

На правах рукописи

Топоркова Яна Юрьевна

**ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗЫ КЛАНА CYP74 – НОВЫЕ УЧАСТНИКИ
ЛИПОКСИГЕНАЗНОГО КАСКАДА**

1.5.21 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Казань – 2022

Работа выполнена в лаборатории оксилипинов Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр» Российской Академии наук (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН)

Научный консультант: **Гречкин Александр Николаевич** – доктор химических наук, академии РАН, заведующий отделом клеточной сигнализации КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань

Официальные оппоненты: **Тишков Владимир Иванович** – доктор химических наук, профессор кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва;

Савченко Татьяна Викторовна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией фотосинтетического окисления воды Федерального государственного учреждения науки Института фундаментальных проблем биологии Российской Академии наук, г. Пущино;

Иванов Игорь Владимирович – доктор химических наук, профессор кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова "МИРЭА – Российского технологического университета", г. Москва.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Защита состоится 3 ноября 2022 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.225.02 при ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» по адресу 420111 г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ФИЦ КазНЦ РАН и на официальном сайте КИББ ФИЦ КазНЦ РАН: <http://kibb.knc.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2022г.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 420111, г. Казань, а/я 261, КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, ученому секретарю диссертационного совета (e-mail: dissovet@kibb.knc.ru).

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Пономарева Анастасия Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Окисление полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) является источником важнейших биорегуляторов – оксипинов, играющих значительную роль в регуляторных процессах, а также ответных реакциях на изменение условий окружающей среды. Например, у млекопитающих эйкозаноиды, продукты окислительных превращений жирных кислот эйкозанового ряда, контролируют работу органов пищеварения, сердечно-сосудистой и респираторной систем, воспроизводства, участвуют в воспалительных процессах, анафилаксии, системах иммунного ответа и др. Окислительный метаболизм ПНЖК у растений значительно менее изучен. Основным источником оксипинов у растений является липоксигеназный каскад, начинающийся с образования гидроперекисей жирных кислот при участии липоксигеназ. Дальнейший метаболизм гидроперекисей контролируется рядом ферментов, в том числе представителями семейства CYP74, неклассическими цитохромами P450. Из ферментов CYP74 наиболее распространены алленоксидсинтазы (АОС) и гидропероксидлиазы (ГПЛ). Они обнаружены у всех изученных к настоящему времени цветковых растений. Гораздо реже встречаются другие представители данного семейства белков – дивинилэфирсинтазы (ДЭС). В последнее время ферменты, сходные с представителями семейства CYP74, а также оксипины, сходные по структуре с продуктами каталитического действия ферментов CYP74, выявляются у таксономически отдаленных организмов – протеобактерий (Lee *et al.*, 2008), животных (Lee *et al.*, 2008), бурых (Proteau, Gerwick, 1993) и красных (Jiang, Gerwick, 1997) водорослей. Выявленные ферменты по требованиям номенклатуры (более 40% идентичности аминокислотных последовательностей) нельзя отнести к семейству CYP74, поэтому было введено понятие клана CYP74 (Nelson, 2013), объединяющее ферменты семейства CYP74, а также других семейств, проявляющие сходство с этими ферментами по структуре, механизмам каталитического действия и результатам филогенетических исследований.

Для цветковых растений характерны следующие оксипины – продукты липоксигеназного каскада: гидрокси-, дигидрокси-, тригидрокси-, оксо-, эпокси- или кето-производные жирных кислот, дивиниловые эфиры, альдегиды, спирты, альдокислоты, циклопентеноны и жасмонаты (Grechkin, 1998; Wasternack, Feussner, 2017). Физиологические свойства оксипинов растений изучены крайне односторонне, с неоправданно большим вниманием к жасмонатам, травматину и летучим соединениям. Гораздо меньшее внимание уделяется другим ветвям липоксигеназного каскада, в том числе образованию эпокси-гидрокси-производных (эпоксиспиртов) и тригидрокси-производных (тригидрокси-кислот), несмотря на то, что эти соединения обнаружены у организмов, принадлежащих разным таксонам (Kato *et al.*, 1985, 1991; Hamberg, 1999; Hamberg, Olsson, 2011; Jin *et al.*, 2012; Wennman, Oliw, 2013; Aghofack-Nguemezi, Schwab, 2013; d'Ippolito *et al.*, 2018; An *et al.*, 2018, 2019; Oliw, 2020, 2021; Edin *et al.*, 2021).

Известно два различных механизма превращения гидроперекисей жирных кислот в эпоксиспирты. Первый механизм осуществляется через восстановление перекисной группировки и эпоксидирование одной двойной связи; второй осуществляется через гомолиз О-О связи гидроперекиси, перегруппировку оксирадикала в эпоксиаллильный радикал и восстановление гидроксильного радикала. Первый механизм осуществляется при участии пероксигеназ (Blée, Schubert, 1990; Hamberg, Hamberg, 1996; Blée *et al.*, 2012) и других оксидоредуктаз (Garscha, Oliw, 2009);

второй осуществляется в присутствии кислот (Gardner *et al.*, 1984a,б), ионов Fe^{3+} (Gardner *et al.*, 1974; Gardner, Kleiman, 1981; Dix, Marnett, 1985), гемопротеинов (Gardner, 1989) и при нагревании (Hamberg, Gotthammar, 1973). В 2008 году был обнаружен первый фермент, катализирующий образование эпокиспиртов по второму механизму – эпоксиалкогольсинтаза BfEAS (CYP440A1) ланцетника *Branchiostoma floridae* Hubbs, 1922 (Lee *et al.*, 2008). Этот фермент входит в состав клана CYP74, что позволяет предположить, что, по крайней мере, некоторые ферменты, ответственные за образование эпокиспиртов по второму пути – эпоксиалкогольсинтазы – будут относиться к клану или семейству CYP74. Однако, несмотря на значительный интерес исследователей к ферментам CYP74 (десятки охарактеризованных ферментов и продуктов их каталитического действия), до сих пор BfEAS (CYP440A1) является единственным представителем этой группы ферментов. Эта группа, по-видимому, является широко распространенной, исходя из того факта, что продукты эпоксиалкогольсинтазной ветви выявляются у многих видов организмов. У растений, несмотря на присутствие продуктов эпоксиалкогольсинтазной ветви, до настоящего времени гены эпоксиалкогольсинтаз не были клонированы, и соответствующие белки не были охарактеризованы.

Цель и задачи исследования. В связи с вышесказанным, основной целью работы было выявление у растений, у которых обнаружены эпокиспирты – продукты эпоксиалкогольсинтазной активности – ферментов их биосинтеза и изучение их структурно-функциональных свойств. В рамках данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Биоинформационный анализ аминокислотных последовательностей ферментов семейства CYP74 растений, у которых выявлены эпоксигидрокси-производные жирных кислот, для определения потенциальных эпоксиалкогольсинтаз.
2. Клонирование генов и получение очищенных препаратов соответствующих рекомбинантных ферментов.
3. Характеристика каталитических свойств полученных ферментов. Определение субстратной специфичности, кинетических параметров катализируемых ими реакций, структуры продуктов.
4. Сопоставление каталитических свойств полученных ферментов и родственных ферментов различных видов организмов.
5. Расшифровка механизма каталитического действия полученных ферментов.
6. Филогенетические исследования полученных ферментов.

Научная новизна работы. У растений и организмов, принадлежащих другим таксонам, у которых ранее были обнаружены эпокиспирты – продукты эпоксиалкогольсинтазной активности – были выявлены и описаны ферменты, ответственные за их образование. Показано, что ряд неохарактеризованных ранее ферментов CYP74 либо охарактеризованных как алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы или дивинилэфирсинтазы, проявляют дополнительную эпоксиалкогольсинтазную активность. Установление этого факта объясняет отсутствие эпоксиалкогольсинтаз у растений, у которых выявлены эпокиспирты – продукты эпоксиалкогольсинтазной ветви липоксигеназного каскада. Кроме того, охарактеризованы истинные эпоксиалкогольсинтазы, входящие в состав как семейства CYP74, так и клана CYP74.

Расшифрована детальная структура эпокиспиртов – продуктов эпоксиалкогольсинтаз-

ной активности ферментов семейства и клана CYP74. Показано, что ферменты растений и бурых водорослей катализируют образование эпокиспиртов, отличных по структуре от продуктов каталитического действия ферментов животных. В экспериментах с использованием ^{18}O показано, что эпоксиалкогольсинтазы представляют собой изомеразы, включающие оба атома кислорода из меченных $^{18}\text{O}_2$ субстратов, и расшифрован механизм каталитического действия эпоксиалкогольсинтаз.

С помощью сайт-направленного мутагенеза получены мутантные формы ферментов семейства CYP74 и проведены следующие превращения ферментов: алленоксидсинтаз – в гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы; ферментов с двойной активностью гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы – в алленоксидсинтазы; дивинилэфирсинтаз – в алленоксидсинтазы, а также в ферменты с двойной активностью гидропероксидлиазы/эпоксиалкогольсинтазы.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Ферменты CYP74C1_CS и CYP74C31 огурца (*Cucumis sativus* L.), CYP74C4_ST картофеля (*Solanum tuberosum* L.), CYP74C13_GM сои (*Glycine max* L.), CYP74C2 дыни (*Cucumis melo* L.) и CYP74C13_MT люцерны (*Medicago truncatula* Gaertn.) проявляют двойную активность гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы в зависимости от используемого субстрата.

2. Дополнительную эпоксиалкогольсинтазную активность проявляет ряд цитохромов P450 клана CYP74: гидропероксидлиазы StHPL (CYP74B3) картофеля, MsHPL (CYP74B4v1) люцерны, CsHPL (CYP74B6) огурца и NtHPL (CYP74C43) табака (*Nicotiana tabacum* L.), дивинилэфирсинтазы LeDES (CYP74D1) томата (*Solanum lycopersicum* L.) и NtDES (CYP74D3) табака (*N. tabacum*), алленоксидсинтаза DcAOS (CYP74B33) моркови (*Daucus carota* L.) и фермент CYP74B16 льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) с двойной активностью дивинилэфирсинтазы и гидропероксидлиазы.

3. Истинные эпоксиалкогольсинтазы выявлены у следующих организмов: лютик японский (*Ranunculus japonicus* Thunb.), плаунок *Selaginella moellendorffii* Hieron, роющая литоральная актиния (*Nematostella vectensis* Stephenson, 1935) и бурая водоросль *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye, 1819.

4. Эпоксиалкогольсинтазы являются изомеразы, механизм каталитического действия которых включает следующие стадии: (1) гомолиз гидроперекисной группы; (2) перегруппировка образующегося алкоксильного радикала с образованием эпоксиаллильного радикала; (3) рекомбинация эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется эпокиспирт.

5. Растительные эпоксиалкогольсинтазы, а также EsEAS бурой водоросли *E. siliculosus* синтезируют в основном (*S,S,S*)-эпимеры эпокиспиртов (*транс-эрипто*), тогда как эпоксиалкогольсинтазы животных – (*S,R,S*)-стереоизомеры (*цис-трео*).

Теоретическая и практическая значимость работы. Благодаря широкому спектру утилизируемых субстратов и каталитической универсальности ферменты P450 являются кандидатами для промышленного и биофармацевтического применения. Цитохромы P450 катализируют окислительно-восстановительные реакции экзогенных соединений, в том числе ксенобиотиков, лекарств, загрязняющих агентов из окружающей среды, химических канцерогенов. Кроме того, некоторые оксипилены проявляют противораковую, антибактериальную, противогрибковую и

противопаразитарную активность (Ruocco *et al.*, 2020). Разработанные системы получения и препаративной очистки цитохромов растений представляют интерес для промышленности. В экономическом аспекте актуальными являются исследования масличных, зерновых и технических культур, а также лекарственных растений.

Выявление и характеристика эпоксиалкогольсинтаз позволяет получить ценную информацию о путях биосинтеза эпокиспиртов и тригидрокси-кислот – группе метаболитов, выполняющих важные функции в растениях, но остающихся крайне слабо изученными.

Каталитические свойства P450 могут быть дополнительно оптимизированы с помощью сайт-направленного мутагенеза, рационального и полурационального инженерного подхода, которые вносят мутации в структуру фермента (McIntosh *et al.*, 2014; Brandenberg *et al.*, 2017), что представляет потенциальный интерес для практического использования в биоинженерии. Полученные результаты работы могут быть использованы для создания сортов растений, удовлетворяющих требованиям современного сельскохозяйственного производства.

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 2010 по 2022 г в соответствии с планом научных исследований КИББ ФИЦ КазНЦ РАН по теме «Развитие геномных и постгеномных исследований для выяснения молекулярных механизмов функционирования живых систем и создания организмов с заданными свойствами» (гос. регистрационный номер АААА-А18-118022790082-2). Исследования автора частично поддержаны грантами РФФИ (14-04-01532, 13-04-40103, 18-04-00508 и 20-34-70126), РНФ (16-14-10286 и 20-14-00338) и Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МК-4886.2013.4, МК-6529.2015.4 и МК-2873.2017.4). Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора. Эксперименты по изучению детальной структуры оксипептинов методом ЯМР проводили совместно со старшим научным сотрудником лаборатории биофизической химии наносистем к.б.н. Хайрутдиновым Булатом Имамудиновичем.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на Международном симпозиуме «Растительные липиды и оксипептины» (Казань, 2008); на Международном симпозиуме «Регуляторные оксипептины» (Швейцария, Лозанна, 2009); на 36-ом конгрессе FEBS «Biochemistry for Tomorrow's Medicine» (Италия, Турин, 2011); на съезде EMBO (Франция, Ницца, 2012); на 18-ой международной конференции «Cytochrome P450: Biochemistry, Biophysics and Biotechnology» (США, Сиэтл, 2013); на международной конференции по ферментам «International Conference on Enzyme (ICE)» (Китай, Пекин, 2014); на VIII Съезде ОФР России и Всероссийской научной конференции «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015); на 5ой международной конференции по кофакторам и активности ферментов (Япония, Уназуки, 2016); на 20ой международной конференции по цитохромам P450: биохимии, биофизики и биотехнологии

(Германия, Дюссельдорф, 2017); на 14ом международном симпозиуме по цитохромам P450 (Великобритания, Йорк, 2018); на II Объединенном научном форуме VI Съезда биохимиков России и IX Российского симпозиума «Белки и пептиды» (Сочи, 2019) и др.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из Введения, Обзора литературы, Экспериментальной части, состоящей из Материалов и Методов, а также Результаты и Обсуждения, и Заключения. В конце диссертации приведены Выводы, Список цитируемой литературы и Приложение. Диссертация изложена на 438 страницах машинописного текста, содержит 26 таблиц и 136 рисунков. Список литературы включает 623 цитируемые работы.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному консультанту академику РАН Александру Николаевичу Гречкину. Автор выражает признательность сотрудникам лаборатории оксипинов: к.б.н. Светлане Сергеевне Гориной, к.б.н. Елене Олеговне Смирновой, к.б.н. Алевтине Михайловне Егоровой, Люции Шакировне Мухтаровой, Наталье Владимировне Ланцовой, к.б.н. Татьяне Михайловне Ильиной и Елене Константиновне Аскаровой, а также старшему научному сотруднику лаборатории биофизической химии наносистем к.б.н. Булату Имамутдиновичу Хайрутдинову за помощь в проведении экспериментов.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Методы биоинформатики. Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей представителей клана CYP74 проводили с использованием баз данных National Center for Biotechnology Information, Phytozome v12.1, Ensembl и ORCAE. Анализ нуклеотидных последовательностей, множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, конструирование олигонуклеотидных праймеров проводили с помощью программы Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen, США). Филогенетические деревья конструировали с помощью программы MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) методом «Neighbor-Joining». Древо визуализировали с помощью программного обеспечения iTOL v.4 Interactive Tree Of Life, режим отображения – Circular.

1.2. Материалы. Семена кукурузы обыкновенной (*Zea mays* L.) сорта «Катерина», льна-долгунца (*L. usitatissimum* L.) сорта «Новоторжский», огурца (*C. sativus*) сорта «Малышок», сои (*G. max* L.) сорта «Скульптор», табака (*N. tabacum*) сорта «Hawana Petite 1» и моркови (*D. carota*) сорта «Нантская» стерилизовали. Через трое суток после проращивания проростки кукурузы помещали в среду Кнопа и выращивали до образования второго листа. Семена льна-долгунца, огурца, сои и моркови замачивали, проращивали в термостате, после чего выращивали в течение 21 дня на коммерческой почве Terra Vita (ЗАО «МНПП ФАРТ», Россия) в климат-камере. Семена табака помещали на агаризованную среду MS (Murashige – Skoog) и выращивали в климат-камере. Растения льна-долгунца выращивали в течение 35 дней в открытом грунте. Растения картофеля сорта Дезире стерильно размножали черенкованием и культивировали на среде MS. Дикорастущие взрослые растения лютика едкого (*Ranunculus acris* L.) собирали в районе озера Средний Кабан в 2012 и 2013 гг. Дикорастущие взрослые растения лютика японского (*R. japonicus*) собирали в ходе экспедиции в Хасанском районе Приморского края в 2013 г. Растения плаунка *S. moellendorffii* были любезно предоставлены профессором Чапплом (Университет Пердью, Уэст-Лафейетт, США). Взрослые особи роющей литоральной актинии *N. vectensis* были любезно предоставлены доктором И. Козевичем (МГУ). Рекомбинантная плазми-

да, содержащая открытую рамку считывания (ОРС) гена *CYP74C13_MT* (XP_003606860 GI:11407666) *M. truncatula*, была любезно предоставлена доктором Р. Хьюзом (Центр Джона Иннеса, Великобритания), рекомбинантная плазмида, содержащая ОРС гена *CYP74B4v1* (CAB54847.1) *Medicago sativa* L. – доктором М.А. Ноордермеер (Утрехтский университет, Нидерланды), рекомбинантная плазмида, содержащая ОРС гена *LeAOS3* томата (*S. lycopersicum*) – доктором Г. Хоу (Мичиганский университет, США), рекомбинантная плазмида, содержащая ОРС гена *NtDES* табака (*N. tabacum*) – доктором Ф. Кардинале (Университет Турина, Италия).

1.3. Молекулярно-биологические методы. Зеленые части растений, а также целые особи *N. vectensis* собирали, замораживали и гомогенизировали, растирая в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с помощью коммерческого набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). После выделения препарат подвергали обработке ДНКазой (Qiagen, США). Качество и концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США). Для постановки реакции обратной транскрипции и получения двуцепочечной кДНК использовали коммерческий набор MINT (Евроген, Москва). Амплификацию ОРС целевых генов, проверку наличия вставки целевых генов, а также сайт-направленный мутагенез проводили методом ПЦР с помощью амплификатора T-100 (Bio-Rad, США). Анализ ДНК проводили после ее электрофоретического разделения в агарозных гелях с помощью системы Gel-Doc и пакета программ Quantity One (Bio-Rad, США). Нуклеотидные последовательности определяли и проверяли с помощью ДНК-анализатора ga3130 (Applied Biosystems, США).

1.4. Получение рекомбинантных ферментов. В работе использовали векторы системы pET (Novagen, США): pET-23a, pET-32 Ek/LIC и pET-40b, а также вектор pGemT (Promega, США), реципиентами которых служили клетки штаммов *E. coli* NovaBlue, BL21(DE3)pLysS и Rosetta-gami(DE3)pLysS B (Novagen, США). Культуры клеток *E. coli* выращивали в питательных средах M9 (Маниатис и др., 1984), SOC и LB (Гловер, 1988). Компетентные клетки *E. coli* для трансформации плазмидами получали с использованием ДМСО (Inoue *et al*, 1990). Нарработку целевого белка индуцировали добавлением в среду 0,5 мМ изопропил-β-тиогалактозида; кроме того, в среду добавляли 50 мг/л δ-аминолевулиновой кислоты – предшественника гема. Клеточные лизаты получали путем механического разрушения с помощью системы French Press Cell Disrupter (Thermo Scientific, США). Очистку рекомбинантных белков проводили металлоаффинной хроматографией на колонках Bio-Scale Mini Profinity IMAC в хроматографической системе BioLogic LP (Bio-Rad, США). Целевые белки элюировали Na-фосфатным буфером (pH 7,5), содержащим 30 мМ гистидина. Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле по Лэмбли (Остерман, 1981) в системе PowerPac Universal MiniProtean (Bio-Rad, США), окрашивая Coomassie R250. Кинетические параметры реакций, катализируемых целевыми ферментами, определяли с помощью спектрофотометра PB 2201 B (Солар, Беларусь) и рассчитывали с помощью программы SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., США).

1.5. Получение субстратов для исследования каталитических свойств целевых ферментов. 9-Гидроперекиси линолевой (9-ГПОД), α-линоленовой (9-ГПОТ), γ-линоленовой (γ-9-ГПОТ) и [1-¹⁴C]линолевой ([1-¹⁴C]9-ГПОД) кислот получали инкубацией соответствующих кислот с рекомбинантной липоксигеназой ZmLOX3 кукурузы. 13-Гидроперекиси линолевой (13-ГПОД), [1-¹⁴C]-линолевой ([1-¹⁴C]13-ГПОД), α-линоленовой (13-ГПОТ), эйкозатетраеновой (15-

ГПЭТЕ) и эйкозапентаеновой (15-ГПЭПЕ) кислот получали инкубацией соответствующих кислот с соевой липоксигеназой V типа. Гидроперекиси дважды очищали методом ВЭЖХ на нормальной фазе на двух последовательно соединенных колонках Kromasil Si (7 мкм, 4.0×250 мм, Elsico, Россия) в изократическом режиме, используя смесь гексана, изопропанола и уксусной кислоты (98.1:1.8:0.1 по объему).

1.6. Условия инкубаций и анализ продуктов реакций, катализируемых целевыми ферментами. Эксперименты по исследованию особенностей катализа проводили по следующей схеме: (1) инкубация рекомбинантного фермента с гидроперекисью; (2) быстрая экстракция 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. В отдельных случаях перед метилированием продукты восстанавливали NaBH_4 или NaB^2H_4 и гидрировали над платиной. Готовые продукты растворяли в гексане и подвергали анализу методом ГХ-МС в виде метиловых эфиров (Me) или Me эфиров триметилсилилированных производных (Me/TMC) с помощью масс-спектрометра QP5050A, соединенного с газовым хроматографом GC-17A (Shimadzu, Япония). В отдельных случаях метилированные продукты очищали с помощью ВЭЖХ, после чего записывали их спектры ^1H -ЯМР, 2D-COSY, HSQC, HMBC и NOESY с помощью ЯМР-спектрометра Bruker Avance III 600 (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{H}_2\text{O}$, 296 K).

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Изучение профилей оксипиринов огурца. На первом этапе выполнения настоящей работы в профилях оксипиринов корней (рис. 1А) и листьев огурца (рис. 1Б) были выявлены соединения **1** и **2**, масс-спектры которых (рис. 1В, Г) позволили идентифицировать их как 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовую и 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовую кислоты (Hamberg, 1987) – оксиранил карбинолы, эпокиспирты, структура которых предполагает наличие в тканях огурца эпоксиалкогольсинтазной активности. Однако к настоящему времени эпоксиалкогольсинтаз (ЭАС) у этого растения описано не было. Геном огурца расшифрован полностью. У него выявлено четыре фермента семейства CYP74, два из которых описаны как 9- и 13-специфичные гидропероксидлиазы (ГПЛ, CYP74C1_CS и CYP74B6 соответственно, Matsui *et al.*, 2000). При этом в статье характеристика этих ферментов дана неполной. Структура третьего фермента позволяет предположить, что он является 13-специфичной алленоксидсинтазой (АОС). Четвертый фермент CYP74 огурца – CYP74C31 – к настоящему времени не охарактеризован, однако его последовательность сходна с таковой фермента CYP74C1_CS с несколькими заменами в каталитически важных доменах, которые не позволяют однозначно предсказать тип его каталитической активности. Вследствие этого, проверку наличия эпоксиалкогольсинтазной активности мы начали с ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 огурца.

