

КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ –
ОБОСОБЛЕННОЕ СТРУКТУРНОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА «КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Топоркова Яна Юрьевна

ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗЫ КЛАНА СУР74 –
НОВЫЕ УЧАСТНИКИ ЛИПОКСИГЕНАЗНОГО КАСКАДА

1.5.21 – физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
академик РАН
Гречкин Александр Николаевич

Казань – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1. Оксипирины	17
1.2. Оксипирины растений	19
1.3. Неферментативные пути образования оксипиринов	21
1.4. Ферментативные пути биосинтеза оксипиринов	28
1.5. Липоксигеназы	32
1.6. α -Диоксигеназы	35
1.7. Суперсемейство цитохромов P450	38
1.8. Пути оксипиринового биосинтеза с участием цитохромов P450	45
1.9. Алленоксидсинтазный путь	50
1.10. Гидропероксидлиазный путь	61
1.11. Дивинилэфирсинтазный путь	70
1.12. Субстратная специфичность ферментов CYP74	72
1.13. Структура ферментов CYP74	74
1.14. Пути образования эпокиспиртов и тригидроксикислот	85
1.15. Эпокиспирты и тригидроксикислоты высших растений	90
1.16. Эпокиспирты и тригидроксикислоты грибов	98
1.17. Эпокиспирты и тригидроксикислоты животных	102

1.18. Эпоксиспирты и тригидроксикислоты бактерий	104
1.19. Физиологическое значение оксипинов	105
1.20. Оксипины в промышленности	109
1.21. Постановка цели исследования	111
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	114
2.1. Методы биоинформатики	114
2.2. Материалы	115
2.3. Выделение образцов тотальной РНК	117
2.4. Реакция обратной транскрипции	118
2.5. Полимеразная цепная реакция	118
2.6. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле	119
2.7. Молекулярное клонирование целевых генов	120
2.7.1. Характеристика используемых векторов	123
2.8. Определение нуклеотидной последовательности ДНК	124
2.9. Характеристика используемых бактериальных штаммов	125
2.10. Среды для культивирования бактерий	127
2.11. Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	128
2.12. Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i>	129
2.13. Индукция синтеза рекомбинантных белков	130
2.14. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле	131

2.15. Выделение и очистка рекомбинантных ферментов	132
2.16. Получение гидроперекисей жирных кислот	133
2.17. Кинетические исследования рекомбинантных ферментов	134
2.18. Инкубация рекомбинантных ферментов с гидроперекисями	135
2.19. Профилирование оксилипинов	136
2.20. Анализ продуктов реакций методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	137
2.20.1. Хроматография на обращенной фазе	137
2.20.2. Хроматография на нормальной фазе	137
2.21. Стерический анализ	138
2.22. Спектральные исследования	138
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	140
3.1. Изучение профилей оксилипинов огурца	140
3.2. Получение рекомбинантных ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 огурца	149
3.3. Идентификация продуктов инкубации ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 с гидроперекисями жирных кислот	150
3.4. Получение ферментов CYP74C2, CYP74C4_ST, CYP74C13_GM, CYP74C13_MT и CYP74C43 и изучение их каталитических свойств	164
3.5. Получение алленоксидсинтаз подсемейств CYP74A и CYP74C и изучение их каталитических свойств	173
3.6. Получение ферментов подсемейства CYP74B и изучение их каталитических свойств	182

3.7. Получение фермента СУР74В33 моркови (<i>Daucus carota</i>) и изучение его каталитических свойств	193
3.8. Получение дивинилэфирсинтаз подсемейства СУР74D и изучение их каталитических свойств	200
3.9. Получение ферментов СУР74В16 льна-долгунца (<i>Linum usitatissimum</i>) и СУР74Q1 лютика едкого (<i>Ranunculus acris</i>) и изучение их каталитических свойств	207
3.10. Получение ферментов СУР74М1, СУР74М2 и СУР74М3 плаунка <i>Selaginella moellendorffii</i>	223
3.11. Изучение каталитических свойств ферментов СУР74М1 и СУР74М3	228
3.12. Изучение каталитических свойств фермента СУР74М2	233
3.13. Получение фермента СУР74А88 лютика японского (<i>Ranunculus japonicus</i>) и изучение его каталитических свойств	238
3.14. Получение фермента СУР5164В1 бурой водоросли <i>Ectocarpus siliculosus</i> и изучение его каталитических свойств	244
3.15. Получение ферментов СУР443D1 и СУР443С1 роющей литоральной актинии <i>Nematostella vectensis</i> и изучение их каталитических свойств	254
3.16. Получение фермента СУР440А18 ланцетника азиатского <i>Branchiostoma belcheri</i> и изучение его каталитических свойств	267
3.17. Филогенетические исследования ферментов СУР74	278
3.18. Анализ взаимосвязи структуры и каталитических свойств ферментов СУР74 с помощью сайт-направленного мутагенеза	288

3.19. Анализ каталитических свойств мутантных форм ферментов CYP74C13_MT, CYP74C1_CS и CYP74C31	290
3.20. Изучение влияния сайта «F/L toggle» на каталитические свойства алленоксидсинтаз подсемейств CYP74A и CYP74C	294
3.21. Изменение каталитической активности алленоксидсинтазы LeAOS3 томата в результате сайт-направленного мутагенеза в участке перегиба I-спирали (CPC-4) и ERR-триаде	302
3.22. Изменения каталитической активности фермента CYP74B16 и NtDES в результате сайт-направленного мутагенеза	306
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	327
ВЫВОДЫ	331
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	333
ПРИЛОЖЕНИЕ	402

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- 1.АОС – алленоксидсинтаза;
- 2.ГПЛ – гидропероксидлиаза;
- 3.ДЭС – дивинилэфирсинтаза;
- 4.ЭАС – эпоксиалкогольсинтаза;
- 5.ЛОГ – липоксигеназа;
- 6.ПОГ – пероксигеназа;
- 7.АОЦ – алленоксидциклаза;
- 8.АФК – активные формы кислорода;
- 9.9-ЛОГ – липоксигеназа, окисляющая полиненасыщенную жирную кислоту по атому углерода в положении 9;
- 10.13-ЛОГ – липоксигеназа, окисляющая полиненасыщенную жирную кислоту по атому углерода в положении 13;
- 11.ПНЖК – полиненасыщенная жирная кислота;
- 12.СРС – субстрат-распознающий сайт;
- 13.18:1 – октадеценовая кислота
- 14.18:2 – октадекадиеновая (линолевая) кислота;
- 15.18:3 – октадекатриеновая (α -линоленовая) кислота;
- 16.13-ГПОТ – (9*Z*,11*E*,13*S*,15*Z*)-13-гидроперокси-(9,11,15)-октадекатриеновая кислота;
- 17.13-ГПОД – (9*Z*,11*E*,13*S*)-13-гидроперокси-(9,11)-октадекадиеновая кислота;
- 18.9-ГПОТ – (9*S*,10*E*,12*Z*,15*Z*)-9-гидроперокси-(10,12,15)-октадекатриеновая кислота;
- 19.9-ГПОД – (9*S*,10*E*,12*Z*)-9-гидроперокси-(10,12)-октадекадиеновая кислота;
- 20.9,10-ЭОД – (12*Z*)-9,10-эпокси-(10,12)-октадекадиеновая кислота;
- 21.12,13-ЭОД – (9*Z*)-12,13-эпокси-(9,11)-октадекадиеновая кислота;
- 22.9,10-ЭОТ – (10*E*,12*Z*)-9,10-эпокси-(10,12,15)-октадекатриеновая кислота;
- 23.12,13-ЭОТ – (9*Z*,11*E*,13*S*,15*Z*)-12,13-эпокси-(9,11,15)-октадекатриеновая кислота;

24. 12-ОФДК – (15Z)-12-оксофито-10,15-диеновая кислота;
25. 12-ОФЕК – 12-оксо-10-фитоеновая кислота;
26. 10-ОФДК – (15Z)-10-оксо-11,15-фитодиеновая кислота;
27. 10-ОФЕК – 10-оксо-11-фитоеновая кислота;
28. НАД(Ф)Н – никотинамиддинуклеотидфосфат восстановленный;
29. ФАД – флавинадениндинуклеотид;
30. ФМН – флавинмононуклеотид;
31. Трис – трис-(гидроксиметил)-аминометан;
32. ДСН – додецилсульфат натрия;
33. ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;
34. ФМСФ – фенилметилсульфонилфлуорид;
35. ПЦР – полимеразная цепная реакция;
36. дНТФ – смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
37. ОРС – открытая рамка считывания;
38. ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид;
39. Диазометан – N-нитрозотолуол-4-сульфометиламид;
40. ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
41. ТМС – триметилсилил;
42. Me/ТМС – ТМС-производное метилового эфира;
43. ГХ-МС – газовая хромато-масс-спектрометрия;
44. ПОЭТЭ – полиоксиэтилен-10-тридецилэфир;
45. ЯМР – ядерный магнитный резонанс;
46. COSY, correlation spectroscopy – корреляционная спектроскопия;
47. HSQC, heteronuclear single quantum coherence spectroscopy – гетероядерная спектроскопия когерентности отдельных квантов;
48. HMBC, heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy – спектроскопия корреляции множественных гетероядер;
49. NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy – спектроскопия ядерных эффектов Оверхаузера.

