

На правах рукописи

Топоркова Яна Юрьевна

**АЛЛЕНОКСИДСИНТАЗА СУР74С3 ТОМАТА: КАТАЛИЗ И ИЗМЕНЕНИЕ
ЕГО ПРИРОДЫ САЙТ-НАПРАВЛЕННЫМ МУТАГЕНЕЗОМ**

03.00.12 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Казань – 2009

Работа выполнена в лаборатории оксипинов Учреждения Российской академии наук Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Научный руководитель: академик РАН, доктор химических наук,
Гречкин Александр Николаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Хохлова Людмила Петровна

кандидат биологических наук
Цыдендамбаев Владимир Дылыкович

Ведущая организация: Институт экологии Волжского бассейна
Российской академии наук
(г. Тольятти)

Защита состоится 24 декабря 2009 года в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Учреждении РАН Казанского института 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 «23» ноября 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Б. Иванова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. В онтогенезе растений и формировании у них ответа на стрессовые факторы важная роль принадлежит ферментам липоксигеназной сигнальной системы: цитохромам P450 семейства CYP74 и липоксигеназам. Результатом работы этой системы является образование окисленных производных жирных кислот – оксипинов. Оксипины относятся к одной из основных групп биоактивных соединений, образующихся в различных организмах в результате окислительного метаболизма полиненасыщенных жирных кислот [Itoh *et al.*, 2002; Stumpe, Feussner, 2006]. В настоящее время имеется достаточно информации, чтобы считать липоксигеназный путь превращения мембранных липидов самостоятельной сигнальной системой [Тарчевский, 2001].

Основное внимание исследователями уделяется изучению продуктов превращения 13-гидроперекисей жирных кислот, к которым относятся жасмоновая кислота и ее производные. Менее известно о биосинтезе и функциях других членов семейства оксипинов у растений.

Первую реакцию в пути биосинтеза жасмоновой кислоты, а именно синтез окиси аллена, катализируют алленоксидсинтазы (АОС). Все алленоксидсинтазы катализируют образование окисей аллена из гидроперекисей жирных кислот: 13-изомеры являются субстратами для алленоксидсинтаз подсемейства CYP74A, 9-изомеры – для алленоксидсинтаз CYP74C. Время полужизни окисей аллена составляет 30 секунд при 0°C, поэтому в качестве продуктов алленоксидсинтазной реакции регистрируются продукты их дальнейших превращений, включающие α - и γ -кетолы, образующиеся в результате спонтанного гидролиза, а также циклопентеноны – продукты циклизации окисей аллена, протекающей либо под действием фермента алленоксидциклазы, либо спонтанно. Спонтанный гидролиз идет гораздо интенсивнее, чем спонтанная циклизация, в результате чего циклопентеноны в качестве окончательного продукта реакции, катализируемой алленоксидсинтазами подсемейства CYP74A, регистрируются в следовых количествах. В отличие от этого, среди продуктов реакций, катализируемых алленоксидсинтазами подсемейства CYP74C, в частности LeAOS3, наблюдается значительное количество циклопентенонов. Этот факт до сих пор не имеет объяснения. Физиологическая роль многих продуктов LeAOS3 также до настоящего времени остается неизвестной. Кроме того, не изучены каталитические свойства данного фермента. Особый интерес представляет филогенез LeAOS3, поскольку ее первичная структура обнаруживает большую гомологию с некоторыми гидропероксидлиазами (ГПЛ) и дивинилэфирсинтазами (ДЭС), чем с 13-АОС других растений. Имеются основания полагать, что изучение данного белка может дать ключ к пониманию эволюции семейства CYP74 в целом.

Цель и задачи исследования. Целью наших исследований было выявление особенностей каталитического действия фермента подсемейства CYP74C цитохромов P450 алленоксидсинтазы LeAOS3 (CYP74C3) томата (*Lycopersicon esculentum*) дикого типа и его мутантных форм и сравнение их с особенностями каталитического действия других (классических) представителей подсемейства CYP74C – гидропероксидлиаз. Были поставлены следующие задачи:

1. Получение рекомбинантной алленоксидсинтазы LeAOS3 (CYP74C3) и выяснение особенностей механизма катализа в сравнении с алленоксидсинтазами подсемейства CYP74A.

2. Выявление консервативных особенностей строения каталитически важных доменов различных ферментов семейства CYP74.

3. Выбор участков для модификаций полипептидной цепи и получение мутантных форм LeAOS3 с единичными заменами аминокислот с помощью сайт-направленного мутагенеза. Сравнение особенностей каталитического действия фермента дикого типа и его мутантных форм.

4. Получение мутантных форм классического представителя подсемейства CYP74C гидропероксидлиазы MtHPL люцерны (*Medicago truncatula*) с единичными заменами аминокислот с помощью сайт-направленного мутагенеза. Сравнение особенностей каталитического действия мутантных форм LeAOS3 и MtHPL.

Научная новизна работы. Впервые показано, что фермент LeAOS3, принадлежащий подсемейству CYP74C цитохромов P450, является мультифункциональным и катализирует не только синтез, но также гидролиз и циклизацию окиси аллена, в отличие от большинства алленоксидсинтаз (CYP74A), катализирующих синтез окисей аллена, но не участвующих в их дальнейших превращениях. Показано, что продуктами LeAOS3 являются: образующийся стереоспецифически (9S)- α -кетол и рацемическая смесь *цис*-10-оксо-11-фитоеновой кислоты (*цис*-10-ОФЕК).

Проведен сравнительный анализ первичных последовательностей ферментов – представителей семейства CYP74; выявлены гипотетические первичные детерминанты катализа – сайты, находящиеся в каталитически важных доменах, имеющих закрепленные последовательности у ферментов с разным типом катализа (алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы и дивинилэфирсинтазы).

На основании сравнения первичных и третичных структур монооксигеназ P450 и ферментов семейства CYP74 выбраны сайты для предполагаемых направленных модификаций представителей подсемейства CYP74C: алленоксидсинтазы LeAOS3 томата и гидропероксидлиазы MtHPL люцерны, проведен сайт-направленный мутагенез по выявленным гипотетическим сайтам – детерминантам катализа CYP74 – соответствующих генов, изучены каталитические свойства мутантных форм.

Впервые показано изменение механизма каталитического действия ферментов семейства CYP74 в результате замены отдельных аминокислот, входящих в состав

доменов, находящихся в активном центре вблизи гема. Мутантные формы LeAOS3 обладают гидропероксидазной (изомеразной) активностью, тогда как алленоксидсинтазная (дегидразная) активность снижена, либо полностью отсутствует. Среди продуктов реакций, катализируемых мутантными формами MtHPL, обнаруживаются новые продукты в результате нарушений в ферментативном катализе.

Впервые проведено направленное превращение ферментов CYP74 в результате замены отдельных аминокислот, которое может служить подтверждением дивергенции генов CYP74 в ходе их эволюции от единого гипотетического предка с гидропероксидазной активностью, существовавшего у примитивных аэробов.

Научно-практическая значимость работы. Полученные данные вносят вклад в понимание функционирования одной из ключевых сигнальных систем растения, способствующей его адаптации к неблагоприятным для роста условиям. Изучены механизмы образования продуктов функционирования липоксигеназной сигнальной системы – оксипиринов, 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 ферментов семейства CYP74. Использование технологии рекомбинантных ДНК и различных систем экспрессии дает 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 Учреждения РАН 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, как исполнителя по данной тематике, частично поддержаны грантами РФФИ № 06-04-48430-а «Липоксигеназы растений. От первичного строения

– к пониманию молекулярных механизмов действия», № 09-04-00915-а «Ферменты СУР74: контроль биосинтеза регуляторных оксипиринов у растений», № 09-04-12222-офи_м «Семейство генов СУР74 *Zea mays*: структура, экспрессия, роль в липоксигеназном сигнальном каскаде», а также грантом ведущей научной школы академика И.А. Тарчевского НШ № 5492.2008.4 «Сигнальные системы клеток – медиаторы, протеом». Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на 10-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2006); на 2-ом Международном симпозиуме «Сигнальные системы растительных клеток: роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 2006); на Российской школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва-Пушино, 2006), на Конференции «Современные достижения в биохимии и клеточной биологии растительных липидов» (США, Солт-Лейк-Сити, 2007); на 12-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2008); на I Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов биологов «Симбиоз Россия 2008» (Казань, 2008); на Международной школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва-Пушино, 2008); на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008); на Международном симпозиуме «Растительные липиды и оксипирины» (Казань, 2008); на Межвузовской конференции по современной биологии (Казань, 2008); на 2-ом Международном семинаре по липидным медиаторам (Испания, Вальядолид, 2008); на Международном симпозиуме «Регуляторные оксипирины» (Швейцария, Лозанна, 2009); на 34-ом конгрессе FEBS «Life`s Molecular Interactions» (Чехия, Прага, 2009); на Международной конференции «Симбиоз-2009: Биология – расширение границ» (Казань, 2009); на II Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия 2009» (Пермь, 2009); на Всероссийской конференции «Устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды» (Иркутск, 2009); на IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009), а также на итоговой конференции Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН (2009). Работа является призером Международной школы-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва-Пушино, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликована 21 работа, из них две статьи в зарубежных рецензируемых изданиях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. В работе представлено 3 таблицы, 5 схем и 41 рисунок. Список литературы включает 213 источников, в том числе, 203 – иностранных.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Система экспрессии целевого фермента. Для клонирования и экспрессии рекомбинантного гена алленоксидсинтазы *leAOS3* томата использовали вектор pET-23b, хозяином которого служили штаммы *E. coli* NovaBlue и Rosetta-gamiTuner(DE3)pLysS (Novagen, США).

