

На правах рукописи

Фатыхова Валерия Сергеевна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА
ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗЫ СУР5164В1 БУРОЙ ВОДОРΟΣЛИ
*Ectocarpus siliculosus***

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2017

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

Научный руководитель: академик РАН, заведующий лабораторией оксилипинов КИББ КазНЦ РАН, г. Казань
Александр Николаевич Гречкин

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, исполняющий обязанности ведущего научного сотрудника лаборатории фотоокисления воды ИФПБ РАН, г. Пущино
Татьяна Викторовна Савченко

доктор биологических наук, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва
Алексей Евгеньевич Соловченко

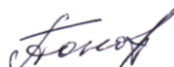
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов

Защита состоится 28 марта 2017 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д002.005.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки КИББ КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я № 30, тел/факс (843)2927347, e-mail: dissovet@kibb.knc.ru

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

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Анастасия Анатольевна Пономарева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Оксипирины являются физиологически активными соединениями, образуемыми в результате окислительной трансформации полиненасыщенных жирных кислот. У животных оксипирины формируются главным образом в рамках каскада реакций превращения арахидоновой кислоты; они играют важную роль в воспалительных процессах, ответах на инфекции и другие стрессовые факторы, при развитии аллергических реакций, реакций на действие лекарств и ксенобиотиков и др. Растения не имеют многих защитных механизмов, свойственных иммунной системе животных. При этом у растений обнаружены принципиально другие, достаточно сложные и эффективные механизмы защиты, в работе которых одну из главных ролей играют оксипирины. Эти биологически активные соединения могут функционировать либо в качестве сигнальных молекул, либо защитных веществ, часто проявляя сочетание тех и других свойств. Поскольку стрессовая устойчивость является важнейшей характеристикой жизнестойкости растений, изучение биосинтеза растительных оксипиринов и их биологической активности, несомненно, является актуальным.

Оксипирины синтезируются при участии липоксигеназ и цитохромов P450 семейства CYP74 (Grechkin, 1998; Brash 2009). Семейство CYP74 включает только ферменты растений, разделяемых на три типа: дегидразы – алленоксидсинтазы (АОС) и дивинилэфирсинтазы (ДЭС), а также изомеразы – гидропероксидлиазы (ГПЛ). К настоящему времени охарактеризовано несколько десятков ГПЛ и АОС, а также несколько ДЭС разных видов растений. Однако разнообразие генов семейства CYP74 в геномах различных организмов предполагает и другие типы катализа. Это предположение основано на разработанной ранее модели механизма катализа, согласно которой общим промежуточным соединением в реакции является эпоксиаллильный радикал. Исходя из этого, среди продуктов липоксигеназного каскада с высокой вероятностью могут быть обнаружены эпокиспирты и их производные – тригидроксикислоты.

Недавно в классификации ферментов CYP74 произошли значительные изменения. Ряд нерастительных цитохромов P450 различных семейств, наряду с растительными ферментами семейства CYP74, были объединены в клан CYP74 на основании данных филогенетического анализа. В состав клана CYP74, помимо АОС, ГПЛ и ДЭС, был включен также фермент эпоксиалкогольсинтаза (ЭАС) ланцетника (*Branchiostoma floridae*) (BfEAS, CYP440A1, GenBank: ACD88492.1) (Lee *et al.*, 2008), катализирующий новый тип реакции. Этот фермент катализирует превращение гидроперекисей жирных кислот в эпокиспирты.

К настоящему времени складывается предположение о древнем происхождении ферментов CYP74, которое подтверждают пластидная локализация большинства ферментов CYP74, особенности структуры и каталитического действия этих ферментов по сравнению с остальными цитохромами P450, а также данные филогенетических исследований. Дополнительным доказательством является тот факт, что представители клана CYP74 описаны у широкого ряда организмов, в том числе у животных (Lee *et al.*, 2008), растений (Hughes *et al.*, 2009), грибов (Hoffmann *et al.*, 2013), протеобактерий (Lee *et al.*, 2008). В то же время, оксипирины обнаружены у гораздо большего числа организмов (Andreou *et al.*, 2009; Barbosa *et al.*, 2016), в том числе у бурых и красных водорослей (Gerwick, 1994, 1999; Gerwick, Singh, 2002). При этом в ряде случаев структура оксипиринов таких организмов совпадает с таковой зеленых растений, что указывает

на возможное сходство ферментов, ответственных за их образование. Исходя из этой гипотезы, эволюция липоксигеназного каскада с участием ферментов СУР74 началась до разделения основных ветвей эукариот и протекала линейно в соответствии с общей эволюцией организмов. Бурые водоросли представляют одну из пяти эукариотических линий происхождения, которые имеют независимо развившийся комплекс многоклеточности (остальными четырьмя являются животные, грибы, зеленые растения и красные водоросли). Поэтому предположение о наличии у представителей данной группы организмов ферментов, родственных ферментам клана СУР74, соответствует гипотезе линейной эволюции липоксигеназного каскада. В широком смысле, выявление подобных ферментов у бурых водорослей является актуальной задачей с точки зрения изучения эволюции не только клана СУР74, но и липоксигеназного каскада, и суперсемейства цитохромов Р450 в целом. Эффективность подобных работ во многом определяется возможностями биоинформационного анализа. К настоящему времени геном одного из представителей бурых водорослей – *Ectocarpus siliculosus* является полностью расшифрованным, что обусловило выбор этого вида объектом настоящего исследования.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является выявление фермента, близкородственного представителям клана СУР74, у бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* и его сравнительная характеристика с ферментами СУР74 высших растений. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявление фермента *E. siliculosus*, близкородственного представителям клана СУР74; клонирование кодирующей области гена и получение очищенного препарата функционально активного соответствующего рекомбинантного фермента.

2. Характеристика особенностей каталитического действия рекомбинантного фермента *E. siliculosus*. Определение субстратной специфичности и константы каталитической для данного фермента. Расшифровка механизма каталитического действия фермента *E. siliculosus*.

3. Определение положения фермента *E. siliculosus*, близкородственного представителям клана СУР74, в молекулярно-филогенетической модели суперсемейства цитохромов Р450.

4. Выявление сайтов, консервативных для фермента *E. siliculosus*, близкородственного представителям клана СУР74, и растительных ферментов СУР74 со сходной субстратной специфичностью.

5. Получение очищенных препаратов мутантных форм по выбранным сайтам фермента *E. siliculosus*, близкородственного представителям клана СУР74, а также рекомбинантных ферментов СУР74 растений со сходной субстратной специфичностью и их мутантных форм по выбранным сайтам.

6. Характеристика значимости выбранных сайтов для каталитического действия ферментов клана СУР74 на основании результатов сопоставления каталитических свойств фермента *E. siliculosus*, близкородственного представителям клана СУР74, и растительных ферментов СУР74 со сходной субстратной специфичностью со свойствами соответствующих мутантных форм по выбранным сайтам.

Научная новизна работы. В геноме бурой водоросли *E. siliculosus* впервые выявлен ген фермента клана СУР74, ответственного за синтез оксипинов – эпоксиалкогольсинтазы EsEAS (СУР5164В1). Рекомбинантный белок EsEAS был получен и охарактеризован. Фермент EsEAS

катализирует превращение 9-гидроперекиси линолевой кислоты в 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовую кислоту, в основном, (9*S*,10*S*,11*S*)-эпимер с *транс*-эпоксидным кольцом. Расшифрован механизм каталитического действия фермента EsEAS, включающий следующие стадии: (1) гомолиз гидроперекисной группы; (2) перегруппировка образующегося оксирадикала с образованием эпоксиаллильного радикала; (3) рекомбинация эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется эпокиспирт.

Впервые с помощью сайт-направленного мутагенеза получены мутантные формы дивинилэфирсинтазы NtDES (CYP74D3) табака обыкновенного (*Nicotiana tabacum*) с измененными механизмами каталитического действия. Мутантная форма NtDES V379F катализирует образование продукта алленоксидсинтазной реакции, в то время как продукты дивинилэфирсинтазной и гидропероксидазной реакций образуются в следовых количествах. Мутантная форма NtDES V379C катализирует образование продуктов алленоксидсинтазной, гидропероксидазной, дивинилэфирсинтазной и эпоксиалкогольсинтазной реакций.

Впервые выявлены продукты эпоксиалкогольсинтазной активности в талломах представителей бурых водорослей: *Saccharina cichorioides*, *Sargassum pallidum*, *Coccophora langsdorfii* и *Pilaella littoralis*.

Научно-практическая значимость работы. Разработанные системы получения и препаративной очистки цитохромов растений, описанные в работе, могут быть применены в промышленности. Качественное изменение ферментативного катализа при сайт-направленном мутагенезе представляет потенциальный интерес для практического использования в биоинженерии. Результаты работы могут способствовать разработке алгоритмов направленной модификации белков с целью получения ферментов с заданными свойствами. Охарактеризован фермент, катализирующий образование оксипинов, обладающих антимикробными свойствами – эпокиспиртов и тригидрокси-кислот.

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

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование. Работа проводилась с 2011 по 2016 гг. в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Липоксигеназы и цитохромы семейства CYP74: структура и роль в катализе биосинтеза оксипинов – эндогенных биорегуляторов растений» (гос. регистрационный номер: 01200901959). Исследования автора частично поддержаны грантами РФФИ № 12-04-01140-а, № 11-04-01601-а, № 12-04-97059-р_поволжье_а, № 14-04-01532-а, МК-4886.2013.4, МК-6529.2015.4, государственным контрактом № 14.740.11.0797, а также грантом ведущей научной школы НШ-825.2012.4. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора или в соавторстве с Мухтаровой Л.Ш. (получение субстратов и проведение инкубаций целевых ферментов с субстратами) и Хайрутдиновым Б.И. (ЯМР).