2.2. Изучение каталитических свойств рекомбинантных ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 огурца. ОПС генов ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 клонировали; соответствующие рекомбинантные белки получили в очищенном виде. Ферменты CYP74C1_CS и CYP74C31 эффективно использовали в качестве субстратов 9- и 13-гидроперекиси линолевой (9-ГПОД и 13-ГПОД) и α -линоленовой (9-ГПОТ и 13-ГПОТ) кислот.

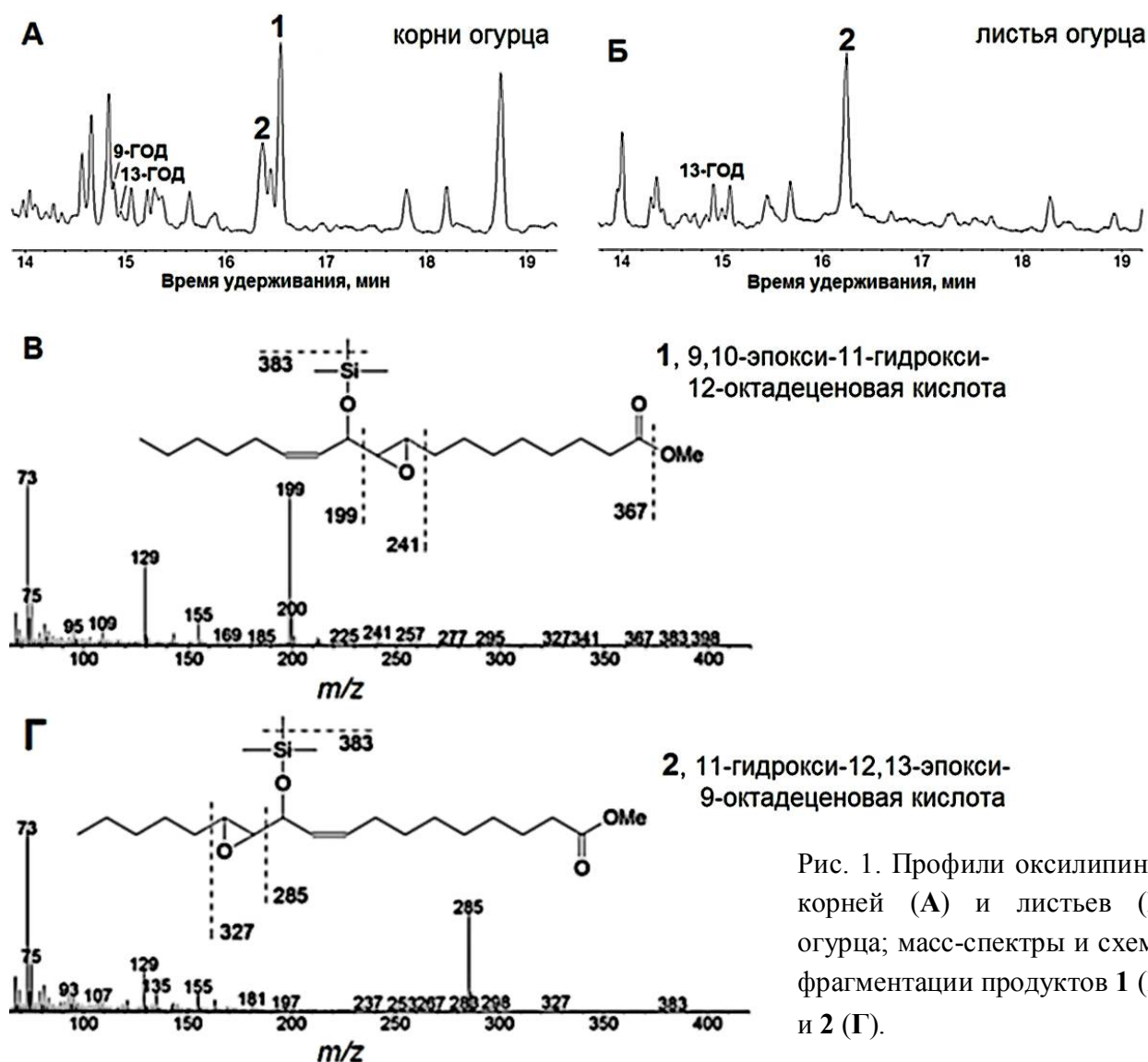


Рис. 1. Профили оксипинов корней (А) и листьев (Б) огурца; масс-спектры и схемы фрагментации продуктов 1 (В) и 2 (Г).

На хроматограмме продуктов (Me/TMC, после восстановления NaBH_4) инкубации CYP74C1_CS с 9-ГПОД (рис. 2А) выявили преобладающий продукт **1** (9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота) и два небольших пика **3а** и **4**. Результаты ЯМР анализа свидетельствуют, что соединение **1**, синтезируемое при участии фермента CYP74C1_CS, имеет структуру (9*S*,10*S*,11*S*,12*Z*)-9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислоты.

Масс-спектр продукта **3а** (рис. 3) точно соответствовал спектру 9-гидроксинонановой кислоты (Me/TMC) (Mukhtarova *et al.*, 2011), что свидетельствовало о ферментативном образовании 9-оксононановой кислоты – продукта спонтанного распада полуцетала – первичного продукта 9-ГПЛ реакции. Масс-спектр последнего (в порядке элюирования) продукта **4** (рис. 3) соответствовал таковому оксиранил винил карбинола (эпоксиспирта, ЭАС продукта) – 9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовой кислоты (Me/TMC). Результаты ЯМР анализа позволило определить, что соединение **4**, синтезируемое при участии фермента CYP74C1_CS, состоит из двух равных пиков энантиомеров – 13*S* и 13*R* эпимеров (9*S*,10*S*,11*E*)-9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовой кислоты.

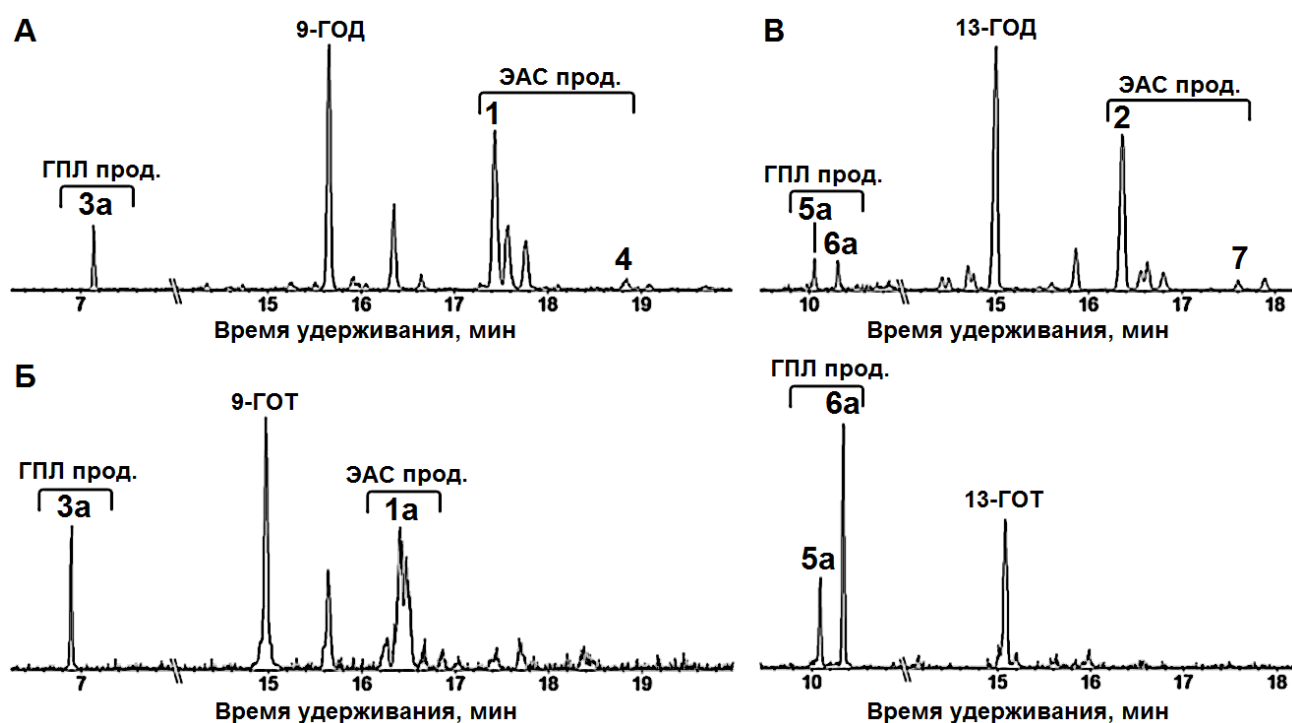


Рис. 2. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А), 9-ГПОТ (Б), 13-ГПОД (В) и 13-ГПОТ (Г) при участии фермента CYP74C1_CS огурца.

ГХ-МС профиль продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОТ при участии фермента CYP74C1_CS практически не отличался от такового 9-ГПОД (рис. 2Б). Отличие заключалось в соотношении пиков. Пик **3a** был относительно выше, чем в результате превращения 9-ГПОД (рис. 2А). Таким образом, фермент CYP74C1_CS в отношении 9-ГПОТ проявлял большую 9-ГПЛ активность, чем в отношении 9-ГПОД. Помимо продукта **3a** образовывался дополнительный продукт **1a** (Me/TMC). Его масс-спектр (рис. 3) соответствовал таковому 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновой кислоты (Me/TMC). Таким образом, в отношении 9-ГПОТ фермент CYP74C1_CS также проявлял ЭАС активность (Torokova *et al.*, 2018a).

Инкубация CYP74C1_CS с 13-ГПОД (рис. 2В) приводила к образованию двух относительно летучих соединений **5a** и **6a** (Me/TMC после восстановления NaBH_4), масс-спектры которых (рис. 4, Me/TMC) соответствовали таковым (9Z)-12-гидрокси-9-додеценовой и (10E)-12-гидрокси-10-додеценовой кислот (Me/TMC). (9Z)-12-Гидрокси-9-додеценовая кислота является результатом восстановления с помощью NaBH_4 альдокислоты (9Z)-12-оксо-9-додеценовой кислоты, образующейся в результате распада первичного продукта 13-ГПЛ – полуацеталя (Mukhtarova *et al.*, 2011). (10E)-12-Гидрокси-10-додеценовая кислота (Me/TMC) образуется в результате восстановления NaBH_4 травматина – (10E)-12-оксо-10-додеценовой кислоты – продукта аллильной изомеризации (9Z)-12-оксо-9-додеценовой кислоты. Таким образом, соединения **5a** и **6a** являются продуктами 13-ГПЛ активности. Помимо соединений **5a** и **6a** были обнаружены два дополнительных пика менее летучих продуктов **2** и **7** (Me/TMC).

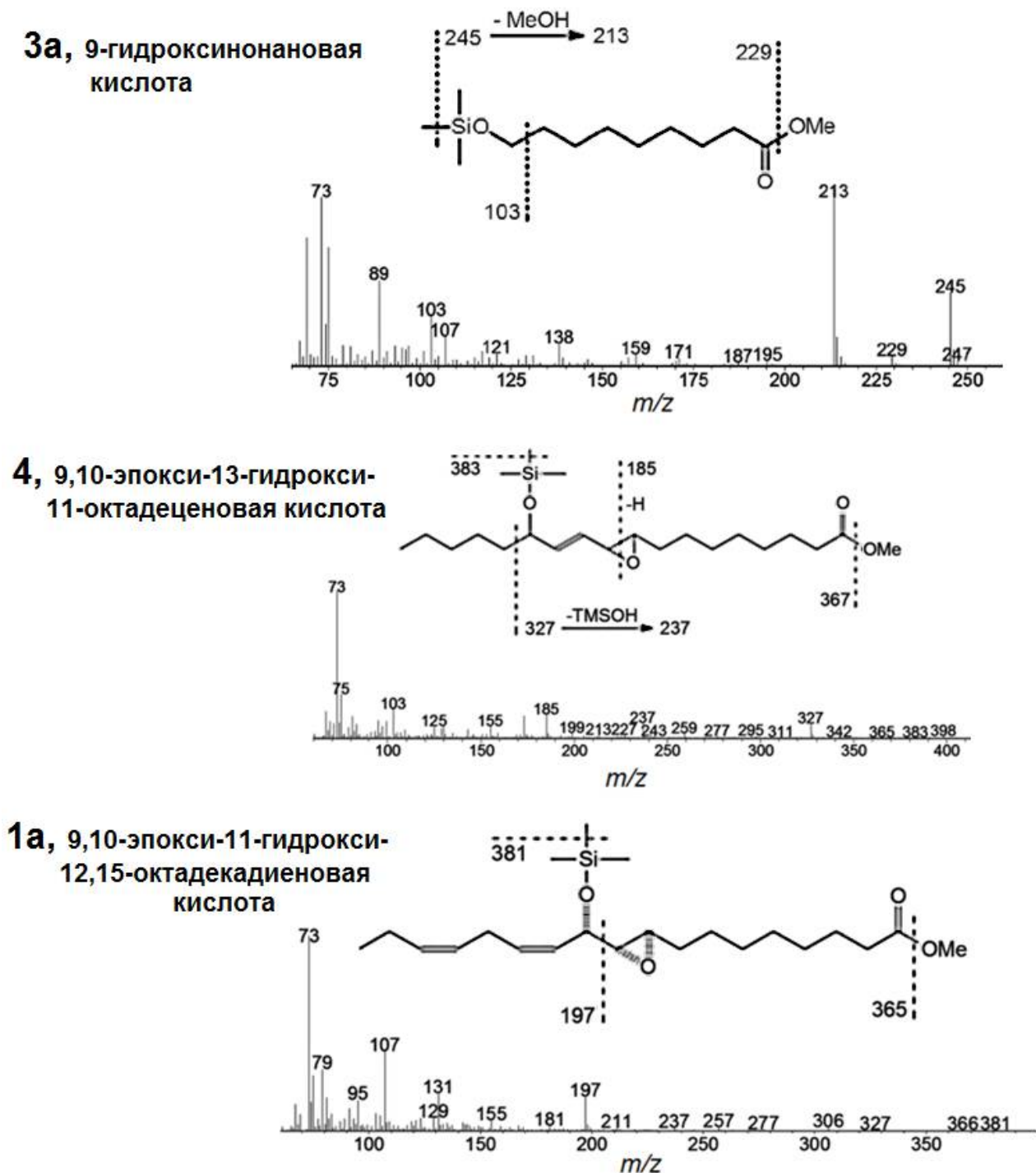


Рис. 3. Масс-спектры и схемы фрагментаций соединений **3а**, **4** и **1а**.

Соединение **2** имело структуру 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (описано выше). Масс-спектр продукта **7** (Me/TMC, рис. 4) соответствовал таковому оксиранил винил карбинола – (10*E*)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовой кислоты (Hamberg, 1996). В результате превращения 13-ГПОТ при участии фермента CYP74C1_CS образовывались 13-ГПЛ продукты **5а** и **6а** (рис. 2Г).

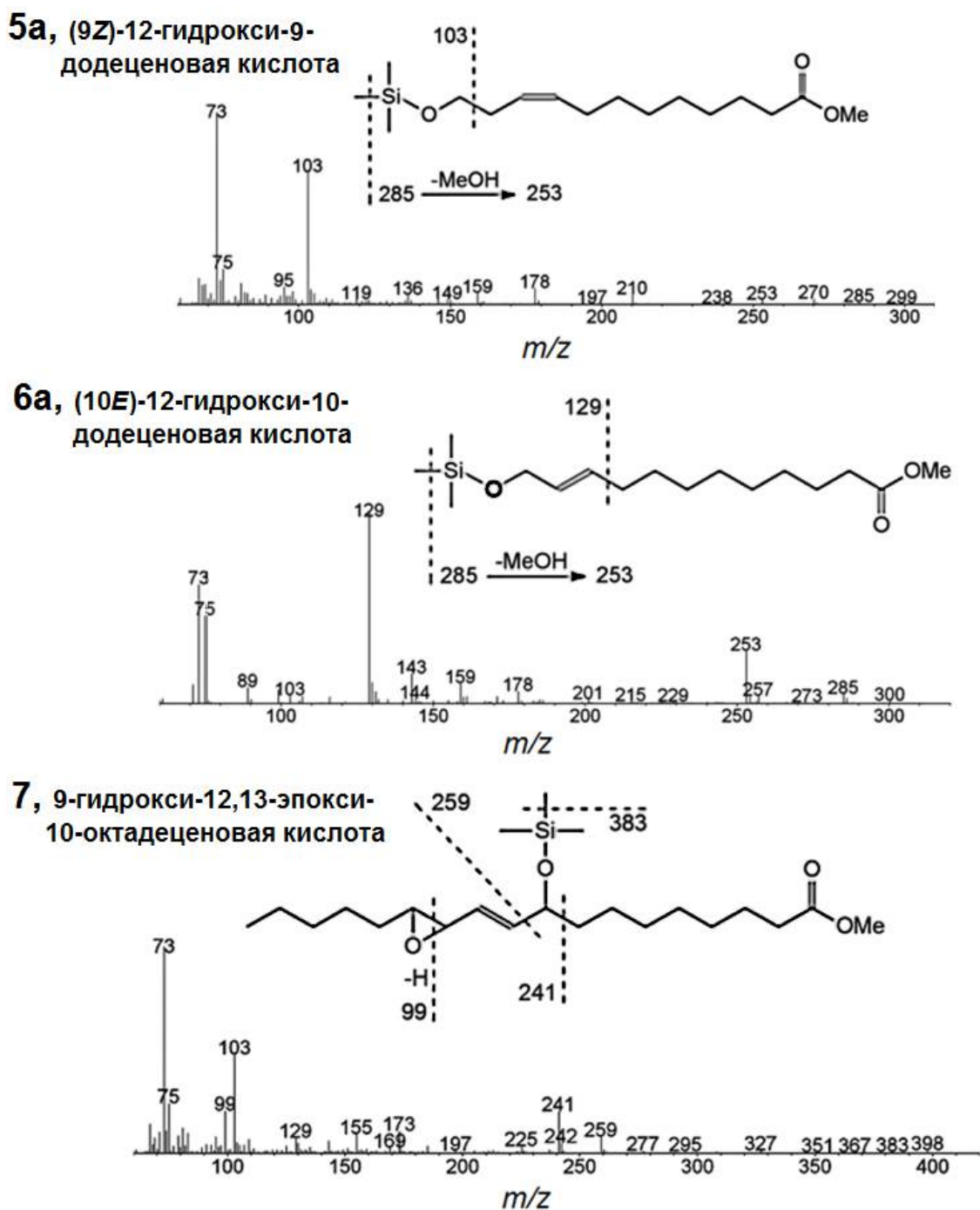
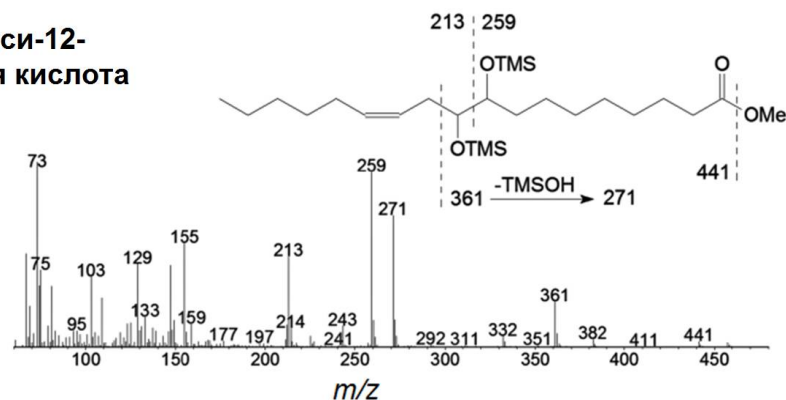


Рис. 4. Масс-спектры и схемы фрагментаций соединений **5a**, **6a** и **7**.

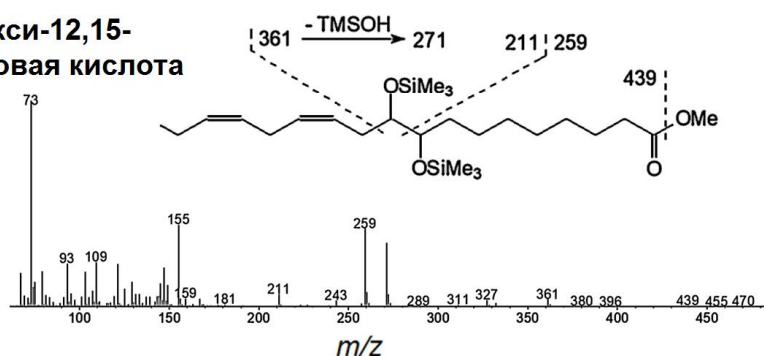
Результаты превращений гидроперекисей жирных кислот при участии фермента CYP74C31 были, в целом, сходными с таковыми, полученными при участии фермента CYP74C1_CS. Однако хроматограмма продуктов превращения 9-ГПОД при участии фермента CYP74C31 (Me/TMC после восстановления NaBH_4) содержала, помимо ЭАС и ГПЛ продуктов, два дополнительных пика **8a** и **8b**, масс-спектры которых (рис. 5) были практически идентичными и соответствовали таковым *эритро* и *трео* стереоизомеров 9,10-диола – 9,10-дигидрокси-12-октадеценной кислоты (Me/TMC), продукта восстановления NaBH_4 α -кетотола **8** – (12Z)-9-

гидрокси-10-оксо-12-октадеценовой кислоты. α -Кетол **8** является продуктом гидролиза окиси аллена – (12*Z*)-9,10-эпокси-10,12-октадекадиеновой кислоты (9,10-ЭОД) – первичного продукта АОС реакции. Таким образом, фермент CYP74C31 превращал 9-ГПОД в смесь ЭАС, АОС и ГПЛ продуктов в соотношении 58: 34: 8 (Торокова *et al.*, 2018a). Таким образом, ЭАС активность ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 объясняет образование эпоксиспиртов у огурца.

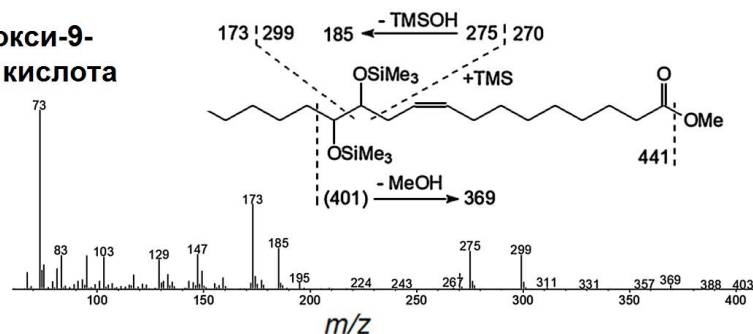
8а, 9,10-дигидрокси-12-октадеценовая кислота



9а, 9,10-дигидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота



10а, 12,13-дигидрокси-9-октадеценовая кислота



11а, 12,13-дигидрокси-9,15-октадекадиеновая кислота

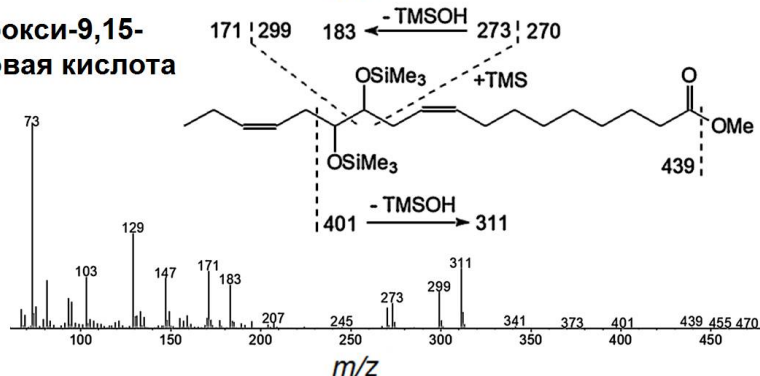


Рис. 5. Масс-спектры и схемы фрагментаций соединений **8а**, **9а**, **10а** и **11а**.

