*)-энантиомер (97%), тогда как у 13-гидроперекиси преобладал (*R*)-энантиомер (96%). Для ZmLOX3 константа Михаэлиса составила 20,2 мкМ, тогда как для мутанта Ala562Gly – 3,2 мкМ. Понижение значения константы Михаэлиса наблюдалось для мутанта Ala542Gly (GmLOX1) и мутантных форм других ферментов [Coffa, Brash, 2004; Coffa *et al*., 2005], что объяснялось эффектом ингибирования реакции при высоких концентрациях субстрата. Таким образом, мутация Ala562Gly привела к изменению региоспецифичности по сравнению с диким типом ZmLOX3, так как при окисления линолевой кислоты наряду с (9*S*)-гидроперекисью образовывалась (13*R*)-гидроперекись (30,2%). Поскольку вопрос ориентации субстрата в субстрат-связывающем кармане остался открытым, то на следующем этапе нашей работы основное внимание было уделено изучению специфичности диоксигени-

рования сложных липидов при участии ZmLOX3 дикого типа и ее мутантной формы Ala562Gly.

2.8. Окисление сложных липидов при участии ZmLOX3 дикого типа и ее мутантной формы Ala562Gly

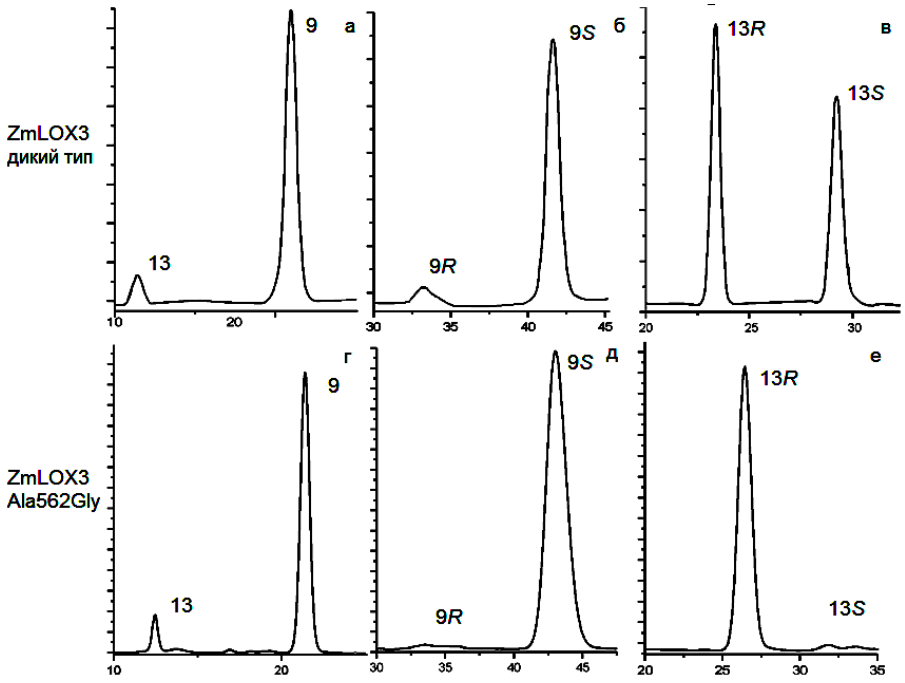

Рис. 10. Анализ продуктов окисления МЛГ с помощью нормально-фазовой ВЭЖХ при участии ZmLOX3 дикого типа (**а**) и мутантной формы Ala562Gly (**г**): 9-гидроперокси-МЛГ и 13-гидроперокси-МЛГ. Анализ энантиомерного состава продуктов окисления МЛГ при участии ZmLOX3 9- (**б**), 13- (**в**) гидроперокси-МЛГ и при участии мутантной формы Ala562Gly 9- (**д**), 13- (**е**) гидроперокси-МЛГ.