Культуры клеток *E. coli* выращивали в питательных средах: SOB [Гловер, 1988], SOC [Гловер, 1988], Luria-Bertani [Гловер, 1988], M9 [Маниатис и др., 1984].

Для трансформации *E. coli* получали компетентные клетки с использованием хлорида рубидия [Гловер, 1988]. Индукцию экспрессии и наработку рекомбинантных белков бактериальными продуцентами проводили по стандартным методикам, [<http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/docs/PROT/TB055.pdf>] с некоторыми модификациями. В питательную среду добавляли предшественник гема – δ -аминолевулиновую кислоту. Клеточные лизаты получали механическим разрушением с использованием аппарата French Press Cell Disrupter (Thermo Scientific, США).

1.2. Выделение плазмидной ДНК. Плазмидную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора GeneElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Germany) или ультрацентрифугированием [http://www.molbiol.ru/protocol/04_04.html] в градиенте CsCl с помощью ультрацентрифуги Optima Max-E (Beckman Coulter, США). Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop1000 (Thermo Scientific, США). Качественные характеристики ДНК получали по результатам электрофореза в агарозных гелях (1,5-2%) [Маниатис и др., 1984], регистрируемых с помощью системы Gel-Doc (Bio-Rad, США) и программы Quantity One (Bio-Rad, США).

Для амплификации фрагментов гена *leAOS3* и наработки рекомбинантных плазмид, содержащих точечные мутации в генах *leAOS3* и *mtHPL*, были сконструированы и синтезированы специфичные праймеры (НПО «Синтол»). Сайт-направленный мутагенез проводили с помощью коммерческого набора QuickChange (Invitrogene, США). Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью амплификатора DNAEngine (Bio-Rad, США). Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили с помощью ДНК-анализатора 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США).

1.3. Получение рекомбинантных ферментов. Рекомбинантные ферменты очищали с помощью металлоаффинной хроматографии на колонках Bio-Scale Mini Profinity IMAC в хроматографической системе BioLogic LP (Bio-Rad, США) по протоколу производителя с некоторыми модификациями. Концентрацию белка измеряли по флуоресценции со специфическими красителями на флуориметре Qubit (Invitrogene, США).

Электрофорез белков проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) с ДДС-Na по Лэмбли [Остерман, 1981], с использованием прибора PowerPac Universal MiniProtean (Bio-Rad, США) по прилагаемой инструкции. Белки окрашивали Coomassie R250.

Препараты нативных алленоксидсинтаз льна и кукурузы получали из ацетонового порошка семян [Grechkin *et al.*, 1991].

1.4. 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 с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В работе были использованы готовые колонки для ВЭЖХ с обращенной фазой Nucleosil 5 ODS (250×4.6 мм) (Macherey-Nagel, Германия), для ВЭЖХ с нормальной фазой Separon SIX (150×3.2 мм; 5 мкм) (TESSEK Ltd, Чехия), а также колонки для хирально-фазовой ВЭЖХ Chiralcel OD-H и Chiralcel OB-H (Daicel Chemical Industries, Ltd., Япония).

1.5. Условия инкубации субстратов с целевыми ферментами. Эксперименты по исследованию особенностей катализа проводили по следующей схеме: (1) инкубация рекомбинантного фермента с гидроперекисью; (2) быстрая экстракция холодным гексаном; (3) этерификация продуктов диазометаном; (4) упаривание растворителя в вакууме; (5) перерастворение в метаноле и выдерживание в течение 30 мин при 23°C; (6) триметилсилирование. Для сравнения каталитического действия ферментов дикого типа и их мутантных форм использовали аналогичную схему, за исключением того, что перед метилированием продукты восстанавливали NaBH_4 или NaB^2H_4 и гидрировали над платиной. Очистку продуктов проводили с помощью ВЭЖХ. Анализ очищенных продуктов проводили газовой хромато-масс-спектрометрией (ГХ-МС) с помощью масс-спектрометра QP5050A, соединенного с газовым хроматографом GC-17A (Shimadzu, Япония).

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

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Получение рекомбинантного фермента LeAOS3

В данных исследованиях был использован рекомбинантный фермент LeAOS3. Для его наработки нами был получен бактериальный продуцент с помощью трансформации клеток *E. coli* штамма Rosetta-gamiTuner(DE3)pLysS (Novagen, США) рекомбинантной плазмидой pET23bAOS3. Плазида была любезно предоставлена доктором А. Хоу из Мичиганского университета. Клоны продуцента, лизаты которых обладали достаточно высокой специфической алленоксидсинтазной активностью, использовали в препаративных экспериментах. Дополнительная последовательность из шести гистидинов, добавленная к С-концу целевого белка, позволила нам провести процедуру металлоаффинной очистки, в результате чего были получены препараты

LeAOS3 в концентрации 2,5 – 3 мг/мл. Высокая степень очистки была подтверждена с помощью электрофореза белков в ПААГ с ДДС-Na.

2.2. Продукты превращения 9-гидроперекиси линолевой кислоты (9-ГПОД) под действием LeAOS3

Большинство растительных алленоксидсинтаз (АОС), принадлежащих подсемейству CYP74A цитохромов P450 [Tijet, Brash, 2002], катализируют синтез окиси аллена, но не участвуют в их циклизации. Окиси аллена, продуцируемые из линолевой кислоты, претерпевают спонтанный гидролиз, но не способны циклизоваться [Grechkin, 1994; Grechkin *et al.*, 2000]. Недавно обнаруженные АОС картофеля и томата (CYP74C) представляют собой исключения. Среди продуктов реакции, катализируемой этими ферментами, наблюдается значительное количество циклопентенона 10-оксо-11-фитоеновой кислоты (10-ОФЕК) наряду с (12Z)-9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовой кислотой (α -кетолом) [Hamberg, 2000; Itoh *et al.*, 2002].

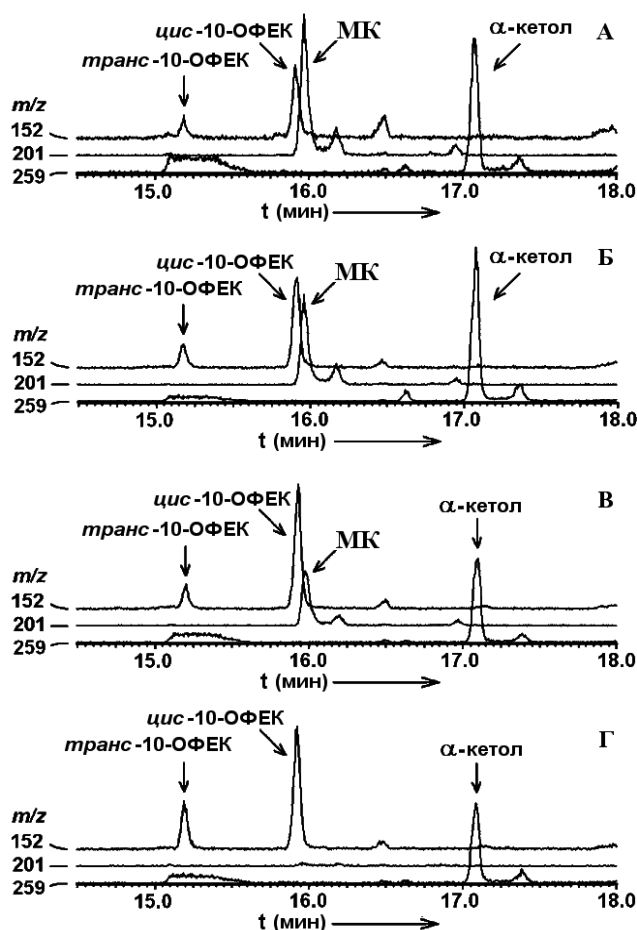


Рис. 1. Хроматограмма продуктов реакции 9-ГПОД с LeAOS3 в концентрациях: А – 0.5 мкг, Б – 2 мкг, В – 5 мкг, Г – 40 мкг. 10-ОФЕК – 10-оксо-11-фитоеновая кислота, МК – метоксикетон.

Для выявления зависимости профиля продуктов реакции от концентрации LeAOS3 9-ГПОД (100 мкг) инкубировали с различными количествами LeAOS3 при 0°C в течение 10 секунд, и продукты анализировали с помощью ГХ-МС в виде метиловых эфиров триметилсилил-производных (ТМС-производных).

Поскольку ожидаемым первичным продуктом катализа LeAOS3 является нестабильная окись аллена (12Z)-9,10-эпоксиоктадека-10,12-диеновая кислота (9,10-ЭОД), продукты инкубации после быстрой экстракции подвергали метанолизу. Эта стадия позволяла регистрировать наличие окиси аллена, эффективно превращая 9,10-ЭОД в рацемический метоксикетон [Hamberg, Hughes, 1989].

При инкубации субстрата с 0.5 мкг LeAOS3 (Рис. 1А) основным улавливаемым продуктом был метоксикетон (Рис. 2Б), соответствующий окиси аллена 9,10-ЭОД. Кроме того, среди продуктов

реакции присутствовал α -кетол – продукт гидролиза 9,10-ЭОД – и соединения, определенные как *транс*- и *цис*-10-ОФЕК (Рис. 1).