Для того чтобы понять, является ли эпоксиалкогольсинтазная активность характерной только для ферментов огурца, были выбраны дополнительно пять ферментов подсемейства CYP74C, последовательности каталитически важных доменов которых были сходными с таковыми ферментов огурца, а именно – ферменты CYP74C2 дыни, CYP74C4_ST картофеля, CYP74C13_GM сои, CYP74C13_MT люцерны и CYP74C43 табака. Все описанные ниже в работе ферменты получали по методикам, описанным для получения ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31.

2.3. Каталитические свойства ферментов CYP74C2, CYP74C4_ST, CYP74C13_GM, CYP74C13_MT и CYP74C43. Ферменты CYP74C13_MT, CYP74C13_GM и CYP74C43 использовали в качестве субстратов 9-ГПОД, 13-ГПОД, 9-ГПОТ и 13-ГПОТ. В отличие от этого, ферменты CYP74C2 и CYP74C4_ST не катализировали превращения 13-ГПОТ. Все ферменты катализировали образование ЭАС и ГПЛ продуктов. При этом профили продуктов каталитического действия ферментов CYP74C2, CYP74C4_ST, CYP74C13_GM и CYP74C13_MT были сходными с таковыми, описанными выше для фермента CYP74C1_CS (Toporkova *et al.*, 2018a). Однако помимо ГПЛ продуктов, в результате превращения 13-ГПОТ при участии ферментов CYP74C13_GM и CYP74C13_MT образовывался минорный продукт **2a**, масс-спектр которого (представлен в диссертации) соответствовал таковому оксиранил карбинола 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновой кислоты (Me/TMC). При этом для всех ферментов, кроме CYP74C43, наблюдается определенная тенденция – в ряду 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ ЭАС активность падает, тогда как ГПЛ активность возрастает. Таким образом, ферменты CYP74C1_CS, CYP74C2, CYP74C4_ST, CYP74C13_GM и CYP74C13_MT являются ферментами с двойной активностью гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы (ГПЛ/ЭАС). В то же время, соотношение ГПЛ и ЭАС продуктов, образуемых в результате инкубации фермента CYP74C43 табака с гидроперекисями, отличалось. Во всех реакциях в основном образовывались продукты ГПЛ активности, в то время как эпокиспирты (ЭАС продукты) синтезировались либо в сопоставимом, либо в меньшем количестве. Таким образом, фермент CYP74C43 табака является гидропероксидлиазой с дополнительной ЭАС активностью (Gorshkov *et al.*, 2021).

Некоторые из описанных в данной работе ферментов с двойной активностью ГПЛ/ЭАС ранее были описаны как ГПЛ. То есть до настоящей работы значительная часть ферментативной активности, а именно – ЭАС активность, оставалась незамеченной. Вероятно, существуют еще ферменты CYP74, у которых ЭАС активность остается до сих пор неизученной. Вследствие чего проверяли наличие ЭАС активности у ферментов с разными типами каталитической активности: у 9-, 13- и 9/13-специфичных АОС, ГПЛ и ДЭС, принадлежащих разным подсемействам CYP74.

2.4. Каталитические свойства алленоксидсинтаз подсемейств CYP74A и CYP74C. Помимо ферментов, охарактеризованных в данной работе как ферменты с двойной активностью ГПЛ/ЭАС, к подсемейству CYP74C относится ряд алленоксидсинтаз. Помимо подсемейства CYP74C, алленоксидсинтазы входят в другое подсемейство – CYP74A. Поэтому для проверки наличия ЭАС активности у АОС выбрали алленоксидсинтазы подсемейств CYP74A и CYP74C: LeAOS3 (CYP74C3) томата, ZmAOS1 (CYP74A19) кукурузы, LuAOS (CYP74A1) льна-долгунца и PpAOS2 (CYP74A8) мха *P. patens*. Результаты, полученные для ZmAOS1, представлены на рисунке 6.

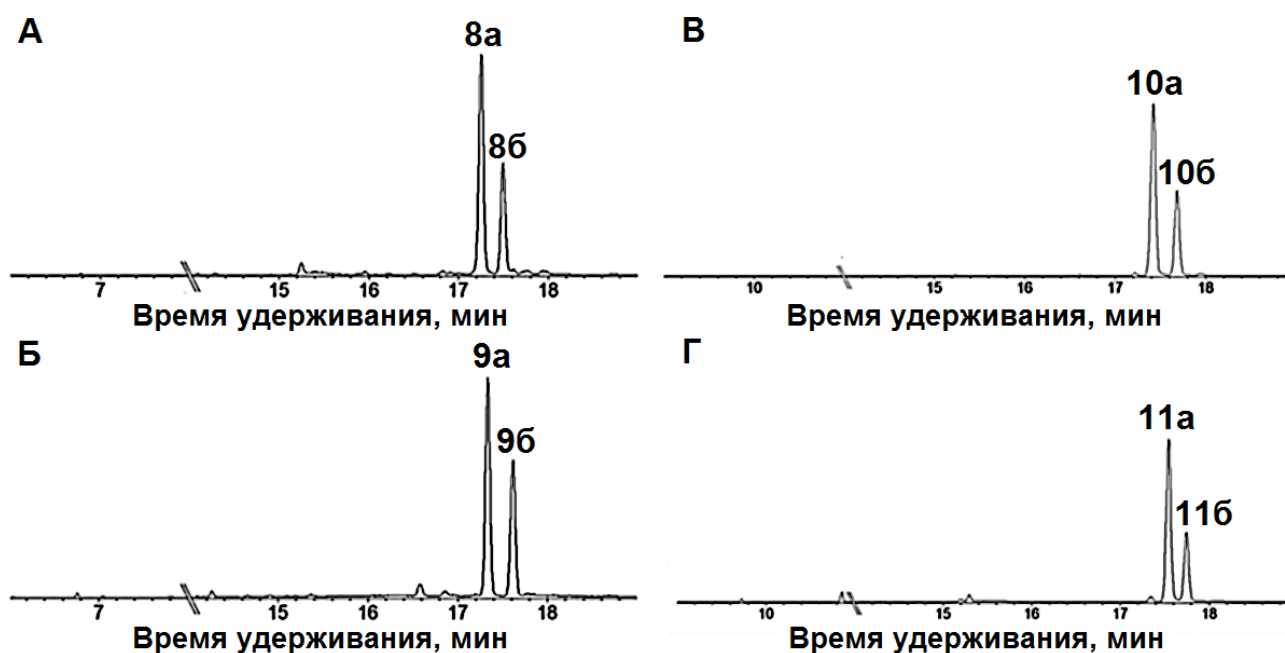


Рис. 6. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TМС после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А), 9-ГПОТ (Б), 13-ГПОД (В) и 13-ГПОТ (Г) при участии ZmAOS1 кукурузы.

Результаты, полученные для остальных АОС, являются аналогичными. Основным продуктом превращения предпочтительного субстрата – 9-ГПОД – при участии всех АОС был α -кетол **8** (описан выше), выявляемый на хроматограммах после восстановления NaBH_4 в виде пары виц-диолов **8a** и **8b** (*трео* и *эритро*, рис. 5, 6). Дополнительным продуктом превращения 9-ГПОД при участии LeAOS3 был циклопентенон – *цис*-10-оксо-11-фитоеновая кислота (*цис*-10-ОФЕК), выявляемая на хроматограмме в виде циклопентанола 10-гидроксифитоновой кислоты (Me/TМС, масс-спектр представлен в диссертации). Превращение 13-ГПОД при участии всех четырех АОС приводило к образованию только α -кетола **10** – (9*Z*)-12-оксо-13-гидрокси-9-октадеценовой кислоты, выявляемой на хроматограммах после восстановления NaBH_4 в виде пары виц-диолов **10a** и **10b** (рис. 5, 6) – *трео* и *эритро* изомеров 12,13-дигидрокси-9-октадеценовой кислоты.

Превращение 9-ГПОТ и 13-ГПОТ при участии ZmAOS1, LuAOS и PrAOS2 приводило к образованию α -кетолов **9** и **11** – 9-гидрокси-10-оксо-12,15-октадекадиеновой и 12-оксо-13-гидрокси-9,15-октадекадиеновой кислот соответственно, которые на хроматограммах после восстановления NaBH_4 (рис. 5, 6) выявлялись в виде диастереомерных пар виц-диолов **9a-9b** и **11a-11b** (Me/TМС) соответственно – изомеров 9,10-дигидрокси-12,15-октадекадиеновой и 12,13-дигидрокси-9,15-октадекадиеновой кислот (Me/TМС). В то же время, LeAOS3 не утилизировал 9-ГПОТ и 13-ГПОТ. При этом ни у одной АОС среди продуктов каталитического действия эпокиспиртов не обнаружено (Grechkin *et al.*, 2008; Toporkova *et al.*, 2020).

2.5. Каталитические свойства ферментов подсемейства CYP74B. После проверки наличия эпоксиалкогольсинтазной активности у представителей подсемейства CYP74C, показав-

шей наличие ЭАС активности у ферментов, ранее аннотированных или описанных как ГПЛ, следующим этапом стала проверка наличия ЭАС свойств у 13-специфичных ГПЛ другого подсемейства – CYP74B: StHPL (CYP74B3) картофеля, MsHPL (CYP74B4v1) люцерны (*Medicago sativa*) и CsHPL (CYP74B6) огурца. По результатам анализа продуктов инкубации MsHPL с 13-ГПОТ (рис. 7А) основными были соединения **5a** и **6a** – (9Z)-12-гидрокси-9-додеценовая и (10E)-12-гидрокси-10-додеценовая кислоты соответственно (восстановленные NaBH₄ 13-ГПЛ продукты). Дополнительным продуктом превращения 13-ГПОТ при участии MsHPL было соединение **2a** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота (ЭАС продукт).

Превращение 13-ГПОД при участии MsHPL (рис. 7Б) также приводило к образованию преобладающих продуктов **5a** и **6a** – (9Z)-12-гидрокси-9-додеценовой и (10E)-12-гидрокси-10-додеценовой кислот (восстановленные NaBH₄ 13-ГПЛ продукты). Дополнительным продуктом реакции было соединение **2** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота (ЭАС продукт) и три минорных стереоизомера соединения **2**. Следовым продуктом превращения 13-ГПОД при участии MsHPL был пик **7** – (10E)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота (ЭАС продукт).

Каталитическая активность MsHPL в отношении 9-гидроперекисей была ниже, чем в отношении 13-гидроперекисей. В хроматограммах продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH₄) превращения 9-ГПОТ при участии MsHPL выявлены продукты **1a** (2 изомера 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновой кислоты, ЭАС продукты), **3a** (9-гидроксинонановая кислота, восстановленный NaBH₄ 9-ГПЛ продукт) и **4a** (2 изомера) (рис. 7В). Масс-спектр одного из двух изомеров соединения **4a** (представлен в диссертации) позволил идентифицировать это соединение как оксиранил винил карбинол 9,10-эпокси-13-гидрокси-11,15-октадекадиеновую кислоту (Me/TMC) – ЭАС продукт.

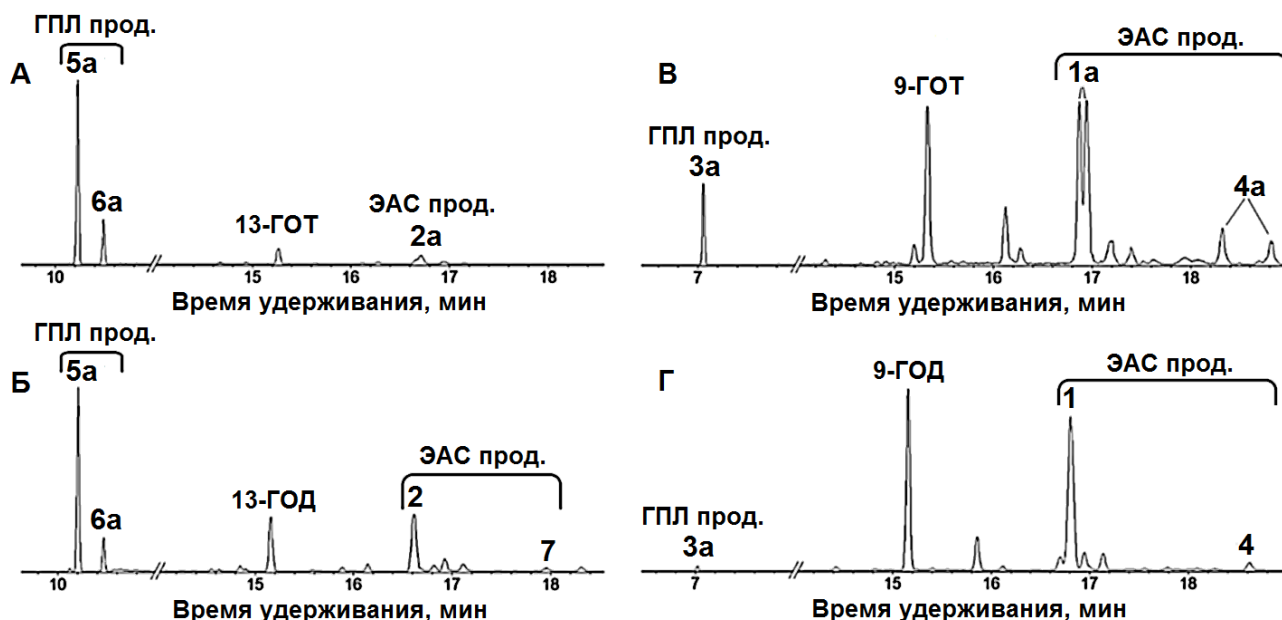


Рис. 7. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH₄) превращения 13-ГПОТ (А), 13-ГПОД (Б), 9-ГПОТ (В) и 9-ГПОД (Г) при участии MsHPL люцерны.

Инкубация MsHPL с 9-ГПОД (Me/TMC после восстановления NaBH_4 , рис. 7Г) приводила к образованию преобладающего продукта **1** (9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислоты, ЭАС продукт), минорных продуктов **3a** (9-гидроксинонановой кислоты, восстановленный NaBH_4 9-ГПЛ продукт) и **4** (9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовой кислоты, ЭАС продукт). Профили продуктов реакций, катализируемых ферментами StHPL и CsHPL аналогичны профилю продуктов фермента MsHPL. Таким образом, в отношении предпочтительных субстратов – 13-гидроперекисей – все три фермента ведут себя в основном как ГПЛ, поэтому ферменты представляют собой ГПЛ с дополнительной ЭАС активностью (Toporkova *et al.*, 2020б). При этом в отношении 13-гидроперекисей наблюдалась интересная тенденция. Специфичность образования продукта зависела от присутствия $\omega 3$ двойной связи у субстрата. Все три фермента MsHPL, StHPL и CsHPL превращали 13-ГПОТ преимущественно в ГПЛ продукты с небольшим количеством эпокиспиртов. В отличие от этого, превращение 13-ГПОД приводило к существенному выходу эпокиспиртов. Это может быть объяснено тем, что $\omega 3$ двойная связь, вероятно, содействует разрыву C-C связи в оксирани эпоксиаллильного радикала, что приводит к образованию винилоксикарбинильного радикала, который рекомбинирует с гидроксильным радикалом с образованием полуацетала, истинного продукта ГПЛ (синоним: полуацетальсинтаза). В отсутствие $\omega 3$ двойной связи раскрытие оксирана происходит в меньшей степени, и в таком случае эпоксиаллильный радикал сразу рекомбинирует с гидроксильным радикалом с образованием эпокиспирта (ЭАС продукт).

2.6. Каталитические свойства фермента CYP74B33 моркови. Одним из растений, у которых ранее было выявлено большое количество эпокиспиртов и тригидроксикислот – продуктов ЭАС ветви липоксигеназного каскада – является морковь, у которой обнаружено два фермента CYP74B – CYP74B33 и CYP74B34. Основными выявляемыми продуктами превращения 9-ГПОД при участии фермента CYP74B33 (рис. 8А) были соединения **8a** и **8б** – *трео* и *эритро* изомеры 9,10-дигидрокси-12-октадеценовой кислоты (восстановленные NaBH_4 9-АОС продукты), основными выявляемыми продуктами превращения 9-ГПОТ (рис. 8Б) – соединения **9a** и **9б**, *трео* и *эритро* изомеры 9,10-дигидрокси-12,15-октадекадиеновой кислоты (восстановленные NaBH_4 9-АОС продукты). В обеих реакциях также образовывались циклопентеноны – *цис*-10-ОФЕК и 10-оксо-11,15-фитодиеновая кислота. Таким образом, в отношении 9-ГПОД и 9-ГПОТ – предпочтительных субстратов – фермент CYP74B33 проявлял АОС активность.

Превращение 13-ГПОД (рис. 8В) было менее специфичным и эффективным и приводило к образованию широкого спектра продуктов: образовывались соединения **2** (11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота, ЭАС продукт), **5a** и **6a** ((9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценовая и (10*E*)-12-гидрокси-10-додеценовая кислоты соответственно – восстановленные NaBH_4 13-ГПЛ продукты), а также соединения **10a** и **10б** – *трео* и *эритро* изомеры 12,13-дигидрокси-9-октадеценовой кислоты (восстановленные NaBH_4 13-АОС продукты). В отношении 13-ГПОТ фермент CYP74B33 проявлял слабую ГПЛ и ЭАС активность (рис. 8Г), продуцируя соединения **5a** и **6a** ((9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценовую и (10*E*)-12-гидрокси-10-додеценовую кислоты соответственно), а также соединение **2a** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновую кислоту (ЭАС продукт). В целом, фермент CYP74B33 является 9-АОС с минорными ГПЛ и ЭАС активностями (Gorina *et al.*, 2019). Белку присвоено тривиальное имя DcAOS (*D. carota* АОС).

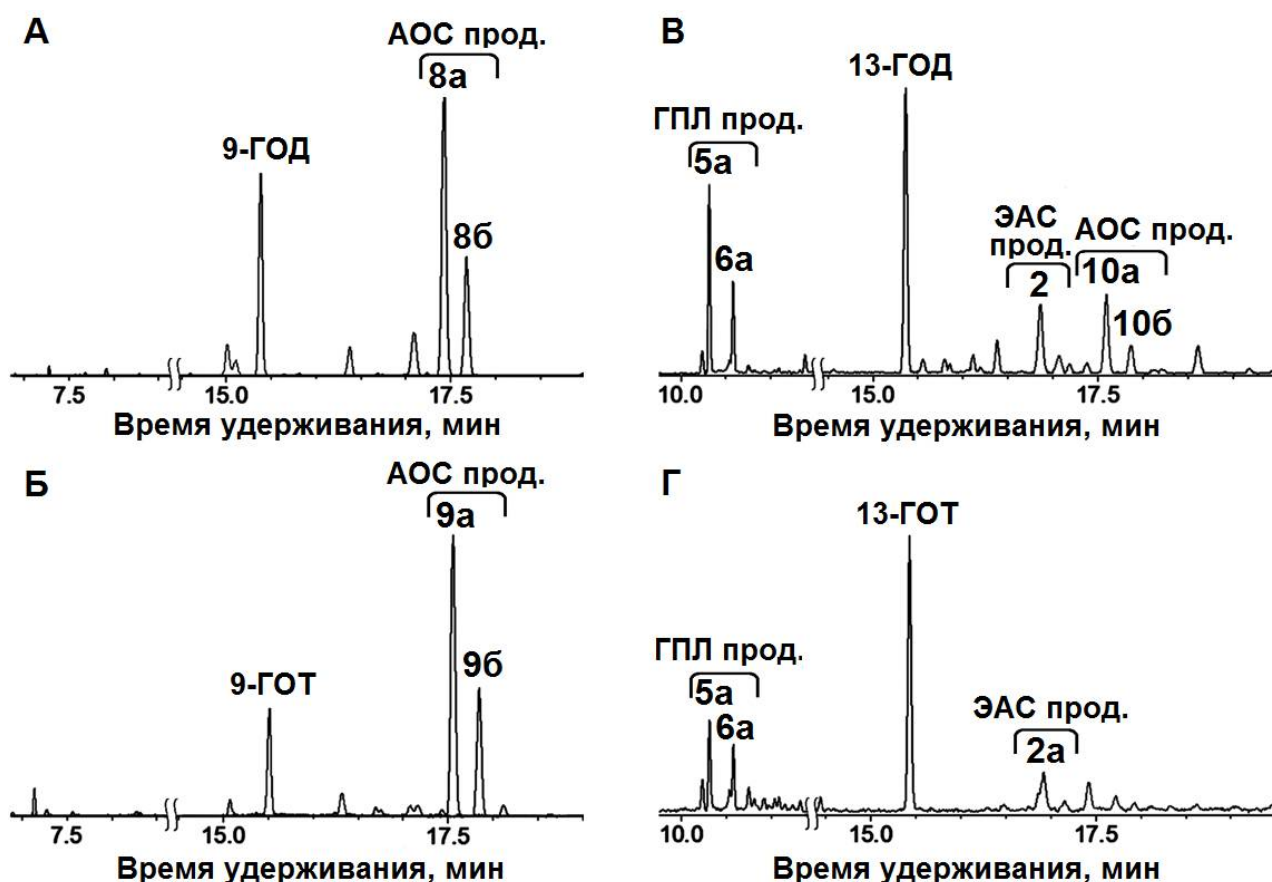


Рис. 8. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А), 9-ГПОТ (Б), 13-ГПОД (В) и 13-ГПОТ (Г) при участии фермента CYP74B33 моркови.

2.7. Каталитические свойства дивинилэфирсинтаз подсемейства CYP74D. После проверки наличия ЭАС активности у ферментов подсемейств CYP74A, CYP74B и CYP74C следующим этапом стала проверка наличия ЭАС активности у ДЭС подсемейства CYP74D: LeDES (CYP74D1) томата (*S. lycopersicum*) и NtDES (CYP74D3) табака (*N. tabacum*). Рекомбинантные ферменты NtDES и LeDES эффективно использовали 9-ГПОД и 9-ГПОТ в качестве субстратов; превращение 13-ГПОД протекало слабо. При этом эти ферменты были абсолютно неактивны в отношении 13-ГПОТ. Основным продуктом превращения 9-ГПОД при участии NtDES (рис. 9А) было соединение **12**, масс-спектр которого (представлен в диссертации) был идентичен таковому 9-[(1'E,3'Z)-нонадиенилокси]-(8E)-ноненоевой (колнелевой) кислоты (Galliard, Phillips, 1972; Fammartino *et al.*, 2007). Вторым по количеству продуктом превращения 9-ГПОД при участии NtDES было соединение **1** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота (ЭАС продукт). Кроме того, выявлен минорный продукт **3a** – 9-гидроксинонановая кислота (восстановленный NaBH_4 9-ГПЛ продукт).