Дополнительным доказательством проникновения в активный центр (9*S*)-липоксигеназ субстрата карбоксильной группой вперед служат данные по окислению сложных липидов. Показано, что (13*S*)-липоксигеназы способны окислять сложные липиды: GmLOX1 окисляет остатки арахидоновой и линолевой кислот в составе фосфатидилхолина [Brash *et al*., 1987, Perez-Gilabert *et al*., 1998], липоксигеназа огурца окисляет трилиноленин сразу по трем остаткам жирных кислот [Hornung *et al*., 2000]. Считается, что (9*S*)-специфичные липоксигеназы - такие как: липоксигеназы томата [Regdel *et al*., 1994], картофеля [Huang *et al*., 2008] и ячменя [Holtman *et al*., 1997] - не способны окислять сложные липиды, поскольку для них характерна обратная ориентация субстрата.

Нами было показано, что ZmLOX3 и ее мутантная форма Ala562Gly способны катализировать окисление сложных липидов, в частности 1-линоленоил-*rac*-глицерол (МЛГ) и 2-линолеол-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (лизоФХ). Оба фермента окисляли МЛГ с высокой регио- и стереоспецифичностью (рис. 10). Основным продуктом реакции являлась (9*S*)-гидроперекись МЛГ (95,1% и 90% соответственно). Мутантная форма Ala562Gly отличалась незначительным изменением региоспецифичности действия, так как (13*R*)-гидроперекись образовывалась в количестве примерно в 3 раза большем (9,6%), чем при действии фермента дикого типа (3,1%).