В результате инкубации 9-ГПОД в тех же условиях с большими концентрациями LeAOS3 (2, 5 или 40 мкг) профили продуктов значительно менялись (Рис. 1Б-Г). Выход продукта метанолиза, соответствующего остаточной окиси аллена, постепенно

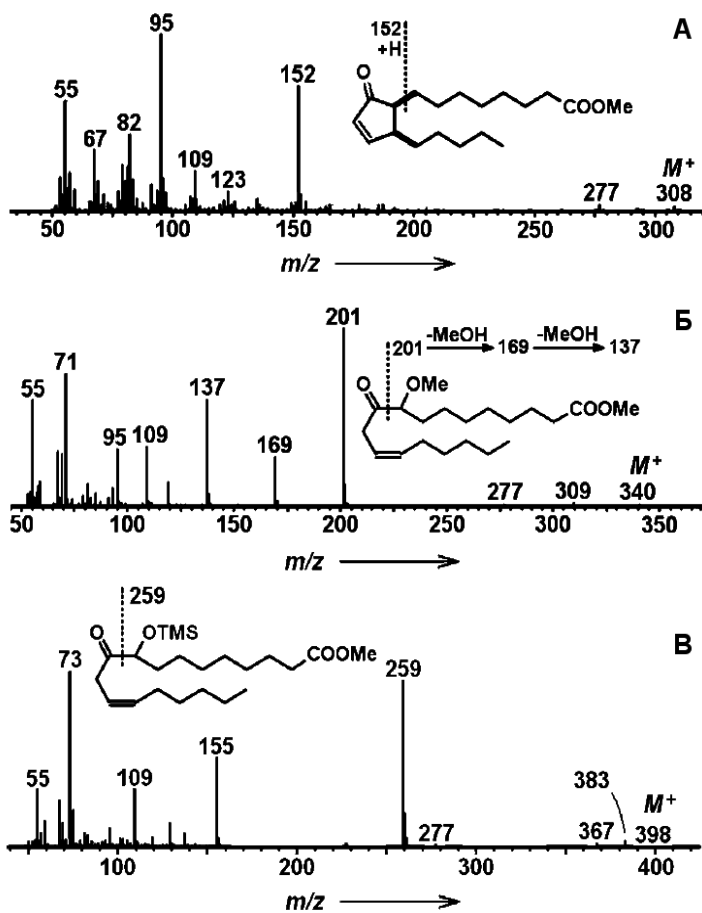


Рис. 2. Масс-спектры продуктов реакции 9-ГПОД с разными концентрациями LeAOS3: А – метиловый эфир рацемического *цис*-циклопентенона; Б – продукт метанолиза окиси аллена; В – α -кетол в виде метилового эфира ТМС-производного.

2.3. Анализ энантиомерного состава *цис*-10-оксо-11-фитоеновой кислоты

Данные анализа энантиомерного состава показали, что продукт реакции LeAOS3 являлся полностью рацемическим и состоял из равных частей (9*R*,13*R*) и (9*S*,13*S*) энантиомеров. Оба энантиомера давали одинаковые пики с максимумом поглощения при 215 нм.

2.4. Анализ энантиомерного состава анализ α -кетола и метоксикетона

После инкубации 9-ГПОД с LeAOS3 α -кетол выделяли и очищали с помощью нормально-фазовой ВЭЖХ, и анализировали его энантиомерный состав с помощью

снижался, тогда как циклопентенонов и α -кетола увеличивался. После инкубации с наибольшим количеством LeAOS3 продукт метанолиза не выявлялся (Рис. 1Г). Это означает, что вся 9-ГПОД полностью превратилась через 9,10-ЭОД в α -кетол (Рис. 2В) и циклопентенон (Рис. 2А) за 20 секунд при 0°C. Таким образом, наблюдаемая скорость превращения 9,10-ЭОД в присутствии LeAOS3 значительно выше, чем ожидаемая скорость спонтанного распада окиси аллена (время полужизни 30 секунд при 0°C).

Получение циклопентенона в качестве продукта реакции было подтверждено также с помощью ядерно-магнитного резонанса.

Следует отметить, что γ -кетол, об образовании которого в реакции, катализируемой LeAOS3, сообщалось ранее [Itoh *et al.*, 2002], не был обнаружен нами ни в одном из многочисленных экспериментов с LeAOS3.

хирально-фазовой ВЭЖХ. α -Кетол, синтезированный LeAOS3, был представлен преимущественно (9*R*) энантиомером (92%). В то же время, α -кетол, синтезированный кукурузным ферментом ZmAOS (CYP74A), являлся в значительной мере рацемическим; (9*R*) и (9*S*) энантиомеры присутствовали в соотношении 62:38. Избирательное образование (9*R*)- α -кетола в присутствии LeAOS3 означает, что окись аллена – первичный продукт этих ферментов – гидролизуется, в основном, по S_N2 механизму. В отличие от гидролиза, метанолиз окиси аллена не является стереоспецифическим. Соотношения (9*R*) и (9*S*) энантиомеров продукта метанолиза и α -кетола, полученного в результате действия алленоксидсинтазы кукурузы, были практически одинаковыми.

2.5. Превращение 13-гидроперекиси линолевой кислоты (13-ГПОД) под действием LeAOS3

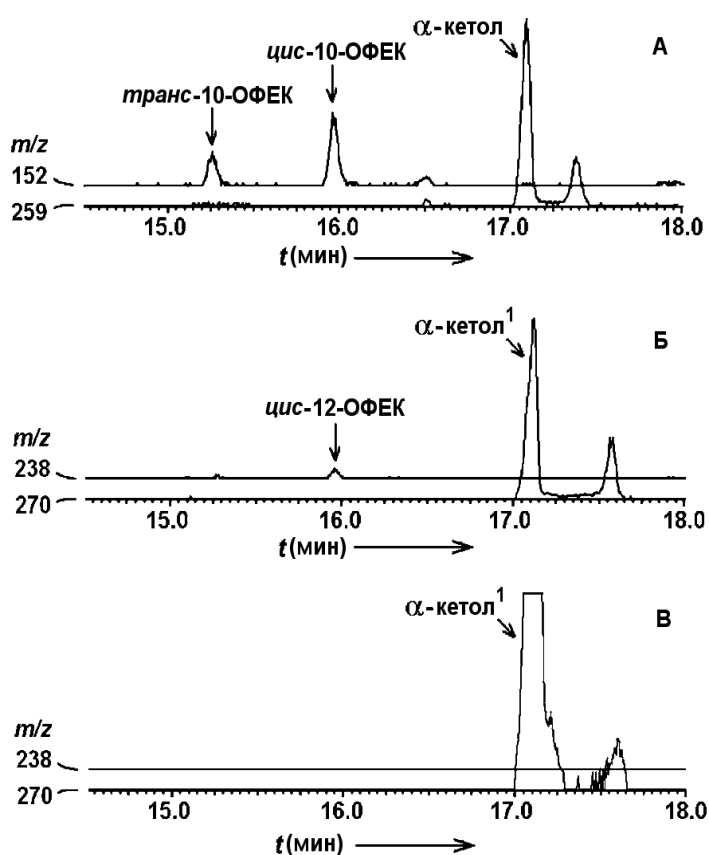


Рис. 3. Хроматограмма продуктов реакции 9-ГПОД (А) и 13-ГПОД (Б) с LeAOS3 и 13-ГПОД с АОС льна (В).

2.6. Образование окиси аллена под действием ZmAOS кукурузы (CYP74A) и ее дальнейшее превращение после добавления LeAOS3 *in situ*

Для дополнительного подтверждения превращения 9-ЭОД в циклопентенон и α -кетол в результате каталитического действия LeAOS3 после инкубации 9-ГПОД (100 мкг) с кукурузной алленоксидсинтазой ZmAOS (CYP74A) в течение 10 секунд в реакционную смесь добавляли LeAOS3 и инкубировали в течение дополнительных 10

На основании данных литературы субстратами LeAOS3 могут быть как 9-, так и 13-гидроперекиси линолевой кислоты. При инкубации LeAOS3 с 13-ГПОД (Рис. 3), окончательным продуктом реакции был, в основном, α -кетол (Рис. 3Б). Выход циклопентенона относительно α -кетола был примерно в 10 раз меньше, чем в случае превращения 9-ГПОД (Рис. 3А). Основным изомером циклопентенона, полученным из 13-ГПОД (Рис. 3Б), являлась *цис*-12-оксофитоеновая кислота (*цис*-12-ОФЕК). В результате инкубации 13-ГПОД с АОС льна (CYP74A) образования циклопентенонов не происходило (Рис. 3В).

секунд. Окись аллена – 9,10-ЭОД – являлась основным продуктом, образуемым под действием ZmAOS (Рис. 4Г). За 10 секунд происходило практически полное превращение 9-ГПОД. Инкубация после добавления LeAOS3 приводила к превращению окиси аллена в 10-ОФЕК и α -кетол (Рис. 4А). В двух контрольных экспериментах – с кипяченым ферментом LeAOS3 и белковым препаратом клеток *E. coli*, несущих вектор рЕТ23b без рекомбинантного гена – окись аллена оставалась не превращенной (Рис. 4Б и В, соответственно).