ВВЕДЕНИЕ

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ И ЕЕ АКТУАЛЬНОСТЬ

Окисление полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) является источником важнейших биорегуляторов – оксилипинов, 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 оксилипинов 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 оксилипины, 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 оксипирины – продукты липоксигеназного каскада: гидроксид-, дигидроксид-, тригидроксид-, оксо-, эпокси- или кето-производные жирных кислот, дивиниловые эфиры, альдегиды, спирты, альдокислоты, циклопентеноны и жасмонаты (Grechkin, 1998; Wasternack, Feussner, 2017). Физиологические свойства оксипиринов 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 эпоксигидроксид-производных (эпоксиспиртов) и тригидроксид-производных (тригидроксидкислот), 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 O-O связи гидроперекиси, перегруппировку оксирадикала в эпоксиаллильный радикал и восстановление гидроксильного радикала. Первый механизм осуществляется при участии пероксигеназ (Blée, Schuber, 1990; Hamberg, Hamberg, 1996; Blée *et al.*, 2012) и других оксидоредуктаз (Garscha, Oliw, 2009); второй осуществляется в присутствии кислот (Gardner *et al.*, 1984a,b), 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 эпоксиспиртов по второму механизму – эпоксиалкогольсинтаза VfEAS (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 эпоксиспиртов 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 VtEAS (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 эпоксиспирты – 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 эпоксигидроксипроизводные 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

У растений и организмов, принадлежащих другим таксонам, у которых ранее были обнаружены эпокси спирты – 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 эпокси спирты – продукты эпоксиалкогольсинтазной ветви липоксигеназного каскада. Кроме того, охарактеризованы истинные эпоксиалкогольсинтазы, входящие в состав как семейства CYP74, так и клана CYP74.

Расшифрована детальная структура эпокси спиртов – продуктов эпоксиалкогольсинтазной активности ферментов семейства и клана CYP74. Показано, что ферменты растений и бурых водорослей катализируют образование эпокси спиртов, 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 изомеразами, 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 оксипипины 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 тригидроксикислот – 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 лек-

ций по биохимии, физиологии растений и молекулярной биологии в ВУЗах.

АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ

Материалы диссертации были представлены на Международном симпозиуме «Растительные липиды и оксипирины» (Казань, 2008); на Международном симпозиуме «Регуляторные оксипирины» (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: биоразнообразию и биотехнологии (Великобритания, Йорк, 2018); на II Объединенном научном форуме VI Съезда биохимиков России и IX Российского симпозиума «Белки и пептиды» (Сочи, 2019) и др.

ПУБЛИКАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

По теме диссертации опубликована 22 научная статья в рецензируемых изданиях (6 статей в отечественных изданиях и 16 – в зарубежных).

СТРУКТУРА И ОБЪЁМ ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация состоит из Введения, Обзора литературы, Экспериментальной части, состоящей из Материалов и Методов, а также Результатов и Обсуждения, и Заключения. В конце диссертации приведены Выводы, Спи-

сок цитируемой литературы и Приложение. Диссертация изложена на 438 страницах машинописного текста, содержит 26 таблиц и 136 рисунков. Список литературы включает 623 цитируемых работ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному консультанту академику РАН Александру Николаевичу Гречкину. Автор выражает признательность сотрудникам лаборатории оксипиринов: 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 сотруднику лаборатории биофизической химии наносистем к.б.н. Булату Имамутдиновичу Хайрутдинову за помощь в проведении экспериментов. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов 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).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Оксипирины

Перекисное окисление липидов является общим для всех биологических систем, при этом образующиеся продукты получили общее название оксипиринов. Термин «оксипирины» охватывает класс соединений, состоящий из нескольких сотен различных окисленных производных полиненасыщенных жирных кислот в различных аэробных организмах, включая животных, растения, грибы и бактерии (Gerwick *et al.*, 1991; Andreou *et al.*, 2009; Griffiths, 2015).

У животных основными оксипиринами являются эйкозаноиды (от греч. *eikosi* – двадцать) – окисленные производные эйкозатриеновой (C20:3), арахидоновой (эйкозотетраеновой, C20:4), тимнодоновой (эйкозопентаеновой, C20:5) кислот. Они регулируют клеточную дифференциацию, иммунные ответы и гомеостаз (Funk, 2001; Christie, Harwood, 2020). Депонироваться эйкозаноиды не могут, разрушаются в течение нескольких секунд, поэтому клетка должна синтезировать их постоянно из соответствующих жирных кислот. Эйкозаноиды играют важную роль в воспалительных процессах и в основном в осуществлении стрессового ответа на инфекции, аллергию и воздействие лекарств и ксенобиотиков (Funk, 2001; Christie, Harwood, 2020). Эйкозаноиды разделяют на следующие группы:

(1) – продукты циклооксигеназного пути превращения полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) – простагландины, тромбоксаны (Reich *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000; Spickett *et al.*, 2010; Christie, Harwood, 2020);

(2) – продукты липоксигеназного пути превращения ПНЖК – гидро(перо)ксиаллилоксид-производные ПНЖК, гепоксилины, лейкотриены, липоксины (Haeggström *et al.*, 2011; Christie, Harwood, 2020);

(3) – продукты цитохром P450 оксидазного пути превращения ПНЖК – 16-, 17-, 18-, 19-, 20-гидрокси- и эпоксипроизводные ПНЖК (Oliw, 1994).

Отдельную группу соединений представляют собой простагландины нециклооксигеназного происхождения – продукты перекисного окисления ПНЖК, изопростагландины (Morrow *et al.*, 1990; Christie, Harwood, 2020).

Простагландины синтезируются практически во всех клетках, кроме эритроцитов и лимфоцитов. Выделяют типы простагландинов А, В, С, D, Е, F. Их функции сводятся к изменению тонуса гладких мышц бронхов, мочеполовой и сосудистой систем, желудочно-кишечного тракта; при этом направленность изменений различна в зависимости от типа простагландинов и условий (Kobayashi, Narumiya, 2002). Они также влияют на температуру тела. Простагландины участвуют в патогенезе таких заболеваний, как астма, артрит, бесплодие, нейродегенеративные нарушения (Miller, 2006). Эти соединения участвуют в свертывании крови при повреждении кровеносных сосудов: одни стимулируют сокращение сосудов и агрегацию тромбоцитов, другие способны вызывать противоположный эффект, не позволяя образовываться сгусткам крови на стенках сосудов в ситуации, когда повреждений сосудов нет (Bhagwat *et al.*, 1985; Miller, 2006). Нарушение в регуляции простагландинов может приводить к инфарктам и инсультам (Miller, 2006; Lončarić *et al.*, 2021). Простагландины вовлечены в регуляцию работы многих органов, таких как желудочно-кишечный тракт, где они ингибируют синтез кислоты и увеличивают секрецию защитной слизи; кроме того, они усиливают кровоток в почках (Wilson *et al.*, 1971). Простагландины участвуют в индукции многих репродуктивных процессов, таких как зачатие и роды, играют роль в функционировании яичников и матки (Challis, Gibb, 1996). Кроме того, они обеспечивают костный метаболизм (Stern *et al.*, 1985), деятельность мозга и нервов (Samuelsson, 1964), регулируют работу гладкой мускулатуры. Простагландины являются промежуточными сигнальными соединениями, играющими важную роль во множестве процессов – лихорадка, сон, боль, воспаление, аллергия, иммунитет, липогенез, функционирование сердечно-сосудистой системы (Kobayashi, Narumiya, 2002; Martin-Arjol *et al.*, 2010; Lončarić *et al.*, 2021). Простагландины широко вовлечены в канцерогенез,

включая рак толстой кишки, легких, простаты, шейки матки, яичников, молочной железы и поджелудочной железы (Oshima, Oshima, 2012; Rundhaug *et al.*, 2011).

Простациклины являются подвидом простагландинов, но дополнительно обладают особой функцией – ингибируют агрегацию тромбоцитов и обуславливают вазодилатацию (Leffler *et al.*, 1994; Christie, Harwood, 2020). Они особенно активно синтезируются в эндотелии сосудов миокарда, матки, слизистой желудка. Тромбоксаны образуются в тромбоцитах, стимулируют их агрегацию и вызывают сужение мелких сосудов (Uotila *et al.*, 1983).

Лейкотриены активно синтезируются в лейкоцитах, в клетках лёгких, селезёнки, мозга, сердца (Lewis *et al.*, 1990; Christie, Harwood, 2020). Выделяют 6 типов лейкотриенов: А, В, С, D, Е, F. В лейкоцитах они стимулируют подвижность, хемотаксис и миграцию клеток в очаг воспаления (Busse, 1998). Кроме того, они вызывают сокращение мускулатуры бронхов в дозах в 100-1000 раз меньших, чем гистамин.

1.2. Оксипирины растений

Растительные оксипирины представляют собой разнообразный и сложный класс молекул – продуктов окисления ПНЖК. Окисление ненасыщенных жирных кислот может происходить в результате ферментативных или неферментативных химических реакций. Разнообразие оксипиринов дополнительно увеличивается в результате реакций вторичного превращения. Структурное разнообразие оксипиринов расширяется за счет существования этих соединений либо в виде производных свободных жирных кислот, либо в виде сложных эфиров в составе простых и сложных липидов. Оксипирины могут выполнять различные биологические функции, в том числе сигнальные (Göbel, Feussner, 2009).

У высших растений наиболее распространенными ПНЖК являются линолевая кислота (C18:2 $\Delta^{9,12}$), α -линоленовая кислота (C18:3 $\Delta^{9,12,15}$) и (реже) гексадекатриеновая кислота (C16:3). γ -Линоленовая кислота (C18:3 $\Delta^{6,9,12}$),

арахионовая кислота ($C_{20}:4 \Delta^{5,8,11,14}$), эйкозапентаеновая кислота ($20:5 \Delta^{5,8,11,14,17}$) и докозагексаеновая кислота ($C_{22}:6 \Delta^{4,7,10,13,16,19}$) содержатся у водорослей, мхов и птеридофитов (рис. 1) (Wolff *et al.*, 1999; You *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2010; Croisier *et al.*, 2010; Lang *et al.*, 2011). Гексадекатриеновая кислота характерна для растений, у которых биосинтез гликолипидов происходит в основном в пластидах.