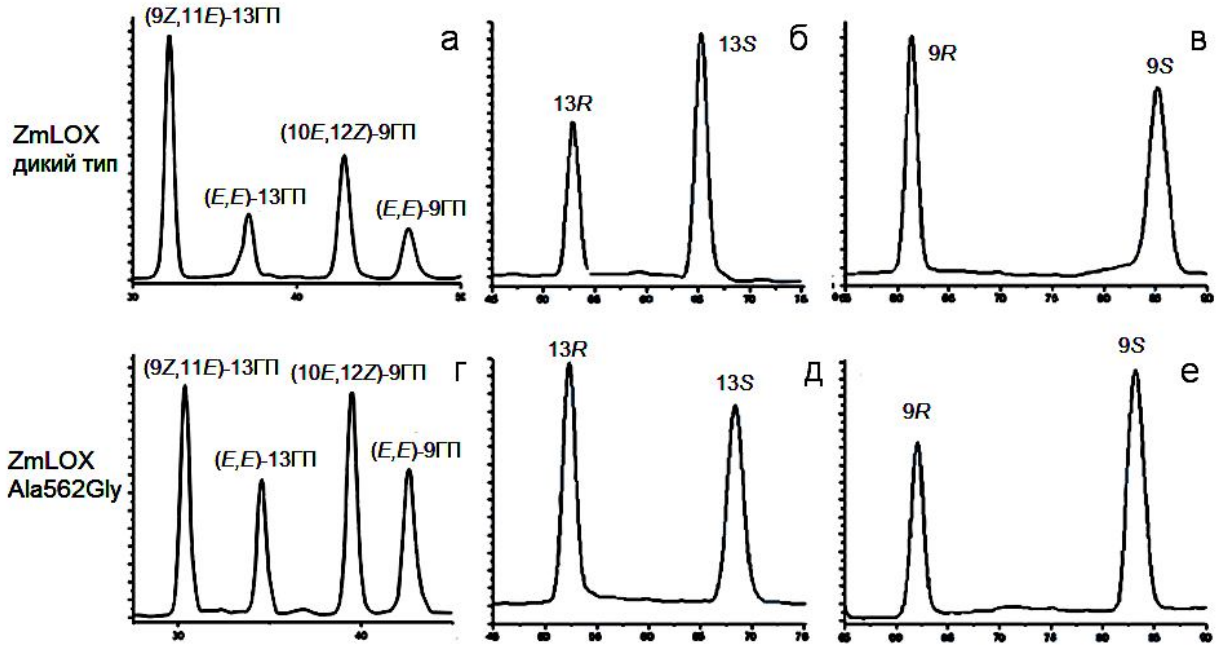

Рис. 11. Анализ продуктов окисления лизоФХ с помощью нормально-фазовой ВЭЖХ при участии ZmLOX3 дикого типа (**а**) и ее мутантной формы Ala562Gly (**б**): (9*Z*,11*E*)-13-гидроперекись, (9*E,*11*E*)-13-гидроперекиси, (10*E*,12*Z*)-9-гидроперекись, (10*E*,12*Z*)-9-гидроперекись. Анализ энантиомерного состава продуктов окисления при участии ZmLOX3 (**б**, **в**) и ее мутантной формы Ala562Gly (**е**, **д**) 9- (**в**, **е**), и 13- (**б**, **д**) гидропероксиси-производных.

Среди продуктов окисления 2-лизоФХ (рис. 11) под действием ZmLOX3 были: обнаружены (9*Z*,11*E*)-13-гидроперекись (45%), (10*E*,12*Z*)-9-гидроперекись (28%) и (*E,E*)-гидроперекиси (27%). Анализ хирально-фазовой ВЭЖХ показал, что 66% 13-гидроперекиси являлось (*S*)-энантиомером, 9-гидроперекись была представлена рацемической смесью энантиомеров. Продуктами окисления лизоФХ при участии ZmLOX3 Ala562Gly являлись (9*Z*,11*E*)-13-гидроперекись (30%), (10*E*,12*Z*)-9-гидропере-кись (28%), и (*E,E*)-гидроперекиси (42%). Энантиомерный анализ показал, что 66,6% (10*E*,12*Z*)-9-гидроперекиси составлял (*S*)-изомер, остальные продукты реакции были представлены рацемической смесью энантиомеров. Образование (*E,E*)-гидроперекисей свидетельствовало об освобождении субстрата в виде радикала из активного центра липоксигеназы до момента присоединения кислорода. Подобное явление наблюдалось при окислении линолевой кислоты липоксигеназой-1 кукурузы [Jang *et al.*, 2007].

Таким образом, нами впервые было показано, что ZmLOX3 дикого типа и ее мутантная форма Ala562Gly способны катализировать диоксигенирование сложных липидов. Полученные данные свидетельствовали о вхождении субстрата в активный центр фермента исключительно метильным концом. Мутация Ala562Gly приводила к незначительному увеличению количества (13*R*)-гидроперекиси МЛГ (до 9,6%). При этом происходило удаление 11-*pro-R* водорода от прохирального центра субстрата как в случае окисления линолевой, гекадекадиеновой и гексадекатриеновой кислот

при участии ZmLOX3 дикого типа, так и при окислении линолевой кислоты мутантной формой Ala562Gly. При окислении лизоФХ ферментом ZmLOX3 дикого типа предпочтительно удалялся 11-*pro-S* водород с образованием (13*S*)-гидроперекиси в качестве преобладающего продукта. При окислении лизоФХ при участии мутантной формы Ala562Gly наиболее вероятно удаление 11-*pro-R* водорода с образованием преобладающего продукта (9*S*)-гидроперекиси. Удаление *pro-R* и *pro-S* водорода от прохирального центра возможно при ориентации субстрата в активном центре «метильным концом вперед».