Положения, выносимые на защиту:

1. Фермент CYP5164B1 *Ectocarpus siliculosus* является 9-гидропероксид-специфичной эпоксиалкогольсинтазой, катализирующей превращение (9*S*)-гидроперекиси линолевой кислоты в 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовую кислоту, в основном, (9*S*,10*S*,11*S*)-эпимер с *транс*-эпоксидным кольцом.
2. Механизм каталитического действия фермента EsEAS включает следующие стадии: (1) гомолиз гидроперекисной группы; (2) перегруппировка образующегося оксирадикала с образованием эпоксиаллильного радикала; (3) рекомбинация эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется эпокси спирт.
3. Превращение дивинилэфирсинтазы NtDES (CYP74D3) табака обыкновенного (*Nicotiana tabacum*) в алленоксидсинтазу возможно в результате замены единичного аминокислотного остатка.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на на 36-ом конгрессе FEBS «Biochemistry for Tomorrow's Medicine» (Италия, Турин, 2011); на VII Съезде общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, 2011); на 3-ем Международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2011); на конференции Young researchers in life sciences (Франция, Париж, 2012, 2014); на 3-ей Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 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 международной конференции по биофизике «International Conference on Biological Physics (ICBP)» (Китай, Пекин, 2014); на годовом собрании общества физиологов растений России «Сигнальные системы растений: от рецепторов до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 2016); на IV Российском симпозиуме с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2016), а также на итоговой конференции Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН (2013).

По результатам работы опубликовано 20 научных работы, из которых 3 статьи в рецензируемых журналах, включенных в список ВАК и международную реферативную базу данных.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 169 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. В работе представлено 7 таблиц, 44 рисунка. Список литературы включает 246 источников, из которых 243 – иностранных.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Методы биоинформатики. Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей представителей клана CYP74 проводили в базах данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) и ORCAE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/orcae/>), а их сравнение проводили с помощью программы BLAST. Множественное выравнивание аминокис-

лотных последовательностей, анализ нуклеотидных последовательностей, а также конструирование праймеров проводили с помощью программы Vector NTI Advance 9 (Invitrogen, США). Построение и визуализацию неукорененных филогенетических деревьев осуществляли с использованием программ ClustalW2 – Phylogeny и TreeView (Thompson *et al.*, 1997), соответственно.

1.2. Молекулярно-биологические методы. Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе DNAEngine (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). Для сайт-направленного мутагенеза целевого гена использовали ПЦР с модифицированными праймерами. Последовательность открытой рамки считывания, кодирующей фермент CYP5164B1, адаптировали для экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Последовательность, а также олигонуклеотидные праймеры, используемые в работе, были синтезированы в ЗАО Евrogen (Москва). Нуклеотидные последовательности определяли и проверяли с помощью ДНК-анализатора ga3130 (Applied Biosystems, США).

1.3. Получение рекомбинантных ферментов. В работе использовали векторы системы pET (Novagen, США): pET-32 Ek/LIC и pET-23a, 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 Luria-Bertani (Гловер, 1988). Компетентные клетки *E. coli* для трансформации плазмидами получали с использованием ДМСО (Inoue *et al.*, 1990). Нарработку целевого белка индуцировали добавлением в среду 0.5 мМ изопропил-β-тиогалактопиранозид; кроме того, в среду добавляли 50 мг/л δ-аминолевулиновой кислоты – предшественник 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 7.0), содержащим 30 мМ гистидина. Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле по Лэмли (Остерман, 1981) в системе PowerPac Universal MiniProtean (Bio-Rad, США). Гели окрашивали Coomassie R250. Ферментативную активность очищенных препаратов целевых ферментов определяли по снижению оптического поглощения субстрата при 234 нм, измеряемого с помощью спектрофотометра Lambda 25 (Perkin-Elmer, США).

1.4. Получение субстратов для исследования каталитического действия целевых ферментов. 9-Гидроперекиси линолевой, [1-¹⁴C]-линолевой и α-линоленовой кислот получали инкубацией соответствующих кислот с рекомбинантной липоксигеназой ZmLOX3 кукурузы. 13-Гидроперекиси линолевой и α-линоленовой, а также 15-гидроперекись эйкозапентаеновой 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, Elenco, Россия) в изократическом режиме, используя смесь гексана, изопропанола и уксусной кислоты (98.1:1.8:0.1 по объему). Меченую [¹⁸O₂-гидроперокси]9-ГПОД получали инкубацией в ¹⁸O₂атмосфере в идентичных условиях.

1.5. Условия проведения и анализ продуктов реакций, катализируемых целевыми ферментами. Гидроперекись (100 мкг) инкубировали с ферментом 15 мин при 4 °С в 10 мл 100 мМ Na-фосфатного буфера (рН 7.0), после чего рН смеси снижали до 6.0 и продукты экстрагировали смесью гексана с этилацетатом (1:1 по объему). Схема подготовки образцов к анализу газовой хромато-масс-спектрометрией (ГХ-МС): перерастворение в 1.5 мл метанола; восстановление NaBH_4 в течение 30 мин; метилирование диазометаном; перерастворение в метаноле и гидрирование над Pt; силирование смесью пиридин/гексаметилдисилазан/триметилхлорсилана (1:1:1 по объему) в течение 30 минут при 23 °С. Готовые продукты растворяли в гексане и подвергали анализу методом ГХ-МС в виде метиловых эфиров ТМС-производных (Me/ТМС) с помощью масс-спектрометра QP5050A, соединенного с газовым хроматографом GC-17A (Shimadzu, Япония). Спектры ^1H -ЯМР, 2D-COSY, HSQC, HMBC и NOESY записывали с помощью ЯМР-спектрометра Bruker Avance III 600 (600 MHz, $[\text{H}_3]$ ацетонитрил, 296 K).

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Биоинформационный анализ предполагаемого CYP74-подобного фермента *Ectocarpus siliculosus*. Поиск ферментов, гомологичных алленоксидсинтазе ZmAOS1 (CYP74A19, GenBank: ACG28578.1) кукурузы обыкновенной (*Zea mays*), с помощью программы BLAST выявил три последовательности в геноме *E. siliculosus*, одна из которых (CBN75517.1) кодирует С-концевую область предполагаемого белка CYP5164B1. Открытая рамка считывания (1434 п.н.), кодирующая белок CYP5164B1 (477 аминокислотных остатка), депонирована в базе данных мРНК (Ectsi_mRNA_LATEST) ORCAE под идентификационным номером Esi_0111_0095. Экспрессируемые концевые последовательности FP272245, FP278707 и FP286043 гена *CYP5164B1* были выявлены в ходе транскрипционного анализа в различных стрессовых условиях (Dittami *et al.*, 2009).

С помощью программы Clustal Omega было проведено множественное выравнивание фермента CYP5164B1 с цитохромами P450 *A. thaliana*, обладающими с ним наибольшим сходством аминокислотных последовательностей, для определения положения фермента CYP5164B1 относительно цитохромов P450, включая ферменты CYP74. Проведенный филогенетический анализ показал, что фермент находится на отдельной ветви вместе с ферментами CYP74A1 и CYP74B1 (Рис. 1).

На филогенетическом древе клана CYP74 фермент CYP5164B1 находится на одной ветви с ферментами CYP74 метиловых бактерий и животных (Рис. 2). Алленоксидсинтаза KfAOS зеленой водоросли *K. flaccidum* (Koeduka *et al.*, 2015) находится

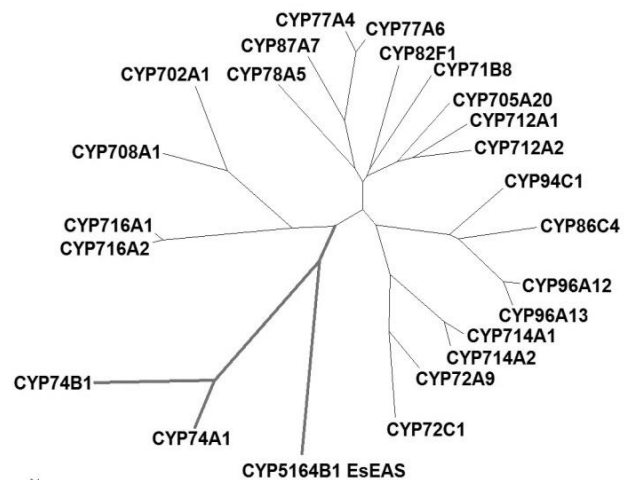


Рис. 1. Неукорененное филогенетическое древо фермента CYP5164B1 и избранных последовательностей цитохромов P450 *A. thaliana*, обладающих максимальным сходством с ферментом CYP5164B1.



Рис. 2. Филогенетическое дерево ферментов клана CYP74. Подсемейства CYP74 обозначены A, B, C, D, E, F, H, M, Q.