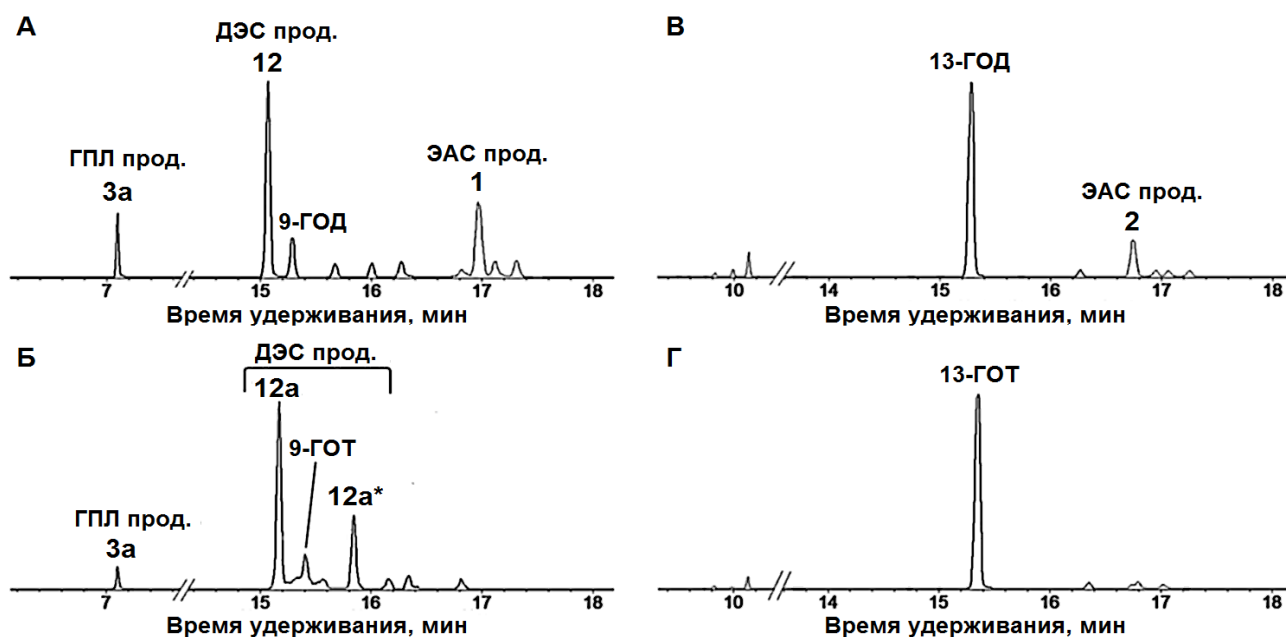


Рис. 9. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А), 9-ГПОТ (Б), 13-ГПОД (В) и 13-ГПОТ (Г) при участии NtDES табака.

Профиль продуктов (Me/TMC) инкубации NtDES с 9-ГПОТ был аналогичным таковому превращения 9-ГПОД (рис. 9Б). Основным продуктом инкубации было соединение **10a**, масс-спектр которого (представлен в диссертации) соответствовал таковому 9-[1'E,3'Z,6'Z-нонатриенилокси]-(8E)-ноненовой (колнеленовой) кислоты (Galliard *et al.*, 1973). Кроме того, в меньшем количестве образовывались соединения **1a** – 9,10-эпоксид-11-гидроксид-12,15-октадекадиеновая кислота (ЭАС продукт) – и соединение **3a** – 9-гидроксинонановая кислота (восстановленный NaBH_4 9-ГПЛ продукт). Инкубация NtDES с 13-ГПОД (рис. 9В) приводила к слабому выходу единственного продукта **2** – 11-гидроксид-12,13-эпоксид-9-октадеценной кислоты (ЭАС продукт). Профили продуктов превращения гидроперекисей при участии LeDES были аналогичными таковым при участии NtDES. Таким образом, NtDES и LeDES вели себя как ДЭС с незначительными ЭАС и ГПЛ активностями в отношении предпочтительных субстратов – 9-гидроперекисей и как ЭАС – в отношении 13-ГПОД (Toporkova *et al.*, 2020в).

2.8. Каталитические свойства ферментов CYP74B16 льна-долгунца (*L. usitatissimum*), CYP74Q1 лютика едкого (*R. acris*) и ферментов CYP74M плаунка *S. moellendorffii*. На следующем этапе проверяли наличие ЭАС активности у 13-специфичных ДЭС. Для этого клонировали ОРС генов, предположительно кодирующих 13-специфичные ДЭС льна-долгунца, лютика едкого и плаунка *S. moellendorffii*. Предпочтительными субстратами рекомбинантного фермента CYP74B16 льна-долгунца были 13-ГПОД и 13-ГПОТ. Фермент CYP74B16 катализировал превращение 13-ГПОТ (рис. 10А) в соединение **13a**, масс-спектр которого (представлен в диссертации), наряду с ультрафиолетовым спектром (максимум поглощения при 267 нм в MeOH), позволил идентифицировать соединение **13a** как (9Z,11E)-12-[(1'Z,3'Z)-гексациенилокси]-9,11-додекадиеновую ((ω5Z)-этероленовую) кислоту (Chechetkin *et al.*, 2008).

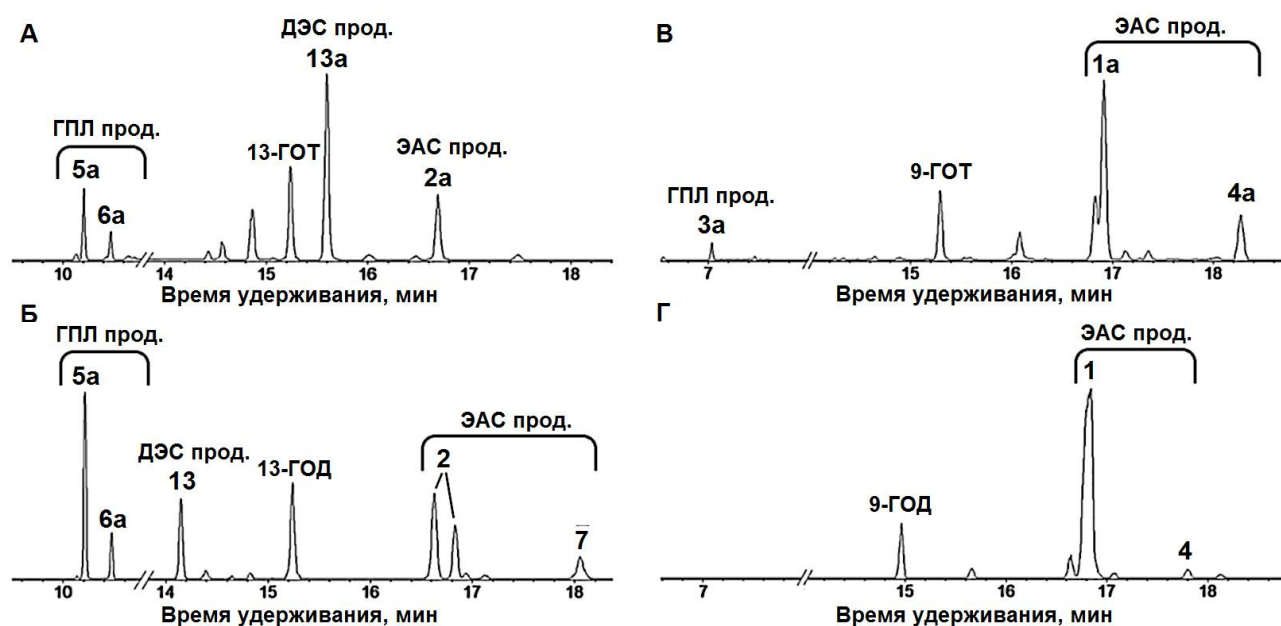


Рис. 10. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS после восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПОТ (А), 13-ГПОД (Б), 9-ГПОТ (В) и 9-ГПОД (Г) при участии фермента CYP74B16 льна-долгунца.

Дополнительными продуктами превращения (рис. 10А) были соединения **2а** (11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота, ЭАС продукт), **5а** и **6а** ((9Z)-12-гидрокси-9-додеценовая и (10E)-12-гидрокси-10-додеценовая кислоты соответственно, восстановленные NaBH_4 13-ГПЛ продукты).

В отличие от 13-ГПОТ, превращение 13-ГПОД при участии фермента CYP74B16 (рис. 10Б) приводило к образованию в основном соединений **5а** и **6а** ((9Z)-12-гидрокси-9-додеценовой и (10E)-12-гидрокси-10-додеценовой кислот, восстановленные NaBH_4 13-ГПЛ продукты). Минорными продуктами были два изомера соединения **2** (11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты, ЭАС продукт), а также соединения **7** (9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота, ЭАС продукт) и **13**, масс-спектр которого (представлен в диссертации) соответствовал таковому (9Z,11E,1'Z)-12-(1'-гексенилокси)-9,11-додекадиеновой, (ω 5Z)-этеролеовой, кислоты (Hamberg, 1998).

Превращение 9-ГПОТ при участии фермента CYP74B16 (рис. 10В) приводило к образованию соединений **1а** (9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота, ЭАС продукт), **3а** (9-гидроксинонановая кислота, восстановленный NaBH_4 9-ГПЛ продукт) и **4а** (9,10-эпокси-13-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота, ЭАС продукт). На хроматограмме продуктов превращения 9-ГПОД при участии фермента CYP74B16 (рис. 10Г) выявлены соединения **2** (9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота, ЭАС продукт) и **4** (9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовая кислота, ЭАС продукт). Таким образом, фермент CYP74B16 является ферментом с двойной активностью ДЭС (в отношении 13-ГПОТ) и GPL (в отношении 13-ГПОД) с дополнительной ЭАС активностью (Гоголев и др., 2011; Gogolev *et al.*, 2012; Torokova *et al.*, 2020в).

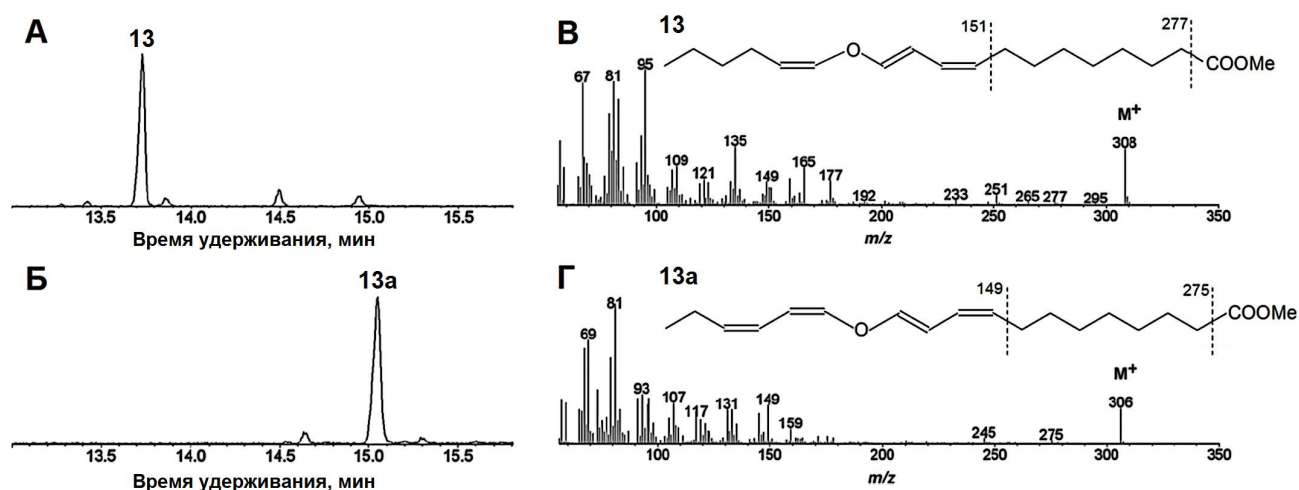


Рис. 11. Хроматограммы (А и Б) и масс-спектры (В и Г) продуктов (Ме) превращения 13-ГПОД (А и В) и 13-ГПОТ (Б и Г) при участии фермента CYP74Q1 лютика едкого.

Помимо льна-долгунца, ДЭС активность была выявлена в растениях семейства Ranunculaceae (Hamberg, 1998, 2002, 2004), в том числе в тканях лютика едкого (*Ranunculus acris* L.), произрастающего на территории Татарстана. Выявлено специфическое превращение 13-ГПОД и 13-ГПОТ при участии фермента CYP74Q1 лютика в продукты **13** и **13a** – (ω 5Z)-изомеры этеролеовой и этероленовой кислот (рис. 11, Gorina *et al.*, 2014). Других продуктов выявлено не было. Новому ферменту было присвоено название RaDES (ДЭС *R. acris*).

Кроме того, ДЭС активность была описана у плаунков рода *Selaginella*. По результатам биоинформационного анализа предположительными ДЭС плаунка *S. moellendorffii* являются 13-специфичные ферменты подсемейства CYP74M. Помимо 13-гидроперекисей, превращению подвергается только 9-ГПОД в присутствии только фермента CYP74M2. Превращение 13-гидроперекисей при участии ферментов CYP74M1 и CYP74M3 приводило к образованию разных изомеров дивиниловых эфиров. Результаты ГХ-МС анализа, а также данные ЯМР свидетельствовали, что преобладающими продуктами каталитического действия фермента CYP74M1 являются (11Z)-изомеры этеролеовой и этероленовой кислот, тогда как преобладающими продуктами каталитического действия фермента CYP74M3 – этеролева и этероленова кислоты (рис. 12). В обоих случаях дополнительными минорными продуктами были (ω 5Z)-изомеры этеролеовой и этероленовой кислот (рис. 12). Продуктов других каталитических активностей не выявлено. Таким образом, ферменты CYP74M1 и CYP74M3 являются дивинилэфирсинтазами (Gorina *et al.*, 2016). Им даны тривиальные названия SmDES1 (CYP74M1) и SmDES2 (CYP74M3).

Общей чертой RaDES, SmDES1, SmDES2 и фермента CYP74B16, отличающей их от NtDES и LeDES, является экспрессия кодирующих их генов в фотосинтезирующих органах. Однако в то время как фермент CYP74B16 и RaDES продуцируют (ω 5Z)-этероленовую и (ω 5Z)-этеролевою кислоты, при участии SmDES1 и SmDES2 эти изомеры образуются только в минорных количествах. Кроме того, SmDES1 и SmDES2, также как и RaDES, являются истинными ДЭС. В отличие от этого, NtDES и LeDES продуцируют в минорном количестве эпокиспирты (ЭАС продукты) и/или альдокислоты (ГПЛ продукты).

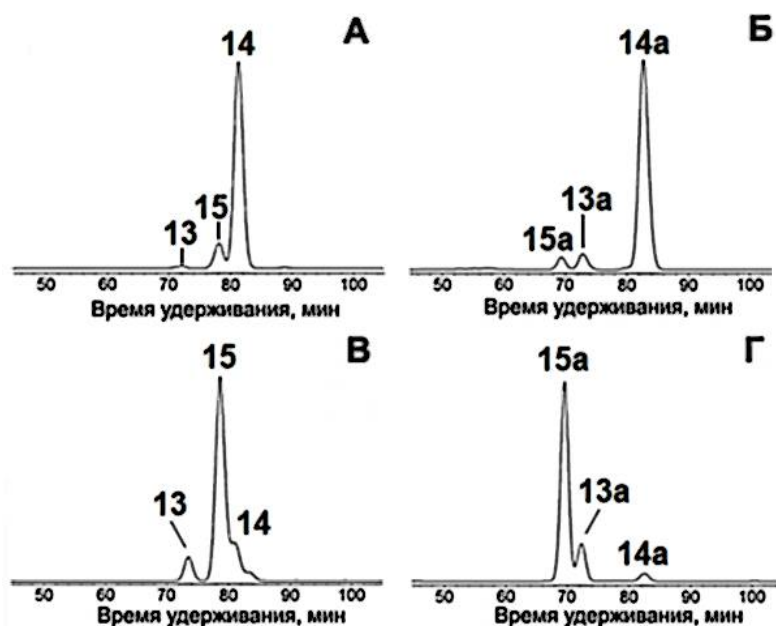


Рис. 12. Результат разделения методом ВЭЖХ на нормальной фазе продуктов (Me) превращения 13-ГПОД (А и В) и 13-ГПОТ (Б и Г) при участии ферментов СУР74М1 (А и Б) и СУР74М3 (В и Г). Представлены хроматограммы при длинах волн 250 нм (А и В) и 267 нм (Б и Г).

Более того, фермент СУР74В16 является ферментом, проявляющим двойную активность ДЭС/ГПЛ с дополнительной ЭАС активностью в зависимости от утилизируемого субстрата, что ставит ее в один ряд с описанными выше ферментами с двойной и тройной активностями (Торюкова *et al.*, 2020в).

В отличие от ферментов СУР74М1 и СУР74М3, основными продуктами превращения 13-ГПОД при участии фермента СУР74М2 (рис. 13А) были стереоизомеры соединения **2** – (9*Z*)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (ЭАС продукт), синтезируемые в соотношении 57%:29%:14% (11*R*,12*S*,13*S*), (11*R*,12*R*,13*S*) и (11*S*,12*S*,13*S*), что было определено методом ЯМР (рис. 13). Кроме того, в реакции образовывался продукт **7** – (10*E*)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота (ЭАС продукт). Превращение 13-ГПОТ при участии фермента СУР74М2 (рис. 13Б) приводило к образованию двух стереоизомеров продукта **2a** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновой кислоты (ЭАС продукт). Инкубация 9-ГПОД с ферментом СУР74М2 (рис. 13В) приводила к образованию соединения **1** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислоты (ЭАС продукт), а также следовых количеств АОС и ГПЛ продуктов: в хроматограммах выявлены *эритро* и *трео* изомеры 9,10-дигидрокси-12-октадеценовой кислоты (**8a** и **8b**) и 9-гидроксинонановая кислота **3a**. Таким образом, фермент СУР74М2 является первой истинной эпоксиалкогольсинтазой, входящей согласно критериям номенклатуры в состав семейства СУР74 и первой ЭАС, обнаруженной у растений (Торюкова *et al.*, 2018б). Данному ферменту присвоено тривиальное название SmEAS.

2.9. Каталитические свойства фермента СУР74А88 лютика японского (*R. japonicus*).

Еще одним растением, у которого были выявлены эпокиспирты, был лютик японский (*R. japonicus*). Инкубация фермента СУР74А88 лютика японского с 9-ГПОД приводила к образованию основного продукта **1** (рис. 14А) – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислоты (ЭАС продукт) – и минорного продукта **3** – 9-оксононановой кислоты (ГПЛ продукт).

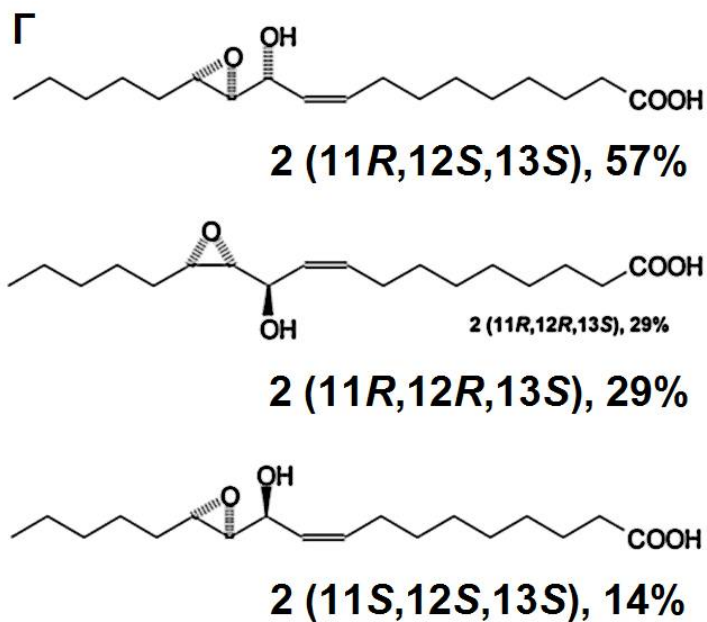
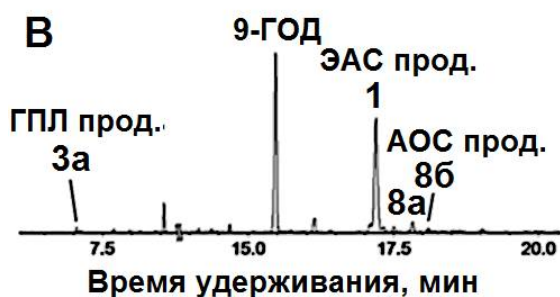
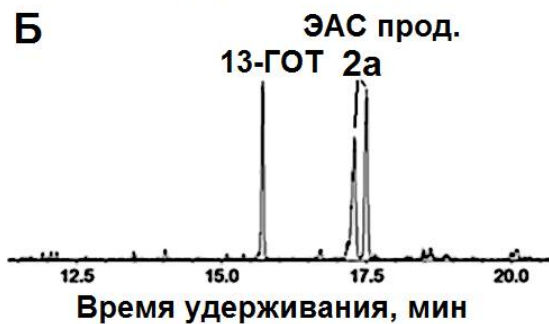
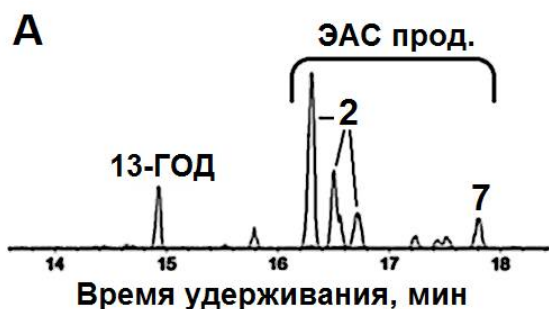
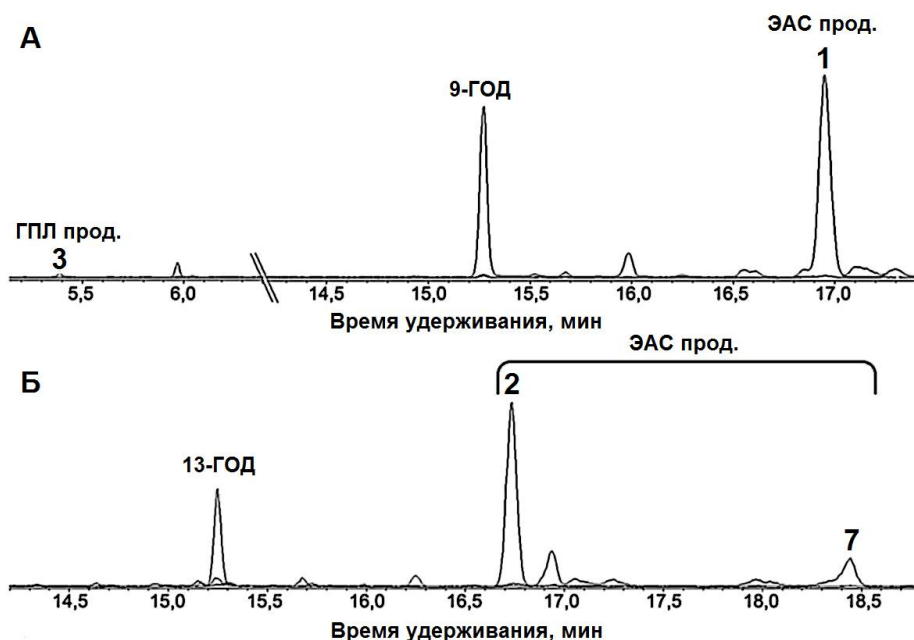


Рис. 13. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TМС после восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПОД (А), 13-ГПОТ (Б) и 9-ГПОД (В) при участии фермента СУР74М2 и структуры изомеров соединения 2 – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (Г), определенные методом ЯМР.