2.9. Модели позиционирования жирных кислот в активном центре липоксигеназ

В настоящее время опубликованы данные рентгеноструктурного анализа отдельных липоксигеназ растений. Однако данные о структуре комплекса липоксигеназы и субстрата до настоящего времени не были получены. Вопрос о позиционировании субстрата в активном центре и участвующих в этом аминокислотных остатках является важным для выяснения специфичности действия липоксигеназ. В связи с этим, было проведено моделирование взаимодействия субстрата и активного центра для (8*R*)-липоксигеназы ((8*R*)-ЛОГ, MMDB ID: 76073), GmLOX1 (MMDB ID: 57726) и ZmLOX3 (рис. 12). Согласно модели активного центра «U»-образной формы, предложенной для (8*R*)-липоксигеназы коралла [Neau *et al.*, 2008], липоксигеназы имеют две полости, соединяющиеся у атома железа. В случае GmLOX1 и ZmLOX3 полости образованы консервативными аминокислотными остатками. По сравнению с (8*R*)-ЛОГ внутренний объем полости GmLOX-1 и ZmLOX3 меньше за счет замен Leu539Ile, Ala540Gly, Ala503Leu. Позиционирование субстрата в активном центре (8*R*)-ЛОГ происходит благодаря заякориванию карбоксильной группы на поверхности фермента аргинином 183. Однако у GmLOX1 и ZmLOX3 гомолог Arg183 заменен на Gly256 и Ser272, соответственно (рис. 12). Консервативный для растительных липоксигеназ аминокислотный остаток Trp498 перекрывает доступ к полости II U-образного кармана. Таким образом, предложенная модель U-образного кармана для GmLOX-1 противоречит данным рентгеноструктурного анализа липоксигеназ растений.

Построенные нами модели позиционирования субстрата для GmLOX1 и ZmLOX3 также существенно различаются. Так, для GmLOX1 характерны два способа позиционирования субстратов в активном центре. В первом случае карбоксильный конец жирной кислоты заякоривается с помощью водородных связей за Trp259, алифатическая часть располагается в полости I и II. Во втором случае алифатическая часть располагается в полости II и частично I, карбоксильная группа располагается в полости III, не задействованной у (8*R*)-ЛОГ. Такое положение субстрата характерно для сложных липидов и 20:2, 22:2, 20:4 жирных кислот. В случае свободной жирной кислоты возможно образование водородных связей с Ser567 и Gln495. Так как ранее было показано, что сложные липиды окисляются при участии GmLOX1 с сохранением специфичности, можно предположить, что конформация активного центра изме-

няется при взаимодействии с такими субстратами. Изменение конформации активного центра возможно и при аллостерической регуляции, однако в данной работе обнаружить аллостерический сайт связывания со сложным липидом не удалось.

Для ZmLOX3 характерен значительно меньший объем субстрат-связывающего кармана за счет боковых групп Ile и Ser, перегораживающих полость I. С другой стороны полость ограничена приподнятым по сравнению с положением в GmLOX1 атомом железа. Полость II перекрыта Phe571 (соответствует Ile551 в GmLOX1). Боковые группы аминокислот дна полости III смещены таким образом, что субстрат располагается ближе к атому железа. Таким образом, благодаря значительно меньшему внутреннему объему, позиционирование субстрата крайне важно для определения каталитических характеристик ZmLOX3.