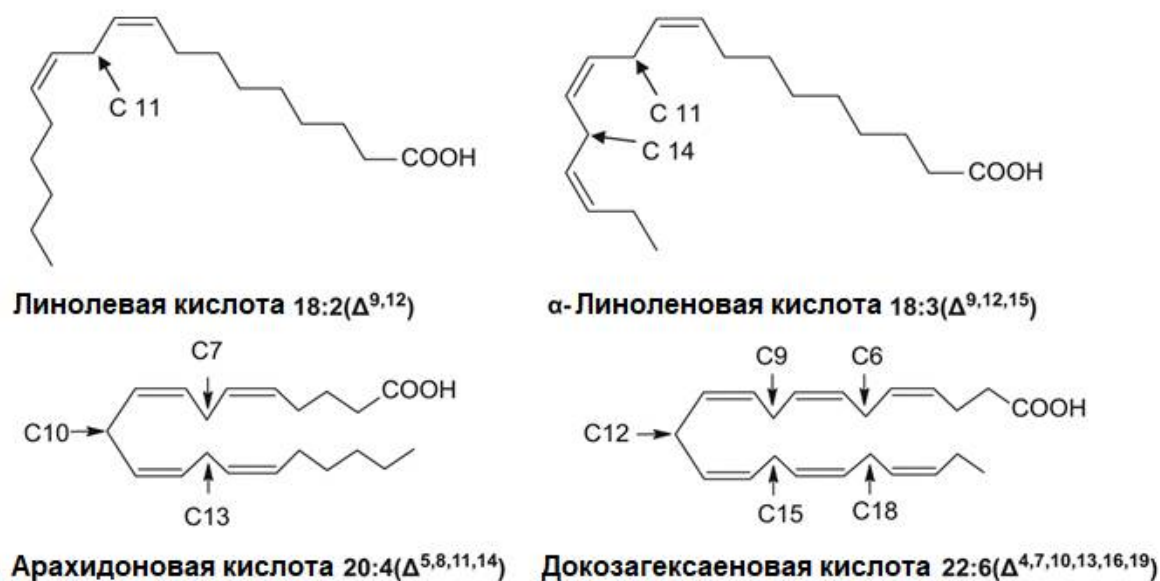


Рис. 1. Примеры ПНЖК в тканях растений. Указанные атомы углерода представляют собой метиленовые мостики (углероды между двойными связями в ацильных цепях), с которых начинается отрыв протонов (Griffits, 2015).

Растительные оксилипины включают гидроперокси-, гидрокси-, оксо-, эпокси-, эпоксигидрокси, ди- и тригидрокси-производные жирных кислот, дивиниловые эфиры, летучие альдегиды, альдокислоты, циклопентеноны, жасмонаты (рис. 2) (Grechkin, 1998; Wasternack, Feussner, 2017). Структурное разнообразие оксилипинов дополнительно увеличивается за счет этерификации сложных глицеролипидов (гликолипиды, фосфолипиды и нейтральные липиды) и их конъюгирования с аминокислотами и другими метаболитами, такими как сульфат, глутатион, этаноламин и углеводы (Mosblech *et al.*, 2009). Оксилипины могут выполнять различные биологические функции в

качестве вторичных мессенджеров и противомикробных, инсектицидных, а также противогрибковых соединений (Blée, 2002; Howe, Jander, 2008).

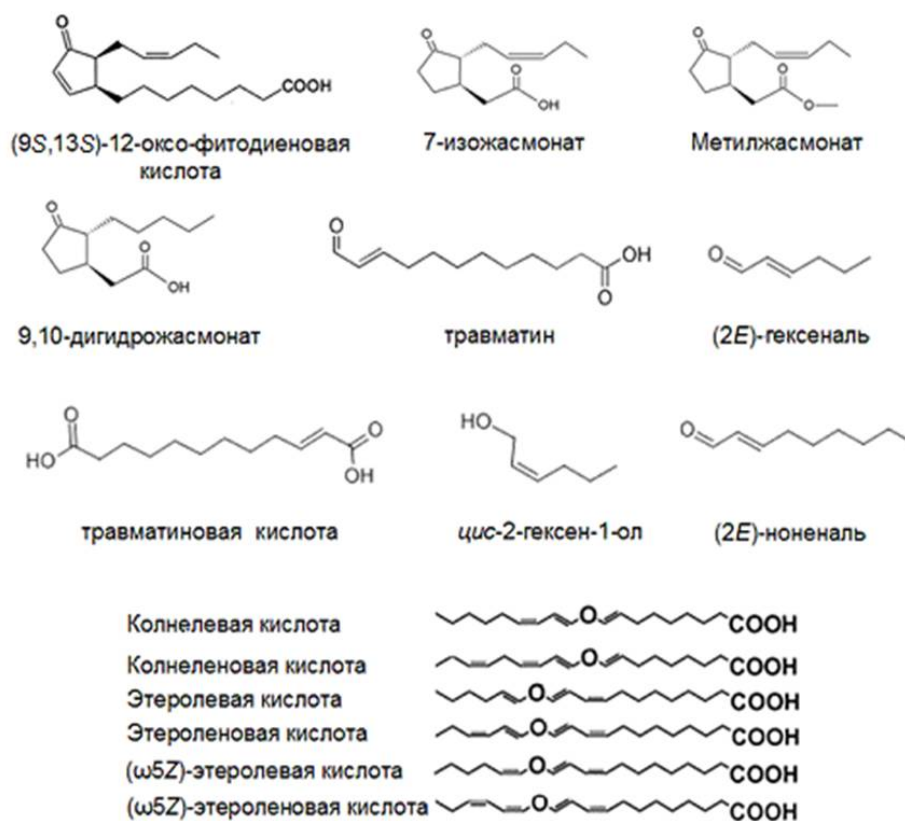


Рис. 2. Примеры растительных оксилипинов.

1.3. Неферментативные пути образования оксилипинов

Все аэробные биологические системы постоянно подвергаются автоокислению, и система двойных связей в составе ПНЖК особенно восприимчива к воздействию активных форм кислорода (АФК). Автоокисление – это прямая реакция молекулярного кислорода с органическими соединениями, в которой кислород ведет себя как бирадикал, когда два основных неспаренных электрона находятся в основном состоянии (триплетное состояние). Окисление липидов происходит через механизм свободных радикалов, включающий стадии инициации, размножения и терминации, часто перекрывающиеся между собой (Halliwell, Gutteridge, 2015).

Во многих фотосенсибилизированных реакциях энергия, получаемая от света и биологического сенсibilизатора (например, хлорофилла), переносится на кислород, который возбуждается, переходя из триплетного в синг-

летное состояние (синглетный кислород $^1\text{O}_2$), что приводит к заметному увеличению реакционной способности (по меньшей мере, в 1500 раз). ПНЖК, вступая в реакцию с $^1\text{O}_2$, образуют гидроперекиси в составе мембранных липидов, что приводит к неблагоприятным изменениям в их функционировании вследствие изменения текучести мембран (Girotti, 1998). Другие биологически важные молекулы, такие как ДНК, β -каротин, α -токоферол, холестерин и белки, также повреждаются $^1\text{O}_2$ (белки – в результате реакций с триптофаном, метионином, цистеином и гистидином) (Halliwell, Gutteridge, 2015). За счет одноэлектронного восстановления кислорода через компоненты цепи транспорта электронов внутри клеток в некоторых типах клеток, например, системы иммунной защиты, генерируется супероксидный радикал ($\text{O}^{2-\cdot}$), участвующий в защите против фитопатогенов (Murphy *et al.*, 2011). Супероксидный радикал может вести себя как восстановитель (часто восстанавливающий Fe^{3+} до Fe^{2+} в цитохроме с) или слабый окислитель (например, при взаимодействии с аскорбиновой кислотой). При участии фермента супероксиддисмутазы супероксидные радикалы частично нейтрализуются в клетках до перекиси водорода, которая затем нейтрализуется при участии гемового белка каталазы с образованием воды. У растений перекись водорода нейтрализуется в хлоропластах при участии как супероксиддисмутазы, так и аскорбатпероксидазы (Asada, 1999). Для полной регенерации аскорбиновой кислоты используется восстановленный глутатион, который образуется в результате восстановления окисленного глутатиона с помощью НАДФН по пути Асада-Холливелла (Foyer, Noctor, 2011). Перекись водорода является слабым окислителем, но в присутствии клеточного Fe^{2+} или других переходных металлов образует гидроксильные радикалы ($\cdot\text{OH}$), которые не несут заряда и способны проникать внутрь клеточных мембран и являются наиболее реакционно-способными и повреждающими активными формами кислорода. Разложение перекиси водорода Fe^{2+} и некоторыми комплексами Fe^{3+} называется реакцией Фентона, хотя, насколько интенсивны эти реакции *in vivo*, является дискуссионным вопросом и сильно зависит от наличия свободных ионов металлов.

Чтобы компенсировать окисление органических макромолекул, в клетках существует широкий ряд систем антиоксидантной защиты. К ним относится аскорбиновая кислота, которая способна восстанавливать гидроперекиси до более стабильных гидроксильных производных при определенных условиях. Ключевая роль аскорбиновой кислоты заключается в регенерации витамина Е после его окисления. Радикал α -токоферола стабилизируется путем делокализации электронов вокруг структуры фенольного кольца, а радикалы восстанавливаются аскорбиновой кислотой или другими восстановителями, такими как цистеин или глутатион (Niki, Noguchi, 2004). В целом, в клетках баланс окислителей и антиоксидантов, вероятно, играет решающую роль в определении судьбы многих органических молекул. Очевидно, существует связь между патологическими состояниями и окислением макромолекул (в том числе, липидов), и это может отражать дисбаланс механизмов, которые регулируют уровни антиоксидантов/прооксидантов.