Рис. 14. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TМС) превращения 9-ГПОД (А) и 13-ГПОД (Б) при участии фермента СУР74А88 лютика японского.



Инкубация фермента СУР74А88 с 13-ГПОД (рис. 14Б) приводила к образованию нескольких стереоизомеров продукта 2 – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты – и продукта 7 – (10*E*)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовой кислоты (ЭАС продукты). Таким образом,

фермент CYP74A88, как и эпоксиалкогольсинтаза SmEAS (CYP74M2) *S. moellendorffii*, является истинной специфичной эпоксиалкогольсинтазой (EC 5.3.99.-), входящей в состав подсемейства CYP74A, к которому ранее относились исключительно 13-специфичные АОС (Топоркова и др., 2019). Ферменту присвоено тривиальное название RjEAS (эпоксиалкогольсинтаза *R. japonicus*).

2.10. Каталитические свойства фермента CYP5164B1 бурой водоросли *E. siliculosus*.

Поскольку среди выявленных за пределами царства растений представителей клана CYP74 была описана одна эпоксиалкогольсинтаза – BfEAS (CYP440A1) ланцетника (Lee *et al.*, 2008), нами была предпринята попытка выявить дополнительные нерастительные эпоксиалкогольсинтазы с целью сравнить каталитические свойства растительных и нерастительных ЭАС. Первый объект для выявления эпоксиалкогольсинтаз был выбран среди обширной группы бурых водорослей по сходству аминокислотных последовательностей с ферментами CYP74. Инкубация фермента CYP5164B1 бурой водоросли *E. siliculosus* с 9-ГПОД (рис. 15А) приводила к образованию двух эпимеров основного продукта **1** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислоты (ЭАС продукт) в соотношении 4:1, имеющих *эрипто* (9*S*,10*S*,11*S*) и *трео* (9*S*,10*S*,11*R*) конфигурацию (определено методом ЯМР, рис. 15) соответственно. Инкубация фермента CYP5164B1 с 13-ГПОД (рис. 15Б) приводила к образованию нескольких стереоизомеров продукта **2** – (9*Z*)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (ЭАС продукт).

Полученные данные свидетельствуют, что фермент CYP5164B1 *E. siliculosus* является эпоксиалкогольсинтазой (Топоркова *et al.*, 2017а). Ферменту присвоено тривиальное название EsEAS (эпоксиалкогольсинтаза *E. siliculosus*). Таким образом, EsEAS стала первым охарактеризованным ферментом клана CYP74 бурых водорослей.

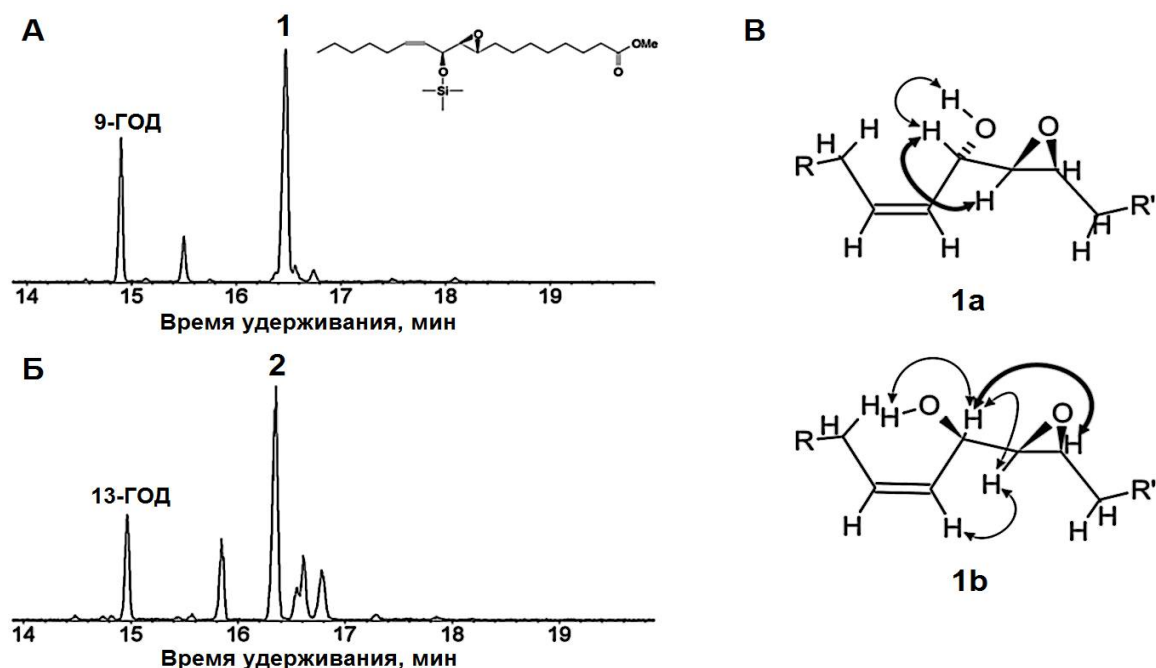


Рис. 15. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TМС после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А) и 13-ГПОД (Б) при участии фермента CYP5164B1 *E. siliculosus* и структуры изомеров соединения **1** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислоты (В), определенные методом ЯМР.

2.11. Каталитические свойства ферментов СУР443D1 и СУР443C1 роющей литоральной актинии *N. vectensis*. Одним из модельных животных организмов является роющая литоральная актиния (*N. vectensis*, Cnidaria). В базе данных NCBI обнаружены белки СУР443D1 (487 аминокислотных остатков; GenBank: XP_001636360.1) и СУР443C1 (485 аминокислотных остатков; GenBank: QJI54761.1), обладающие соответственно 25% и 28,5% идентичности последовательности с ферментом СУР74B16 льна-долгунца (92% и 74% покрытия).

При участии фермента СУР443D1 9-ГПОД (рис. 16А) преобразовывался в соединение **1**, (9*S*,10*R*,11*S*,12*Z*)-9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовую кислоту (ЭАС продукт, определено по данным ЯМР, рис. 17), 9-ГПОТ – в соединение **1a** (9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновую кислоту, ЭАС продукт, рис. 16Б), γ -9-ГПОТ – в соединение **16** (рис. 16В), масс-спектр которого (представлен в диссертации) соответствовал таковому оксиранил карбинола 9,10-эпокси-11-гидрокси-6,12-октадекадиеновой кислоты (эпоксиспирт, ЭАС продукт).

Превращение 13-ГПОД при участии фермента СУР443D1 (рис. 16Г) приводило к образованию *трео* и *эритро*, то есть 11(*S*) и 11(*R*) эпимеров соединения **2** (рис. 17) – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (ЭАС продукт), а также трех изомеров более полярного соединения **7** – 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовой кислоты (ЭАС продукт). Один из трех пиков продукта **7** (наиболее удаленный от 13-ГОД) состоял из двух почти равных изомеров, определенных методом ЯМР как (9*S*) и (9*R*) эпимеры (10*E*,12*R*,13*S*)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовой кислоты.

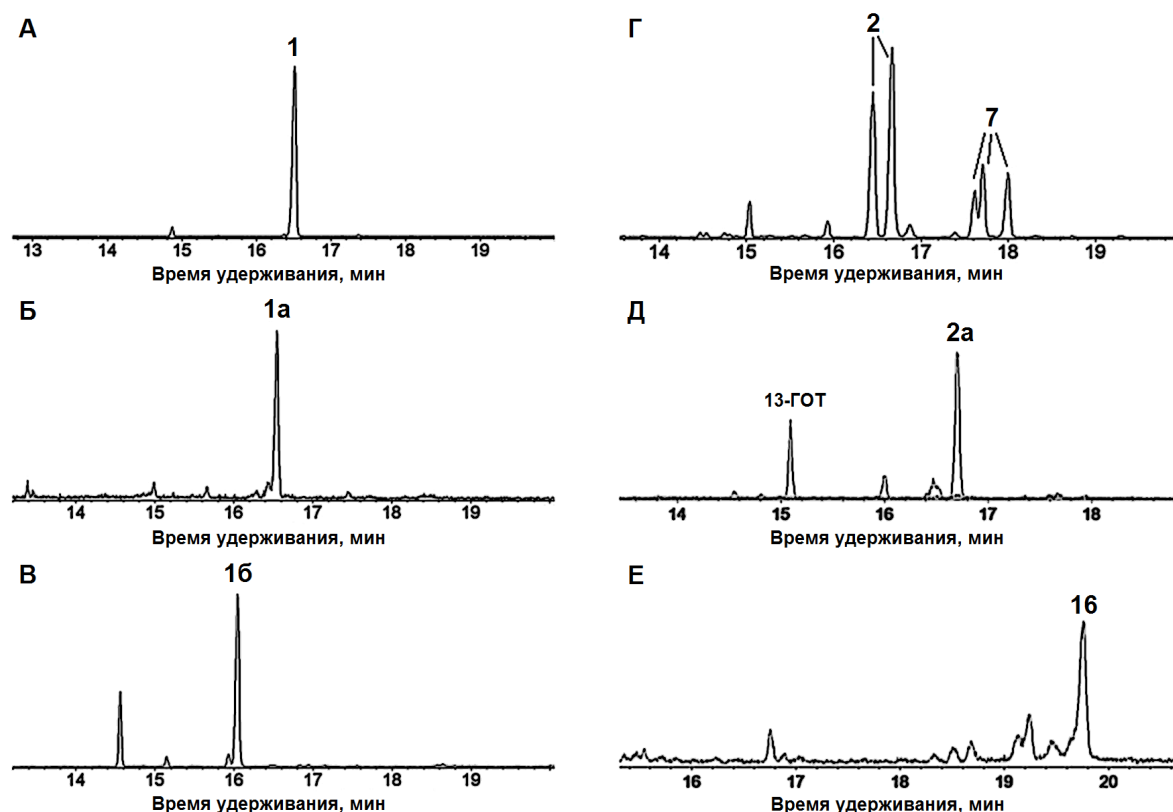


Рис. 16. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TМС после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А), 9-ГПОТ (Б), γ -9-ГПОТ (В), 13-ГПОД (Г), 13-ГПОТ (Д) и 15-ГПЭПЕ (Е) при участии фермента СУР443D1.

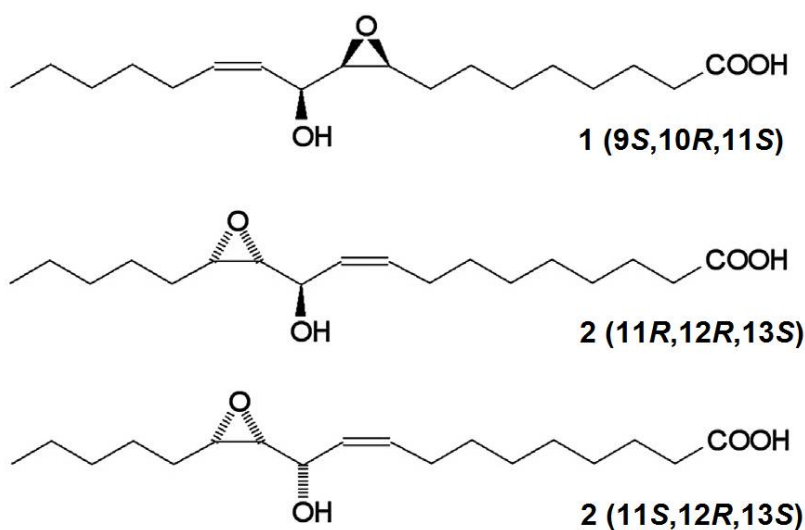


Рис. 17. Детальные структуры некоторых продуктов каталитического действия фермента СУР443D1, определенные методом ЯМР. 1, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; 2, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота.

Превращение 13-ГПОТ при участии фермента СУР443D1 (рис. 16Д) приводило к образованию соединения **2a** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновой кислоты (ЭАС продукт). Инкубация 15-ГПЭПЕ при участии фермента СУР443D1 приводила к слабому выходу продукта **16** (рис. 16Е), масс-спектр которого (представлен в диссертации) соответствовал такому оксиранил карбинола 13-гидрокси-14,15-эпокси-5,8,11,17-эйкозатетраеновой кислоты (эпоксиспирт, ЭАС продукт). Таким образом, фермент СУР443D1 *N. vectensis* является специфичной эпоксиалкогольсинтазой (Torokova *et al.*, 2017б). Ферменту СУР443D1 присвоено тривиальное название NvEAS (ЭАС *N. vectensis*).

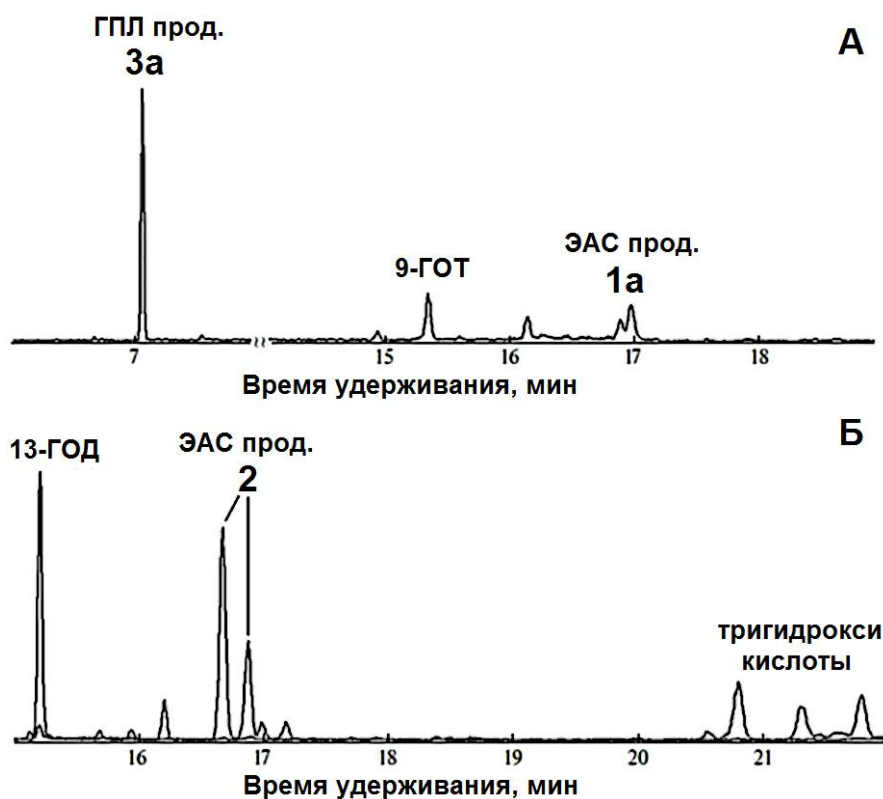


Рис. 18. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TМС после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОТ (А) и 13-ГПОД (Б) при участии фермента СУР443C1.

Инкубация второго фермента *N. vectensis* – СУР443С1 – с 9-ГПОТ (рис. 18А) приводила к образованию основного продукта **3a** (Me/ТМС) – 9-гидроксинанановой кислоты (восстановленный NaBH_4 9-ГПЛ продукт), а также минорного продукта **1a** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновой кислоты (ЭАС продукт). В результате инкубации фермента СУР443С1 с 13-ГПОД (рис. 18Б) происходило образование двух изомеров продукта **2** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (ЭАС продукт), а также тригидроксикислот – продуктов спонтанного гидролиза эпокиспиртов. 9-ГПОД, 13-ГПОТ и 15-ГПЭПЕ при участии фермента СУР443С1 превращались с меньшей эффективностью. Таким образом, фермент СУР443С1 проявляет двойную активность ГПЛ/ЭАС. Ферменту СУР443С1 присвоено тривиальное название NvHPL/EAS (*N. vectensis* ГПЛ/ЭАС) (Горина и др., 2019).

2.12. Каталитические свойства фермента СУР440А18 ланцетника азиатского *B. belcheri*. Первая эпоксиалкогольсинтаза была описана у ланцетника *B. floridae*. В базе данных NCBI у этого вида ланцетника выявлено около 20 последовательностей, сходных с таковыми ферментов СУР74. У других видов ланцетников подобных последовательностей меньше, но тем не менее, их значительное количество. Так, например, у ланцетника азиатского 10 подобных последовательностей, у одной из которых (СУР440А18) последовательности каталитически важных доменов обладают высокой степенью сходства с таковыми ферментов подсемейства СУР74А, в том числе RjEAS. Основными продуктами превращения гидроперекисей С18 жирных кислот при участии фермента СУР440А18 были эпокиспирты (рис. 19), а именно – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая и 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислоты (ЭАС продукты); минорными продуктами – соответствующие α -кетолы.

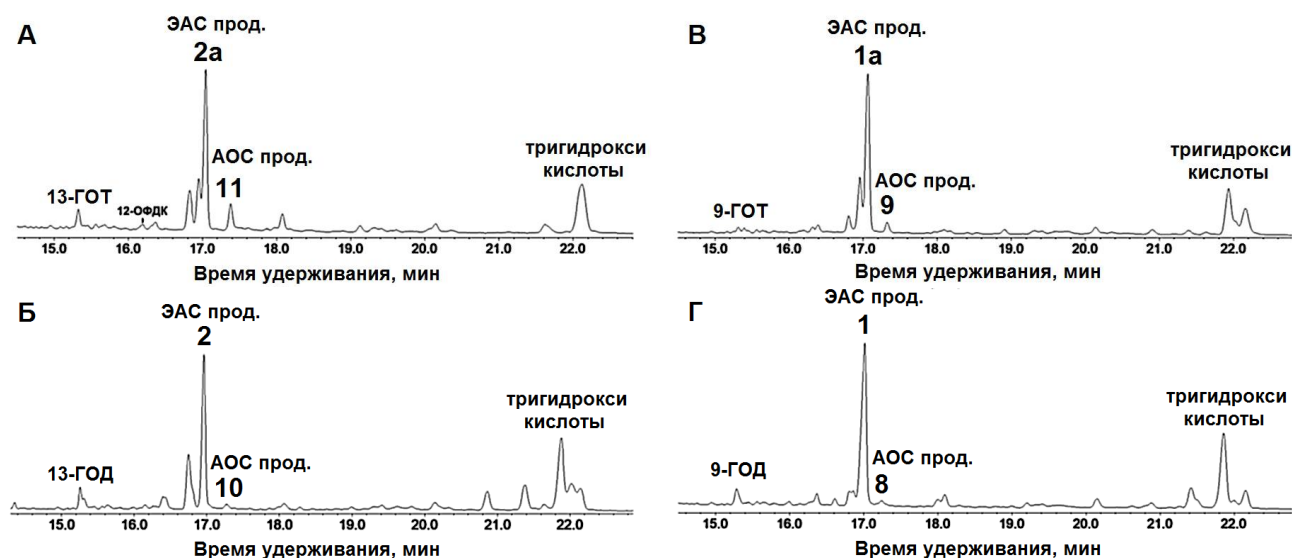


Рис. 19. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/ТМС без восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПОТ (А), 13-ГПОД (Б), 9-ГПОТ (В) и 9-ГПОД (Г) при участии фермента СУР440А18 ланцетника азиатского.

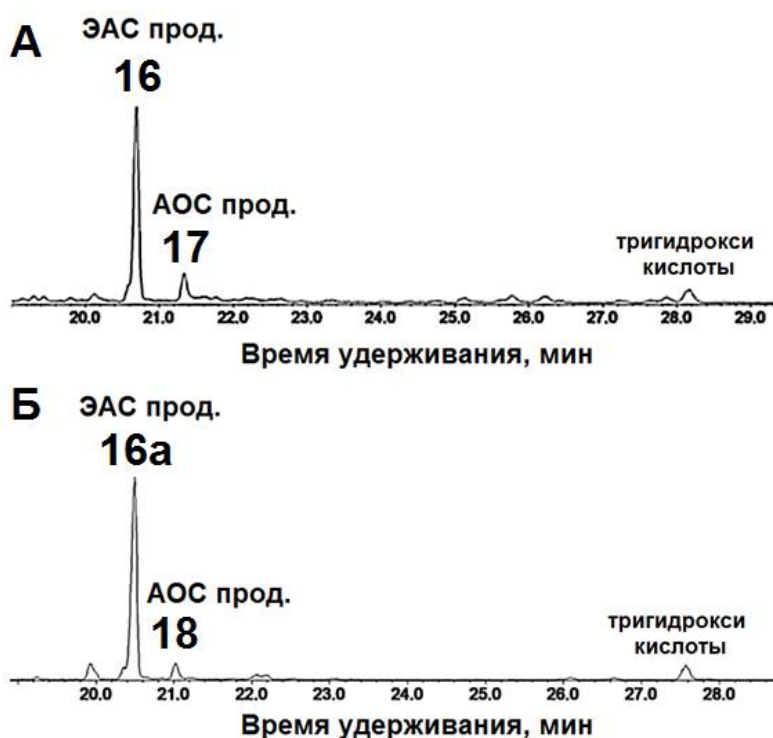


Рис. 20. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS без восстановления NaBH_4) превращения 15-ГПЭПЕ (А) и 15-ГПЭТЕ (Б) при участии фермента СYP440A18 ланцетника азиатского.

Инкубация 15-ГПЭПЕ с ферментом СYP440A18 (рис. 20А) приводила к образованию основного продукта **16** – 13-гидрокси-14,15-эпокси-5,8,11,17-эйкозатетраеновой кислоты (ЭАС продукт) и минорного продукта **17** – α -кетол 14-оксо-15-гидрокси-5,8,11,17-эйкозатетраеновой кислоты, результатом восстановления которого с помощью NaBH_4 была пара соответствующих виц-диолов **17а** и **17б**. Масс-спектры соединений **17** и **17а** представлены в диссертации. Основным продуктом превращения 15-ГПЭТЕ при участии фермента СYP440A18 (рис. 20Б) было соединение **16а**, масс-спектр которого соответствовал таковому 13-гидрокси-14,15-эпокси-8,11,17-эйкозатриеновой кислоты; минорным продуктом – α -кетол **18**, 14-оксо-15-гидрокси-5,8,11-эйкозатриеновая кислота, результатом восстановления которого с помощью NaBH_4 была пара соответствующих виц-диолов **18а** и **18б**. Масс-спектры соединений **16а**, **18** и **18а** представлены в диссертации.

Помимо α -кетолов, алленоксидсинтазная активность фермента СYP440A18 в отношении 13-ГПОТ и 15-ГПЭПЕ приводила также к образованию *цис*-циклопентенонов – *цис*-12-оксо-10,15-фитодиеновой и дигомо-*цис*-12-оксо-3,6,10,15-фитотетраеновой кислот соответственно, масс-спектры которых представлены в диссертации. Описанные результаты указывают на двойную активность эпоксиалкогольсинтазы/алленоксидсинтазы (ЭАС/АОС) фермента СYP440A18 *B. belcheri* (Toporkova *et al.*, 2021). Ферменту СYP440A18 дано название BbEAS/AOS. BbEAS/AOS – второй фермент клана СYP74, обнаруженный у Chordata, после BfEAS (СYP440A1) ланцетника *B. floridae* (Lee *et al.*, 2008), и первый фермент Chordata, проявляющий АОС активность.