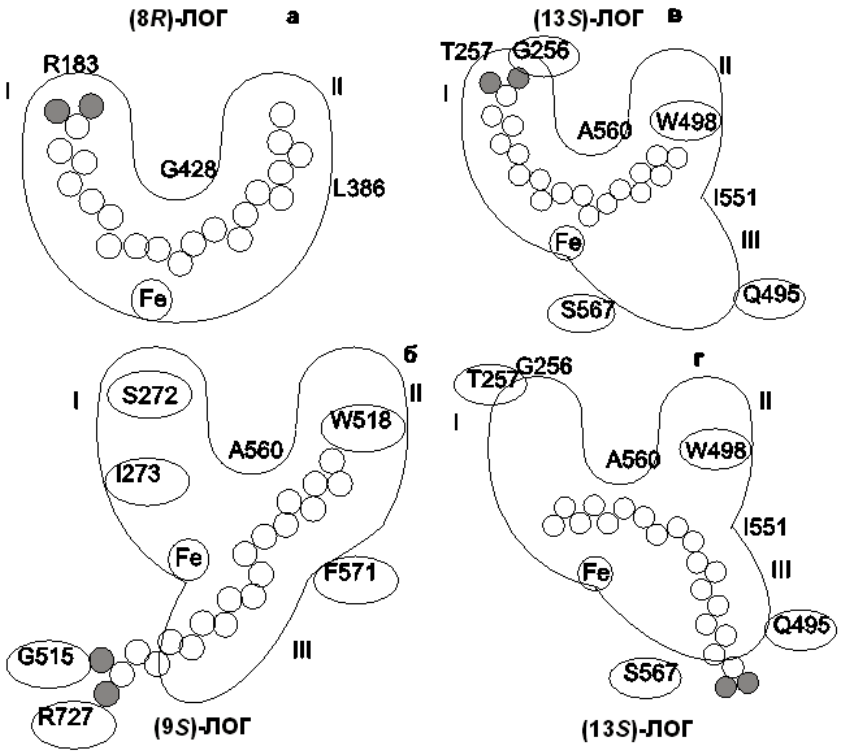

Рис. 12. Модели позиционирования субстрата в полости активного центра липоксигеназ. **а** – «U»-образная модель (8*R*)-ЛОГ коралла, **б** –ZmLOX3, **в** – GmLOX1 при взаимодействии с субстратами C<20, г – GmLOX1 при взаимодействии с субстратами C≥20 и сложными липидами. Римскими цифрами обозначены соответствующие полости ферментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря прогрессу в области молекулярной биологии определены аминокислотные последовательности множества липоксигеназ, а также условия экспрессии их генов в растениях. В то же время, работы по клонированию генов липоксигеназ растений в большинстве случаев завершаются лишь поверхностной характеристикой свойств рекомбинантного белка. Остаются неизученными субстратные предпочтения, регио- и стереоспецифичность действия, что препятствует выяснению общих закономерностей 9- и 13-липоксигеназных путей. В результате экспериментов с жирными кислотами, имеющими разную длину углеродной цепи (16:2, 18:2, 20:2, 22:2), выяснено, что для ZmLOX3 определяющим фактором является расстояние от карбоксильного конца субстрата до центра пентадиенильного основания. Так, высокие скорость реакции и специфичность липоксигеназы сохраняются в случае, если указанное это

расстояние соответствует характерному для линолевой кислоты расстоянию, как наблюдается в случае гексадекадиеновой кислоты. Такое соответствие можно объяснить необходимостью заякоривания карбоксильной группы субстрата на поверхности фермента. Нарушение регио- и стереоспецифичности диоксигенирования 20:2 и 22:2 может быть связано с неправильным позиционированием субстрата в активном центре фермента. Однако в настоящей работе показано сохранение специфичности действия по (n-2) типу фермента GmLOX1 при использовании различных субстратов. Полученные экспериментальные данные согласуются с построенной нами моделью позиционирования субстрата в активном центре фермента, согласно которой расположение пентадиенильного основания может определяться лимитированным объемом субстрат-связывающего центра данного фермента. В связи с этим, окисление субстратов с удлиненной цепью оказывается затрудненным, что проявляется в снижении скорости, но не специфичности реакции.