Относительные скорости окисления ряда С18 жирных кислот показывают, что линолевая кислота в 40 раз более реакционноспособна, чем олеиновая, а α -линоленовая кислота в 2,4 раза более реакционноспособна, чем линолевая. Окисляемость линолевой, α -линоленовой, арахидоновой и докозагексаеновой кислот прямо пропорциональна количеству присутствующих бис-аллильных положений и показывает, что окисляемость увеличивается примерно в 2 раза для каждой активной бис-аллильной метиленовой группы; таким образом докозагексаеновая кислота в 5 раз более реакционноспособна, чем линолевая (Frankel, 2005).

Неферментативное перекисное окисление липидов мембран катализируется во время окислительного стресса и образования АФК, таких как перекись водорода и синглетный кислород (Mueller, 2004). Превращение АФК в высокореактивный гидроксильный радикал приводит к окислению ПНЖК мембран, и получающиеся в результате этого рацемические смеси радикалов перокси-производных жирных кислот могут инициировать цепные радикальные реакции, приводя к образованию и накоплению рацемических гидропе-

рекисей жирных кислот, которые в свою очередь превращаются в сложные липиды в составе мембран либо в свободном виде (рис. 3 справа) (Leverentz *et al.*, 2002).

При автоокислении жирных кислот для каждой дополнительной C=C связи генерируются два дополнительных окисленных продукта. Кинетические свойства и скорости превращений сложных эфиров жирных кислот рассчитать сложнее, чем неэтерифицированных жирных кислот, из-за коллоидных свойств липидов. Кинетическое поведение дополнительно осложняется присутствием ионов металлов, которые разлагают гидроперекиси липидов; и, как правило, скорость автоокисления пропорциональна квадратному корню из концентрации ионов металла (Frankel, 2005). Метиленовые атомы углерода являются сайтами протонного рассеяния и образования углеродных радикалов. Радикальная перегруппировка приводит к радикальному сдвигу в направлении + 2 или - 2 относительно карбоксильного конца цепи, и новый углеродный радикальный центр затем подвергается воздействию молекулярного кислорода, что приводит к образованию пероксирадикала. Это сопровождается сдвигом двойной связи для генерации сопряженного диена с сильным поглощением при λ_{\max} 234 нм. Таким образом, отделение протона от C11 линолевой кислоты обычно продуцирует 9-гидроперокси или 13-гидроперокси-производные. Для α -линоленовой кислоты дополнительный метиленовый углерод в положении C14 генерирует 12 и 16 окисленные производные, и они образуются в виде рацемической смеси с *R:S* 50:50 (Leverentz *et al.*, 2002; Göbel, Feussner, 2009).

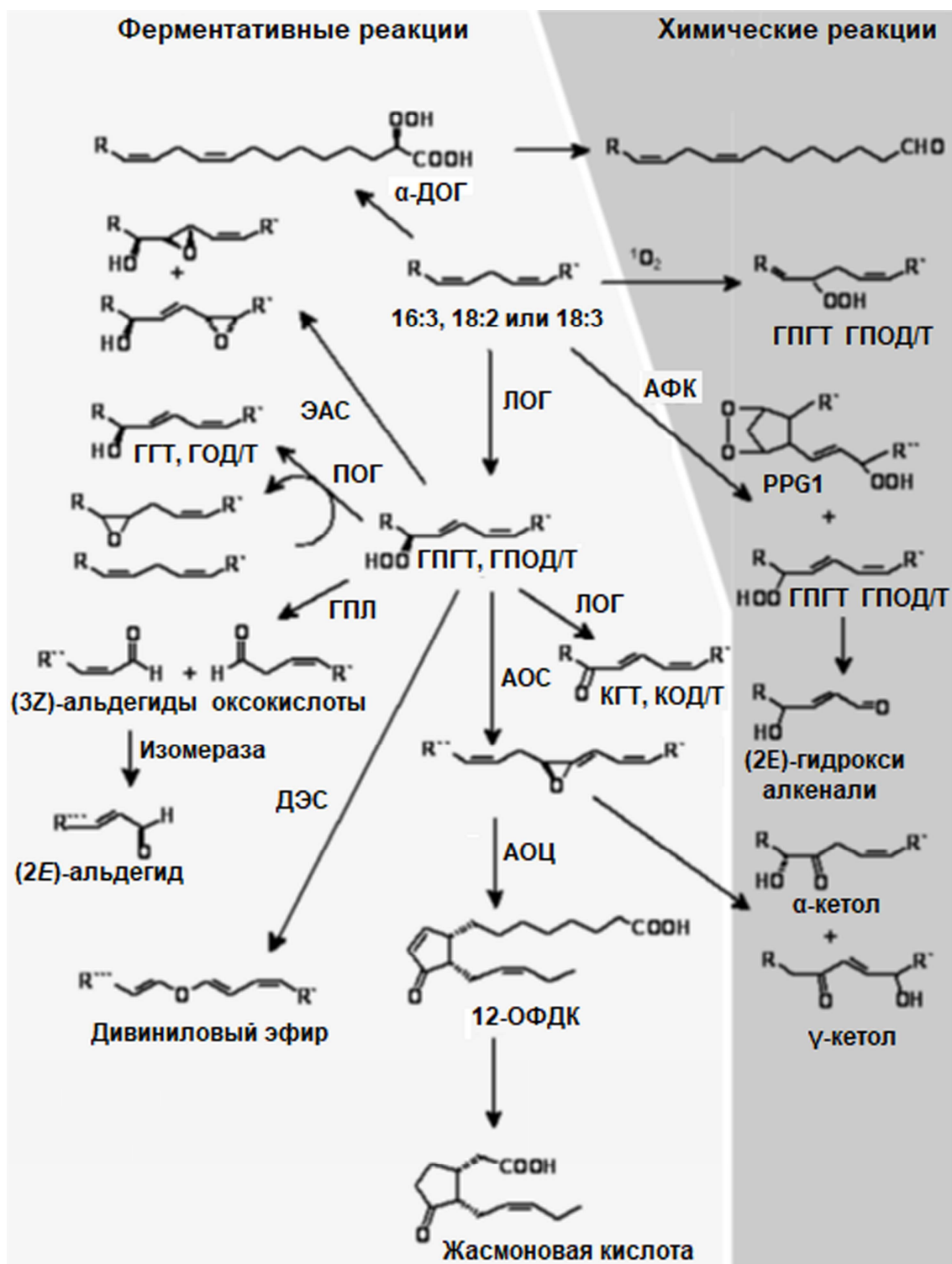


Рис. 3. Оксипиновый метаболизм. ЛОГ, липоксигеназа; α-ДОГ, α-диоксигеназа; АОС, алленоксидсинтаза; АОЦ, алленоксидциклаза; ДЭС, дивинилэфирсинтаза; ЭАС, эпоксиалкогольсинтаза; ГПЛ, гидропероксидлиаза; ПОГ, пероксигеназа; АФК, активные формы кислорода. Ферментативные реакции выделены светло-серым цветом, неферментативные – темно-серым. Г(П)ГТ, гидро(перо)ксигексадекатриеновая кислота; Г(П)ОД/Т, гидро(перо)ксиоктадека(ди/три)еновая кислота; КГТ, кетогексадекатриеновая кислота; КОД/Т, кетооктадека(ди/три)еновая кислота; PPG1, фитопростаны G1-типа (Göbel, Feussner, 2009).

В случае гидроперекисей жирных кислот и пероксирадикалов с более чем двумя двойными связями этот процесс окисления может также включать внутримолекулярные радикальные цепные реакции, приводящие к образованию нестабильных бициклических эндоперокси-производных гидроперекисей с простагландиновой системой G-кольца (фитопростаны типа G1), посредством ферментативных и неферментативных путей. Другими хорошо охарактеризованными продуктами превращений пероксирадикалов являются ди- и тригидрокси-производные жирных кислот, эпокиспирты, кетодиены, кетотриены и алкенали (Gardner, 1989).

Неферментативная циклизация арахидоновой и α -линоленовой кислоты у животных и растений соответственно приводит к образованию соответственно изопростанов (изо-P) и C18 изопростанов, называемых динор-изопростанами или фитопростанами (фитоP). ФитоP структурно напоминают жасмоновую кислоту (ЖК), но не образуются ферментативно (Durand *et al.*, 2009). Реакции спонтанного восстановления и перегруппировки, в конечном итоге, приводят к образованию фитопростанов типа A1-, B1-, D1-, E1-, F1- и дезокси-J1, которые структурно аналогичны изопростанам животных (Imbusch, Müller, 2000a,б). Дополнительной реакцией в пути образования и превращения фитопростанов может быть распад фитопростанов G1-типа с образованием малонового диальдегида (МДА) (Imbusch, Mueller, 2000a,б; Krischke *et al.*, 2003; Mueller, 2004; Jahn *et al.*, 2010). *In vivo* повсеместно обнаруживаются F1-фитоP и E1-фитоP (рис. 4). Аналогичный ряд изопростанов – производных арахидоновой кислоты хорошо охарактеризован (Jahn *et al.*, 2008; Milne *et al.*, 2011) и используется в качестве маркеров перекисного окисления липидов в тканях млекопитающих (рис. 4) (Nourooz-Zadeh, 2008). Из метиленовых атомов углерода, указанных на рис. 1, следует, что для арахидоновой кислоты могут образовываться C5, C9, C8, C12, C11 и C15 окисленные производные. В свою очередь, в нервной ткани был идентифицирован сложный паттерн F4-нейропростанов (рис. 4), полученных в результате

автоокисления докозагексаеновой кислоты (Morrow *et al.*, 1990; Musiek *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2005; Kadiiska *et al.*, 2005).