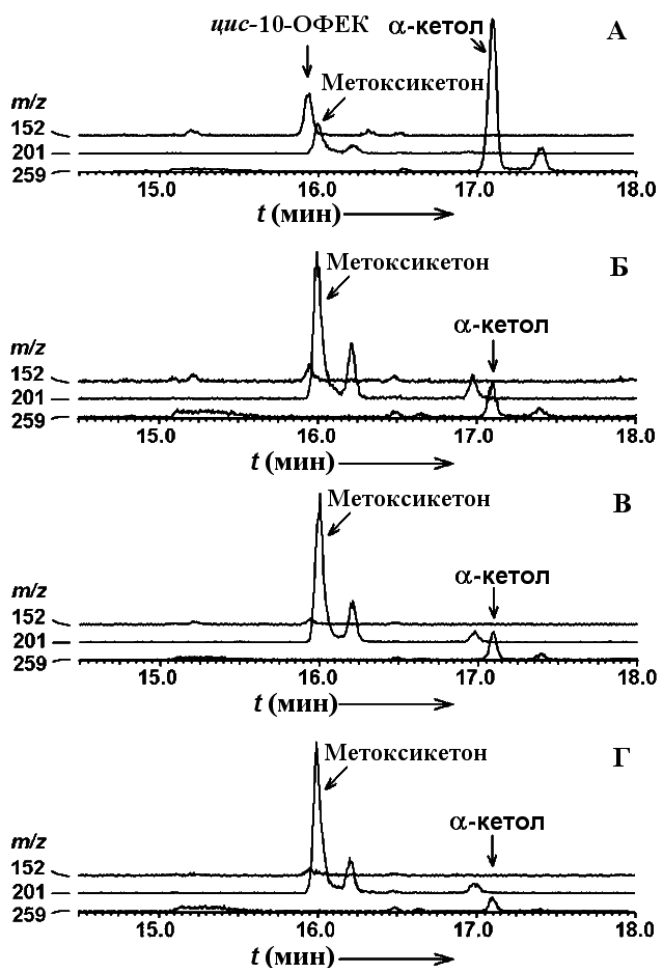


Рис. 4. Хроматограмма продуктов реакции 9-ГПОД с ZmAOS и: А – активной LeAOS3, Б – кипяченой LeAOS3, В – белковым препаратом клеток *E. coli*, несущих вектор без вставки. Г – Хроматограмма продуктов реакции 9-ГПОД с ZmAOS.

2.7. Предположительная схема механизма реакции, катализируемой LeAOS3

Полученные данные позволили нам предположить, что LeAOS3 является мультифункциональным ферментом, который катализирует три превращения (Схема 1). Продуктом первой реакции является короткоживущая окись аллена – 9,10-ЭОД (Схема 1, реакция 1), – синтезируемая и высвобождаемая из каталитического центра LeAOS3. Затем LeAOS3 вновь захватывает 9,10-ЭОД для катализа двух последующих конкурирующих превращений, а именно гидролиза и циклизации (Схема 1, реакции 2 и 3, соответственно). Гидролиз, но не циклизация, протекает стереоспецифически. Окончательными продуктами LeAOS3 являются (9*R*)- α -кетол и рацемическая *цис*-10-ОФЕК.

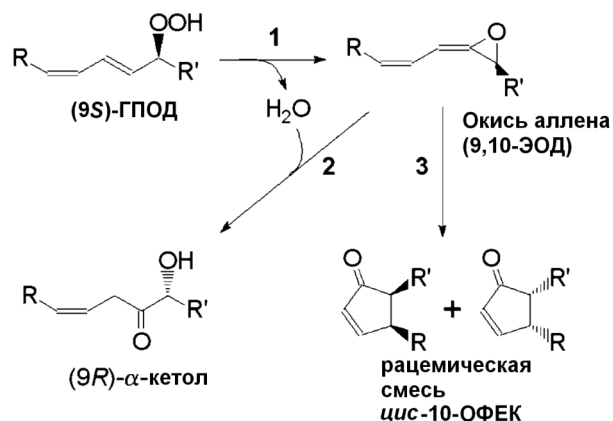


Схема 1. Механизм реакции с участием LeAOS3.

2.8. Выбор сайтов для мутагенеза в первичной последовательности LeAOS3

В настоящее время клонирован ряд генов CYP74 [Grechkin, 2002; Stumpe, Feussner, 2006], изучены свойства некоторых рекомбинантных белков. Показано, что все цитохромы P450 имеют определенные консервативные домены, в частности, несколько «субстрат-узнающих сайтов» [Gotoh, 1992]. Некоторые из этих сайтов формируют стенки полости цитохромов P450 и участвуют в катализе; один из них входит в состав I-спирали (в LeAOS3 соответствует участку 282-315). Однако конкретные аминокислотные остатки, участвующие в катализе, до сих пор не были определены. Мы полагаем, что к ним относятся шесть аминокислотных остатков в центре I-спирали (мы назвали их «центральный домен I-спирали», IHCD), соответствующие участку 293-298 LeAOS3 (мотив AGFNSY). Выбор этого участка был основан на результатах сопоставления первичных последовательностей ферментов CYP74, проведенного с помощью программы Vector NTI (Invitrogene, США), и наложения третичных структур монооксигеназы цитохрома P450 2c8 человека и алленоксидсинтазы *Arabidopsis thaliana*, проведенного с помощью программы VMD 1.8.6 [Humphrey *et al.*, 1996]. Абсолютно консервативный и необходимый для катализа монооксигеназной реакции треонин кислород-связывающего домена цитохрома 2c8 соответствует консервативному для всех ферментов семейства CYP74 аспарагину центрального домена I-спирали алленоксидсинтазы *Arabidopsis*.

Практически все ферменты суперсемейства P450 являются монооксигеназами, и для них характерно использование двух субстратов: непосредственно окисляемого соединения и молекулярного кислорода. Уникальным свойством ферментов семейства CYP74 является отсутствие необходимости во втором субстрате, а именно молекулярном кислороде. В реакции участвует кислород гидропероксигруппы окисленной жирной кислоты. Соответственно, IHCD ферментов CYP74, соответствующий «кислород-связывающему» домену цитохромов P450, который находится в непосредственной близости к гему, является вырожденным. С противоположной стороны к гему примыкает другой консервативный для всех цитохромов P450 домен, названный ERR-триада (в LeAOS3 соответствует аминокислотным остаткам 354-370). Исходя из сопоставления первичных последовательностей мы предположили, что функция некоторых аминокислотных остатков, входящих в состав этих доменов, заключается в непосредственном участии в катализе ферментов CYP74.

Для проверки данной гипотезы мы провели замены аминокислот, входящих в состав IHCD и ERR-триады кДНК алленоксидсинтазы LeAOS3 (CYP74C3) томата, получили и проанализировали следующие мутантные формы LeAOS3: F295I, S297A, K302S, D359R и T366Y.

Мутантные формы рекомбинантной плазмиды были получены в ПЦР со специфичными праймерами, содержащими предполагаемые мутации. Наличие

мутаций в последовательностях генов было подтверждено определением первичной структуры соответствующего участка плазмиды.

Полученные плазмиды с модифицированными генами *leAOS3* использовали для получения мутантных форм рекомбинантных ферментов с помощью тех же процедур, что были использованы для получения фермента дикого типа.

2.9. Анализ продуктов *LeAOS3* дикого типа и ее мутантных форм

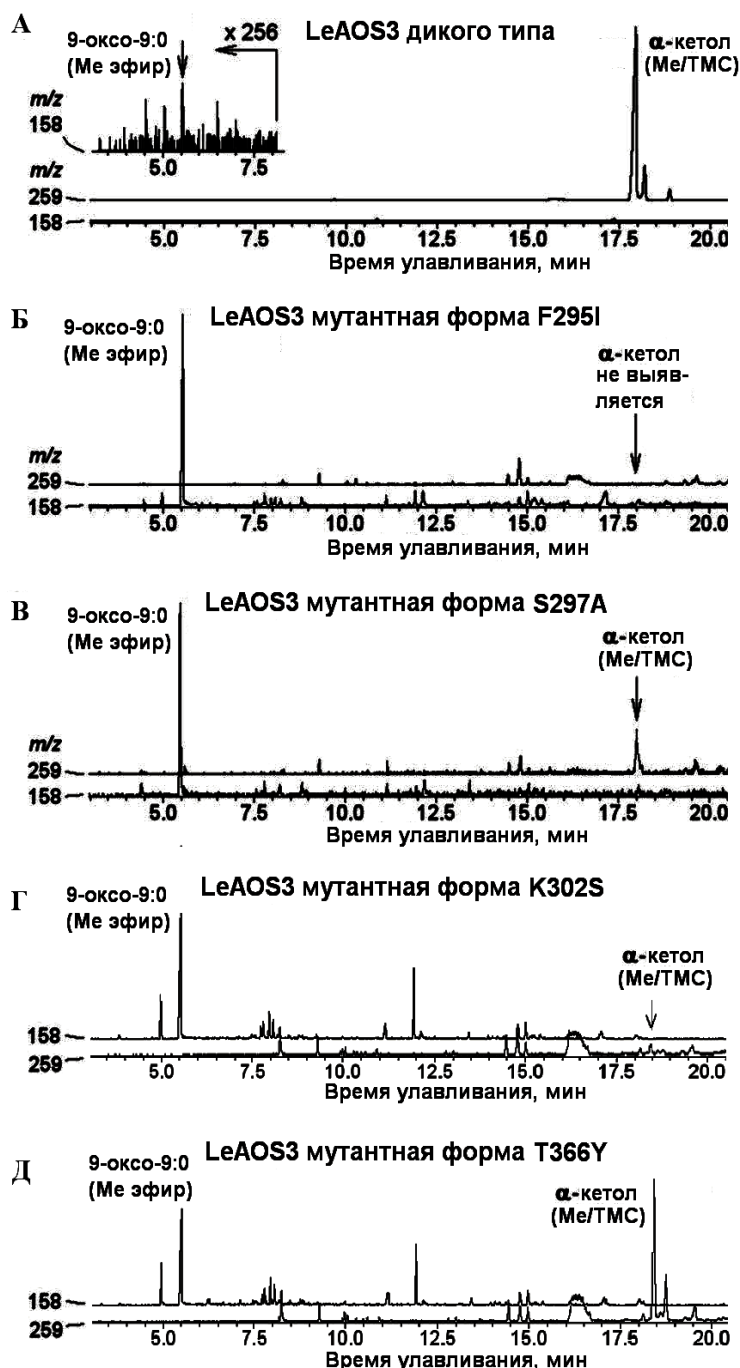


Рис. 5. Хроматограмма продуктов инкубации мутантных форм *LeAOS3* с 9-ГПОД. 9-оксо-9:0 – 9-оксононановая кислота.