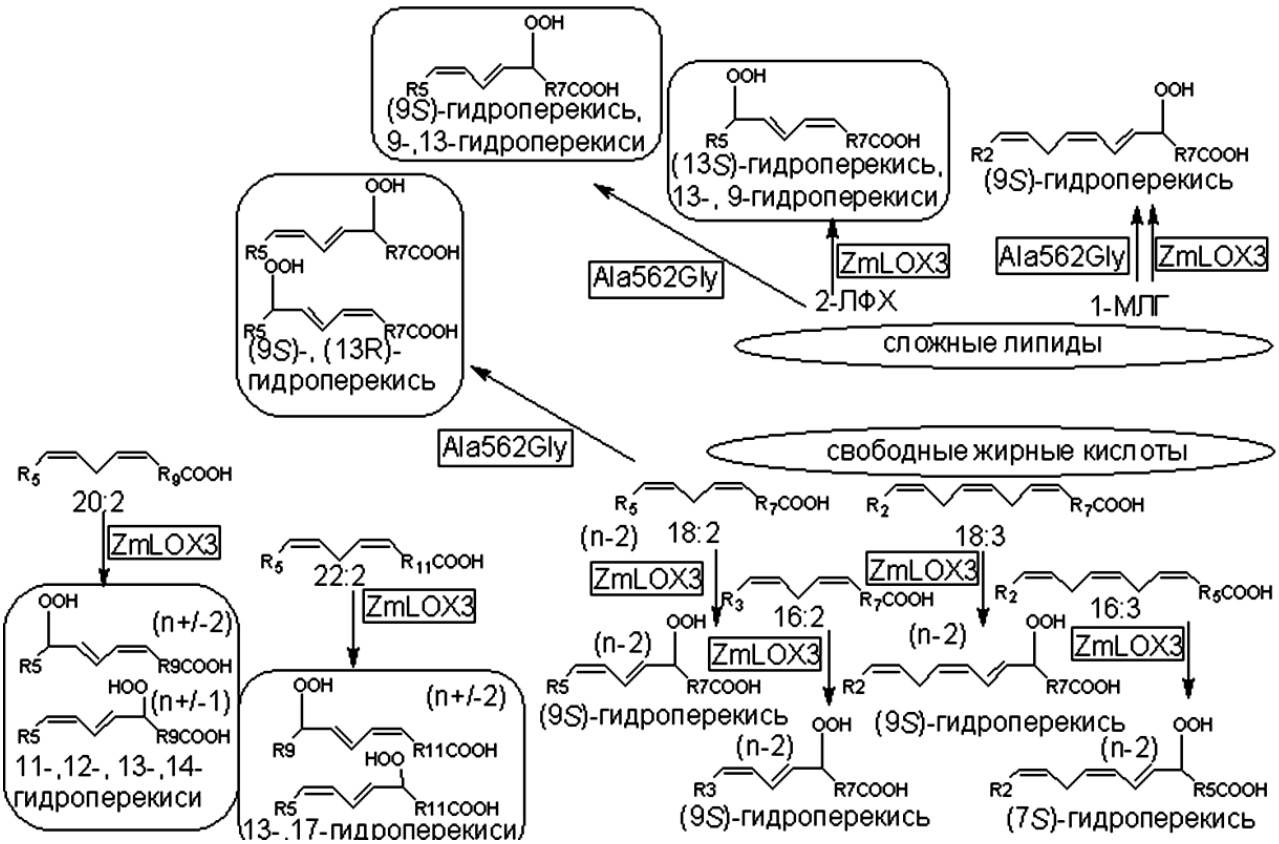

Рис. 13. Схема липоксигеназных реакций, катализируемых при участии ZmLOX3 и ее мутантной формы Ala562Gly.

Ранее сообщалось, что замена одного аминокислотного остатка в сайте Коффа приводила к смене регио- и стереоспецифичности действия 13-специфичных липоксигеназ [Coffa, Brash, 2004]. Нами показано, что мутация Ala562Gly 9-специфичной липоксигеназы ZmLOX3 лишь частично изменяет региоспецифичность фермента. Также получены данные о возможности окисления 9-специфичными липоксигеназами сложных липидов. Таким образом, результаты нашего исследования указывают на

ограниченность теории специфичности липоксигеназ, связанной с ориентацией субстрата в активном центре и необходимость разработки новой модели, основанной на признании того, что субстрат поступает в активный центр только метильным концом.

Выявленные нами пути метаболизма липидов, катализируемые ZmLOX3, представлены ны на рис. 13. Значительные каталитические возможности фермента предполагают разнообразие его физиологических функций. Если такие субстраты как 20:2, 22:2, 20:4 не встречаются в растениях, или встречаются в крайне малых количествах, то жирные кислоты гексадеканового ряда могут составлять до 20% от общей массы жирных кислот в 16:3 растениях [Mongrand *et al*., 2005]. Нами в экспериментах *in vitro* впервые показано, что ZmLOX3 стерео- и региоспецифически катализирует превращение гексадекатриеновой кислоты с образованием (7*S*)-гидроперекиси.