каталитически важных доменов у монооксигеназ является кислород-связывающий домен A/G-G-X-D/E-T/S-T/S. Вследствие особенностей каталитического действия ферментов CYP74, в их последовательностях данный домен заменен центральным доменом I-спирали (IHCD; Рис. 3), который непосредственно участвует в катализе (Тороркова *et al.*, 2008; 2013). В последовательности фермента CYP5164B1 вместо остатков глутаминовой или аспарагиновой кислот, консервативных для монооксигеназ, содержится остаток глутамина (Q272). У ферментов CYP74 в данном сайте находится синонимичный остаток аспарагина (Рис. 3). Он участвует в гомолитическом расщеплении связи O-O гидроперокси (Lee *et al.*, 2008). Вероятно, у фермента CYP5164B1 остаток глутамина играет аналогичную роль.



Рис. 3. Множественное выравнивание частичных аминокислотных последовательностей фермента CYP5164B1 с ферментами семейства и клана CYP74, а также монооксигеназами P450: цифрами 1-6 пронумерован домен IHCD, символами ♦, ◇ и ● отмечены ERR-триада, PPV-домен и гем-связывающий остаток цистеина.

между указанной ветвью и ферментами семейства CYP74 растений.

В последовательности фермента CYP5164B1 есть ряд особенностей, отличающих ферменты CYP74 от классических монооксигеназ P450 – в первую очередь, вставка из 9 аминокислотных остатков в гем-связывающем домене (Brash, 2009). У фермента CYP5164B1, также как у представителей клана CYP74, эта вставка присутствует (ей соответствует последовательность SEPGRVGGM), тогда как у ферментов CYP11A1 и CYP19A1 человека – нет (Рис. 3). Вторая особенность, отличающая ферменты CYP74 от монооксигеназ P450, относится к I-спирали. Одним из

2.2. Идентификация фермента CYP5164B1 *E. siliculosus* как эпоксиалкогольсинтазы.

Рекомбинантный фермент CYP5164B1 эффективно утилизирует 9- (9-ГПОД) и 13-гидроперекиси (13-ГПОД) линолевой кислоты, тогда как 9- и 13-гидроперекиси α -линоленовой и 15-гидроперекись эйкозапентаеновой кислот – нет. Вычисленное значение константы каталитической (k_{cat}) превращения 9-ГПОД 149 сек^{-1} , превращения 13-ГПОД – 18.1 сек^{-1} . Для характеристики продукты инкубаций (Me/TMC) гидроперекисей с рекомбинантным ферментом CYP5164B1 анализировали методом ГХ-МС.

Инкубации рекомбинантного фермента CYP5164B1 с 9-ГПОД приводили к образованию основного продукта **1** (Рис. 4). Электронный масс-спектр продукта **1** (Me/TMC) содержит M^+ при m/z 398 (0.1 %); $[M - Me]^+$ при m/z 383 (0.7 %); $[M - C1/C8]^+$ при m/z 241 (3.6 %); $[M - C1/C9]^+$ при m/z 212 (3.7 %); $[M - C1/C10]^+$ при m/z 199 (97 %). Большой пик при m/z 199 в спектре указывает на присутствие оксиранил-карбинольной группы с оксираном при C9/C10 и боковым спиртом (TMC) при C11. Каталитическое гидрирование продукта **1** над PtO_2 с последующими метилированием и триметилсилилированием приводят к образованию 9,10-эпокси-11-гидрокси-октадекановой кислоты (Me/TMC). Таким образом, данные масс-спектра подтверждают, что соединение **1** является 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценной кислотой.

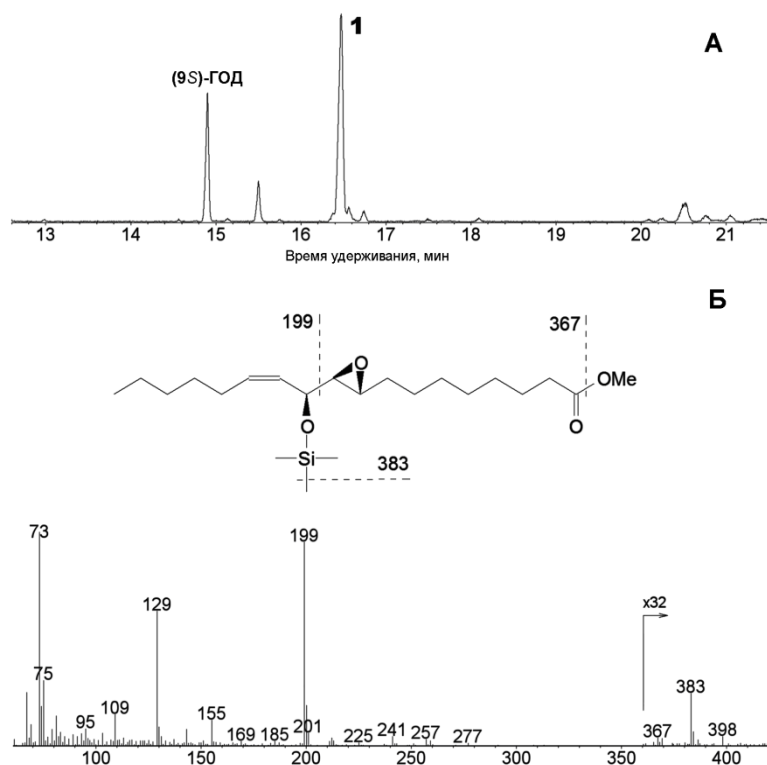


Рис. 4. Результат ГХ-МС анализа продуктов (Me/TMC) инкубации рекомбинантного фермента CYP5164B1 с 9-ГПОД. (А) ГХ-МС хроматограмма по полному ионному току продуктов инкубации (Me/TMC). (Б) Масс-спектр и схема фрагментации продукта **1** (Me/TMC).

Для подробного изучения структуры соединения **1** (Me эфира) фермент CYP5164B1 инкубировали с $[1-^{14}C]9$ -ГПОД, и основной продукт очищали методом радио-ВЭЖХ на нормальной фазе, который выявил, что соединение **1** состоит из двух эпимеров **1a** и **1b** в соотношении 4:1. Оба эпимера собрали по отдельности, затем проанализировали методом ЯМР. Оба продукта имеют одну *цис*-двойную связь ($J_{12,13} = 11.0$ Гц) и *транс*-эпоксидное кольцо ($J_{9,10} = 2.3$ и 2.2 Гц, соответственно). Таким образом, спектр подтверждает наличие оксиранил-карбинольной группы в структуре соединений **1a** и **1b**. Химический сдвиг H11 в двух спектрах различается: 4.52 ppm (**1a**) и 4.25 ppm (**1b**). Эта разница свидетельствует о том, что H11 в соединении **1a** демаскируется из-за пространственной близости к кислороду эпоксида. Спектр NOESY продукта **1a** содержит

большой кросс-пик между H11 и H10, в то время как корреляция между H11 и H9 не обнаружена. В отличие от этого, в спектре NOESY для соединения **1b** выявлена сильная корреляция ядерного эффекта Оверхаузера между H11 и H9, тогда как кросс-пик между H11 и H10 был относительно небольшим. Результаты спектров NOESY однозначно указывают на то, что эпокси спирты **1a** и **1b** имеют *эритро* (9*S*,10*S*,11*S*) и *трео* (9*S*,10*S*,11*R*) конфигурации, соответственно (Рис. 5).

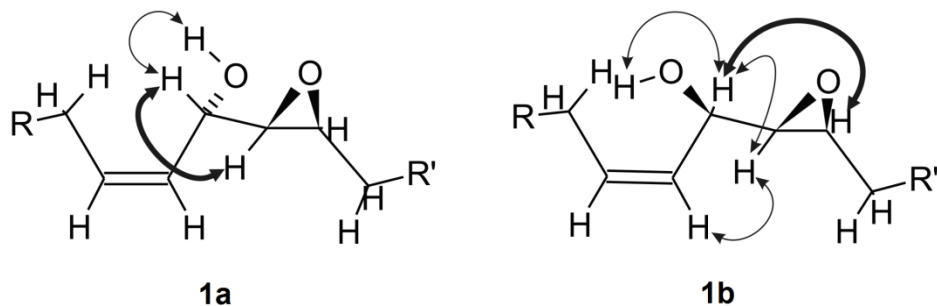


Рис. 5. Корреляция ядерного эффекта Оверхаузера в NOESY спектре эпимеров **1a** и **1b**.