2.13. Изучение механизма каталитического действия эпоксиалкогольсинтаз. Чтобы расшифровать механизм каталитического действия эпоксиалкогольсинтаз, проводили эксперименты с использованием меченого ^{18}O . Для этого ферменты инкубировали с $[^{18}\text{O}_2]$

гидроперокси]9-ГПОД. В результате инкубаций синтезировался продукт, масс-спектр которого (Me/TMC), содержал M^+ при m/z 402 (вместо 398 в спектре немеченого продукта) и $[M - Me]^+$ при m/z 387 (вместо 383 в спектре немеченого продукта). На рисунке 21 представлены результаты экспериментов с использованием ^{18}O в отношении EsEAS (CYP5164B1) *E. siliculosus*.

В результате инкубации эпоксиалкогольсинтаз с немеченой гидроперекисью в атмосфере или воде, содержащих меченый ^{18}O , встраивания ^{18}O в продукт не происходило. Результаты свидетельствуют о том, что эпоксиалкогольсинтазы являются изомеразами, а механизм эпоксиалкогольсинтазной реакции протекает через (1) гомолиз гидроперекисной группы; (2) перегруппировку образующегося оксирадикала с образованием эпоксиаллильного радикала; (3) рекомбинацию эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется эпоксиспирт (рис. 22).

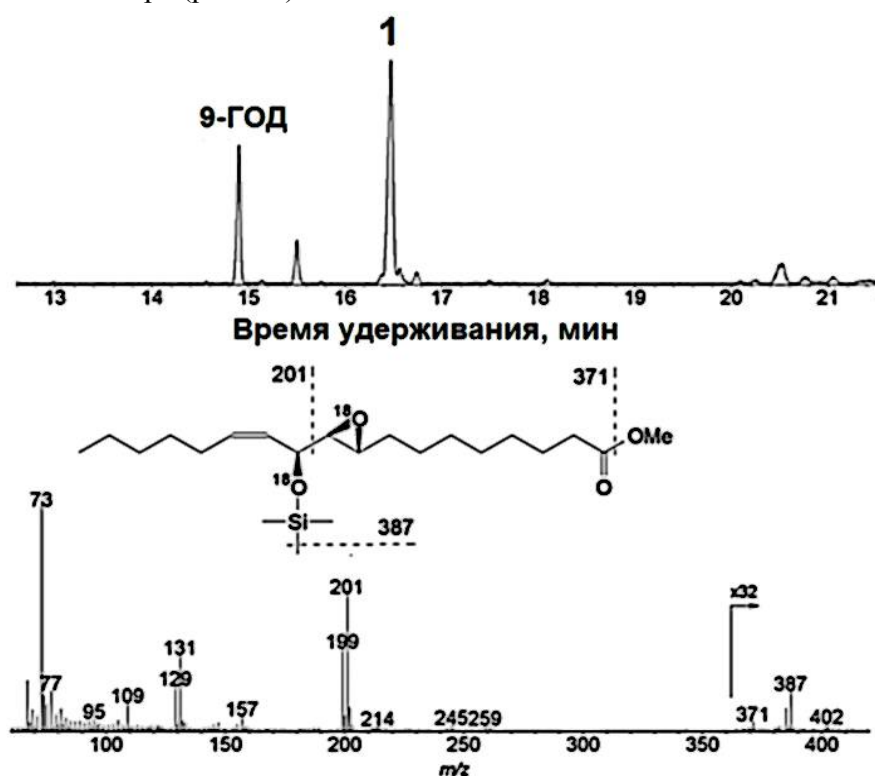


Рис. 21. Результат ГХ-МС анализа продукта инкубации (Me/TMC после восстановления $NaBH_4$) фермента EsEAS с $[^{18}O_2$ -гидроперокси]9-ГПОД. (А) хроматограмма по полному ионному току продукта инкубации (Me/TMC). (Б) Масс-спектр и схема фрагментации продукта 1 (Me/TMC), полученного в результате инкубации EsEAS с $[^{18}O_2$ -гидроперокси]9-ГПОД.

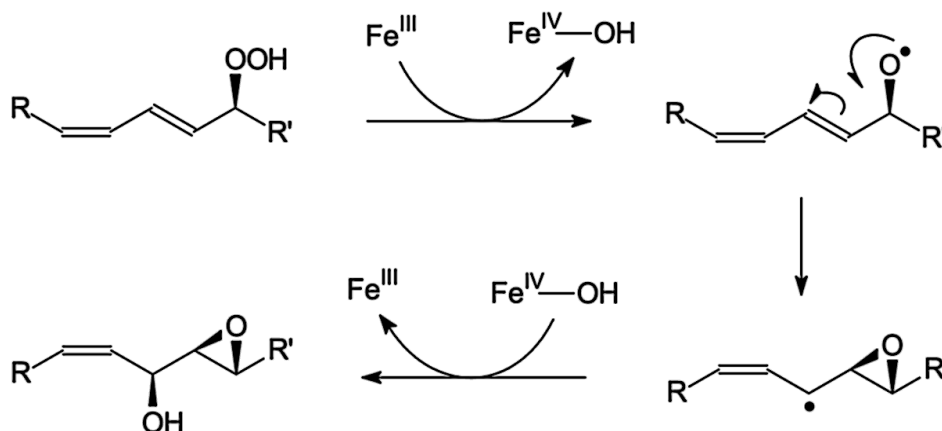


Рис. 22. Механизм реакции, катализируемой ЭАС, на примере EsEAS.

2.14. Филогенетические исследования ферментов CYP74. До недавнего времени классификация ферментов CYP74 была следующей: к подсемействам CYP74A и CYP74B относились 13-специфичные АОС и ГПЛ соответственно, к подсемейству CYP74C – 9- и 9/13-специфичные АОС и ГПЛ, к подсемейству CYP74D – 9-специфичные ДЭС. Кроме того, до настоящей работы были охарактеризованы отдельные представители других подсемейств, такие как, например, дивинилэфирсинтаза AsDES (CYP74H1) чеснока (*Stumpe et al.*, 2008). Результаты настоящей работы расширили список охарактеризованных ферментов CYP74 и усложнили действующую классификацию (рис. 23). Так, показано, что в подсемействе CYP74A также встречаются 13-специфичные ЭАС, в подсемействе CYP74B описаны 13-специфичный фермент с двойной ДЭС/ГПЛ активностью и 9-специфичная АОС.

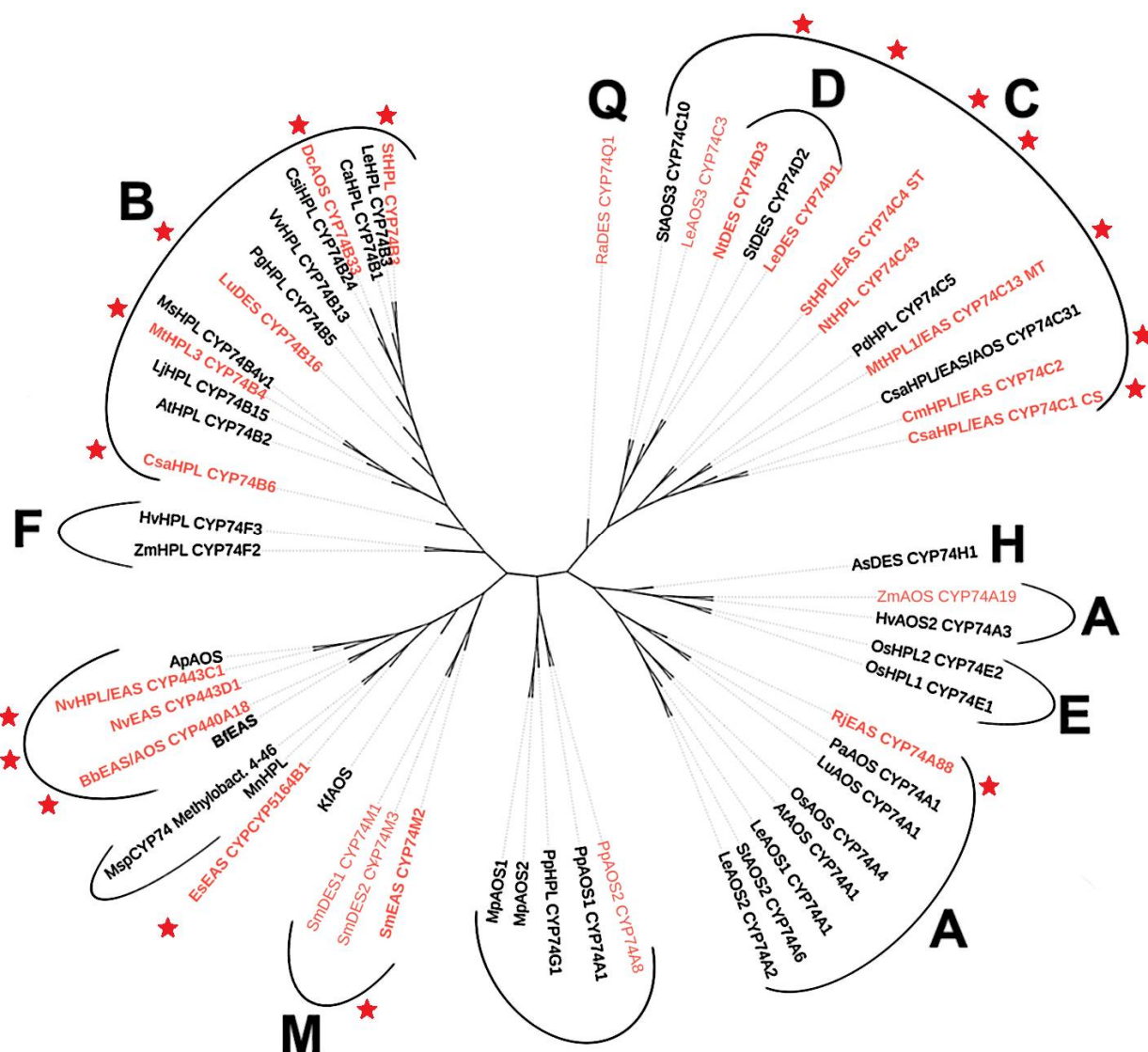


Рис. 23. Неукорененное филогенетическое древо клана CYP74. Подсемейства CYP74 обозначены А, В, С и т.д. Подсемейства, включающие более одного члена, обведены. Красным цветом отмечены охарактеризованные в данной работе ферменты; звездочками – ферменты, проявляющие эпоксиалкогольсинтазную активность.

Кроме того, показано, что ферменты подсемейства CYP74C, ранее аннотированные или описанные как 9/13-специфичные ГПЛ, являются ферментами с двойной ГПЛ/ЭАС активностью. Помимо этого, выявлены и охарактеризованы представители новых подсемейств CYP74M и CYP74Q, а также ферменты, входящие в состав клана, но не семейства CYP74: эпоксиалкоголь-синтазы EsEAS (CYP5164B1) бурой водоросли *E. siliculosus* и NvEAS (CYP443D1) роющей литоральной актинии *N. vectensis*, а также фермент NvHPL/EAS с двойной ГПЛ/ЭАС активностью (CYP443C1) *N. vectensis* и фермент BbEAS/AOS с двойной ЭАС/АОС активностью (CYP440A18) *B. belcheri*.

Выявленные ЭАС, а также ферменты с ЭАС активностью, катализируют образование разных по стереохимии оксиранил карбинолов. У продуктов всех этих ферментов сохраняется исходная (*S*) стереоконфигурация углерода, несущего гидропероксигруппу. При этом растительные ферменты, а также EsEAS, синтезируют в основном (9*S*,10*S*,11*S*)-эпимер эпокиспирта с *транс*-эпоксидом и *эритро*-конфигурацией между эпоксидом и спиртовой группировкой, тогда как ферменты животных, включая охарактеризованную ранее BbEAS (CYP440A1) ланцетника – (*S,R,S*)-стереоизомеры с *цис*-эпоксидом и *трео*-конфигурацией между эпоксидом и спиртовой группировкой.

2.15. Анализ взаимосвязи структуры и каталитических свойств ферментов CYP74 с помощью сайт-направленного мутагенеза. Выравнивание аминокислотных последовательностей охарактеризованных биохимически ферментов семейства CYP74 (рис. 24) позволило предположить корреляцию между аминокислотными остатками в отдельных сайтах (в основном субстрат-распознающих сайтах, CPC (Gotoh, 1992)) и типом катализируемой реакции. Например, сайт «F/L toggle», локализующийся в CPC-1 (Gotoh, 1992) вблизи N-конца, у всех АОС содержит остаток фенилаланина, в то время как у всех известных ГПЛ и ДЭС – остаток лейцина.

			*	123456▼		
CsAOS	(145)	KVEKKDLFTGTYMPVT	(317)	RLGISREEACHNLLFTTCFNSFGGMKIFFPNMIKWIGRAG		
GmAOS	(131)	KVEKKDVFTGTFTMPST	(303)	RLGITRDEACHNLLFATCFNSFGGMKLFFPNVLKWIGRAG		
HbAOS	(137)	KVEKKDLFTGTFTMPST	(309)	KMGISREEACHNLLFATCFNTFGGLKIFFPNILKWIGRAG		
HnAOS	(111)	KVEKKDLFTGTFTMPST	(283)	KLGISRDEACHNLLFATCFNSFGGMKIFFPNMMKSIKAG		
LjAOS	(140)	KVDKTDVFTGTFTMPST	(312)	RLGVSREEACHNLLFATCFNSLGGMKLFFPNVLKWIGRGG		
AtAOS	(130)	KVEKKDLFTGTYMPST	(302)	KLGISREEATHNLLFATCFNTWGGMKILFFPNMVKRIGRAG		
LeAOS2	(124)	KVEKKDLFTGTFTVPST	(296)	KLGISKDEACHNLLFATCFNSFGGMKIFFPNMLKSIKAG		
CYP74C13_MT	(90)	KVEKRDVLDGTFTMPST	(296)	KLGISKDEACHNLLFATCFNSFGGMKIFFPNMLKSIKAG		
CYP74C13_Gm	(86)	KVDKRDVLDGTFTMPST	(262)	RVGIKRDEACHNLVFMLSFNAQGGVLVNQFPILIKWLAG		
CYP74C4_ST	(102)	KVEKKNVLDGTFTMPST	(278)	KSGIKRDEACHNLVFLAGFNAYGGMKILFPSLMKWVASGG		
CYP74C1_CS	(86)	KVEKRNILDGTYPSTL	(261)	KQGIDREKACHNLVFLAGFNAYGGMKVLFPITLLKWVGTGG		
CYP74C2	(89)	KVEKRNILDGTYPSTL	(264)	KQGIDREKACHNLVFLAGFNAYGGMKVLFPITLLKWVGTAG		
CYP74C31	(91)	KVEKRNVLDGTYPSTL	(265)	KQGINREKACHNLVFLAGFNAYAGMKVLLPILINWVGSAG		
LeHPL	(97)	IVEKANVLVGDFMPSV	(271)	EFQLTEQEAIHNLWFILGFNAFGGFSIFLPTLLGNLGDEK		
CjHPL	(120)	IVEKKNILVGDFMPSV	(294)	EFGLTKEEAIHNLWFILGFNAFGGFSIFVVPKLINATASDT		
NtHPL	(115)	IVEKANVLVGDFMPSV	(289)	EFGLTEQEAIHNLWFILGFNAFGGFSIFLPTLLGNLGDEK		
AtHPL	(111)	LVDKRDVLIGDFRPSL	(286)	EFRLTRDEAIQNLLFVLGFNAFGGFSVFLPSLIGRITGDN		
PgHPL	(112)	IVEKSNVLVGDFMPSV	(286)	EFGLTHQEAIHNLWFILGFNAFGGFSIFLPTLLSNILSDT		
CYP74B16	(95)	IADKKDTLLGDFMPSV	(270)	EYGLTEEEAIHNLWFVLAFNSFEGFTLEIPKLLTRLLSDS		

Рис. 24. Множественное выравнивание частичных последовательностей CYP74: CPC-1 (слева) и I-спирали (справа). Участок перегиба I-спирали (CPC-4) пронумерован 1–6, первый остаток глицина после участка перегиба I-спирали, консервативный для всех АОС и ГПЛ, отмечен символом ▼, сайт «F/L toggle» (CPC-1) отмечен звездочкой.

Второй каталитически важный домен – участок перегиба I-спирали – у ферментов с определенным типом каталитической активности имеет консервативную структуру. Для определения первичных детерминантов каталитической активности, в первую очередь эпоксиалкогольсинтазной активности, использовали метод сайт-направленного мутагенеза.

2.16. Каталитические свойства мутантных форм ферментов CYP74C13_MT, CYP74C1_CS и CYP74C31. Было получено по три мутантных формы трех ферментов подсемейства CYP74C: CYP74C13_MT L97F, CYP74C13_MT TCFNSF и CYP74C13_MT L97F/TCFNSF; CYP74C1_CS L93F, CYP74C1_CS G283A и CYP74C1_CS L93F/G283A; CYP74C31 L98F, CYP74C31 A287G и CYP74C31 L98F/A287G. Все описанные мутантные формы сохранили высокую каталитическую активность, которая в некоторых случаях превышала активность соответствующего фермента дикого типа. Замена участка перегиба I-спирали на TCFNSF в последовательности фермента CYP74C13_MT практически не меняла специфичность катализа по сравнению с ферментом дикого типа (рис. 25А). В отличие от этого, мутантная форма CYP74C13_MT L97F проявляла хорошую АОС активность в отношении 9-ГПОД (рис. 25Б). Эта мутантная форма превращала 9-ГПОД в α -кетол (соединение 8), 9-оксононановую кислоту (соединение 3) и 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовую кислоту (соединение 1) в соотношении 28: 14: 58. В свою очередь, сочетание мотива TCFNSF и мутации L97F привело к еще большей АОС активности (87%) (рис. 25В).

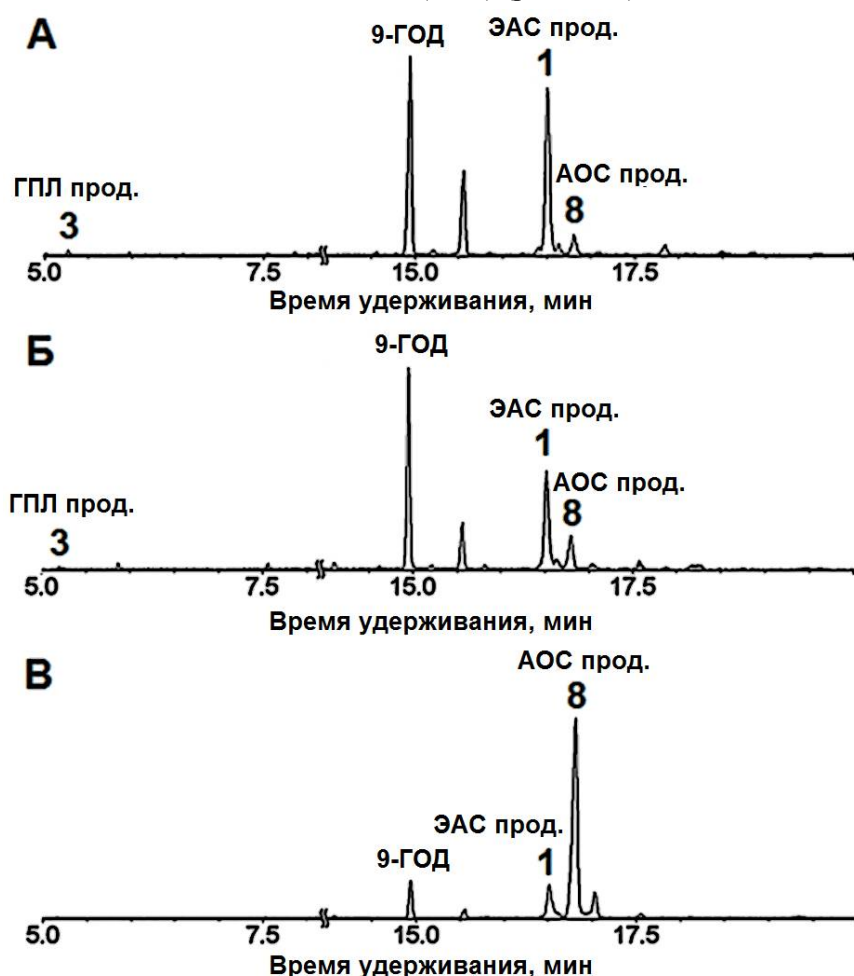


Рис. 25. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC) превращения 9-ГПОД при участии мутантных форм CYP74C13_MT TCFNSF (А), L97F (Б) и L97F/TCFNSF (В).

Все мутантные формы ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 обладали в основном АОС активностью в отношении 9-ГПОД и 9-ГПОТ, за исключением мутантных форм CYP74C1_CS G283A и CYP74C31 A287G, которые вели себя как высокоспецифичные ГПЛ в отношении 9-ГПОТ. При этом почти все мутантные формы (за исключением CYP74C1_CS L93F и CYP74C1_CS G283A/L93F) обладали преобладающей ГПЛ активностью в отношении 13-ГПОТ. Мутантная форма CYP74C1_CS L93F катализировала превращение 13-ГПОТ в α -кетол, а CYP74C1_CS G283A/L93F – примерно в равные количества ГПЛ и АОС продуктов. Другая ситуация наблюдалась с 13-ГПОД. Мутантные формы CYP74C1_CS G283A и CYP74C31 A287G, а также CYP74C31 A287G/L98F обладали в основном ГПЛ активностью, тогда как оба мутанта по сайту «F/L toggle», а также CYP74C1_CS G283A/L93F обладали преимущественно АОС активностью (Toporkova *et al.*, 2018a).

2.17. Изучение влияния сайта «F/L toggle» на каталитические свойства алленоксид-синтаз подсемейств CYP74A и CYP74C. Для получения дополнительной информации о роли сайта «F/L toggle» на специфичность действия ферментов CYP74 проводили обратную мутацию у некоторых АОС из подсемейств CYP74A и CYP74C и получили мутантные формы LeAOS3 F108L, ZmAOS1 F95L, LuAOS F155L и PrAOS2 F93L. В результате инкубации мутантной формы LeAOS3 F108L с 9-ГПОД наряду с α -кетолом **8** и 10-ОФЕК – продуктами каталитического действия фермента дикого типа (рис. 26А) образовывалось соединение **1** (рис. 26Б) – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота (ЭАС продукт).