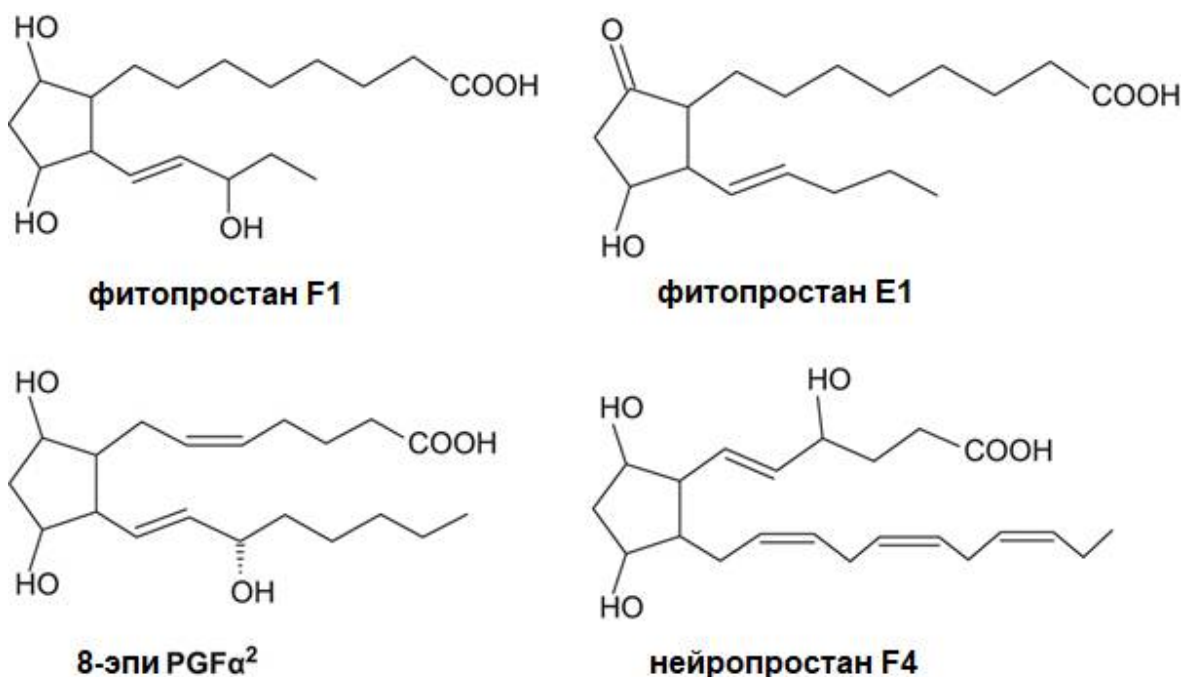


Рис. 4. Неферментативно образующиеся в биологических тканях циклопентанильные продукты (Griffiths, 2015).

У растений неферментативное образование оксипинов может происходить в ответ на воздействие патогенов. При этом уровни этерифицированных гидроксикислот и фитопростана F1 повышаются в составе этерифицированных липидов в 30 раз сильнее, чем в виде свободных оксипинов, что свидетельствует о том, что преимущественно они образуются в мембранах, из которых могут быть высвобождены (Grun *et al.*, 2007). Исследования с использованием фитопростана A1 также показали, что он действует как сигнальное соединение и модулирует протеом *A. thaliana*, причем более 35% затронутых белков локализируются в хлоропластах (Dueckershoff *et al.*, 2008).

В настоящее время фитопростанам уделяется большое внимание структурной аналогии с медиаторами биологических реакций у млекопитающих, такими как изопростаны и простагоиды (Yonny *et al.*, 2016; Medina *et al.*, 2018; Domínguez-Perles *et al.*, 2018, 2019). В течение последних лет активно изучают разнообразие фитопростанов в различных видах и продуктах расти-

тельного происхождения, включая растительные масла, семена и непищевые растительные материалы. Их рассматривают в качестве биомаркеров физиологического состояния растений (Pinciroli *et al.*, 2018, 2019; Lipan *et al.*, 2020), окислительной деградации продуктов питания растительного происхождения (Collado-Gonzalez *et al.*, 2015, 2020), а также в качестве биоактивных соединений, обладающих противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами, в том числе предотвращающими поражение нейронов у людей (Minghetti *et al.*, 2014; Collado-Gonzalez *et al.*, 2015; Pino Ramos *et al.*, 2019; Medina *et al.*, 2019, 2020; Martínez Sanchez *et al.*, 2020).

1.4. Ферментативные пути биосинтеза оксилипинов

Ферментативный биосинтез оксилипинов начинается с образования гидроперекисей при участии липоксигеназы (ЛОГ, EC 1.13.11.12, Brash *et al.*, 1999; Kuhn *et al.*, 2015), α -диоксигеназы у растений (α -ДОГ), циклооксигеназы у животных (ЦОГ) или линолеатдиолсинтазы у грибов (ЛДС) (Hamberg *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2007; Goulah *et al.*, 2013). У растений образование гидроперекисей катализируется ЛОГ (Royo *et al.*, 1996; Feussner, Wasternack, 2002) и α -ДОГ (Hamberg *et al.*, 2005) (рис. 3, слева) и инициирует пути превращения полученных гидроперекисей жирных кислот в шести альтернативных ферментативных ветвях, первые реакции в которых катализируются следующими ферментами: алленоксидсинтазами (АОС), дивинилэфирсинтазами (ДЭС), гидропероксидлиазами (ГПЛ), пероксигеназами (ПОГ), вицинальдиолсинтазами и эпоксиалкогольсинтазами (ЭАС) (Grechkin, 1998; Blée, 1998; Wasternack, Feussner, 2017). Разнообразие растительных оксилипинов, продуктов липоксигеназного пути, во многом зависит от этих вторичных превращений гидроперекисей жирных кислот (Brash, 2009; Hughes *et al.*, 2009; Griffiths, 2015). Три фермента относятся к семейству CYP74 цитохромов P450: АОС (EC 4.2.1.92), ГПЛ (синоним «полуацетальсинтаза» (Mukhitova *et al.*, 2018)) и ДЭС (EC 4.2.1.121) (Blée, 2002; Howe, Schilmiller, 2002; Matsui, 2006; Stumpe, Feussner, 2006; Lee *et al.*, 2008). К настоящему времени наи-

большее внимание исследователи уделяют алленоксидсинтазному и гидропероксидлиазному путям формирования оксипинов, обходя вниманием остальные ветви.

Синтез оксипинов в виде производных свободных жирных кислот описан у различных растений. В свободной форме оксипины могут быть связаны с растворимыми фракциями, такими как цитозоль, строма пластид или пероксисомальный матрикс (Browse, 2005; Mosblech *et al.*, 2009). Недавние исследования показали, что оксипины могут присутствовать в клетке в составе сложных липидов в этерифицированном виде. Одной из групп метаболитов, содержащих этерифицированные оксипины, являются так называемые арабидопсиды (рис. 5) – производные пластидиальных гликолипидов, моно- и дигалактозилдиацилглицеридов (МГДГ и ДГДГ соответственно). Они содержат (9*S*,13*S*)-12-оксо-10,15-фитодиеновую кислоту (12-ОФДК) и/или (7*S*,11*S*)-10-оксо-динор-фитодиеновую кислоту (дн-ОФДК) вместо жирных кислот в положениях sn₁ и sn₂ (Hisamatsu *et al.*, 2003, 2005; Nakajyo *et al.*, 2006). Некоторые арабидопсиды дополнительно содержат 12-ОФДК/дн-ОФДК, ацилирующие галактозу (Andersson *et al.*, 2006; Kourtchenko *et al.*, 2007) (таблица 1 приложения).

Другие окисленные гликолипиды, имеющие в составе один или два оксипина, могут содержать помимо 12-ОФДК/дн-ОФДК кетолы в положениях sn₁ и/или sn₂ (Stelmach *et al.*, 2001; Buseman *et al.*, 2006; Glauser *et al.*, 2008). До сих пор не ясно, по какому пути образуются окисленные гликолипиды; они образуются либо в результате включения свободных оксипинов в пластидиальные липиды, либо в результате прямого действия ферментов биосинтеза оксипинов на этерифицированные субстраты (Feussner, Wasternack, 1998).