Инкубация фермента СУР5164В1 с 13-ГПОД приводила к образованию основного продукта **2**, а также трех дополнительных продуктов, имеющих незначительно большее время удерживания, чем соединение **2** (Рис. 6А). Электронный масс-спектр продукта **2** (Рис. 6Б) содержит M^+ при m/z 398 (0.1 %); $[M - Me]^+$ при m/z 383 (2.2 %); $[M - n\text{-пентил}]^+$ при m/z 327 (3.0 %); $[M - C12/C18]^+$ при m/z 285 (89.2 %); $[TMC]^+$ при m/z 73 (100 %). Профили фрагментации (Рис. 5Б, вставка) подтверждают, что соединение **2** является 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислотой (Me/TMC). Каталитическое гидрирование продукта **2** над PtO_2 с последующими метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию 11-гидрокси-12,13-эпокси-октадекановой кислоты (Me/TMC), подтверждая идентификацию продукта **2**. Минорные пики, элюируемые после продукта **2** (Рис. 6А) имеют идентичные профили масс-спектров. Они являются стереоизомерами соединения **2**, различаясь стереоконфигурацией при C11 или C12.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что фермент СУР5164В1 *E. siliculosus* является эпоксиалкогольсинтазой. В соответствии с принятой номенклатурой ферментов СУР74, ферменту присвоено тривиальное название EsEAS (эпоксиалкогольсинтаза

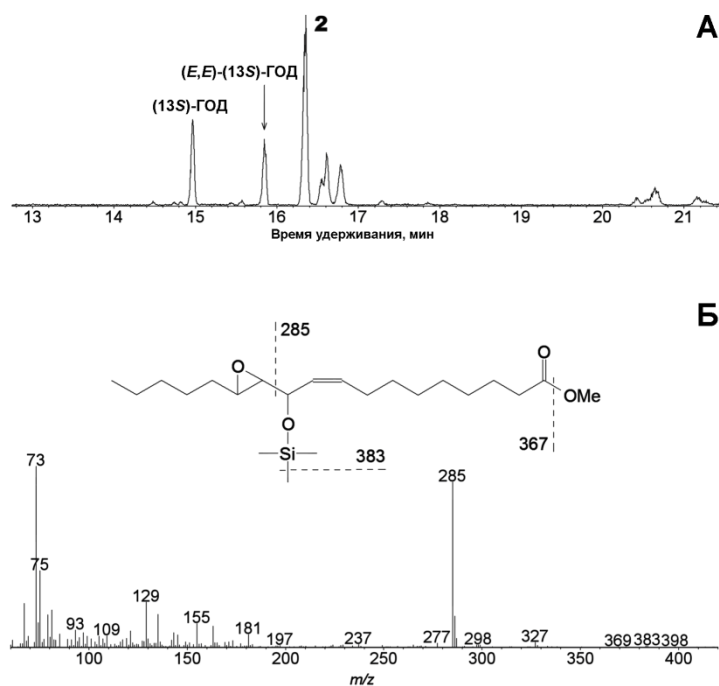


Рис. 6. Результат ГХ-МС анализа продуктов инкубации (Me/TMC) рекомбинантного фермента СУР5164В1 с 13-ГПОД. (А) ГХ-МС хроматограмма по полному ионному току продуктов инкубации (Me/TMC). (Б) Масс-спектр и схема фрагментации продукта **2** (Me/TMC).

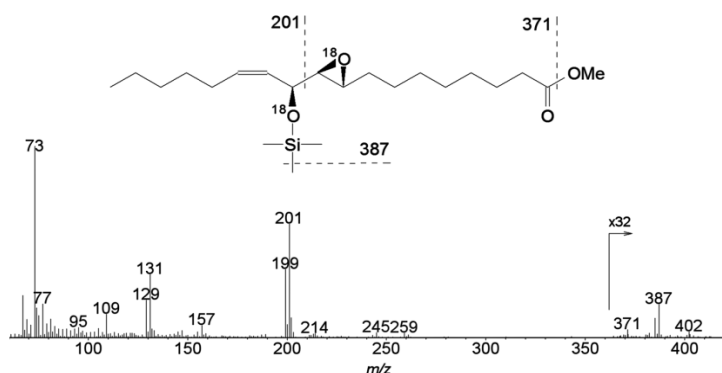


Рис. 7. Масс-спектр и схема фрагментации продукта **1** (Me/TMC), полученного в результате инкубации EsEAS с [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД.

m/z 387 (соответствуют 398 и 383, соответственно, в спектре немеченого продукта) (Рис. 7). 73.27 ± 0.46 % соединения **1**, полученного в результате инкубации EsEAS с [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД, содержал два атома ^{18}O . Оставшаяся часть содержала ^{18}O только в эпоксидной группе. При этом анализ показал, что исходная [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД содержала 84.95 ± 0.52 % ^{18}O . Таким образом, практически весь эпоксидный и ок. 70% гидроксильного кислорода эпокиспирта имеет происхождение из [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД. Результаты свидетельствуют, что EsEAS преимущественно синтезирует эпокиспирты посредством изомеризации гидроперекиси и ферментативная реакция идет следующим образом: (1) гомолиз гидроперекисной группы; (2) перегруппировка образующегося оксирадикала с образованием эпоксиаллильного радикала; (3) рекомбинация эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется эпокиспирт (Рис. 8).

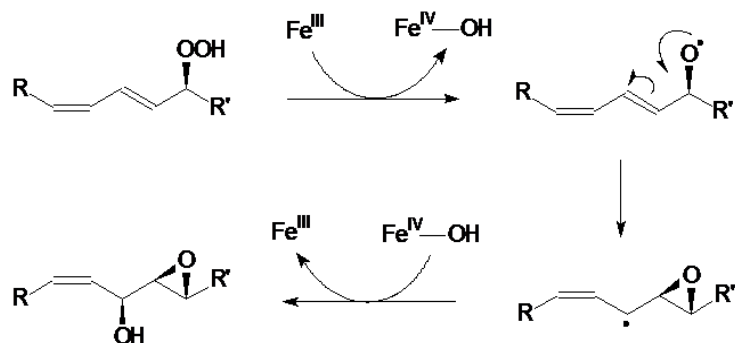


Рис. 8. Предполагаемый механизм реакции, катализируемой EsEAS.

следовательно, проследить судьбу обоих атомов кислорода в превращениях, катализируемых этими ферментами, невозможно.

2.4. Анализ оксилипинового профиля бурых водорослей разных видов. Нами был проведен скрининг оксилипинового профиля бурых водорослей нескольких видов: *Saccharina cichorioides*, *Sargassum pallidum*, *Coccophora langsdorfii* и *Pilaella littoralis*. Материал был собран во время экспедиции на побережье Японского моря в Хасанском районе ДВФО в окрестностях

E. siliculosus), также как и соответствующему гену – *EsEAS*.

2.3. Механизм каталитического действия эпоксиалкогольсинтазы EsEAS *E. siliculosus*.

Чтобы расшифровать механизм каталитического действия EsEAS, проводили эксперименты с использованием меченого ^{18}O . В результате инкубации EsEAS с [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД образуется продукт **1** (Me/TMC), масс-спектр которого содержит M^+ при m/z 402 и $[\text{M} - \text{Me}]^+$ при

Помимо ЭАС, изомеризацию гидроперекисей жирных кислот катализируют ГПЛ, также входящие в состав клана CYP74 и широко распространенные у высших растений. Оба атома ^{18}O из $^{18}\text{O}_2$ -гидроперекиси встраиваются в полуацеталь – первичный продукт гидропероксидлиазной реакции (Grechkin, Hamberg, 2004; Grechkin *et al.*, 2006). Два других фермента клана CYP74 – АОС и ДЭС являются дегидразами; и,

биостанции ДВО РАН. У всех изученных бурых водорослей в спектре оксипинов обнаружены линолевая кислота, а также ряд эпокиспиртов и тригидрокси-кислот, что указывает на наличие в талломах этих представителей бурых водорослей эпоксиалкогольсинтазной активности. Известно, что тригидрокси-кислоты являются продуктами гидролиза эпокиспиртов (Hamberg, 1999; Hamberg, Olsson, 2011). У всех видов выявлена 12,13-эпокси-11-гидрокси-9-октадеценовая кислота, у трех видов (кроме *S. pallidum*) – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; эти соединения являются продуктами превращения 13-ГПОД и 9-ГПОД, соответственно. Кроме того, в спектрах всех бурых водорослей были обнаружены несколько изомеров гидроксикислот, у которых гидроксильная группа расположена в положениях 9, 12, 13 (Рис. 9). Выявление 9- и 13-гидроксикислот свидетельствует о наличии 9- и 13-липоксигеназной активностях. Таким образом, EsEAS является возможным участником липоксигеназного каскада *E. siliculosus*, существование которого подтверждается наличием в геноме как минимум четырех генов липоксигеназ, расположенных по данным ORCAE в локусах Es-03_000010, Es-03_000020, Es-20_003620 и Es-20_003630.

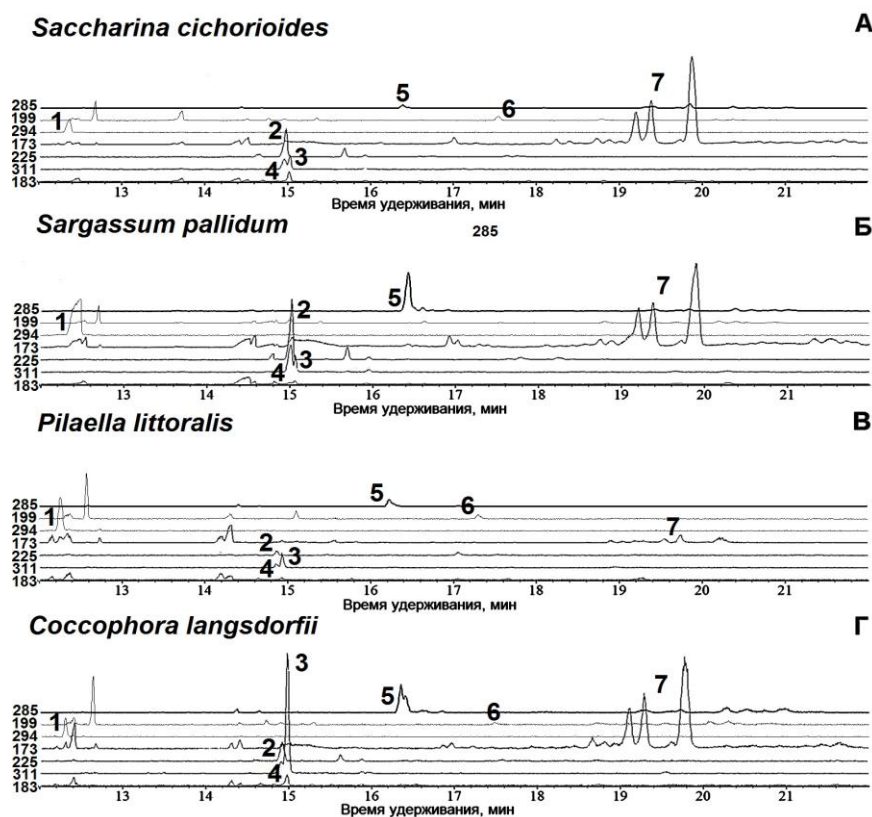


Рис. 9. Хроматограммы профиля жирных кислот (Me/TMC) бурых водорослей *S. cichorioides*, *S. pallidum*, *C. langsdorfii* и *P. littoralis* по селективным ионным токам, которые соответствуют: (1) m/z 294 – линолевой кислоте, (2) m/z 225 – 9-гидроксикислоте, (3) m/z 311 – 13-гидроксикислоте, (4) m/z 183 – 12-гидроксикислоте, (5) m/z 285 – 12,13-эпокси-11-гидрокси-9-октадеценовой кислоте, (6) m/z 199 – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислоте, (7) m/z 173 – тригидрокси-кислотам.