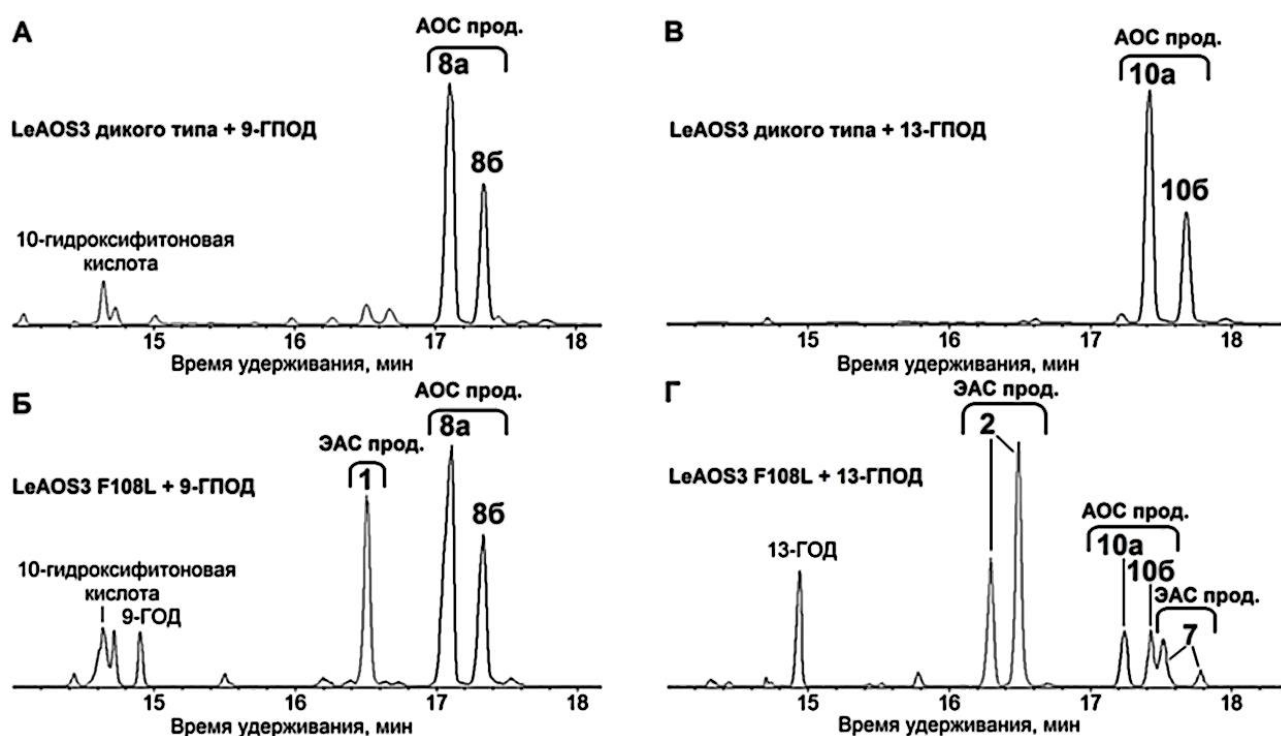


Рис. 26. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А и Б) и 13-ГПОД (В и Г) при участии LeAOS3 дикого типа (А и В) и мутантной формы LeAOS F108L (Б и Г).

Инкубация мутантной формы LeAOS3 F108L с 13-ГПОД (рис. 26Г) приводила к появлению двух основных изомеров соединения **2** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (ЭАС продукт), а также минорных продуктов: 12,13-диола **10a** и **10б** (восстановленные NaBH₄ 13-АОС продукты) и трех изомеров соединения **7** – (10*E*)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовой кислоты (ЭАС продукт). Таким образом, мутантная форма LeAOS3 F108L обладала двойной активностью АОС/ЭАС, и ЭАС активность была основной при инкубации мутантной формы с 13-ГПОД (Горина и др., 2018; Toporkova *et al.*, 2020б).

В то же время, мутантная форма PrAOS2 F93L в отношении 9-ГПОТ (рис. 27Б) не проявляла АОС активность. В реакции образовывался преобладающий продукт **4a** – 9,10-эпокси-13-гидрокси-11,15-октадекадиеновая кислота (ЭАС продукт) и минорные продукты **1a** и **3a** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота (ЭАС продукт) и 9-гидроксинонановая кислота (восстановленный NaBH₄ 9-ГПЛ продукт) соответственно. Результаты инкубации мутантной формой PrAOS2 F93L с 9-ГПОД были аналогичными. Таким образом, основной активностью мутантной формы PrAOS2 F93L в отношении 9-гидроперекисей являлась ЭАС активность. Мутантная форма ZmAOS1 F95L сохранила АОС активность в отношении 9-гидроперекисей. Однако наряду с виц-диолами в хроматограмме продуктов инкубации мутантной формы ZmAOS1 F95L с 9-ГПОТ (рис. 27В) выявлены соединения **1a** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота (ЭАС продукт) и **3a** – 9-гидроксинонановая кислота (восстановленный NaBH₄ 9-ГПЛ продукт). Результаты инкубации мутантной формой ZmAOS1 F95L с 9-ГПОД были аналогичными.

Инкубация 13-гидроперекисей с ZmAOS1 F95L и PrAOS2 F93L (после восстановления NaBH₄) приводила к образованию основных продуктов **5a** и **6a** – (9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценовой и (10*E*)-12-гидрокси-10-додеценовой кислот соответственно (восстановленные NaBH₄ 13-ГПЛ продукты). Кроме того, превращение 13-ГПОД при участии PrAOS2 F93L (рис. 27Д) приводило к образованию меньшего количества α-кетол и двух изомеров соединения **2** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (ЭАС продукт). В то же время, превращение 13-ГПОТ мутантной формой PrAOS2 F93L не приводило к образованию эпоксиспиртов. Продукты превращения 13-ГПОД (рис. 27Е) и 13-ГПОТ при участии ZmAOS1 F95L были аналогичными таковым превращения 13-ГПОД при участии PrAOS2 F93L (Toporkova *et al.*, 2020б).

2.18. Изменение каталитической активности алленоксидсинтазы LeAOS3 томата в результате сайт-направленного мутагенеза в участке перегиба I-спирали (CPC-4) и ERR-триаде. Для проверки значимости последовательности каталитически важного участка перегиба I-спирали, а также ERR-триады (другого каталитически важного домена) в проявлении разных типов каталитической активности, в первую очередь эпоксиалкогольсинтазной, у ферментов CYP74, мы получили мутантные формы LeAOS3 S297A, K302S, F295I, D359R и T366Y и проверили особенности их каталитического действия в сравнении с ферментом дикого типа. В результате инкубации мутантной формы LeAOS3 F295I с 9-ГПОД основной алленоксидсинтазный продукт, α-кетол **8**, не был выявлен (рис. 28А). Вместо этого, мутантная форма F295I продуцировала только соединение **3** – 9-оксононановую кислоту (ГПЛ продукт). Таким образом, мутация F295I превратила алленоксидсинтазу в гидропероксидлиазу. Мутантные формы LeAOS3 S297A и K302S также проявляли активность ГПЛ.

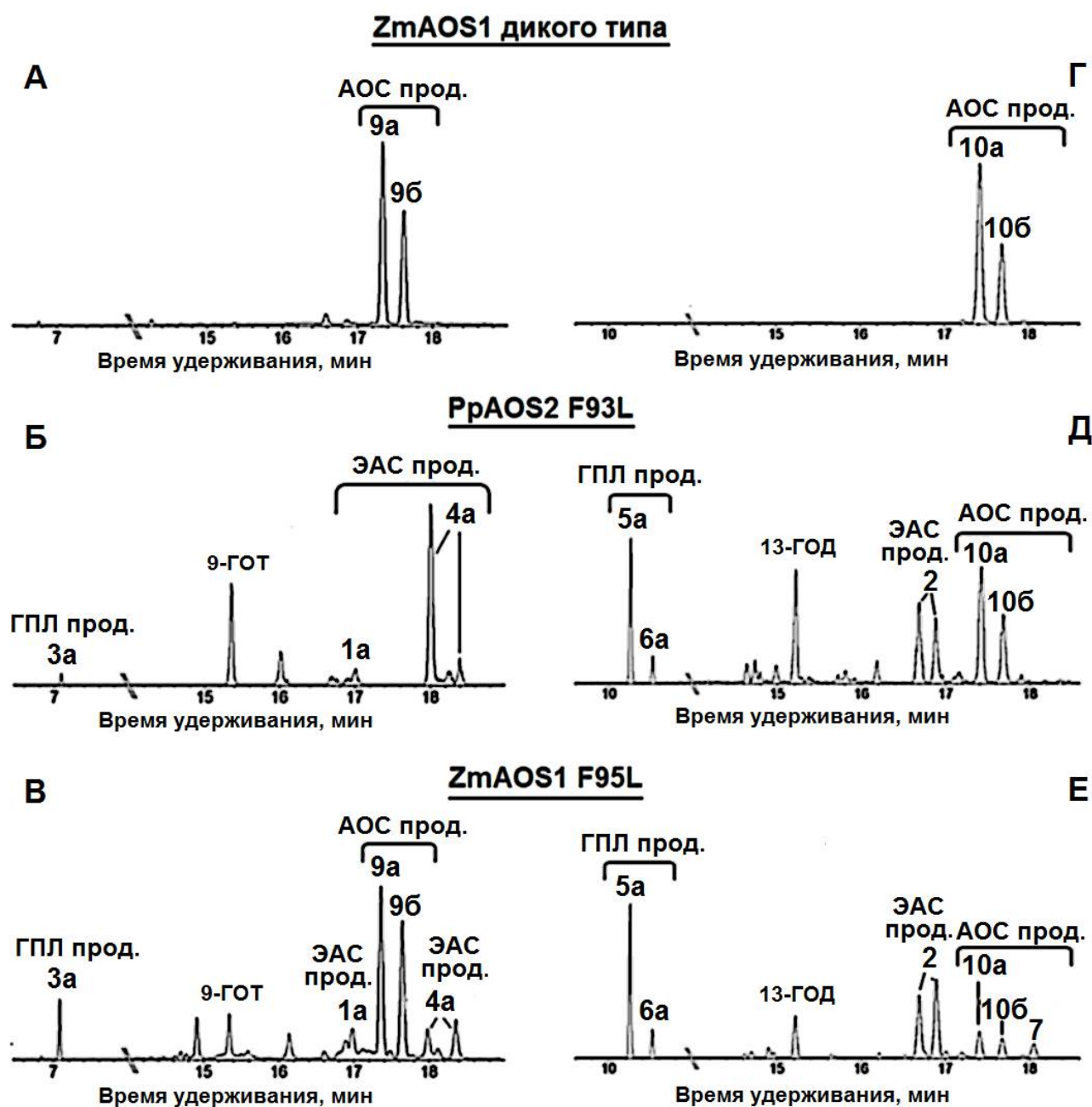


Рис. 27. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОТ при участии ZmAOS1 дикого типа (А), PrAOS2 F93L (Б) и ZmAOS1 F95L (В) и 13-ГПОД при участии ZmAOS1 дикого типа (Г), PrAOS2 F93L (Д) и ZmAOS1 F95L (Е).

Они продуцировали 9-оксононановую кислоту в качестве основного продукта (рис. 28Б и В) и α -кетол **8** в качестве минорного продукта. Мутантная форма LeAOS3 T366Y проявлял двойную активность ГПЛ и АОС, продуцируя соизмеримое количество 9-оксононановой кислоты **3** и α -кетол **8** в качестве продуктов реакции (рис. 28Г). Продуктов других каталитических активностей выявлено не было.

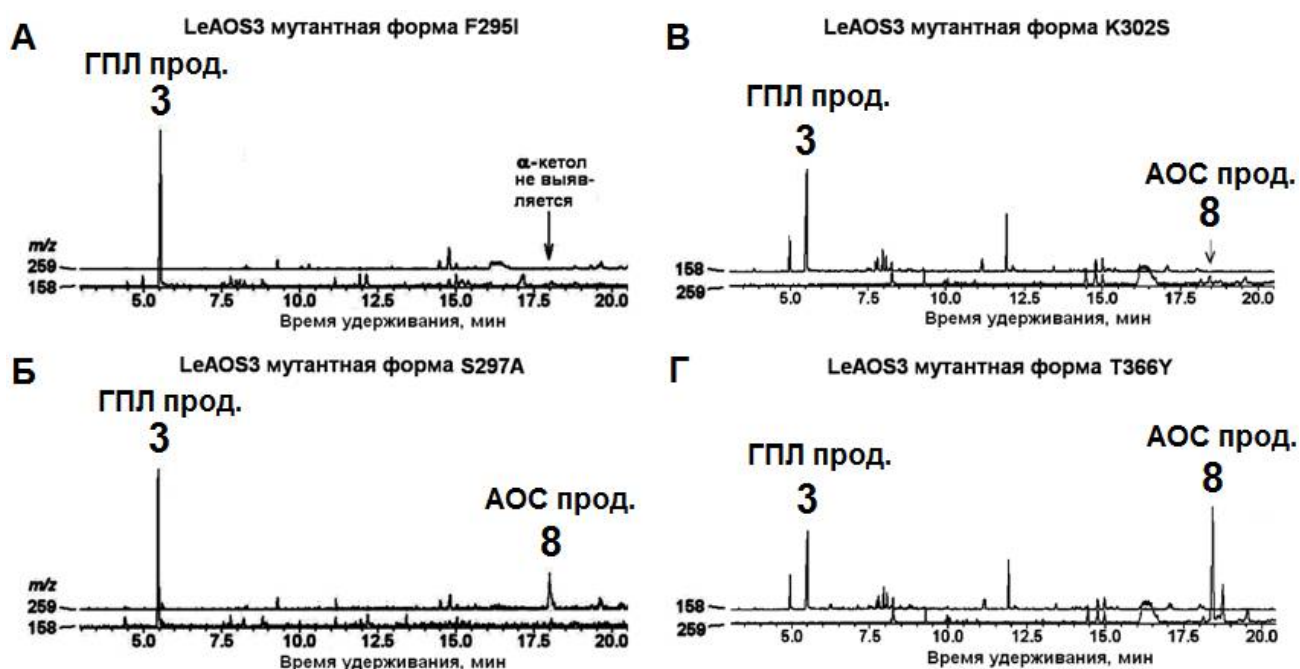


Рис. 28. Хроматограммы продуктов (Me/TMC) превращения 9-ГПОД при участии мутантных форм LeAOS3 F295I (А), S297A (Б), K302S (В) и T366Y (Г).

2.19. Изменения каталитической активности NtDES и фермента CYP74B16 в результате сайт-направленного мутагенеза. Дивинилэфирсинтазы содержат в своих последовательностях ряд замен, кардинально отличающих их от АОС и ГПЛ, например, сайт, следующий после участка перегиба I-спирали, в котором все АОС и ГПЛ содержат остаток глицина, тогда как ДЭС – другой, больший по размеру остаток. Для проверки этого сайта в качестве первичной детерминанты катализа CYP74 провели замену в этом сайте в последовательности фермента CYP74B16 льна-долгунца и получили мутантную форму CYP74B16 E292G. Мутантная форма CYP74B16 E292G катализировала превращение 13-ГПОТ в α -кетол **11**, (9Z,15Z)-12-оксо-13-гидрокси-9,12-октадекадиеновую кислоту (АОС продукт), а также *транс*- и *цис*-изомеры 12-ОФДК (АОС продукт) вместо дивинилового эфира (рис. 29, Ермилова и др., 2013; Toropkova *et al.*, 2013).

Кроме того, внутри ERR-триады выявили дополнительную гипотетическую первичную детерминанту катализа CYP74. Для проверки значимости этого сайта в формировании типа каталитической активности получили мутантную форму NtDES V379F. Основным продуктом превращения 9-ГПОД при участии этой мутантной формы (рис. 29) был α -кетол **8**, 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовая кислота (АОС продукт). Помимо α -кетола, в реакции образовывались колнелевая кислота (12,4% всех продуктов, ДЭС продукт) и 9-оксононановая кислота (3,1% всех продуктов, ГПЛ продукт). Таким образом, мутантные формы CYP74B16 E292G и NtDES V379F проявляли преимущественно АОС активность (Ермилова и др., 2013; Toropkova *et al.*, 2013).

Для получения дополнительной информации о значимости участка перегиба I-спирали в формировании типа каталитической активности получили дополнительных мутантов фермента CYP74B16 по сайтам участка перегиба I-спирали CYP74B16 A287G и F291V.

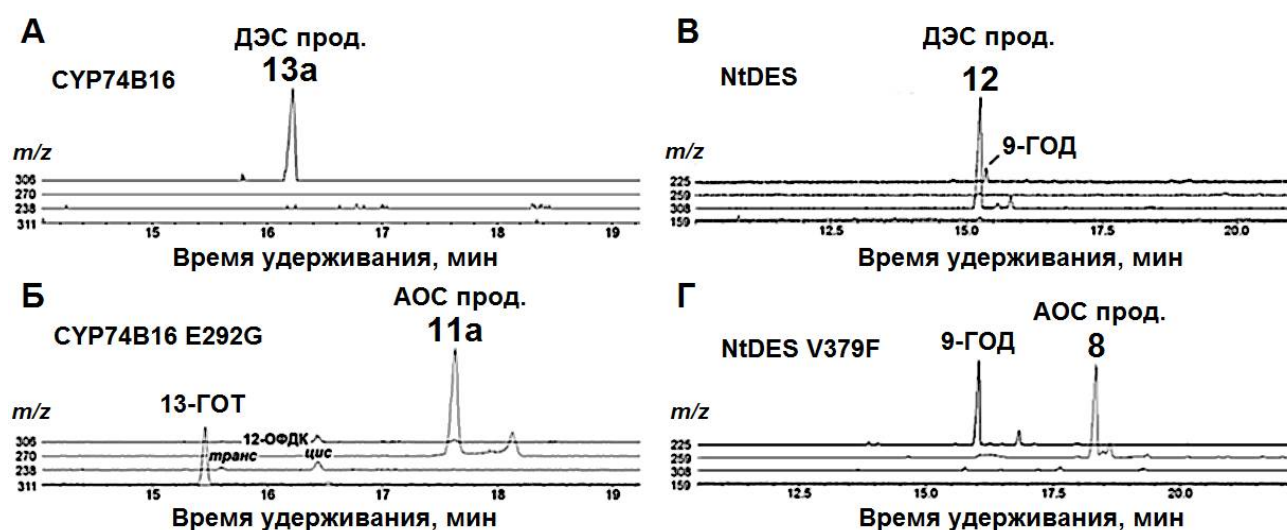


Рис. 29. Хроматограммы продуктов (Ме/ТМС) превращения 13-ГПОТ при участии фермента CYP74B16 дикого типа (А) и его мутантной формы CYP74B16 E292G (Б), а также 9-ГПОД при участии NtDES дикого типа (В) и его мутантной формы NtDES V379F (Г).

Оба мутанта привели к практически полной потере ДЭС активности и увеличению ГПЛ и ЭАС активностей. На рисунке 30 представлены результаты, полученные для мутантной формы CYP74B16 A287G. Результаты, полученные для мутантной формы CYP74B16 F291V, являются аналогичными. Неожиданным оказалось увеличение каталитической активности обоих мутантов в отношении 9-ГПОД и 9-ГПОТ по сравнению с ферментом дикого типа. Оба мутанта проявляли основную ЭАС и минорную ГПЛ активности в отношении этих субстратов.

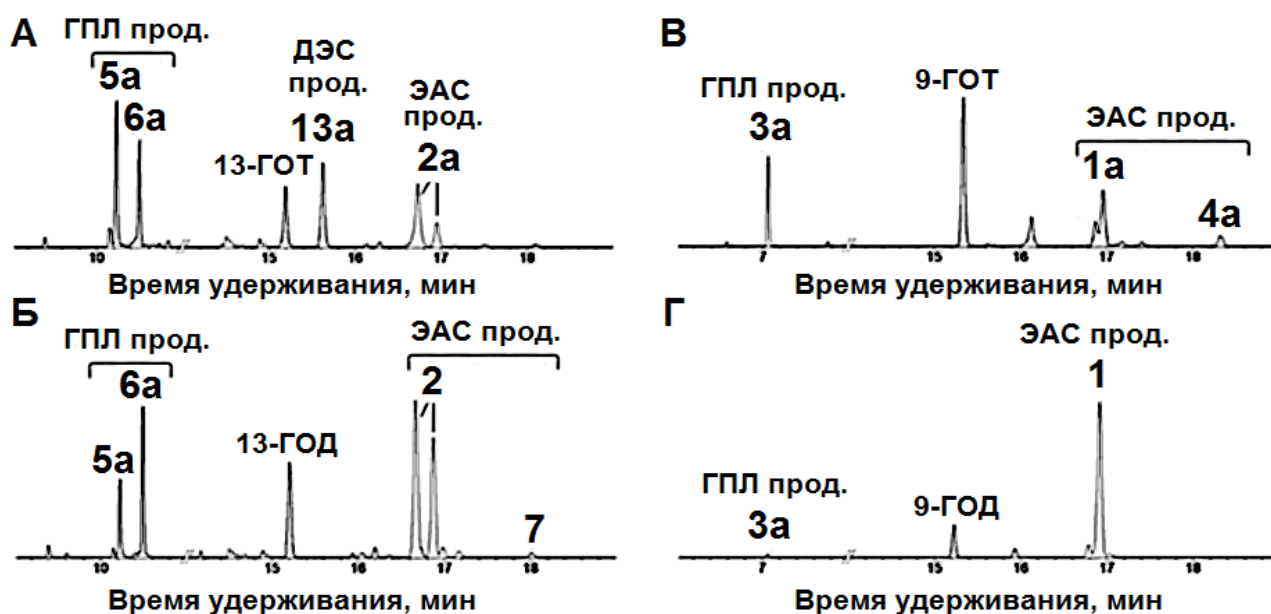


Рис. 30. Хроматограммы продуктов (Ме/ТМС после восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПОТ (А), 13-ГПОД (Б), 9-ГПОТ (В) и 9-ГПОД (Г) при участии мутантной формы CYP74B16 A287G.

Полученные результаты свидетельствуют о значимости сайта «F/L toggle» (CPC-1), участка перегиба I-спирали (CPC-4) и ERR-триады в катализе CYP74. Совокупность этих доменов можно рассматривать как своеобразные «отпечатки пальцев» ферментов CYP74, позволяющие (как правило) предсказать тип каталитической активности по последовательности. Однако, по-видимому, наряду с описанными участками на катализ CYP74 также влияют некоторые другие каталитически важные домены.

Результаты сайт-направленного мутагенеза указывают на тесную взаимосвязь разных типов катализа. Две начальные стадии катализа являются общими для всех ферментов CYP74. Во-первых, перекисная группировка подвергается гомолитическому расщеплению с образованием промежуточного алкоксильного радикала, в то время как отщепленный гидроксильный радикал связывается с гемовым железом (III) с образованием «соединения II», FeIV-OH. Во-вторых, алкоксильный радикал перегруппируется в эпоксиаллильный радикал (рис. 31). Эпоксиаллильный радикал является общим промежуточным продуктом CYP74 (рис. 31). В зависимости от первичной структуры фермента эпоксиаллильный радикал подвергается либо (1) окислению с последующей потерей протонов с образованием окиси аллена (АОС путь); либо (2) рекомбинации с гидроксильным радикалом с образованием эпокиспирта (ЭАС путь); либо гомолитическому раскрытию оксирана с образованием винилоксикарбинильного радикала, который (3) рекомбинирует с гидроксильным радикалом с образованием полуацетала (ГПЛ путь), либо (4) окисляется и теряет протоны с образованием дивинилового эфира (ДЭС путь).

В результате экспериментов по сайт-направленному мутагенезу были проведены (частично или полностью) качественные изменения катализа CYP74: алленоксидсинтаз – в гидропероксидлиазы либо эпоксиалкогольсинтазы, ферментов с двойной ГПЛ/ЭАС активностью – в алленоксидсинтазы; дивинилэфирсинтаз – в алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы либо эпоксиалкогольсинтазы, что позволило сделать предположение об эволюции реакций, катализируемых ферментами CYP74. Эволюция реакций, по-видимому, шла по пути эпоксиалкогольсинтазная – гидропероксидлиазная – алленоксидсинтазная – дивинилэфирсинтазная. С точки зрения молекулярной эволюции эпоксиалкогольсинтазная реакция, вероятно, является базовой, а остальные реакции по очереди надстраивались в процессе видоизменения этой базовой реакции в результате дополнительного влияния боковых групп новых аминокислот, появляющихся в ходе эволюции в результате точечных мутаций. Результаты сайт-направленного мутагенеза – это моделирование обратного процесса – реверсий. А в результате, например, нескольких одновременных замен нам удалось смоделировать эволюцию гидропероксидлиазной реакции до алленоксидсинтазной.