7-Гидроперекись гексадекатриеновой кислоты обнаружена в 16:3 растениях, и в 18:3 растениях. Присутствие данного оксилипина в 18:3 растениях можно объяснить результатом либо β-окислением 9-гидроперекиси 18:3, либо β-окислением 18:3 до 16:3 и последующим образованием гидроперекиси с помощью 9-специфичной липоксигеназы. Однако, гидроперекиси жирных кислот с более короткой цепью, которые присутствовали бы в случае β-окисления 9-гидроперекиси 18:3, наряду с 7-гидроперекисью 16:3, обнаружены не были. Возможно, образование 7-гидроперекиси 16:3 для растений не является случайным, и физиологическая роль данного оксилипина еще не выявлена. Согласно полученным результатам, 7-гидроперекись 16:3 может использоваться другими ферментами липоксигеназного каскада в качестве субстрата для последующих реакций. (9*S*)-Специфичная дивинилэфирсинтаза табака преобразует 7-гидроперекись 16:3 *in vitro* в новый оксилипин – динор-колнеленовую кислоту. Алленоксидсинтаза кукурузы преобразует 7-гидроперекись 16:3 *in vitro* в α-кетол – 7-гидрокси-8-оксо-10(*Z*),12(*Z*)-гексадекадиеновую кислоту. Полученные результаты предполагают возможность участия 7-гидроперекиси гексадекатриеновой кислоты в липоксигеназном каскаде в растениях. Также показано, что GmLOX1 может использовать в качестве субстрата 16:3, образуя 11-гидроперекись, участвующую в липоксигеназном каскаде. Использование в качестве субстрата гексадекатриеновой кислоты липоксигеназами, принадлежащими к филогенетически отдаленным группам и с различающимися по специфичности действия, предполагает существование еще не известной физиологической роли этих новых оксилипинов. Полученные результаты открывают новые возможности исследования гексадеканоидного липоксигеназного пути и механизмов регуляции специфичности действия липоксигеназ.

ВЫВОДЫ

1. Получен препарат очищенной рекомбинантной липоксигеназы (ZmLOX3) кукурузы. Преобладающим продуктом окисления линолевой кислоты при участии ZmLOX3 является (9*S*)-гидроперекись линолевой кислоты.

2. Специфичность действия ZmLOX3 сохраняется при окислении субстратов с укороченной цепью, но теряется при окислении субстратов с удлиненной углеродной цепью.

3. ZmLOX3 и соевая липоксигеназа-1 (GmLOX1) специфически окисляют (7*Z*,10*Z*,13*Z*)-гексадекатриеновую кислоту с образованием (7*S*)-гидроперекиси и (11*S*)-гидроперекиси, соответственно. Впервые обнаружено, что гидроксипроизводные кислот гексадеканового ряда содержатся в некоторых растениях.

4. Впервые показано участие (7*S*)-гидроперекиси гексадекатриеновой кислоты в липоксигеназном каскаде растений. При участии дивинилэфирсинтазы табака и алленоксидсинтазы кукурузы (7*S*)-гидроперекись превращается в дивиниловый эфир (динор-колнеленовую кислоту) и α-кетол, соответственно.

5. Показано, что ZmLOX3 катализирует специфическое окисление 1-линоленоил-глицерола и 2-линолеол-глицеро-3-фосфохолина, что свидетельствует о проникновении субстрата в активный центр метильным концом вперед.

6. Получена мутантная форма ZmLOX3 Ala562Gly, которая при окислении линолевой кислоты и 1-линоленоил-глицерола проявляет измененную специфичность действия, образуя (13*R*)-гидроперекиси наряду с обычными для фермента дикого типа (9*S*)-гидроперекисями. Таким образом, даже минимальные изменения объема полости активного центра приводят к изменению специфичности действия ZmLOX3.

7. Создана модель трехмерной структуры ZmLOX3, а также модели взаимодействия субстратов (жирные кислоты, сложные липиды) с активным центром, объясняющие специфичность действия фермента.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Properties of mutant forms of maize recombinant 9-lipoxygenase protein / **E.V. Osipova**, I.R.Chechetkin, A.Yu. Yarin, F.K. Mukhitova, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // Abstracts / Изд-во КГУ. – Kazan, 2008. - P. 61.