При инкубации *LeAOS3* дикого типа с 9-ГПОД, основным продуктом был α-кетол, выявленный в виде метилового эфира ТМС-производного (Рис. 5А). Этот продукт образуется в результате гидролиза окиси аллена. Наряду с продуктами АОС было выявлено ничтожно малое количество 9-оксононановой кислоты в виде метилового эфира (Рис. 5А) – продукта, характерного для ГПЛ, – что означает, что *LeAOS3* дикого типа продуцирует 9-оксононановую кислоту в качестве минорного продукта. Тем не менее, продукты АОС являлись преимущественными. Дивиниловые эфиры обнаружены не были.

Мутантные формы *LeAOS3* также инкубировали с 9-ГПОД, и продукты реакции анализировали в виде метиловых эфиров ТМС-производных. Было показано, что все полученные нами мутантные формы *LeAOS3* сохранили способность утилизировать 9-ГПОД.

Однако, наряду с продуктами, характерными для реакции LeAOS3, появились продукты, характерные для ГПЛ, а именно 9-оксононановая кислота (Рис. 5Б-Д). Мутантные формы F295I (Рис. 5Б), S297A (Рис. 5В), K302S (Рис. 5Г) и T366Y (Рис. 5Д) проявляли 13, 52, 36 и 72%, соответственно, тотальной активности LeAOS3 дикого типа. Анализ продуктов, формируемых этими мутантами, продемонстрировал кардинальные изменения в типе катализа. Все четыре мутанта проявляли активность гидропероксидлиазы (изомеразы), тогда как алленоксидсинтазная (дегидразная) активность была сильно снижена (S297A, K302S и T366Y) или отсутствовала (F295I).

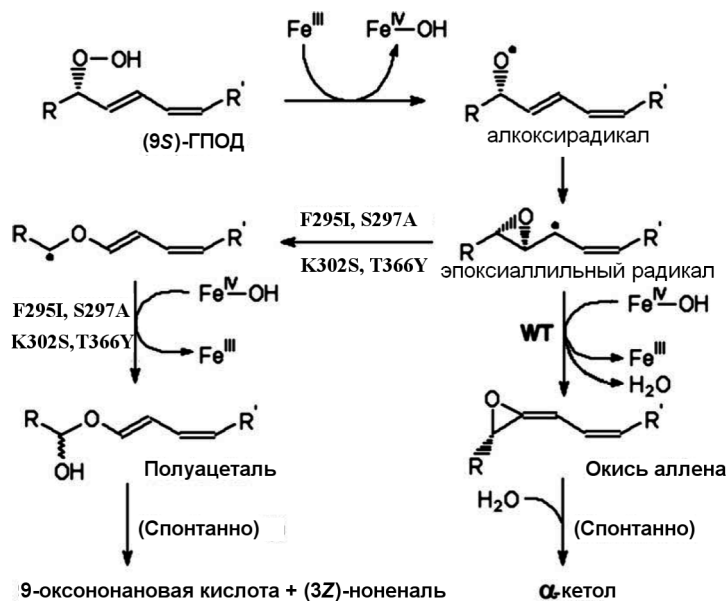


Схема 2. Механизм реакции LeAOS3 дикого типа и ее мутантных форм.

Полученные данные указывают на то, что все ферменты CYP74 контролируют гомолитическую перегруппировку с промежуточными продуктами – алкоксирадикалом и эпоксиаллильным радикалом (Схема 2) [Grechkin, 2002; Grechkin, Hamberg, 2004; Grechkin *et al.*, 2006]. Результаты сайт-направленного мутагенеза свидетельствуют, что эпоксиаллильный радикал является ключевой точкой катализа ферментов CYP74 (Схема 2). В зависимости от первичных последовательностей IHCD и ERR-триады, эпоксиаллильный радикал либо теряет атом водорода с образованием окиси аллена, либо подвергается перегруппировке в радикал винилового эфира, который затем рекомбинирует с гидроксильным радикалом с образованием полуацеталей – первичного продукта ГПЛ (Схема 2).

2.10. Выбор сайтов для мутагенеза в первичной последовательности MtHPL и сравнительный анализ результатов сайт-направленного мутагенеза LeAOS3 и MtHPL

К настоящему времени все более вероятным становится предположение о том, что предковый фермент CYP74 мог обладать активностью гидропероксидлиазы

С другой стороны, замена аспарагиновой кислоты на аргинин в ERR-триаде (D359R) не привела к изменениям в характере катализа.

Результаты настоящей работы демонстрируют, что первичные последовательности IHCD и ERR-триады определяют тип катализа CYP74. IHCD и ERR-триаду можно использовать в качестве «отпечатков пальцев» CYP74, позволяя, как правило, предсказывать тип катализа по первичной последовательности.

(Гипотеза 1). Последующая дупликация генов привела к возможности появления новых функций в результате различных процессов, одним из которых является случайный точечный мутагенез, и, как следствие, появлению существующего разнообразия ферментов CYP74.

Альтернативой гипотезе 1 является предположение о том, что гипотетический предковый фермент CYP74 обладал некой иной активностью, нежели алленоксидсинтазная, гидропероксидлиазная или дивинилэфирсинтазная, а все ныне существующие ферменты произошли от этого гипотетического предка в результате процессов, аналогичных указанным в гипотезе 1 (Гипотеза 2).

К настоящему времени определены два сайта, необходимые для формирования типа катализа. Первый был определен в работе американских исследователей под руководством Рамана; ему соответствует Phe137 в последовательности алленоксидсинтазы *Arabidopsis thaliana* [Lee *et al.*, 2008]. Второй сайт был определен в ходе настоящей работы по сайт-направленному мутагенезу LeAOS3. Он входит в состав последовательности IHCD, и в LeAOS3 ему соответствует Phe295. Все обнаруженные на данный момент АОС содержат в обоих сайтах фенилаланин. ГПЛ содержат фенилаланин в домене IHCD и лейцин или изолейцин в сайте, определенном Раманом с сотр. [Lee *et al.*, 2008]. ДЭС содержат лейцин или изолейцин в обоих сайтах.

Для получения дополнительных данных о существовании зависимости между первичной последовательностью IHCD и определенным типом катализа, а также с целью поиска фактов в пользу гипотезы 1 или 2 мы проанализировали действие мутантных форм гидропероксидлиазы MtHPL люцерны (*Medicago truncatula*): F284I и N285T, полученных нами в результате сайт-направленного мутагенеза, а также F287V, N285A и G288I, любезно предоставленных доктором Ричардом Хьюзом из Великобритании. В качестве субстрата для MtHPL мы использовали 13-гидроперекись α -линоленовой кислоты (13-ГПОТ).

Все мутантные формы сохранили способность утилизировать 13-ГПОТ. Помимо основного продукта реакции 12-оксо-(9Z)-додеценовой кислоты (12-ОДДК) выявлялись дополнительные продукты, а именно (9Z,11E)-13-оксотридеценовая (13-ОТДК) и (9Z)-11-оксоундеценовая (11-ОУДК) кислоты. Относительное количество этих новых продуктов в некоторых случаях превышало количество специфического продукта (Рис. 6Б-Е). В результате каталитического действия MtHPL дикого типа 11-ОУДК практически не выявлялась в качестве продукта реакции (Рис. 6А). Содержание 13-ОТДК среди продуктов реакции, катализируемой ферментом дикого типа, было выше 11-ОУДК, но гораздо ниже основного продукта (Рис. 6А).

Ранее некоторые исследователи сообщали, что аспарагин IHCD CYP74 (Asn285 в MtHPL) является абсолютно консервативным, и любая мутация этого сайта полностью уничтожит любую специфическую активность фермента CYP74 [Lee *et al.*, 2008]. Для проверки этого мы проанализировали мутантную форму MtHPL с заменой

N285A. Этот мутант оказался неспособным катализировать какое-либо превращение 13-ГПОТ (Рис. 6Г). Однако, проанализировав и сопоставив первичные последовательности ИСД СУР74, содержащиеся в геномных, транскриптомных или белковых базах данных, мы выявили несколько ферментов с нативной заменой в данном сайте (ГПЛ *Helianthus annuus*, *Helianthus argophyllus*, *Glycine max* и др.). В большинстве случаев аспарагин замещен на серин или треонин. Нами была получена мутантная форма MtHPL с заменой N285T. Этот фермент обладал низкой степенью специфической активности гидропероксидазы (Рис. 6Д), что является доказательством неабсолютной консервативности данного сайта.