2.5. Сравнительная характеристика EsEAS с ферментами CYP74 высших растений.

Для сравнительной характеристики нами были выбраны ферменты семейства CYP74, проявляющие сходную с EsEAS субстратную специфичность: алленоксидсинтазу LeAOS3 (CYP74C3; GenBank: AF454634.1) томата (*Solanum lycopersicum*) и дивинилэфирсинтазу NtDES (CYP74D3; GenBank: NM_001325677.1) табака обыкновенного (*Nicotiana tabacum*). Ген *NtDES*, клонированный в неэкспрессирующем векторе pBSK, был любезно предоставлен нам профессором Ф. Кардинале. На первом этапе мы переклонировали OPC гена *NtDES* в экспрессирующий вектор pET-32 Ek/LIC методом безлигазного клонирования и оптимизировали методику получения реком-

бинантных ферментов NtDES и LeAOS3 дикого типа.

На следующем этапе мы проводили поиск сайтов, консервативных для EsEAS, NtDES и LeAOS3. Несмотря на успешные эксперименты по превращению ферментов семейства CYP74 в результате сайт-направленного мутагенеза, до сих пор не было опубликовано ни одного сообщения об экспериментах по попытке превращения ферментов клана CYP74 в результате единичных замен аминокислотных остатков. Это, вероятно, является следствием низкой степени сходства аминокислотных последовательностей представителей клана CYP74, не позволяющей выявить сайты, участвующие в формировании того или иного типа катализы. Мы проанализировали результат множественного выравнивания ферментов семейства и клана CYP74, обращая внимание при этом на ERR-триаду, поскольку последовательность этого домена является наиболее консервативной для всех цитохромов суперсемейства P450. Анализ выявил внутри ERR-триады сайт, в котором у всех ферментов семейства и клана CYP74 есть три варианта несинонимичных аминокислотных остатков (Рис. 10). Подобные сайты являются наиболее вероятными кандидатами на детерминанты типа каталитической активности. В данном сайте практически все алленоксидсинтазы, а также гидропероксидлиазы подсемейства CYP74C содержат остаток ароматической аминокислоты. В то же время ферменты подсемейства CYP74B в данном сайте содержат остаток цистеина, а дивинилэфирсинтазы подсемейства CYP74D – остаток валина. Ферменты клана CYP74 в данном сайте содержат остатки тех же аминокислот: EsEAS – остаток цистеина, алленоксидсинтаза АрAOS коралла *A. palmata* – остаток валина, эпоксиалкогольсинтаза VfEAS ланцетника – остаток тирозина. Мы предположили, что данный сайт участвует непосредственно в каталитическом действии ферментов CYP74, в том числе EsEAS.

		◆ ◆ ◆◆		★	◆
GmAOS	(359)	SGG-GE-ISMAMEKMPIMKSVVY	PARRIDPPVALQFGSAKRDLLIE---	SHDHAEQVKKGEMIFGYQPFATKDPKIFDR-ABEFVADRFVGG-EGEKLI	
LuAOS	(376)	STGGGK-VTMAAMEKMPIMKSVVY	ETRIEPPVALQYGRKAKDFILE---	SHEAAQVKKGEMIFGYQPFATKDPKIFDR-PEEFVADRFVGG-EGVKLI	
LeAOS	(374)	SNS-GK-VTMAAMEKMPIMKSVVY	ESRIEPPVALQYGRKAKDHMVIE---	SHDASEFIKGGELLYGYQPFATKDPKIFDR-PEEFVADRFVGG-EGEKLI	
NaAOS	(361)	SAG-GK-ITMSAMEKMPIMKSVVY	PARRIDPPVALQYGRKAKRDLMTE---	SHDGVFEVKKGEMIFGYQPFATKDPKIFDR-EDEFVADRFVGG-EGEKLI	
StAOS1	(370)	SNS-GK-VTMAAMEKMPIMKSVVY	ESRIEPPVALQYGRKAKDHMVIE---	SHDASEFIKGGELLYGYQPFATKDPKIFDR-PEEFVADRFVGG-EGEKLI	
StAOS2	(352)	SAG-GK-ITMSAMEKMPIMKSVVY	PARRIDPPVALQYGRKAKODLKIE---	SHDAVFEVKKGEMIFGYQPFATKDPKIFDR-PEEFVADRFVGG-EGEKLI	
ZmAOS2	(356)	AHA-GE-VTKALAEEMPLVKSVMV	PARRIDPPVALQYGRKAKRDVMVE---	SHDYGEVREKEMIFGYQPFATKDPKIFDR-ABEYVADRFVGG-DGAQLI	
ZmAOS1	(317)	EAG-GK-VTLAAVEKMEPLVKSVMV	ESRIEPPVALQYGRKAKDLQVQ---	SHDAVFEVKKGEMIFGYQPFATKDPKIFDR-PEEFVADRFVGG-EGEKLI	
PaAOS	(313)	SYGDEN-VTLEATEQMPITKSVVY	ESRIEPPVVFQYGRKAKSNFTIE---	SHDATFEVKKGEMIFGYQPFATKDPKIFDR-PEEFVADRFVGG-DGEALI	
AtAOS	(357)	SNG-GE-LTMGATEKMEPLKSVVY	ESRIEPPVTAQYGRKAKDLVIE---	SHDAAFKVKKEMIFGYQPFATKDPKIFDR-ADEFVADRFVGG-EGEKLI	
StAOS3	(333)	E--AGG-VTLSAIDKMLVKSVMV	ETRMDEPVVVFQYGRKAKNLIIVS---	NHEASFLIKKDELIFGYQPLATKDSKVEKN-GEENFADRFVGG--GEKLI	
◆ LeAOS3	(333)	E--AGG-VTLSAIDKMLVKSVMV	ETRMDEPVVVFQYGRKAKNLIIT---	NHESSFLIKKDELIFGYQPLATKDSKVEKN-ABEENFADRFVGG--GEKLI	
MtHPL	(326)	Q--EGG-VTIQSLEKMLVKSVMV	PARRIDPPVALQYGRKAKDLIVK---	SHDAAEFIKKGEMIFGYQPFATKDPKIFDR-PEEFVADRFVGG--GEKLI	
MtHPL3	(322)	E--EGG-VNLYLDKMTLTKSTVY	PARRIDPPVALQYGRKAKDLVQ---	SHDASEFIKKGEMIFGYQPFATKDPKIFDR-PEEFVADRFVGG--GEKLI	
PdHPL	(324)	ES-EGE-VTFALAKMTLTKSVVY	PARRIDPPVALQYGRKAKEDIVIQ---	SHDATFEIKKGEMIFGNVFGDKPKVEEN-PEEFVADRFVGG--GEKLI	
CmHPL	(320)	E--EGG-LTFALEKMSLLKSVVY	PARRIDPPVALQYGRKAKEDIVIQ---	SHDSSFKIKKGETIFGYQPFATKDPKIFDR-SEKVFADRFVGG--GEKLI	
CsHPL	(320)	E--EGG-LTFALEKMSLLKSVVY	PARRIDPPVALQYGRKAKEDIVIQ---	SHDSSFKIKKGETIFGYQPFATKDPKIFDR-SEKVFADRFVGG--GEKLI	
RaDES	(328)	ESGDEE-TALAALEKMSLLKSVVY	PARRIDPPVALQYGRKAKDLIVQ---	SHDSSFKIKKGETIFGYQPFATKDPKIFDR-SEKVFADRFVGG--GEKLI	
VfEAS	(262)	HGG----LITRESLEEMPKMSEFVLE	VIRACSPMFWSTIATRPTIVVEYTTD	SGEHALKIKKERGERVYASSYWALRDPAVEDK-PEEFVADRFVGG--GEKLI	
MspCYP74	(271)	AAQAGR----GAT--PVLDRV	IRRTLRHPPVFFVGFATRDRLVD---	TESGSAIRRGGELVGMVIFPAQNDPAHVPR-PEEFVADRFVGG--GEKLI	
MnHPL	(278)	GLPAGR----PAT--PILDRV	IRRTLRHPPVFFVGFATRDRLSD---	SESGRRIRKGGELVGMVIFPAQNDPAHVPR-ADVFADRFVGG--RTG	
AtHPL	(342)	S--PSSDLNFKTVNEMELVKSVMV	ETRIEPPVALQYGRKAKDFQLS---	SHDAVFEVKKGELLYGYQPLVMRDPAVEDK-PEEFVADRFVGG--GEKLI	
BvHPL	(339)	S--PSSLSFTAIDQMPNVQSFVY	ETRIEPPVALQYGRKAKDFVLQ---	SHDSRVDVKKGELLYGYQPLVMRDPAVEDK-PEEFVADRFVGG--GEKLI	
CaHPL	(329)	TN--QENLSFESVKEMELVQSFVY	ETRIEPPVALQYGRKAKDFMLIS---	SHDSVYEIKKGGELLYGYQPLVMRDPAVEDK-PEEFVADRFVGG--GEKLI	
NaHPL	(345)	LK--PENLSFESVKEMELVQSFVY	ETRIEPPVALQYGRKAKDFMLQ---	SHDSVYEIKKGGELLYGYQPLVMRDPAVEDK-PEEFVADRFVGG--GEKLI	
NtHPL	(342)	LK--PENLSFESVKEMELVQSFVY	ETRIEPPVALQYGRKAKDFMLIS---	SHDSVYEIKKGGELLYGYQPLVMRDPAVEDK-PEEFVADRFVGG--GEKLI	
PgHPL	(346)	ALSFASVKEMELVKSVMV	ETRIEPPVALQYGRKAKDFMLK---	SHDSVYDVKKGELLYGYQPLVMRDPAVEDK-PEEFVADRFVGG--GEKLI	
StHPL	(329)	VN--PENLSFESVKEMELVQSFVY	ETRIEPPVALQYGRKAKDFMLIS---	SHDSVYEIKKGGELLYGYQPLVMRDPAVEDK-PEEFVADRFVGG--GEKLI	
AsDES	(313)	SEE-GK-IIFAGLEKMEPLVKSVMV	ESRIEPPVALQYGRKAKDLVIE---	SHDGKYQVKKGEMIFGYQPFATKDPKIFDR-ABEYVADRFVGG--GEKLI	
LuDES	(325)	TELFFTSFQKMPHIOQSFVY	ETRIEPPVALQYGRKAKDFMLIS---	SEASVYKVKKGGELLYGYQPLVMRDPAVEDK-PEEFVADRFVGG--GEKLI	
◆ EsEAS	(308)	TI-----KVSDAKRFPLDLSFHW	ETRIEPPVALQYGRKAKDFMLVVP---	TSGARQVQRKGMILCCHPLIHTDEAVFGADATEFKKRFKRIKGNP-GLKLD	
◆ NtDES	(320)	EEG-GA-VTLSAINKMSLVKSVMV	ETRIEPPVALQYGRKAKDFMLVQ---	SHDASYMIKKGQFLVGYQPMASRDPKIFDR-PDEFVADRFVGG--EKM	
StDES	(319)	EEG-GA-VTLSAINKMSLVKSVMV	ETRIEPPVALQYGRKAKDFMLVQ---	SHDASYMIKKGQFLVGYQPMASRDPKIFDR-PDEFVADRFVGG--EKM	
CaDES	(319)	EEG-GA-VTLSAINKMSLVKSVMV	ETRIEPPVALQYGRKAKDFMLVQ---	SHDASYMIKKGQFLVGYQPMASRDPKIFDR-PDEFVADRFVGG--EKM	
LeDES	(319)	EEG-GA-VTLSAINKMSLVKSVMV	ETRIEPPVALQYGRKAKDFMLVQ---	SHDASYMIKKGQFLVGYQPMASRDPKIFDR-PDEFVADRFVGG--EKM	
ApAOS	(258)	NK---E-LSEASLEEMILLHNF	LEVIRMHPPVVFVFGPARDFDSE---	TECGTIVRKKDQLLVGNVMAHRSSEIFDQ-PDEFVADRFVGG--EKM	