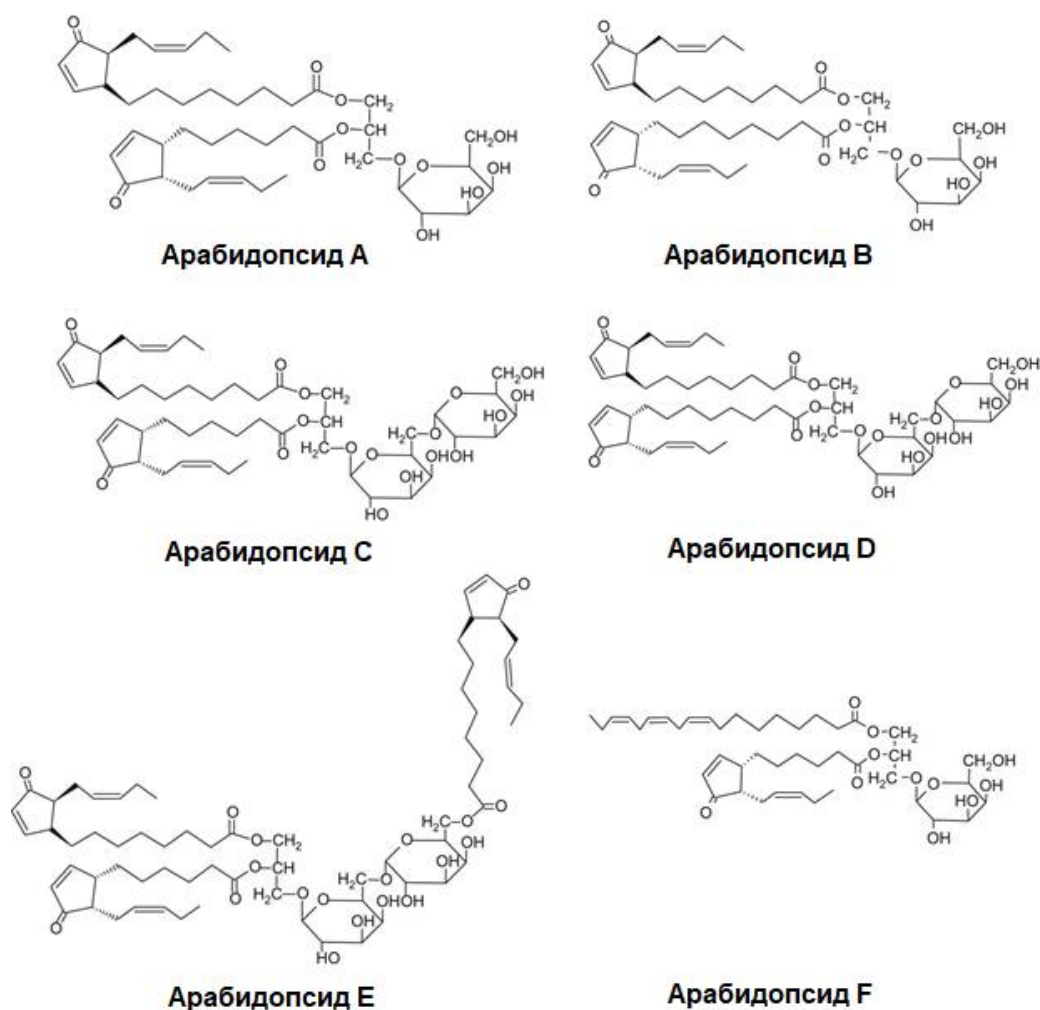


Рисунок 5. Хлоропластные галактолипиды, содержащие циклические окисленные производные жирных кислот (Griffiths, 2015).

Показано, что уровень этих циклооксипиновых галактолипидов увеличивается после поранения (Hisamatsu *et al.*, 2005). После поранения листьев *A. thaliana* в течение 30 минут уровень арабидопсида А повышается с базального уровня (20%) до 80%. Уровень арабидопсида В также растет с <3% до 15%. Высказано предположение, что арабидопсиды могут выполнять двойную функцию – выступать как антипатогенные вещества и как запасные соединения, которые обеспечивают медленное высвобождение жасмонатов (Ibrahim *et al.*, 2011). Однако широкое распространение предшественников гликолипидов для биосинтеза жасмонатов, вероятно, ограничено только рядом видов (Mosblech *et al.*, 2009).

В листьях льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) были обнаружены линолипиды – галактолипиды, содержащие этерифицированные остатки ди-

виниловых эфиров. Линолипины А и В идентифицированы как МГДГ. Линолипин А содержит один остаток α -линоленовой кислоты и один остаток дивинилового эфира – (9Z,11E,1'Z,3'Z)-12-(1',3'-гексадиенилокси)-9,11-додекадиеновой ((ω 5Z)-этероленовой) кислоты в положениях sn₁ и sn₂ соответственно. Линолипин В содержит остатки (ω 5Z)-этероленовой кислоты в обоих положениях sn₁ и sn₂ (Chechetkin *et al.*, 2009). Линолипины С и D идентифицированы как ДГДГ. Линолипин С содержит один остаток (ω 5Z)-этероленовой кислоты и один остаток α -линоленовой кислоты в положениях sn₁ и sn₂ соответственно. Линолипин D содержит два остатка (ω 5Z)-этероленовой кислоты в положениях sn-1 и sn-2. Содержание этих соединений значительно увеличивается в ответ на патогенез – накопление этерифицированных противомикробных дивиниловых эфиров может иметь отношение к защите растений (Chechetkin *et al.*, 2009). Кроме того, быстрое образование (2-30 минут) линолипинов А – D происходит в листьях льна при их механическом повреждении (Chechetkin *et al.*, 2013).

В листьях лютика лугового (*Ranunculus acris*) было также выявлено присутствие линолипинов, быстрое накопление которых происходило в поврежденных листьях, в то время как неповрежденные листья их не содержали. Три из них были идентичны линолипинам В-D, обнаруженным в листьях льна. Другие соединения были идентифицированы как 1-O-(ω 5Z)-этероленоил-2-O-динор-(ω 5Z)-этероленоил-3-O- β -D-галактопиранозил-sn-глицерид, 1-O-(ω 5Z)-этероленоил-2-O-(7Z,10Z,13Z)-гексадекатриеноил-3-O- β -D-галактопиранозил-sn-глицерид, 1-O-(ω 5Z)-этероленоил-2-O-(7Z,10Z)-гексадекадиеноил-3-O- β -D-галактопиранозил-sn-глицерид, 1-O-(ω 5Z)-этероленоил-2-O- α -линоленоил-3-O- β -D-галактопиранозил-sn-глицерид и 1-O-(ω 5Z)-этероленоил-2-O-пальмитоил-3-O-(α -галактопиранозил-1-6- β -D-галактопиранозил)-sn-глицерид. Этим новым комплексным оксипипинам были даны тривиальные названия «линолипины Е, F, G, H и I» соответственно (Chechetkin *et al.*, 2019).

Вероятно, биосинтез окисленных гликолипидов не ограничен только перечисленными видами растений (Böttcher, Weiler, 2007). У других видов растений окисленных гликолипидов может быть очень мало, либо эти соединения представляют собой особую адаптацию, обнаруживаемую только у определенных видов (Mosblech *et al.*, 2009). Кроме того, описаны этерифицированные оксипирины в составе других сложных липидов, таких как фосфолипиды или нейтральные липиды. Этерифицированная 12-ОФДК обнаружена в составе фосфатидилглицерида, липида пластид (Buseman *et al.*, 2006); также выявлена 12-ОФДК в составе фосфатидилинозитола в клубнях картофеля (Fauconnier *et al.*, 2003). Окисленные нейтральные запасные липиды выявлены на ранних стадиях прорастания в растениях огурца, подсолнечника и льна (Feussner *et al.*, 1997). Кроме того, оксипирины могут быть связаны с сульфатами, глутатионом, этаноламином, углеводами или аминокислотами в форме сложных эфиров или конъюгатов. Модификации жасмоновой кислоты являются наиболее разнообразными (таблица 2 приложения). N-Ацилэтаноламины, синтезируемые в растениях нескольких видов, также могут преобразовываться при участии ферментов биосинтеза оксипиринов (van der Stelt *et al.*, 2000); однако до настоящего времени NAE-оксипирины не описаны *in vivo*. Образование аддуктов глутатиона является еще одной модификацией, обнаруженной, например, для 12-ОФДК и (2E)-гексенала, и, скорее всего, приводит к деградации соответствующих соединений (Davoine *et al.*, 2006).

1.5. Липоксигеназы

Липоксигеназы (ЛОГ) представляют собой негемовые железо- или марганец-содержащие ферменты, которые катализируют регио- и стереоспецифическое перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот в соответствующие гидроперекиси. ЛОГ обнаружены у животных, растений, грибов и бактерий. Кроме того, гены ЛОГ обнаружены также у красной водоросли *Phyropia haitanensis* и цианобактерии *Nostoc punctiforme* (Koeduka *et al.*, 2007;

Lang, Feussner, 2007; Zhu *et al.*, 2015). Типичными субстратами растительных ЛОГ являются линолевая и α -линоленовая кислоты, тогда как арахидоновая кислота является основным субстратом животных ЛОГ. Субстратами для бактериальных ЛОГ являются арахидоновая, α -линоленовая и олеиновая кислоты, а субстратами для грибных ЛОГ являются арахидоновая и α -линоленовая кислоты (Joo, Oh, 2012; Heshof *et al.*, 2016). ЛОГ классифицируются по атому С, который они окисляют. Выделяют 5-, 8-, 9-, 10-, 11, 12-, 13- и 15-ЛОГ (Heshof *et al.*, 2016). ЛОГ катализируют регио- и стереоспецифическое диоксигенирование ПНЖК, содержащих (1Z,4Z)-пентадиеновую систему (Feussner, Wasternack, 2002; Andreou, Feussner, 2009). Продукты ЛОГ выступают в качестве предшественников для дальнейших ферментативных путей, приводя к большому разнообразию сигнальных молекул, которые действуют как внутри- и межвидовые сигналы у растений, животных и грибов (Brodhun, Feussner, 2011; Andreou *et al.*, 2009; Fischer, Keller, 2016).

Растительные ЛОГ классифицируются как 9- или 13-ЛОГ в зависимости от сайта окисления в углеводородной цепи линолевой кислоты, продуцирующие либо 9-гидроперокси, либо 13-гидроперокси-производные субстрата (рис. 6) (Liavonchanka, Feussner, 2006; Schneider *et al.*, 2007; Andreou, Feussner, 2009). Кроме того, было показано, что 12-гидроперекиси С20 жирных кислот могут быть предшественниками С8 летучих оксипинов у *M. polymorpha* (Kihara *et al.*, 2014).

Исследования методом сайт-направленного мутагенеза показали, что 13-ЛОГ можно превратить в 9-ЛОГ, заменив остаток гистидина (His608) на меньший по размеру остаток валина. Предполагается, что демаскировка положительно заряженной гуанидиновой группировки вблизи активного сайта приводит к обратной ориентации жирнокислотного субстрата от головы к хвосту, тем самым облегчая его стерическую конфигурацию, так что стереоспецифическая диоксигенация происходит исключительно в положении С9 (Hornung *et al.*, 1999).