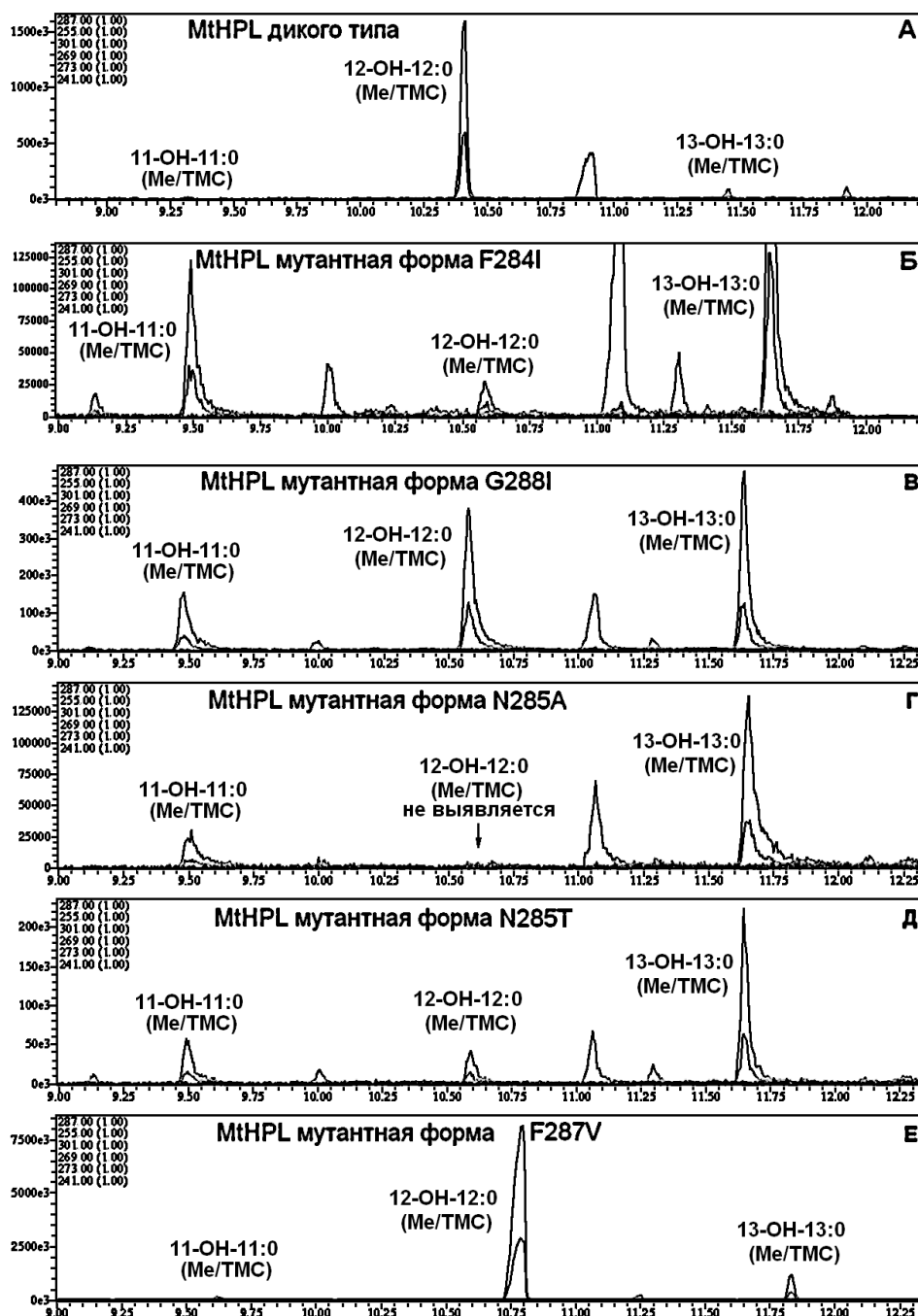


Рис. 6. Хроматограмма продуктов инкубации 13-ГПОТ с MtHPL дикого типа (А) и ее мутантными формами: F284I (Б), G288I (В), N285A (Г), N285T (Д) и F287V (Е).

Появление 13-оксотридеценовой и 11-оксоундеценовой кислот свидетельствует о нарушениях в ферментативном катализе. Эти соединения являются результатом спонтанного α или β -разрезания (Схема 3). В обоих вариантах происходит задержка катализа после перегруппировки эпоксиаллильного радикала. В случае образования 13-ОТДК происходит разрыв C13-C14 связи. В случае образования 11-ОУДК, как мы предполагаем, происходит окисление эпоксиаллильного радикала с последующим разрывом C11-C12 связи.

Анализируя полученные данные, можно предположить следующее: если верна гипотеза 2, то замена F284I приведет к появлению дивиниловых эфиров в качестве продуктов реакции, поскольку оба сайта, необходимые для формирования типа катализа, содержат в данном случае изолейцины, как и типичные дивинилэфирсинтазы. Этого следует ожидать по аналогии с мутантной формой алленоксидсинтазы *Arabidopsis thaliana* F137L, полученной Раманом с сотр. [Lee *et al.*, 2008], в которой сайты, которые необходимы для формирования типа катализа, и продукты реакции соответствуют таковым у ГПЛ. Однако, если верна гипотеза 1, мы с большой долей вероятности не должны обнаружить дивиниловые эфиры в качестве продуктов реакции, катализируемой мутантной формой MtHPL F284I, так как для формирования дивинилэфирсинтазной активности в таком случае одной точечной мутации не достаточно.

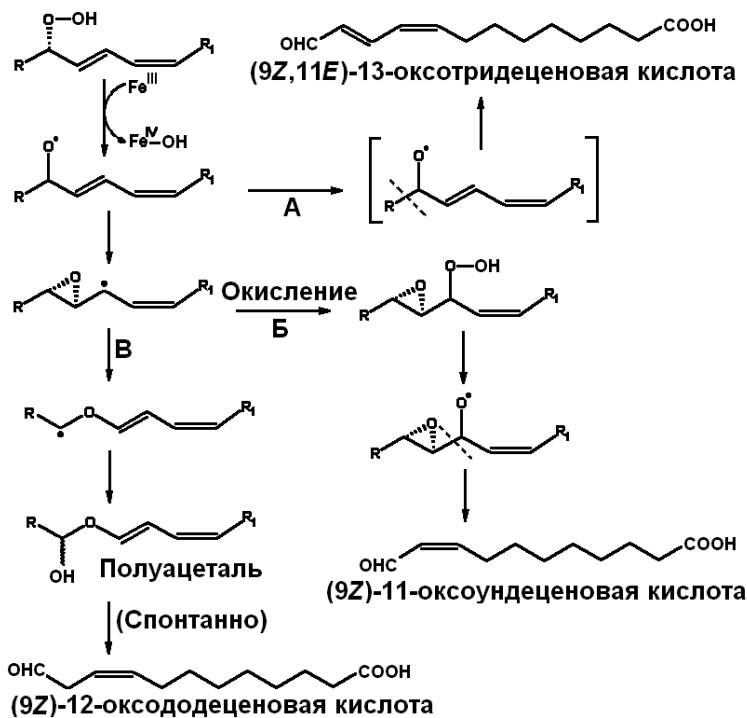


Схема 3. Предполагаемые механизмы реакций, катализируемых MtHPL дикого типа и мутантными формами F284I, N285T, F287V, N285A, G288I.

Гидропероксидлиазная активность мутантной формы F284I была сильно снижена, и среди продуктов реакции дивиниловых эфиров обнаружено не было (Рис. 6Б), что подтверждает гипотезу 1. Данные, полученные в экспериментах с другими мутантными формами MtHPL N285T, F287V, N285A, G288I (Рис. 6В-Е), также подтверждают эту гипотезу. У всех модифицированных ферментов наблюдалось появление новых продуктов, однако не вследствие приобретения новой

специфической активности, а в результате нарушения в ферментативном катализе. Мутация N285A привела к потере активности (Рис. 6Г), что подтверждает важную роль аспарагина

в этом сайте для катализа CYP74.

Полученные нами результаты по сайт-направленному мутагенезу LeAOS3 также частично подтверждают гипотезу 1. Все мутации F295I, S297A, K302S и T366Y привели к появлению активности ГПЛ, но не ДЭС, как можно было ожидать в случае мутантов F295I и D359R, исходя из сопоставления первичных последовательностей. Видимо, для превращения АОС в ДЭС точечной мутации не достаточно. В отличие от этого, для превращения АОС в ГПЛ нужна замена в любом каталитически важном сайте.

Мы предполагаем, что гидропероксидлиазная реакция по механизму является базовой, а алленоксидсинтазная и дивинилэфирсинтазная реакции формируются в процессе видоизменения этой базовой реакции из-за дополнительного влияния боковых групп определенных аминокислот. Результатом мутаций является устранение этого влияния в той или иной степени и, как следствие, возвращение к базовому типу катализа (ГПЛ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большинство растительных алленоксидсинтаз, принадлежащих подсемейству CYP74A цитохромов P450 [Tijet, Brash, 2002], катализируют синтез окисей аллена, но не участвуют в их циклизации. Окиси аллена, образуемые в результате каталитического действия алленоксидсинтаз подсемейства CYP74A, претерпевают спонтанный гидролиз и, в гораздо меньшей степени, спонтанную циклизацию. Недавно обнаруженные АОС картофеля и томата подсемейства CYP74C представляют собой исключения. Среди продуктов реакции, катализируемой этими ферментами, наблюдается значительное количество циклопентенонов наряду с α -кетолом [Hamberg, 2000; Itoh *et al.*, 2002].

В полном согласии с данными литературы [Hamberg, 2000; Itoh *et al.*, 2002], первичным продуктом, продуцируемым и высвобождаемым из каталитического центра LeAOS3, являлась короткоживущая окись аллена. Таким образом, синтез окиси аллена является общей функцией АОС как подсемейства CYP74A, так и CYP74C.