Рис. 10. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей области ERR-триады фермента EsEAS с ферментами семейства и клана CYP74: символами ◆ отмечена ERR-триада, символами ◇ – PPV-домен. Выбранный для мутирования сайт отмечен звездочкой. Стрелками указаны ферменты, для которых были получены мутантные формы по данному сайту: LeAOS3, EsEAS и NtDES.

Для проверки данного предположения мы провели сайт-направленный мутагенез EsEAS, LeAOS3 и NtDES и получили следующие мутантные формы: EsEAS C365F и C365V, LeAOS3 F391V и F391C, NtDES V379F и V379C.

Замены в последовательностях EsEAS C365F и C365V и LeAOS3 F391V и F391C не привели к изменениям типа каталитической активности. Результатом мутаций было снижение каталитической активности по сравнению с ферментом дикого типа, что указывает на возможное значение данного сайта в каталитическом действии или корректном фолдинге ферментов.

В отличие от LeAOS3 и EsEAS, в результате замен V379C и V379F в последовательности NtDES (Рис. 11Б,В) произошли изменения каталитической активности по сравнению с ферментом дикого типа, основным продуктом каталитического действия которого является дивиниловый эфир (Рис. 11А). Масс-спектр основного продукта превращения 9-ГПОД при участии NtDES V379F (Рис. 11Б) идентичен масс-спектру α -кетола – 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовой кислоты (Me/TMC) (Grechkin *et al.*, 2008). Кроме того, в реакции образовывались в следовых количествах 9-оксононановая и колнелевая кислоты. Таким образом, мутантная форма NtDES V379F проявляет не дивинилэфирсинтазную, а алленоксидсинтазную активность с минорными гидропероксидлиазной и дивинилэфирсинтазной активностями.

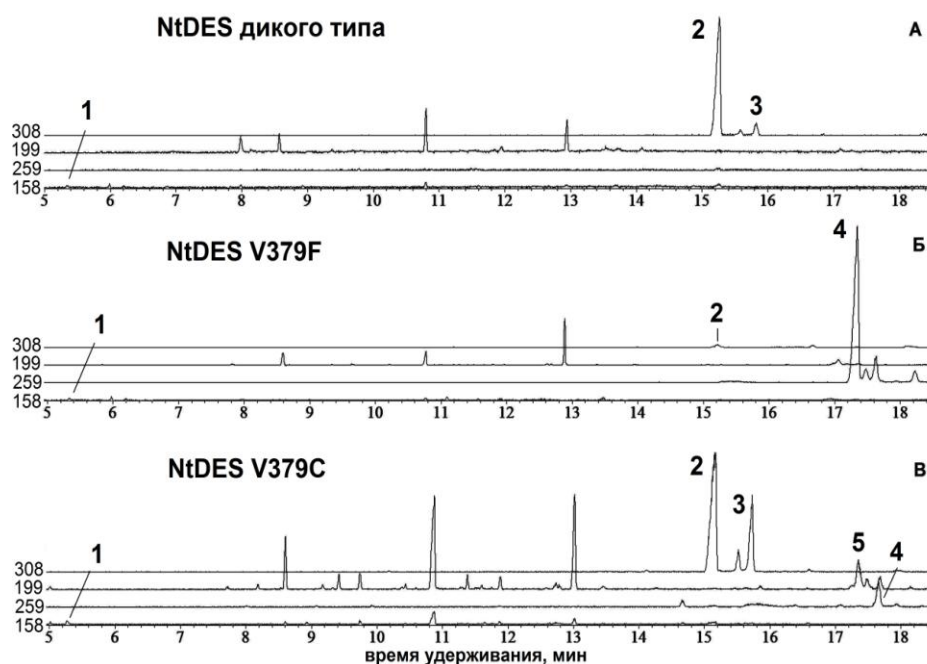


Рис. 11. Хроматограммы анализа продуктов превращения (9S)-ГПОД (Me/TMC) при участии NtDES дикого типа (А) и его мутантных форм NtDES V379F (Б) и NtDES V379C (В) по селективным ионным токам, которые соответствуют следующим соединениям: (1) 158 – 9-оксононановая кислота, (2) 308 – колнелевая кислота, (3) (all-*trans*)-колнелевая кислота (5) 199 – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота, (4) 259 – α -кетол.

Мутантная форма NtDES V379C обладает каталитической активностью, сопоставимой с таковой фермента дикого типа (Рис. 11В). Однако в результате инкубации NtDES V379C с 9-ГПОД, помимо колнелевой кислоты, образуется изомер колнелевой кислоты со всеми транс-двойными связями, а также небольшие количества продуктов, характерных для других ферментов СУР74, а именно – α -кетол (алленоксидсинтазный продукт), 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота (эпоксиалкогольсинтазный продукт), а также следовые количества 9-оксононановой кислоты (гидропероксидлиазный продукт). Таким образом, в результате единичных замен аминокислотных остатков выполнено превращение дивинилэфирсинтазы NtDES та-

бака в АОС, ГПЛ и ЭАС. Полученные данные подтверждают предположение о сходстве механизмов каталитического действия у разных ферментов СУР74 и свидетельствуют о том, что эпоксиаллильный радикал представляет собой не только промежуточный продукт (Grechkin, 1998), но и своеобразную точку переключения в механизме катализа СУР74 (Рис. 12). В зависимости от фермента эпоксиаллильный радикал претерпевает различные превращения: рекомбинирует с гидроксильным радикалом с образованием эпокиспиртов (ЭАС); теряет атом водорода с образованием *экзо*-двойной связи при окисрании, что приводит к образованию окиси аллена (АОС). У ГПЛ и ДЭС происходит гомолиз С-С связи в окисрании с образованием винилоксикарбинильного радикала, который теряет атом водорода с образованием дивинилового эфира (ДЭС), либо рекомбинирует с гидроксильным радикалом с образованием полуацетала (ГПЛ).