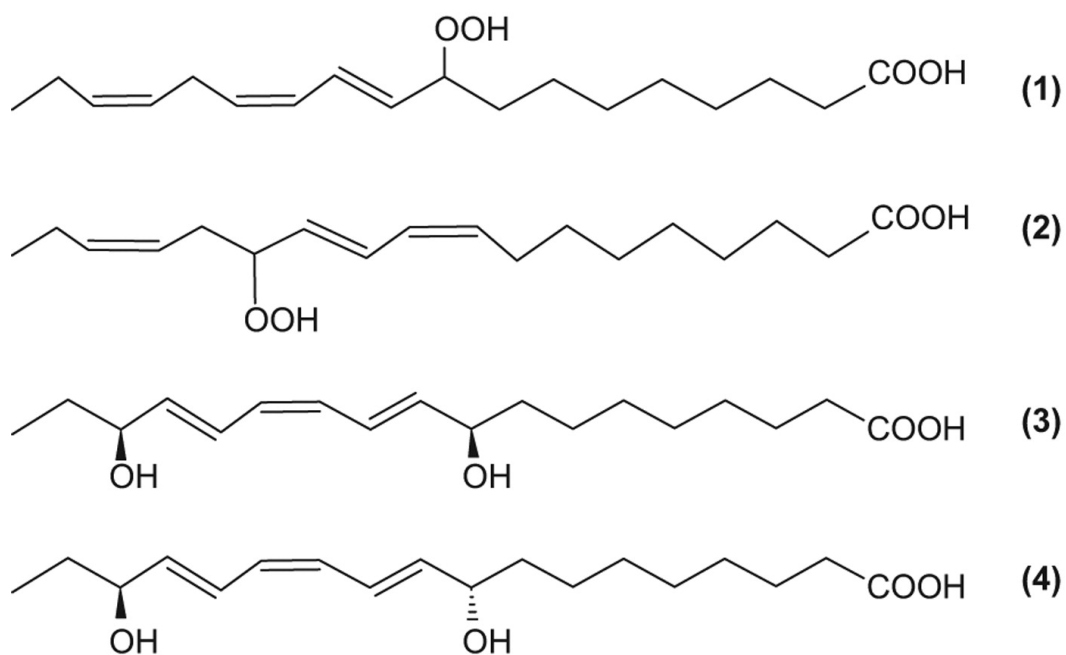


Рис. 6. Примеры липоксигеназных продуктов. 9-Гидропероксилиноленовая кислота (9-ГПОТ) (1), 13-гидропероксилиноленовая кислота (13-ГПОТ) (2), (9*S*,16*S*)-дигидрокси-(10*E*,12*Z*,14*E*)-линоленовая кислота (3) и (9*R*,16*S*)-дигидрокси-(10*E*,12*Z*,14*E*)-линоленовая кислота (4) (Griffiths, 2015).

С другой стороны, замена A562G в последовательности ZmLOX3 кукурузы приводила к изменению региоспецифичности этого фермента: мутантная форма ZmLOX3 A562G продуцировала не только (9*S*)-, но и (13*R*)-гидроперекиси линолевой кислоты (Chechetkin *et al.*, 2011).

Растительные ЛОГ окисляют не только свободные ПНЖК, но и ПНЖК в составе комплексных липидов, например, фосфолипидов или триацилглицеридов (Brash *et al.*, 1987; Feussner *et al.*, 1997; Holtman *et al.*, 1997; Andreou, Feussner, 2009). Так, исследования гена *LOXHI* листьев картофеля показали, что он локализован в хлоропластах, и выявили высокую активность по отношению к фосфатидилглицериду, специфичному для хлоропластов фосфолипиду и потенциальной мишени для индукции пластидных сигнальных путей (León *et al.*, 2002). Ингибирование LOXHI посредством антисмысловой опосредованной ко-супрессии не влияло на базальный или индуцированный повреждением уровень жасмонатов, однако приводило к заметному снижению продукции летучих C6 альдегидов, образующихся в ГПЛ ветви. Обнаруже-

ние оксигенированных предшественников жасмоновой кислоты в хлоропластных галактолипидах, МГДГ и ДГДГ (Andersson *et al.*, 2006; Kourtchenko *et al.*, 2007; Glauser *et al.*, 2008), позволило предположить, что ЛОГ может также использовать их как субстраты, что было подтверждено в исследованиях *in vitro* с использованием соевой ЛОГ (Nakashima *et al.*, 2011).

Гены ЛОГ присутствуют в виде мультигенных семейств во всех проанализированных до сих пор видах растений, например, у *A. thaliana* 6 генов (Bannenbergh *et al.*, 2009a) и у картофеля 14 генов ЛОГ (Feussner, Wasternack, 2002). Такое разнообразие изоформ ЛОГ может быть связано с различными физиологическими функциями, обеспечивающими различные пулы гидроперекисей ПНЖК в качестве субстратов для альтернативных путей дальнейшего превращения (Feussner, Wasternack, 2002; Liavonchanka, Feussner, 2006; Andreou, Feussner, 2009). Специфические изоформы ЛОГ, по-видимому, контролируют направленный поток метаболитов и, в конечном счете, определяют инициируемые нижестоящие сигнальные пути. Действительно, анализ мутантных линий *A. thaliana* с дефицитом 13-ЛОГ показал, что только одна из четырех 13-ЛОГ, LOX6, ответственна и необходима для стресс-индуцируемого накопления жасмонатов в корнях. Кроме того, LOX6 необходима для производства 12-ОФДК в листьях и корнях. Мутанты со сниженным содержанием LOX6 более привлекательны для детритивных ракообразных и более чувствительны к засухе, что указывает на то, что оксипирины – производные LOX6 – важны для реакций на эти факторы (Grebner *et al.*, 2013). Недавно с использованием соевой 15-ЛОГ были получены четыре изомера дигидроксилированных производных α -линоленовой кислоты, которые обладают ингибирующим эффектом на свойства тромбоцитов и проявляют противовоспалительные свойства (Liu *et al.*, 2013).

1.6. α -Диоксигеназы

В отличие от ЛОГ, α -ДОГ представляют собой белки, содержащие гем – простетическую группировку, фундаментальную для всех аэробных форм

жизни. Он состоит из протопорфирина IX с лигированным железом. Гем обычно нековалентно связан с белком, но в некоторых случаях образуются ковалентные связи. Помимо четырех азотных лигандов гема, он обычно связывает два дополнительных аксиальных лиганда снизу и сверху атома железа. Природа этих лигандов, из которых, по меньшей мере, один обычно является функциональной группой аминокислотного остатка белка, в значительной степени влияет на реакционную способность гемовой группы (Oliw *et al.*, 2011). Исследования кристаллической структуры α -ДОГ риса показали, что связывание H_2O_2 играет важную роль на дистальной поверхности гема, смещая остатки основных аминокислот, что приводит к связыванию O_2 со специфическим аминокислотным остатком – аспарагиновой кислотой (Zhu *et al.*, 2013).

Все гем-содержащие ДОГ можно разделить на три группы: простагландин-Н-синтазы (ПГНС) позвоночных и кораллов, линолеатдиолсинтазы (ЛДС) и (10*R*)-ДОГ нитчатых грибов и α -ДОГ растений (Sanz *et al.*, 1998; Hörnsten *et al.*, 1999; Garscha, Oliw, 2009). Последовательности растительных α -ДОГ проявляют сходство с таковыми простагландинэндопероксидсинтаз (1 и 2 типа) животных.

α -Окисление, катализируемое α -ДОГ, приводит к образованию нестабильных (2*R*)-гидроперокси-производных ПНЖК путем специфического диоксигенирования углеродной цепи, но эта реакция происходит конкретно на α -углероде, и поэтому ее механизм не зависит от 1,4-пентадиеновой группировки. Нестабильное (2*R*)-гидроперокси-производное может быть превращено в соответствующее 2-гидрокси-производное, укороченный альдегид и укороченную кислоту (например, 8,11,14-гептадекатриеновую кислоту), см. рис. 7 (Hamberg *et al.*, 1999).



Рис. 7. Продукты функционирования α -ДОГ, полученные из α -линоленовой кислоты (Griffiths, 2015).

У растений после инфицирования бактериями уровни 2-гидроксилиноленовой и 8,11,14-гептадекатриеновой кислот резко возрастают, тогда как уровни ЛОГ продуктов сильно снижаются (Hamberg *et al.*, 2005). Анализ оксипинов в зараженных листьях табака выявил наличие ряда 2-гидроксикислот, различающихся по длине цепи и степени ненасыщенности, а также двух новых диоксигенированных оксипинов – (2*R*,9*S*)-дигидрокси-(10*E*,12*Z*,15*Z*)-октадекатриеновой и (2*R*,9*S*)-дигидрокси-(10*E*,12*Z*)-октадекадиеновой кислот. Превращение линолевой кислоты при участии α -ДОГ инициируется стереоспецифическим отщеплением про-*R* водорода в положении С2 с последующим супраповерхностным введением молекулярного кислорода с образованием (2*R*)-ГПОД, который спонтанно распадается на альдегиды (Hamberg *et al.*, 2005). Со времени открытия α -ДОГ у табака и *A. thaliana* α -ДОГ выявлены у большого числа видов (Hamberg *et al.*, 2005). Кроме того, было показано, что геном *A. thaliana* содержит ген второго фермента, гомологичного ПГНС, который был обозначен как α -ДОГ2 (Hamberg *et al.*, 2005; Vannenberg *et al.*, 2009б), хотя в отличие от α -ДОГ1 он, по-видимому, участвует не в защите от патогенов, а в процессах старения. При сопоставлении последовательности с ПГНС-1 выявлено, что все после-

довательности α -ДОГ содержат консервативные проксимальный и дистальный остатки гистидина и остаток тирозина (Hamberg *et al.*, 2005). Продуктируемая α -ДОГ 2-гидроксилиноленовая кислота оказывает тканезащитное действие против бактериальной инфекции. Недавно слитые белки, содержащие ДОГ домен, были обнаружены у патогена риса, *Magnaporthe oryzae*; они могут играть важную роль при патогенезе (Hoffmann *et al.*, 2014). Работа с двойными мутантами *A. thaliana* по генам *lox1* и *dox1* показала, что 9-ЛОГ и α -ДОГ работают сопряжено в процессе инициации оксипинового биосинтеза при бактериальной инфекции. Продукт 9-ЛОГ активности, 9-кетоктадекатриеновая кислота (9-КОТ), накапливалась при инфекции в качестве антимикробного агента (Vicente *et al.*, 2012).