В то же время, характер дальнейших превращений окиси аллена в присутствии LeAOS3 сильно различается по нескольким аспектам. Во-первых, время полужизни окиси аллена строго зависит от концентрации LeAOS3. Чем выше концентрация LeAOS3, тем меньше время полужизни 9,10-ЭОД. Во-вторых, 9,10-ЭОД сразу превращается в 10-ОФЕК и α -кетол. Когда концентрация LeAOS3 достигает значения насыщения, происходит полное превращение 9-ГПОД через 9,10-ЭОД в 10-ОФЕК и α -кетол за 20 секунд при 0°C, pH 7.0. В-третьих, α -кетол образуется стереоспецифически (9R). Окончательными продуктами LeAOS3 являются (9R)- α -кетол и рацемическая *цис*-10-оксо-11-фитоеновая кислота (Схема 4, путь А).

Этот путь метаболизма жирных кислот характерен не только для томата. В нашей лаборатории были проведены эксперименты по скринингу липоксигеназного каскада у растений и выявлено, что аналогичные пути превращения гидроперекисей жирных кислот в циклопентеноны и кетоны под действием алленоксидсинтаз характерны для ряда растений, в том числе имбиря, ландыша и подсолнечника.

Биологическое значение описанного пути превращения жирных кислот еще предстоит выяснить. Возможно, эти соединения образуются в результате действия каскадов, альтернативных образованию жасмоновой кислоты.

Практически все ферменты суперсемейства P450 являются монооксигеназами, и для них характерно использование двух субстратов: непосредственно окисляемого соединения и молекулярного кислорода. Уникальным свойством ферментов семейства CYP74 является отсутствие необходимости во втором субстрате, а именно молекулярном кислороде. В реакции участвует кислород гидропероксигруппы окисленной жирной кислоты. Соответственно, центральный домен I-спирали ферментов CYP74 является вырожденным. Аминокислотные остатки, участвующие в связывании и активации кислорода и переносе электронов у монооксигеназ, отсутствуют в последовательностях CYP74. Мы предположили, что функция центрального домена I-спирали у CYP74 заключается во взаимодействии с гидроперекисной группировкой субстрата и непосредственном участии в реакциях, катализируемых ферментами CYP74. Кроме того, исходя из сопоставления первичных последовательностей и расположения другого консервативного домена ферментов CYP74 – ERR-триады – относительно гема, мы предположили, что некоторые аминокислотные остатки, входящие в его состав, также могут принимать участие в катализе специфических реакций.

Полученные нами данные демонстрируют превращение ферментов CYP74 в результате сайт-направленного мутагенеза (Схема 4). Четыре единичные мутации LeAOS3 (CYP74C3) F295I, K302S, T366Y и S297A превратили АОС (дегидразу) (Схема 4, путь А) в ГПЛ (изомеразу) (Схема 4, путь Б). Мутантные формы сохранили способность утилизировать 9-ГПОД. Однако, наряду с продуктами, характерными для реакции LeAOS3, появились продукты, характерные для ГПЛ, а именно 9-оксононановая кислота (Схема 4, путь Б). Если в случае замен K302S, T366Y и S297A синтезировались продукты как алленоксидсинтазой, так и гидропероксидлиазной реакцией, то в случае замены фенилаланина на изолейцин (F295I) продуктов алленоксидсинтазной реакции практически не наблюдалось. Это свидетельствует о роли данных консервативных аминокислот в специфической функции фермента. С другой стороны, замена аспарагиновой кислоты на аргинин (D359R) в ERR-триаде не привела к изменениям в механизме катализа.

Результаты данной работы по сайт-направленному мутагенезу LeAOS3 и MtHPL частично подтверждают гипотезу о том, что предковый фермент CYP74 мог функционировать в качестве ГПЛ.

К настоящему времени определены два сайта, необходимые для формирования типа катализа. Первый был выявлен в работе Рамана с сотр. [Lee *et al.*, 2008], второй – в результате настоящей работы. Алленоксидсинтазы содержат фенилаланин в обоих сайтах. Гидропероксидлиазы содержат фенилаланин в домене IHCD и лейцин или изолейцин в сайте, определенном Раманом с сотр. [Lee *et al.*, 2008]. Дивинилэфирсинтазы содержат лейцин или изолейцин в обоих сайтах.

Поскольку ни одна из единичных мутаций в каталитически важных сайтах MtHPL, определенных ранее в экспериментах с LeAOS3, не привела к появлению нового каталитического механизма, характерного для семейства CYP74, тогда как четыре из пяти мутаций в LeAOS3 превратили данный фермент из дегидразы в изомеразу (частично или полностью), можно предположить, что гидропероксидлиазная реакция по механизму является базовой, а алленоксидсинтазная и дивинилэфирсинтазная реакции формируются в процессе видоизменения этой базовой реакции из-за дополнительного влияния боковых групп определенных аминокислот.

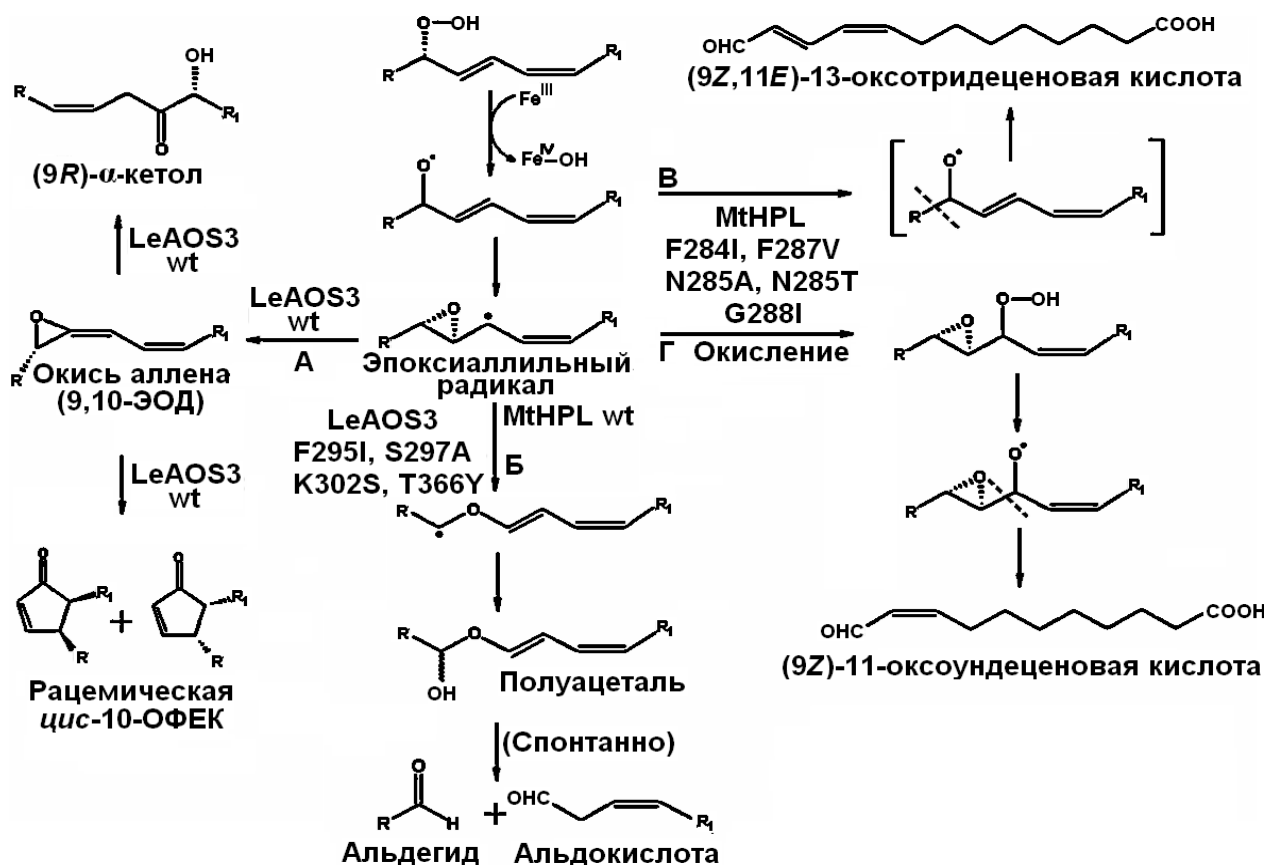


Схема 4. Механизмы реакций, катализируемых ферментами CYP74 дикого типа и их мутантными формами. А – механизм реакции, катализируемой LeAOS3 дикого типа (тип катализа – дегидратация); Б – механизм реакции, катализируемой мутантными формами LeAOS3 и MtHPL дикого типа (тип катализа – изомеризация); В и Г – механизмы реакций, катализируемых мутантными формами MtHPL (нарушение ферментативного катализа). R=(CH₂)₇CO₂Me; R'=(CH₂)₄Me для LeAOS3 и R=CH₂CH=CHCH₂Me; R'=(CH₂)₇CO₂Me для MtHPL.

Результатом мутаций является устранение этого влияния в той или иной степени и, как следствие, возвращение к базовому типу катализа (ГПЛ). Все мутации LeAOS3 F295I, S297A, K302S и T366Y привели к появлению гидропероксидлиазной, но не дивинилэфирсинтазной, активности, как можно было ожидать в случае мутантов F295I и D359R. По-видимому, для превращения АОС в ДЭС не достаточно точечной мутации. В отличие от этого, превращение АОС в ГПЛ происходит при замене в любом каталитически важном сайте.