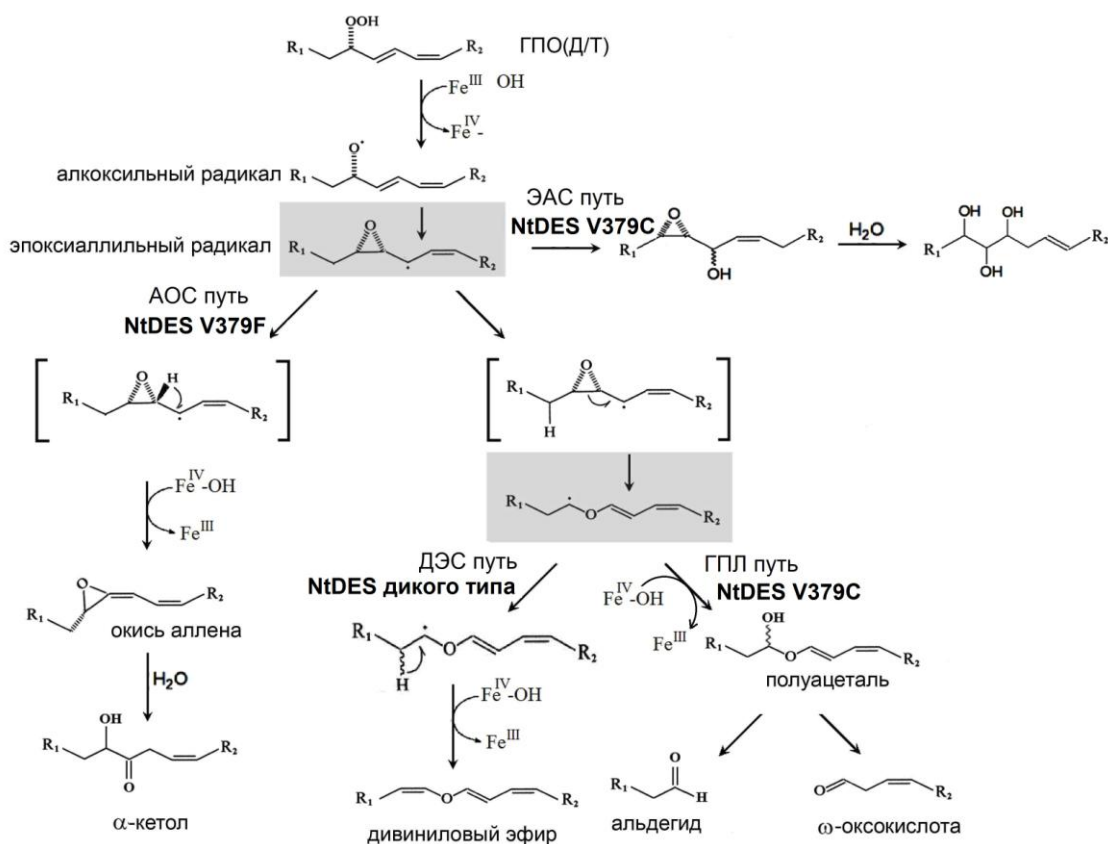


Рис. 12. Схема переключения механизма катализа в результате единичных замен аминокислотных остатков. Серым цветом выделены две точки переключения между механизмами каталитического действия всех ферментов СУР74: эпоксиаллильный радикал является общей точкой переключения, винилоксикарбинильный радикал – точкой переключения между гидропероксидазной и дивинилэфирсинтазной реакциями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время ферменты СУР74 распространены, главным образом, среди сосудистых растений. В связи с этим многие исследователи считают липоксигеназный каскад эволюционным приобретением высших растений, а именно – печеночников (*Marchantiophyta*). Было высказано предположение, что появление липоксигеназного каскада связано с возникновением и развитием алленоксидсинтазного пути, который у покрытосеменных растений является источ-

ником важных сигнальных соединений – жасмонатов. Появление данных о присутствии у прокариот (протеобактерии) и животных (ланцетник, кораллы) (Lee *et al.*, 2008) оксипиринов и ферментов, обладающих сходными каталитическими свойствами и аминокислотными последовательностями с таковыми ферментов CYP74, привело к объединению всех этих ферментов (зачастую относящихся к разным семействам) в клан CYP74 (Nelson, 2006). При этом распространение данных ферментов за пределы наземных растений связывалось с событиями горизонтального переноса генов в эволюционной истории клана (Nelson, Werck-Reichhart, 2011; Nelson *et al.*, 2013). Было предложено два варианта обмена генетической информацией. По одной из версий перенос генов происходил от наземных растений к протеобактериям и затем от протеобактерий к морским животным (Nelson, Werck-Reichhart, 2011). По другому сценарию тех же авторов (Nelson *et al.*, 2013) наземные растения получили гены ферментов CYP74 от морских животных посредством протеобактерий. Обнаружение нами функционального фермента клана CYP74 у одного из видов бурых водорослей – морских организмов, которые представляют самостоятельную ветвь эволюции эукариот, значительно уменьшает вероятность признания горизонтального переноса в качестве основного инструмента эволюции данного клана. Полученные данные свидетельствуют в пользу сделанного ранее предположения о древнем эволюционном происхождении ферментов CYP74 (Lee *et al.*, 2008).

Соединения, содержащие оксиранил-карбинольную группу, подобные продукту каталитического действия EsEAS, образуются в результате превращений гидроперекисей жирных кислот, происходящих в присутствии кислот (Gardner *et al.*, 1984; Gardner *et al.*, 1984), ионов Fe^{3+} (Gardner, 1975) и гематина (Dix, Marnett, 1985). Эпоксиспирты также образуются в качестве минорных продуктов при участии некоторых цитохромов P450, в частности, алленоксидсинтаз (Song *et al.*, 1993; Hughes *et al.*, 2008). Эти данные свидетельствуют о том, что превращение гидроперекисей происходит посредством гомолиза гидроперекисной группы, и эпоксиаллильный радикал является промежуточным продуктом всех ферментов клана CYP74. Превращение эпоксиаллильного радикала при участии разных типов ферментов CYP74 происходит по-разному. До недавнего времени были известны три типа ферментов CYP74, а именно – АОС, ГПЛ, ДЭС. Фермент VfEAS (CYP440A1) клана CYP74 ланцетника (*B. floridae*) является первой ЭАС (Lee *et al.*, 2008), специфически продуцирующей эпоксиспирты. EsEAS (CYP5164B1) является вторым цитохромом P450, обладающим специфической эпоксиалкогольсинтазной активностью (наряду с VfEAS) и первым CYP74-подобным ферментом бурых водорослей. Механизмы каталитического действия EsEAS и VfEAS являются сходными. Фермент CYP5164B1 является, несомненно, филогенетически родственным клану CYP74, преимущественно ферментам метилобактерий и животных. Вставка из 9 аминокислотных остатков в гем-связывающем домене и отсутствие кислород-связывающего домена также являются отличительными особенностями, объединяющими EsEAS и ферменты клана CYP74. Основные механистические особенности (формирование эпоксиаллильного радикала в качестве промежуточного продукта) также являются общими. Все полученные данные позволили нам классифицировать новый белок как CYP74-подобный фермент. На данный момент времени, это первый охарактеризованный рекомбинантный фермент, участвующий в биосинтезе оксипиринов у бурых водорослей.

На филогенетическом древе эпоксиалкогольсинтаза EsEAS *E. siliculosus* находится меж-

ду ферментами семейства и клана CYP74 (Рис. 2). Ближе всего среди представителей клана CYP74 к EsEAS оказываются ферменты протеобактерий, что указывает на древнее расхождение ферментов CYP74 бурых водорослей с остальными представителями клана CYP74.

По всей вероятности, образование эпокиспиртов, но не жасмонатов, является наиболее архаичным вариантом липоксигеназного каскада. Полученные нами данные о продукции эпокиспиртов мутантными формами некоторых растительных ферментов CYP74 могут послужить примером возврата данных ферментов к базовому механизму катализа. С этой точки зрения возникновение алленоксидсинтаз, гидропероксидлиаз и дивинилэфирсинтаз у высших растений и развитие соответствующих сигнальных систем, в том числе интенсивно изучаемой жасмонат-зависимой сигнальной системы, следует рассматривать не как первоначальное событие, а как совершенствование имеющегося древнего ферментативного инструмента. Хотя полностью физиологическая роль эпокиспиртов и их производных еще не ясна, не вызывает сомнения их древнее возникновение в окислительном метаболизме жирных кислот. Подтверждением этому может служить обнаружение у цианобактерий *Acaryochloris marina* наряду с окисью аллена (9S,10S,13S)-эпокиспиртов (Niisuke *et al.*, 2009). Образование данных продуктов связывают с активностью других гем-содержащих ферментов, относящихся к мини-каталазам.

Дальнейшие исследования помогут выяснить физиологическую роль липоксигеназного каскада у морских организмов и расширить представление о месте ферментов CYP74 в эволюционной истории цитохромов P450.