Часть полученных в результате сайт-направленного мутагенеза мутантов, как и некоторые ферменты CYP74 дикого типа, обладает двумя или тремя активностями. Возможное объяснение этому может быть в конформационной пластичности цитохромов P450 в целом, которая позволяет им адаптироваться к разным субстратам. Для большей части цитохромов P450 главной функцией является утилизация потенциально вредных и опасных молекул. Поскольку организм может сталкиваться все с новыми и новыми подобными соединениями – возможными субстратами P450, а образование новых ферментов P450 не может идти с той же скоростью, должна быть возможность утилизировать эти молекулы.



К первой группе относятся алленоксидсинтазы – ферменты, специфически продуцирующие окиси аллена, которые, в свою очередь, являются предшественниками, как минимум, трех известных групп метаболитов: жасмонатов, цикlopентенонов и кетолов. Для жасмонатов и цикlopентенонов на данный момент установлена роль в сигнальных процессах внутри организма;

кетолы остаются пока недостаточно изученными. Таким образом, алленоксидсинтазы можно назвать ферментами сигналинга.

Вторая группа – ферменты, участвующие в процессах защиты организма от изменений условий окружающей среды – включает гидропероксидлиазы, эпоксиалкогольсинтазы и дивинилэфирсинтазы. Продукты ГПЛ реакции выполняют функции сигналов между растением и другими организмами (летучие соединения), а также проявляют заживляющие свойства (альдо-кислоты). Продукты ЭАС и ДЭС реакций изучены наименее подробно, однако для ряда продуктов этих ветвей показаны антимикробные и фунгицидные свойства. При этом в одном ферменте CYP74 могут сочетаться несколько типов активности – ГПЛ и ЭАС, ДЭС и ГПЛ, а также все три типа активности, но, тем не менее, наблюдаются сочетания, как правило, только «защитных» активностей. Такие сочетания дают организмам преимущества при формировании защитных ответов, поскольку одновременно синтезируется широкий спектр защитных соединений – заживляющих, сигнальных (между организмами), антимикробных и фунгицидных.

Дивинилэфирсинтазы являются, по-видимому, самой молодой группой ферментов CYP74, представители которой встречаются у небольшого числа филогенетически отдаленных видов. При этом существуют как специфические ДЭС, так и ферменты, объединяющие несколько типов активностей, включая ДЭС. Филогенетическое расположение разных ДЭС и разнообразие их структур указывает на их независимое происхождение, и, по-видимому, в некоторых случаях эволюция пошла по пути специализации на синтезе исключительно дивиниловых эфиров, в других случаях – по пути формирования ферментов с двойной или тройной функцией.

Древнее происхождение ферментов CYP74 подтверждается особенностями механизмов каталитического действия, структуры и филогенетического положения. Практически все цитохромы P450 являются монооксигеназами и для их каталитического действия необходимы молекулярный кислород, окислительно-восстановительный партнер и непосредственно окисляемый субстрат. Уникальной особенностью всех ферментов CYP74 является отсутствие необходимости в молекулярном кислороде, а также окислительно-восстановительных потенциалах. Гидроперекись жирной кислоты является одновременно источником того и другого. Вследствие этого, каталитический цикл ферментов CYP74 является более простым по сравнению с таковым классических цитохромов P450.

Гем-связывающий домен ферментов CYP74 по сравнению с остальными цитохромами P450 содержит дополнительный мотив из девяти аминокислотных остатков. С эволюционной точки зрения, делеция девяти аминокислотных остатков является более вероятным событием, чем встраивание. Гипотезу о древнем происхождении CYP74 подтверждает также тот факт, что локализация современных ферментов семейства в значительной степени связана с хлоропластами, являющимися потомками первых фотосинтезирующих организмов (Feussner, Wasternack, 2002). Кроме того, мы построили филогенетическое древо цитохромов P450 (представлено в диссертации), чтобы выяснить место, занимаемое на нем ферментами CYP74. Для построения были взяты все цитохромы P450 четырех организмов: *C. sativus* (Cs), *S. moellendorffii* (Sm), *N. vectensis* (Nv) и *E. siliculosus* (Es). На древе клан CYP74 находится в корне. То есть, данные филогенетического анализа также подтверждают, что ферменты CYP74 являются наиболее древними из всех современных цитохромов P450.

Первой обнаруженной эпоксиалкогольсинтазой был фермент CYP440A1 (BfEAS) ланцетника, входящий в состав клана CYP74. Обнаружение эпоксиалкогольсинтаз клана CYP74 у растений, животных и бурых водорослей свидетельствует, что эти ферменты являются достаточно древней группой ферментов, которые появились еще до разделения растений и животных. Результаты экспериментов по сайт-направленному мутагенезу указывают на то, что эпоксиалкогольсинтазы являются наиболее древними ферментами CYP74. Таким образом, как мы предполагаем, ферменты CYP74 являются потомками древних кислород-независимых цитохромов P450, существовавшими уже около 850 млн лет назад (до разделения линий эукариот), а эпоксиалкогольсинтазы – наиболее древними среди ферментов CYP74.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липоксигеназный каскад прочно занимает свое достойное место среди других жизненно необходимых систем, являясь источником таких широко изучаемых оксипинов как, например, жасмонаты, летучие соединения и травматин у растений, а также простагландины, простациклины и тромбоксаны у животных. Однако многие широко распространенные продукты этого биохимического пути остаются практически неизученными: не известны пути их биосинтеза и дальнейшего превращения, биологические свойства. Подобная ситуация наблюдается в отношении эпокиспиртов, которые обнаружены у широкого круга организмов, принадлежащих разным таксонам. Ферменты, ответственные за синтез этих соединений, оставались неизвестными до настоящей работы, несмотря на достаточно подробную изученность липоксигеназного каскада, как минимум, у ряда объектов. В результате проделанной работы у растений и организмов, принадлежащих другим таксонам, у которых ранее были обнаружены эпокиспирты – продукты эпоксиалкогольсинтазной активности – были выявлены и описаны ферменты, ответственные за их образование. Охарактеризованы истинные эпоксиалкогольсинтазы, входящие в состав как семейства CYP74, так и клана CYP74. Показано, что ряд охарактеризованных ранее как алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы или дивинилэфирсинтазы ферментов CYP74 проявляют дополнительную эпоксиалкогольсинтазную активность. Установление этого факта объясняет отсутствие эпоксиалкогольсинтаз у растений, у которых выявлены эпокиспирты – продукты эпоксиалкогольсинтазной ветви липоксигеназного каскада. При этом наличие двух активностей у одного фермента (как правило, гидропероксидлиазной и эпоксиалкогольсинтазной) позволяет растению применять одновременно более широкий спектр соединений, участвующих в защите – заживляющих, сигнализирующих об опасности и непосредственно защитных (антимикробных и фунгицидных).

В целом, в результате проделанной работы охарактеризован ряд эпоксиалкогольсинтаз у растений и животных, а также значительно большее число ферментов с другими типами каталитической активности – алленоксидсинтаз, гидропероксидлиаз и дивинилэфирсинтаз, проявляющих эпоксиалкогольсинтазную активность в качестве дополнительной. Проведены исследования их структуры, механизмов каталитического действия, а также филогении, показавшие в том числе, что растительные эпоксиалкогольсинтазы и ферменты, проявляющие эпоксиалкогольсинтазную активность, относятся к семейству CYP74, в то время как нерастительные ферменты относятся к другим семействам, входящим совместно с семейством CYP74 в клан CYP74. Выяв-

лена определенная закономерность проявления дополнительной эпоксиалкогольсинтазной активности у ферментов CYP74 разных подсемейств: у ферментов CYP74C, описанных ранее как гидропероксидлиазы, эпоксиалкогольсинтазная активность, как правило, является одной из двух основных наравне с гидропероксидлиазной, тогда как у ферментов CYP74B и CYP74D эпоксиалкогольсинтазная активность является дополнительной минорной активностью. С помощью экспериментов с использованием меченого ^{18}O был расшифрован механизм эпоксиалкогольсинтазной реакции и показано, что этот механизм протекает через (1) гомолиз гидроперекисной группы; (2) перегруппировку образующегося оксирадикала с образованием эпоксиаллильного радикала; (3) рекомбинацию эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется эпокиспирт. Таким образом, эпоксиалкогольсинтазы являются изомеразми. Результаты филогенетических исследований свидетельствуют, что эпоксиалкогольсинтазы и ферменты, проявляющие эпоксиалкогольсинтазную активность в качестве дополнительной, не группируются вместе, а распределены по древу равномерно. Результаты детального изучения структуры оксиранил карбинолов, синтезируемых при участии растительных и животных ферментов, свидетельствуют, что растительные эпоксиалкогольсинтазы, а также EsEAS бурой водоросли *E. siliculosus*, синтезируют, в основном, (*S,S,S*)-эпимеры эпокиспиртов (*транс*-эпоксиды), тогда как BfEAS и NvEAS – (*S,R,S*)-стереоизомеры с *цис*-эпоксидом.

Синтез оксиранил карбинолов, основных продуктов эпоксиалкогольсинтаз, является прототипическим превращением гидроперекисей жирных кислот. Об этом свидетельствует тот факт, что синтез оксиранил карбинолов происходит неферментативно в присутствии кислот, металлов с переходной валентностью, гемовых белков и при нагревании, однако с гораздо меньшей скоростью, чем при участии эпоксиалкогольсинтаз. У эпоксиалкогольсинтаз клана CYP74 скорость превращения сопоставима с остальными ферментами CYP74. Вследствие вышесказанного, можно предположить, что эпоксиалкогольсинтазы являются прототипическими ферментами метаболизма гидроперекисей жирных кислот.

Первой обнаруженной эпоксиалкогольсинтазой был фермент CYP440A1 (BfEAS) ланцетника, входящий в состав клана CYP74. Обнаружение эпоксиалкогольсинтаз клана CYP74 у растений и бурых водорослей означает, что эти ферменты являются достаточно древней группой ферментов, которые появились еще до разделения растений и животных.

Помимо эпоксиалкогольсинтаз, в ходе выполнения работы получены рекомбинантные дивинилэфирсинтазы разных видов и исследованы их биохимические свойства. Дивинилэфирсинтазы также представляют собой разнородную группу ферментов, различающуюся по структуре, специфичности образования продуктов и филогении.

Кроме того, показана возможность превращения ферментов в результате сайт-направленного мутагенеза: алленоксидсинтаз – в гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы; ферментов с двойной активностью гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы – в алленоксидсинтазы; дивинилэфирсинтаз – в алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы. Результаты этой работы свидетельствуют о родстве механизмов каталитического действия всех ферментов CYP74 и могут способствовать разработке алгоритмов направленной модификации белков с целью получения ферментов с заданными свойствами.

Полученные фундаментальные знания о механизмах превращений гидроперекисей жирных кислот, катализируемых гемовыми белками, также вносят существенный вклад в понимание функционирования липоксигеназного каскада, продукты которого – оксипирины – играют важную роль в клеточной сигнализации и адаптации организмов к биогенным и абиогенным стрессовым факторам. В ходе выполнения работы были получены фундаментальные знания о липоксигенажном каскаде хозяйственно значимых культурных растений и модельных организмов, о новых оксипиринах, механизмах биосинтеза оксипиринов, в том числе сигнальных соединений, которые могут быть ответственны за адаптацию организмов к действию неблагоприятных факторов. Полученные результаты в дальнейшем могут способствовать разработке методов получения биологически активных оксипиринов, например, средств химической и биологической защиты сельскохозяйственных растений, а также фармацевтических препаратов нового поколения.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружен новый тип ферментов клана CYP74 – эпоксиалкогольсинтазы растений, животных и бурых водорослей.
2. Установлено, что эпоксиалкогольсинтазы являются изомеразми. Эксперименты по включению ^{18}O выявили механизм каталитического действия эпоксиалкогольсинтаз, включающий следующие стадии: (1) гомолиз гидроперокси-группы; (2) перегруппировка образующегося оксирадикала в эпоксиаллильный радикал; (3) рекомбинация эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом с образованием эпокиспирта.
3. Показано, что растительные эпоксиалкогольсинтазы, а также EsEAS бурой водоросли *E. siliculosus*, синтезируют, в основном, (S,S,S)-эпимеры эпокиспиртов (*транс-эрипто*), тогда как BfEAS и NvEAS – (S,R,S)-стереоизомеры (*цис-трео*).
4. Выявлены и охарактеризованы две истинные эпоксиалкогольсинтазы растений: SmEAS (CYP74M2) плаунка *Selaginella moellendorffii* и RjEAS (CYP74A88) лютика японского (*Ranunculus japonicus*); две эпоксиалкогольсинтазы клана CYP74: EsEAS (CYP5164B1) бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* и NvEAS (CYP443D1) роющей литоральной актинии (*Nematostella vectensis*), а также фермент CYP443C1 *N. vectensis* с двойной активностью гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы и фермент CYP440A18 ланцетника азиатского (*Branchiostoma belcheri*) с двойной активностью эпоксиалкогольсинтазы и алленоксидсинтазы.
5. Установлено, что ферменты подсемейства CYP74C, ранее описанные как 9/13-специфичные гидропероксидлиазы, являются ферментами с двойной активностью гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы в зависимости от используемого субстрата.
6. Установлено, что гидропероксидлиазы подсемейства CYP74B проявляют минорную эпоксиалкогольсинтазную активность. Специфичность образования продуктов зависит от наличия (ω3)-двойной связи.
7. Установлено, что дивинилэфирсинтазы подсемейства CYP74D проявляют минорную эпоксиалкогольсинтазную активность; фермент CYP74B16 льна-долгунца (*Linum usitatissimum*) является ферментом с двойной активностью дивинилэфирсинтазы и гидропероксидлиазы и минорной эпоксиалкогольсинтазной активностью в зависимости от используемого субстрата.

8. Выявлены и охарактеризованы следующие ферменты CYP74: 13-специфичные дивинилэфирсинтазы RaDES (CYP74Q1) лютика едкого (*Ranunculus acris*), SmDES1 (CYP74M1) и SmDES2 (CYP74M3) плаунка *Selaginella moellendorffii*; 9-специфичная алленоксидсинтаза DcAOS (CYP74B33) моркови (*Daucus carota*), проявляющая минорные эпоксиалкогольсинтазную и гидропероксидлиазную активности и 9/13-специфичная гидропероксидлиаза NtHPL (CYP74C43) табака (*Nicotiana tabacum*), проявляющая минорную эпоксиалкогольсинтазную активность.
9. С помощью сайт-направленного мутагенеза проведены следующие превращения ферментов семейства CYP74: алленоксидсинтаз в гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы; ферментов с двойной активностью гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы – в алленоксидсинтазы; дивинилэфирсинтаз – в алленоксидсинтазы либо ферменты с двойной активностью гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы.
10. Результаты экспериментов по сайт-направленному мутагенезу подтверждают возможность приобретения новых каталитических свойств ферментами CYP74 в процессе эволюции в результате дупликаций и мутаций.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Toporkova Y.Y.**, Askarova, E.K., Gorina, S.S., Ogorodnikova, A.V., Mukhtarova, L.S. & Grechkin, A.N. Epoxyalcohol synthase activity of the CYP74B enzymes of higher plants //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2020. – Т. 1865. – №. 9. – С. 158743. DOI: 10.1016/j.bbalip.2020.158743
2. **Toporkova Y.Y.**, Smirnova, E.O., Mukhtarova, L.S., Gorina, S.S. & Grechkin, A.N. Catalysis by allene oxide synthases (CYP74A and CYP74C): alterations by the Phe/Leu mutation at the SRS-1 region //Phytochemistry. – 2020. – Т. 169. – С. 112152. DOI: 10.1016/j.phytochem.2019.112152
3. **Toporkova Y.Y.**, Smirnova, E.O., Iljina, T.M., Mukhtarova, L.S., Gorina, S.S. & Grechkin, A.N. The CYP74B and CYP74D divinyl ether synthases possess a side hydroperoxide lyase and epoxyalcohol synthase activities that are enhanced by the site-directed mutagenesis //Phytochemistry. – 2020. – Т. 179. – С. 112512. DOI: 10.1016/j.phytochem.2020.112512
4. **Toporkova Y.Y.**, Smirnova, E.O., Lantsova, N.V., Mukhtarova, L.S. & Grechkin, A.N. Detection of the First Epoxyalcohol Synthase/Allene Oxide Synthase (CYP74 Clan) in the Lancelet (*Branchiostoma belcheri*, Chordata) //International journal of molecular sciences. – 2021. – Т. 22. – №. 9. – С. 4737. DOI: 10.3390/ijms22094737
5. Gorshkov V.Y., **Toporkova Y.Y.**, Tsers I.D., Smirnova E.O., Ogorodnikova A.V., Gogoleva N.E. ... & Gogolev Y.V. Differential modulation of the lipoxygenase cascade during typical and latent *Pectobacterium atrosepticum* infections //Annals of Botany. – 2021 – mcab108. DOI: 10.1093/aob/mcab108
6. **Топоркова Я.Ю.**, Фатыхова В.С., Горина С.С., Мухтарова Л.Ш., Гречкин А.Н. Эпоксиалкогольсинтаза RjEAS (CYP74A88) лютика японского (*Ranunculus japonicus*): клонирование и характеристика каталитических свойств // Биохимия – 2019. – Т. 84(2). – С. 269-280. DOI: 10.1134/S0320972519020106

7. Gorina S.S., Mukhitova F.K., Ilyina T.M., **Toporkova Y.Y.** & Grechkin A.N. Detection of unprecedented allene oxide synthase member of CYP74B subfamily: CYP74B33 of carrot (*Daucus carota*) //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2019. – Т. 1864. – №. 11. – С. 1580-1590. DOI: 10.1016/j.bbalip.2019.07.004
8. Горина С.С., **Топоркова Я.Ю.**, Мухтарова Л.Ш., Гречкин А.Н. Цитохром CYP443C1 (клан CYP74) актинии *Nematostella vectensis* – первый фермент Metazoa, проявляющий двойную активность гидропероксидлиазы/эпоксиспиральсинтазы // Доклады Академии наук – 2019. – Т. 486(3). – С. 384-388. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524863384-388>
9. **Toporkova Y.Y.**, Gorina S.S., Bessolitsyna E.K., Smirnova E.O., Fatykhova V.S., Brühlmann F. ... & Grechkin, A.N. Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2018. – Т. 1863. – №. 4. – С. 369-378. DOI: 10.1016/j.bbalip.2018.01.002
10. **Toporkova Y.Y.**, Smirnova E.O., Gorina S.S., Mukhtarova L.S., & Grechkin A.N. Detection of the first higher plant epoxyalcohol synthase: Molecular cloning and characterisation of the CYP74M2 enzyme of spikemoss *Selaginella moellendorffii* //Phytochemistry. – 2018. – Т. 156. – С. 73-82. DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.08.010
11. Горина С.С., Смирнова Е.О., Мухтарова Л.Ш., **Топоркова Я.Ю.**, Гречкин А.Н. Превращение алленоксидсинтазы LeAOS3 (CYP74C3) томата в эпоксиспиральсинтазу в результате сайт-специфического мутагенеза // Доклады Академии наук – 2018. – Т. 483(3) – С. 342-345. DOI 10.31857/S086956520003262-1
12. **Toporkova Y.Y.**, Fatykhova V.S., Gogolev Y.V., Khairutdinov B.I., Mukhtarova L.S. & Grechkin A.N. Epoxyalcohol synthase of *Ectocarpus siliculosus*. First CYP74-related enzyme of oxylipin biosynthesis in brown algae //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2017. – Т. 1862. – №. 2. – С. 167-175. DOI: 10.1016/j.bbalip.2016.11.007
13. **Toporkova Y.Y.**, Gorina S.S., Mukhitova F.K., Hamberg M., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S. & Grechkin A.N. Identification of CYP443D1 (CYP74 clan) of *Nematostella vectensis* as a first cnidarian epoxyalcohol synthase and insights into its catalytic mechanism //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2017. – Т. 1862. – №. 10. – С. 1099-1109. DOI: 10.1016/j.bbalip.2017.07.015
14. Gorina S.S., **Toporkova Y.Y.**, Mukhtarova L.S., Smirnova E.O., Chechetkin I.R., Khairutdinov B.I. ... & Grechkin A.N. Oxylipin biosynthesis in spikemoss *Selaginella moellendorffii*: molecular cloning and identification of divinyl ether synthases CYP74M1 and CYP74M3 //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2016. – Т. 1861. – №. 4. – С. 301-309. DOI: 10.1016/j.bbalip.2016.01.001
15. Ogorodnikova A.V., Gorina S.S., Mukhtarova L.S., Mukhitova F.K., **Toporkova Y.Y.**, Hamberg M., Grechkin A.N. Stereospecific biosynthesis of (9S,13S)-10-oxo-phytoenoic acid in young maize roots // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2015. – Т. 1851. – №. 9. – С. 1262-1270. DOI: 10.1016/j.bbalip.2015.05.004
16. Gorina S.S., **Toporkova Y.Y.**, Mukhtarova L.S., Chechetkin I.R., Khairutdinov B.I., Gogolev Y.V. & Grechkin A.N. Detection and molecular cloning of CYP74Q1 gene: Identification of *Ranuncu-*

lus acris leaf divinyl ether synthase //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2014. – Т. 1841. – №. 9. – С. 1227-1233. DOI: 10.1016/j.bbalip.2014.05.005

17. Ермилова В.С., Горина С.С., Осипова Е.В., **Топоркова Я.Ю.**, Мухтарова Л.Ш., Гоголев Ю.В., Гречкин А.Н. Изменение каталитических свойств дивинилэфирсинтаз в результате единичных аминокислотных замен // Доклады Академии наук. – 2013. – Т.452 (5). – С. 567-570. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0869565213300233>

18. **Топоркова Y.Y.**, Ermilova V.S., Gorina S.S., Mukhtarova L.S., Osipova E.V., Gogolev Y.V. & Grechkin A.N. Structure–function relationship in the CYP74 family: conversion of divinyl ether synthases into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis //FEBS letters. – 2013. – Т. 587. – №. 16. – С. 2552-2558. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.06.030

19. Gogolev Y.V., Gorina S.S., Gogoleva N.E., **Топоркова Y.Y.**, Chechetkin I.R. & Grechkin A.N. Green leaf divinyl ether synthase: gene detection, molecular cloning and identification of a unique CYP74B subfamily member //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2012. – Т. 1821. – №. 2. – С. 287-294. DOI: 10.1016/j.bbalip.2011.11.003

20. Grechkin A.N. Lantsova N.V., **Топоркова Y.Y.**, Gorina S.S., Mukhitova F.K. & Khairutdinov B.I. Novel Allene Oxide Synthase Products Formed via Favorskii-Type Rearrangement: Mechanistic Implications for 12-Oxo-10,15-phytodienoic Acid Biosynthesis //ChemBioChem. – 2011. – Т. 12. – №. 16. – С. 2511-2517. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100346>

21. Гоголев Ю.В., Горина С.С., Гоголева Н.Е., **Топоркова Я.Ю.**, Мухтарова Л.Ш., Чечеткин И.Р., Гречкин А.Н. Выявление и первичная характеристика нового цитохрома CYP74B1 льна (*Linum usitatissimum*) // Доклады Академии наук. – 2011. – Т. 440(4). – С. 540-543. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1607672911050085>

22. **Топоркова Я.Ю.**, Осипова Е.В., Мухтарова Л.Ш., Гоголев Ю.В., Гречкин А.Н. Изменение катализа ферментов подсемейства CYP74C в результате сайт-направленного мутагенеза. // Доклады Академии наук. – 2010. – Т.435(1). – С.117-120.