Результаты экспериментов по сайт-направленному мутагенезу свидетельствуют о принципиальной роли I-спирали и ERR-триады в структуре и каталитическом действии ферментов семейства CYP74. Насколько нам известно, до нашей работы [Toporkova *et al.*, 2008] и выполненной независимо работы [Lee *et al.*, 2008], в литературе не было описанных примеров принципиального изменения механизма катализа в результате сайт-направленного мутагенеза. Результаты экспериментов по мутагенезу открывают возможности для целенаправленного изменения каталитического действия ферментов CYP74 (Схема 4). Полученные нами данные подтверждают эволюционное происхождение существующего разнообразия семейства CYP74 от единого предкового гена в результате дупликации и единичных мутаций.

ВЫВОДЫ

1. В отличие от алленоксидсинтаз подсемейства CYP74A, фермент LeAOS3, принадлежащий подсемейству CYP74C, является мультифункциональным и катализирует не только синтез, но также гидролиз и циклизацию окиси аллена.
2. Гидролиз окиси аллена под действием LeAOS3 протекает стереоспецифически, приводя к образованию (9R)- α -кетола, тогда как циклизация приводит к образованию рацемической смеси *цис*-10-ОФЕК.
3. Методами биоинформатики выявлены гипотетические сайты, определяющие механизм каталитического действия ферментов CYP74. С помощью сайт-направленного мутагенеза проведены единичные замены аминокислот в LeAOS3: мутации F295I, K302S, и S297A в центре I-спирали и T366Y и D359R в ERR-триаде. В центре I-спирали MtHPL с помощью сайт-направленного мутагенеза проведены замены F284I и N285T.
4. Мутации кардинально изменили механизм каталитического действия LeAOS3. Полученные мутантные формы проявляют активность гидропероксидлиазы (изомеразы), тогда как алленоксидсинтазная (дегидразная) активность либо сильно снижена (K302S, T366Y и S297A), либо полностью отсутствует (F295I).
5. Результаты экспериментов по сайт-направленному мутагенезу свидетельствуют, что эпоксиаллильный радикал – центральный промежуточный интермедиат катализа ферментов CYP74 – либо теряет один атом водорода, приводя к образованию окиси аллена (фермент дикого типа), либо подвергается

перегруппировке в изомерный радикал, который рекомбинирует с гидроксильным радикалом с образованием полуацетала – первичного продукта ГПЛ (мутантные формы F295I, K302S, T366Y и S297A).

6. Помимо основного продукта (9Z)-12-оксододеценной кислоты в реакциях, катализируемых мутантными формами MtHPL, появляются (9Z,11E)-13-оксотридекадиеновая и (9Z)-11-оксоундеценная кислоты – продукты гомолитической фрагментации углеродного остова.
7. Консервативный аспарагин в центре I-спирали не является абсолютно необходимым для каталитической активности ферментов СУР74. Мутантная форма MtHPL N285T сохраняет остаточную активность гидропероксидлиазы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Топоркова, Я.Ю.** Экспрессия и функциональная характеристика рекомбинантной алленоксидсинтазы томата / **Я.Ю. Топоркова**, И.Р. Чечеткин, Ю.В. Гоголев // Сб. тезисов / Изд-во Пущинского НЦ РАН. – Пущино, 2006. – С. 96-97.
2. Новый путь биосинтеза оксипиринов-циклопентенонов в растениях / А.Н. Гречкин, Л.Ш. Мухтарова, А.В. Огородникова, Ю.В. Гоголев, **Я.Ю. Топоркова** // Тез. докл. / Изд-во «ФизтехПресс» КФТИ КазНЦ РАН. – Казань, 2006. – С. 32.
3. Экспрессия и функциональная характеристика рекомбинантной алленоксидсинтазы томата / **Я.Ю. Топоркова**, Е.В. Осипова, И.Р. Чечеткин, Ю.В. Гоголев // Сб. тезисов / Москва, Пущино-на-Оке, 2006. – С. 92.
4. Получение и характеристика мутантных форм алленоксидсинтазы 3 томата / **Я.Ю. Топоркова**, И.Р. Чечеткин, Л.Ш. Мухтарова, Ф.К. Мухитова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сб. тезисов / Изд-во Пущинского НЦ. – Пущино, 2008. – С. 110-111.
5. Характеризация диких и мутантных форм некоторых ферментов подсемейства СУР74С цитохромов P450 / **Я.Ю. Топоркова**, Н.В. Ланцова, И.Р. Чечеткин, Л.Ш. Мухтарова, Ф.К. Мухитова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сб. научных трудов / Изд-во КГУ. – Казань, 2008. – С. 32-34.
6. **Топоркова, Я.Ю.** Изменение каталитических свойств LeAOS3 томата (*Licopersicon esculentum*) в результате замены отдельных аминокислот / **Я.Ю. Топоркова**, А.Н. Гречкин // Тезисы / Москва, Пущино, 2008–С. 177-178.
7. Бифункциональная (алленоксидсинтазная и алленоксидциклазная) ферментативная активность СУР74С3 из томатов / А.Н. Гречкин, Л.Ш. Мухтарова, **Я.Ю. Топоркова**, Ф.К. Мухитова // Сб. трудов / Изд-во Арта. – Новосибирск, 2008.–С. 34.
8. Получение и характеристика мутантных форм некоторых ферментов подсемейства СУР74С цитохромов P450 / **Я.Ю. Топоркова**, Н.В. Ланцова, И.Р. Чечеткин, Л.Ш. Мухтарова, Ф.К. Мухитова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сб. трудов / Изд-во Арта. – Новосибирск, 2008. – С. 45.
9. The alteration of LeAOS3 catalysis type by site-directed mutagenesis / А.М. Husainov, **Ya.Yu Toporkova**, L.Sh. Mukhtarova, Yu.V. Gogolev, A.N. Grechkin // Abstracts / Изд-во КГУ. – Kazan, 2008. – P. 41.

10. Producing and characterization of tomato allene oxide synthase 3 LeAOS3 / E.V. Sofronova, **Ya.Yu Toporkova**, L.Sh. Mukhtarova, Yu.V. Gogolev, A.N. Grechkin // Abstracts / Изд-во КГУ. – Kazan, 2008. – P. 45.
11. Tomato CYP74C3 is a multifunctional enzyme not only synthesizing allene oxide but also catalyzing its hydrolysis and cyclization / A.N. Grechkin, L.S. Muchtarova, L.R. Latypova, Y.V. Gogolev, **Y.Y. Toporkova**, M. Hamberg // Chembiochem. – 2008. – V. 9. – P. 2498-2505.
12. Determinants governing the CYP74 catalysis: conversion of allene oxide synthase into hydroperoxide lyase by site-directed mutagenesis / **Y.Y. Toporkova**, Y.V. Gogolev, L.S. Muchtarova, A.N. Grechkin // FEBS Letters. – 2008. – V. 582. – P. 3423-3428.
13. Alteration of catalytic properties of tomato allene oxide synthase LeAOS3 and alfalfa hydroperoxide lyase MtHPL / **Ya.Yu. Toporkova**, L.Sh. Muchtarova, Yu.V. Gogolev, A.N. Grechkin // Abstracts / Изд-во КГУ. – Kazan, 2009 – P. 69-70.
14. Софронова, Е.В. Получение и очистка гидропероксидлиазы MtHPL *Medicago truncatula* / Е.В. Софронова, **Я.Ю. Топоркова**, Ю.В. Гоголев // Материалы конгресса / РИО ПГУ. – Пермь, 2009. – С. 244.
15. Изменение каталитических свойств в результате сайт-направленного мутагенеза алленоксидсинтазы LeAOS3 томата / **Я.Ю. Топоркова**, Л.Ш. Мухтарова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Материалы конгресса / РИО ПГУ. – Пермь, 2009. – С. 252.
16. Characterization of tomato allene oxide synthase LeAOS3 catalysis and its alteration by site-directed mutagenesis / **Y.Y. Toporkova**, Y.V. Gogolev, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin // Abstract Book / Wiley-Blackwell, FEBS. – Prague, 2009.– P. 14.
17. Alteration of LeAOS3 (CYP74C3) catalysis by site-directed mutagenesis / **Ya.Yu. Toporkova**, I.R. Chechetkin, L.Sh. Mukhtarova, F.K. Mukhitova, Yu.V. Gogolev, A.N. Grechkin // Abstracts / Изд-во КГУ. – Kazan, 2008. – P. 64.
18. 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.
19. Enzymes of CYP74 family in oxylipin biosynthesis: new products and new insights into the mechanism of catalysis / A.N. Grechkin, **Ya.Yu Toporkova**, E.V. Osipova, N.V. Lantsova, A.V. Ogorodnikova // Abstracts / Изд-во КГУ. – Kazan, 2008. – P. 20.
20. Получение и характеристика диких и мутантных форм алленоксидсинтазы LeAOS3 томата и гидропероксидлиазы MtHPL люцерны/ **Я.Ю. Топоркова**, Л.Ш. Мухтарова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Материалы конференции / ИЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН. – Иркутск, 2009. – С. 471-473.
21. Изменение каталитических свойств в результате сайт-направленного мутагенеза алленоксидсинтазы LeAOS3 томата и гидропероксидлиазы MtHPL люцерны/ **Я.Ю. Топоркова**, Л.Ш. Мухтарова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Тезисы докладов / Изд-во «ФизтехПресс» КФТИ КазНЦ РАН. – Казань, 2009. – С. 364.