ВЫВОДЫ

1. В геноме *Ectocarpus siliculosus* выявлен ген, кодирующий фермент CYP5164B1, обладающий высокой степенью сходства с ферментами CYP74; на основе искусственно синтезированной последовательности, кодирующей фермент CYP5164B1 получен соответствующий очищенный рекомбинантный фермент.
2. Установлено, что предпочтительным субстратом рекомбинантного фермента CYP5164B1 является 9-гидроперекись линолевой кислоты, основным продуктом превращения которой является 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота, в основном, ее (9S,10S,11S)-эпимер с *транс*-эпоксидом. Фермент CYP5164B1 идентифицирован как 9-гидропероксид-специфичная эпоксиалкогольсинтаза. Новому ферменту присвоено тривиальное название EsEAS.
3. В талломах бурых водорослей *Saccharina cichorioides*, *Sargassum pallidum*, *Coccolophora langsdorfii* и *Pilaella littoralis* выявлены линолевая кислота, эпокиспирты (12,13-эпокси-11-гидрокси-9-октадеценовая (у всех видов) и 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая (у всех видов, кроме *S. pallidum*) кислоты) и тригидрокси-кислоты, свидетельствующие о наличии эпоксиалкогольсинтазной активности, а также выявлено наличие 9-, 12- и 13-липоксигеназной активности.
4. По данным филогенетического анализа, а также структурным и механистическим особенностям фермент CYP5164B1 является представителем клана CYP74.
5. Для сравнительной характеристики свойств фермента CYP5164B1 были получены очищенные ферменты со сходной субстратной специфичностью: алленоксидсинтаза LeAOS3 (CYP74C3) томата (*Lycopersicon esculentum*) и дивинилэфирсинтаза NtDES (CYP74D3) табака

обыкновенного (*Nicotiana tabacum*).

6. Методом биоинформационного анализа внутри консервативного каталитически важного домена выявлен сайт, в котором ферменты клана CYP74, катализирующие разные реакции, содержат несинонимичные аминокислотные остатки. Методом сайт-направленного мутагенеза получены мутантные формы фермента CYP5164B1 по данному сайту, а также мутантные формы алленоксидсинтазы LeAOS3 и дивинилэфирсинтазы NtDES. Охарактеризованы каталитические свойства полученных мутантов по сравнению с ферментами дикого типа.

7. Замены в последовательностях фермента CYP5164B1 C365F и C365V и LeAOS3 F391V и F391C не привели к изменениям типа каталитической активности. Результатом мутаций было снижение каталитической активности по сравнению с ферментом дикого типа.

8. В результате единичных мутаций в последовательности дивинилэфирсинтазы NtDES произошли изменения в механизме каталитического действия. Мутантная форма NtDES V379C катализирует образование продуктов алленоксидсинтазной, гидропероксидлиазной, дивинилэфирсинтазной и эпоксиалкогольсинтазной реакций. Мутантная форма NtDES V379F катализирует образование преимущественно продуктов алленоксидсинтазной реакции, а также следовые количества продуктов дивинилэфирсинтазной и гидропероксидлиазной реакции.

9. Установлено, что для каталитической активности фермента CYP5164B1 основное значение играет С-концевая, но не N-концевая последовательность.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Epoxyalcohol synthase of *Ectocarpus siliculosus*. First CYP74-related enzyme of oxylipin biosynthesis in brown algae / Y.Y. Toporkova, **V.S. Fatykhova**; Y.V. Gogolev, B.I. Khairutdinov, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin // *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2017. – V. 1862. – P. 167-175.
2. Structure-function relationship in the CYP74 family: Conversion of divinyl ether synthases into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis / Y.Y. Toporkova, **V.S. Ermilova (Fatykhova)**, S.S. Gorina, L.S. Mukhtarova, E.V. Osipova, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // *FEBS Letters*. – 2013. – V. 587. – P. 2552–2558.
3. Изменение каталитических свойств дивинилэфирсинтаз в результате единичных аминокислотных замен / **В.С. Ермилова (Фатыхова)**, С.С. Горина, Е.В. Осипова, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, Ю.В. Гоголев, академик А.Н. Гречкин // Доклады академии наук. – 2013. – Т. 452. - № 5. – С. 567–570.

Работы, опубликованные в материалах научных мероприятий

1. **Ermilova (Fatykhova), V.S.** Alteration of catalytic properties of tobacco divinyl ether synthase (*Nicotiana tabacum*) by site-directed mutagenesis / **V.S. Ermilova**, E.V. Osipova, I.R. Chechetkin, F.K. Mukhitova, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // Wiley Blackwell, FEBS: Book of Abstracts. – Torino, Italy, 2011. – P. 313.
2. **Ермилова (Фатыхова), В.С.** Каталитические свойства дивинилэфирсинтазы NtDES табака (*Nicotiana tabacum*) / **В.С. Ермилова**, Е.В. Осипова, Н.В. Ланцова, Ю.В. Гоголев, А.Н.

Гречкин // Сборник материалов V Российского симпозиума «Белки и пептиды». - Петрозаводск, 2011. - С. 299.

3. **Ермилова (Фатыхова), В.С.** Структурные особенности дивинилэфирсинтазы табака (*Nicotiana tabacum*) / **В.С. Ермилова**, Е.В. Осипова, Н.В. Ланцова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сборник материалов VII Съезда Общества физиологов растений России и Международной конференции «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий». – Нижний Новгород, 2011. – С. 243.

4. **Ермилова (Фатыхова), В.С.** Изменение каталитических свойств дивинилэфирсинтазы табака (*Nicotiana tabacum*) / **В.С. Ермилова**, Е.В. Осипова, И.Р. Чечеткин, Ф.К. Мухитова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сборник материалов III Международного симпозиума «Клеточная сигнализация растений. Cell signaling in plants». – Казань, 2011. – С 43.

5. **Ermilova (Fatykhova), V.S.** Evolution of CYP74 enzymes / **V.S. Ermilova**, E.V. Osipova, N.V. Lantsova, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // Abstract book of the Young Researchers in Life Science Conference (YRLS 2012). – Paris, France, 2012. – P. 89

6. **Ермилова (Фатыхова), В.С.** Реконструкция эволюционной истории ферментов CYP74 / **В.С. Ермилова**, Е.В. Осипова, Н.В. Ланцова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сборник материалов III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». – Казань. 2012. – С. 142.

7. **Ermilova (Fatykhova), V.S.** Epoxy alcohol synthase is a novel participant in plant defense mechanisms / **V.S. Ermilova**, N.V. Lantsova, Y.Y. Toporkova, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // Abstract book of the Young Researchers in Life Science Conference (YRLS 2013). – Paris, France, 2013. – P. 109.

8. **Ермилова (Фатыхова), В.С.** Эпоксисалкогольсинтаза – новый участник защитного механизма растений / **В.С. Ермилова**, Н.В. Ланцова, Е.В. Осипова, Я.Ю. Топоркова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сборник материалов Первого международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений». - Казань, 2013. - С. 33.

9. Топоркова Я.Ю. Семейство CYP74 в эволюции цитохромов P450 / Я.Ю. Топоркова, **В.С. Ермилова (Фатыхова)**, С.С. Горина, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сборник материалов Первого международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений». - Казань, 2013. - С. 56.

10. **Ermilova (Fatykhova), V.** Epoxy alcohol synthase is a novel participant in plant defense mechanisms / **V. Ermilova**, N. Lantsova, L. Mukhtarova, E. Osipova, Y. Toporkova, Y. Gogolev, A. Grechkin // Abstract book of the 5th EMBO meeting. – Amsterdam, Netherlands, 2013. - P. 175.

11. **Ermilova (Fatykhova), V.** Unusual cytochrome P450 of brown alga *Ectocarpus siliculosus* / Abstract book of the 2014 International Conference on Enzyme (ICE 2014). – Beijing, China, 2014. - P. 25-26.

12. **Ermilova (Fatykhova), V.S.** The role of the C-terminus in the catalysis of the cytochromes P450 of the CYP74 family / **V.S. Ermilova**, Y.Y. Toporkova, L.S. Mukhtarova, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // Abstract book of the 8th IUPAP International Conference on Biological Physics (ICBP 2014). – Beijing, China, 2014. – P. 70-71.

13. **Ermilova (Fatykhova), V.** The lipoxygenase cascade in several species of brown algae / **V.**

Ermilova, Y. Toporkova, L. Mukhtarova, Y. Gogolev, A. Grechkin // Abstract book of the FEBS EM-BO 2014 Conference. – Paris, France, 2014. - P. 340.

14. **Ermilova (Fatykhova), V.S.** The 1st cytochrome P450 of the CYP74 clan found in brown algae / **V.S. Ermilova**, Y.Y. Toporkova, L.S. Mukhtarova, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // Abstract book of the Young Researchers in Life Science Conference (YRLS 2014). - Paris, France, 2014. - P. 184.

15. **Ermilova (Fatykhova), V.S.** The lipoxygenase signaling system of several species of brown algae / **V.S. Ermilova**, Y.Y. Toporkova, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin // Abstract book of the 4th International symposium on Plant signaling and behavior. – St. Petersburg, Russia, 2016. – P. 139-140.

16. **Ермилова (Фатыхова), В.С.** Первый представитель клана СYP74 цитохромов P450 у бурых водорослей // В.С. Ермилова, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин // Сборник материалов годичного собрания Общества физиологов растений России «Сигнальные системы растений: от рецепторов до ответной реакции организма». Санкт-Петербург. 2016. – С. 113-114.

17. **Ермилова (Фатыхова), В.С.** Механизм каталитического действия растительных эпоксиалкогольсинтаз / **В.С. Ермилова**, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сборник тезисов IV Российского симпозиума с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений». – Казань, 2016. – С. 61-62.