2. Recombinant enzymes: applications in studies of the plant lipoxygenase cascade / Yu.V. Gogolev, **E.V. Osipova**, Ya.Yu Toporkova, A.N. Grechkin // Abstracts / Изд-во КГУ. – Kazan, 2008. – P. 19.

3. Изменение специфичности мутантной 9-липоксигеназы кукурузы при сайт-направленном мутагенезе / **Е.В. Осипова**, И.Р. Чечеткин, Ф.К. Мухитова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин / Сб. тезисов / Казань, 2008. - С. 97-98.

4. Образование новых оксилипинов в 16:3 растениях / **Е.В. Осипова**, Н.В. Ланцова, Ф.К. Мухитова, И.Р. Чечеткин, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин// Сб. тезисов / Изд-во Пущинского НЦ РАН. - Пущино, 2008. - С. 99.

5. Изменение специфичности мутанта рекомбинантного белка 9-липоксигеназы кукурузы / **Е.В. Осипова**, И.Р. Чечеткин, Ф.К. Мухитова, А.Ю. Ярин, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сб. тезисов / Изд-во Пущинского НЦ РАН. - Пущино, 2008. - С. 99-100.

6. Специфичность действия некоторых мутантных форм 9-липоксигеназы кукурузы / **Е.В. Осипова**, И.Р. Чечеткин, А.Ю. Ярин, Ф.К. Мухитова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сб. тезисов / Изд-во КГУ. Казань, 2008. - С. 72-75.

7. **Осипова, Е.В.**, Изменение региоспецифичности 9-липоксигеназы кукурузы при сайт-направленном мутагенезе / **Е.В. Осипова,** Ю.В. Гоголев А.Н. Гречкин // Сб. тезисов / Москва, Пущино, 2008. - С. 165-166.

8. 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 / Изд-во Арта. - Новосибирск, 2008. - С. 42

9. Specifity of maize 9-lipoxygenase / L. Coronel, **E.V. Osipova**, N.B. Tarasova, I.R. Chechetkin, N.V. Lancova, F.K. Muhitova, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // Abstracts / Изд-во КГУ. - Kazan, 2009. - P. 45.

10. Специфичность 9-липоксигеназы кукурузы / Л.К. Коронель, **Е.В. Осипова**, Н.Б. Тарасова, И.Р. Чечеткин, Н.В. Ланцова, Ф.К. Мухитова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сб. тезисов / РИО ПГУ. - Пермь, 2009. - С. 215-216.

11. Специфичность 9-липоксигеназы / **Е.В. Осипова**, Н.В. Ланцова, Н.Б. Тарасова, Ф.К. Мухитова, И.Р. Чечеткин, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин / Сб. тезисов // Изд-во «ФизтехПресс» КФТИ КазНЦ РАН. - Казань, 2009. - С. 348.

12. Особенности специфичности 9-липоксигеназы кукурузы / Л.К. Коронель, **Е.В. Осипова**, Н.Б. Тарасова, И.Р. Чечеткин, Н.В. Ланцова, Ф.К. Мухитова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин //Сб. тезисов / Изд-во Пущинского НЦ РАН. - Пущино, 2009. - С. 25.

13. 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.

14. Гексадеканоидный путь в растениях: диоксигенирование (7*Z*,10*Z*,13*Z*)-гексадекатриеновой кислоты липоксигеназами / **Е.В. Осипова**, Н.В. Ланцова, И.Р. Чечеткин, Ф.К. Мухитова, М. Хамберг, А.Н. Гречкин // Биохимия. – 2010. – Т.75. – Вып. 6. С. 796-806.

15. Рекомбинантная 9-липоксигеназа кукурузы: экспрессия, очистка, свойства / **Е.В. Осипова**, И.Р. Чечеткин, Ю.В. Гоголев, Н.Б. Тарасова // Биохимия. – 2010. – Т.75. – Вып. 7. С. 978-983.