1.7. Суперсемейство цитохромов P450

Окисление ПНЖК при участии ЛОГ и α -ДОГ инициирует пути превращения полученных гидроперекисей жирных кислот в альтернативных ферментативных ветвях, часть из которых начинаются с реакций, катализируемых цитохромами P450. Цитохромы P450 представляют собой суперсемейство гем-тиолатных белков, обнаруживаемых в большинстве живых организмов от бактерий до человека (Montellano, 2005). Названные в честь специфического спектрального максимума поглощения при 450 нм, когда гемовое железо связывает моноокись углерода, цитохромы P450 интенсивно изучали в течение более 50 лет с момента их открытия в печени мыши в 1940 году (Klingenberg, 1958; Omura, Sato, 1964; Denisov *et al.*, 2005). Путем включения одного атома кислорода из молекулярного кислорода в органический субстрат цитохромы P450 катализируют широкий спектр необратимых, часто ограничивающих скорость реакций в метаболических путях (Nelson, 2018), включающие гидрокселирование, эпоксицирование, дегидрирование, деалкилирование, десатурацию, нитрование и образование связей C–C/C–N (Montellano, 2005; Denisov *et al.*, 2005). Цитохромы P450 участвуют в катаболизме ксенобиотиков, антибиотиков, пестицидов, различных лекарственных

средств, а также метаболизме эндогенных молекул, включая стерины, пигменты, антиоксиданты, жирные кислоты, простагландины и другие метаболиты, которые, как считается, обладают адаптивными преимуществами в определенных экологических нишах (Montellano, 2005; Isin, Guengerich, 2008). Учитывая каталитическое разнообразие, открываются перспективы для потенциального применения цитохромов P450 в медицине, сельском хозяйстве и промышленности с помощью методов метаболической инженерии (Syed *et al.*, 2013; Renault *et al.*, 2014). В типичном каталитическом цикле эти ферменты используют окислительно-восстановительные белки или домены для переноса электронов от НАД(Ф)Н к гемовому железу, что позволяет связывать и активировать молекулярный кислород с образованием гемового железа (IV), называемого соединением I, которое, в свою очередь, осуществляет различные реакции окисления (Isin, Guengerich, 2008).

Суперсемейство P450 – это одно из крупнейших суперсемейств ферментов, демонстрирующее особые закономерности эволюции, включая всплески диверсификации (Nelson, 2018). Известно, что все существующие цитохромы P450 имели общего предка и эволюционировали в различные формы с разной активностью (Omura, Gotoh, 2017). Полный набор генов P450 в геноме определенного вида называется «CYPome». Например, у пшеницы и кукурузы идентифицировано 1285 и 263 полноразмерных цитохрома P450 соответственно (Li, Wei, 2020). В настоящее время в результате больших проектов по секвенированию доступно более 350 000 последовательностей P450, более 41 000 из которых названы, хотя функции большинства остаются неизвестными (Nelson, 2018). Номенклатура CYP основана на идентичности аминокислотных последовательностей. Обычно последовательности, имеющие более 40% идентичности, принадлежат к одному семейству, а последовательности, имеющие более 55% идентичности, принадлежат одному подсемейству. Например, цитохромы P450 пшеницы и кукурузы разделены на 45 и 43 семейства соответственно (Li, Wei, 2020). Семейства CYP 1–49, 301–499 и 3001–4999 включают ферменты животных; 51–69, 501–699 и 5001–6999 –

ферменты низших эукариот; 71–99, 701–999 и 7001–9999 – ферменты растений; 101–299 и 1001–2999 – ферменты бактерий (Nelson, 1998; Phillips, Shephard, 1998). Принадлежность к семейству подтверждается филогенетическими реконструкциями.

Кланы CYP относятся к более высоким классификационным единицам. Они представляют собой глубокие ветвящиеся клады на филогенетических деревьях, которые образуют естественные подразделения среди последовательностей CYP из одного царства. Изначально цитохромы P450 растений были разделены на две основные категории: А-тип и не-А-тип. Большинство ферментов, участвующих в специализированном метаболизме, относятся к А-типу, а ферменты не-А-типа, как полагают, связаны с основным метаболизмом, таким как окисление стеролов и липидов и биосинтез гормонов. Недавно растительные ферменты были разделены на 11 кланов. Тип А включает Клан CYP71 включает ферменты А-типа, тогда как ферменты не-А-типа относятся к 10 кланам, а именно – CYP51, CYP72, CYP74, CYP85, CYP86, CYP97, CYP710, CYP711, CYP727 и CYP746 (Nelson, 2018; Li, Wei, 2020).

Благодаря широкому диапазону используемых субстратов и каталитической универсальности цитохромы P450 представляют большой интерес для фармацевтических и химических применений (Behrendorff *et al.*, 2015). По сравнению с химическими катализаторами цитохромы обладают значительным преимуществом благодаря способности регио- и стереоспецифически активировать и модифицировать инертные группы субстратов в мягких условиях. Одним из наиболее успешных применений в промышленности является процесс производства правастатина, препарата для снижения уровня холестерина, используемого для профилактики сердечнососудистых заболеваний (Serizawa, 1996).

Однако, несмотря на огромный потенциал, промышленное применение цитохромов P450 ограничено по нескольким причинам, включая низкую активность ферментов, потребность в партнерах по переносу электронов и потребность в дорогостоящем кофакторе НАД(Ф)Н (Bernhardt, Urlacher, 2014).

Для решения этих проблем часто используют биоинженерные подходы, такие как, например, поиск и изменение окислительно-восстановительных партнеров. В последние годы число кристаллических структур P450 резко возросло, что существенно помогло в исследованиях взаимосвязи между структурой и функцией, а также в рациональном и полурациональном дизайне цитохромов P450 для различных применений.

Первым цитохромом P450, для которого была получена кристаллическая структура, стал цитохром P450cam (CYP101A1) *Pseudomonas putida*, катализирующий регио- и стереоспецифическое гидроксирование камфоры до 5-экзогидроксикамфоры (Poulos *et al.*, 1985). Структура гемового домена другого хорошо охарактеризованного цитохрома – P450BM3 (CYP102A1) *Bacillus megaterium* – гидроксилазы жирных кислот, была расшифрована в 1993 году (Ravichandran *et al.*, 1993). Растущее в последнее время число расшифрованных структур P450 свидетельствует, что общая структура этих ферментов довольно консервативна и обычно состоит из области, богатой α -спиралями (α A- α L), и области, обогащенной β -складчатыми структурами (β 1- β 10) (рис. 8) (Poulos, Johnson, 2015; Guengerich *et al.*, 2016). Гемовая простетическая группа расположена почти в центре структуры и не контактирует с растворителем. На проксимальной стороне гема имеется связывающий его консервативный остаток цистеина (расстояние связывания 2,2–2,3 Å). Дистальная сторона гема содержит лиганд-связывающий сайт, который связывает воду, кислород и молекулы субстрата.

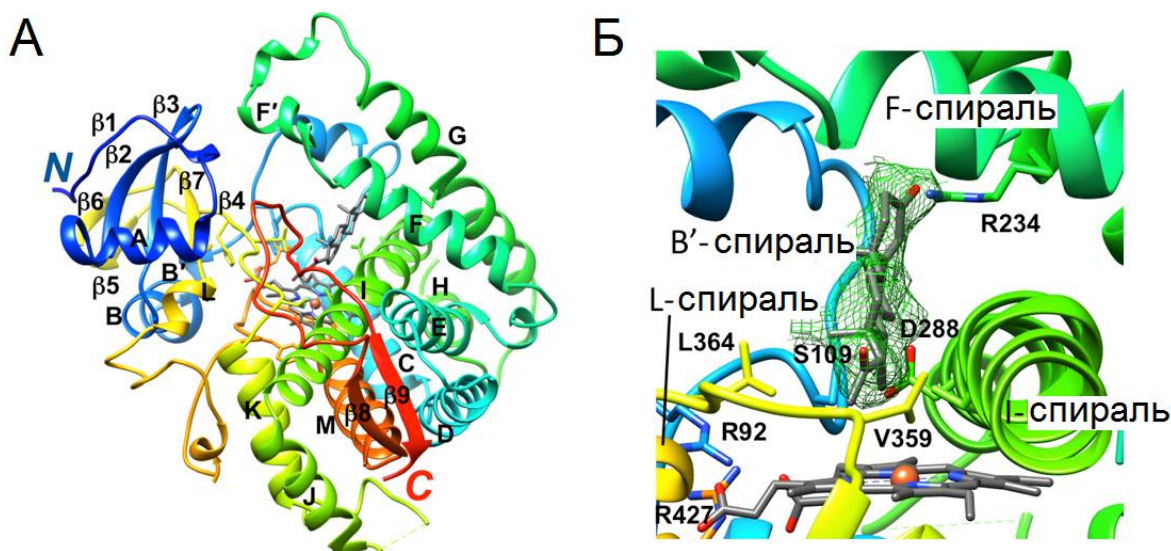


Рис. 8. Третичная структура комплекса цитохрома P450 21A2 с прогестероном и конфигурация активного сайта (PDB 4Y8W; www.rcsb.org) (Pallan *et al.*, 2015). (А) Диаграмма общей структуры цитохрома P450 21A2 с окраской от синего (N-конец) до красного (С-конец) цвета. Отмечены отдельные вторичные структурные элементы; атомы углерода гема и прогестерона окрашены в серый цвет; Fe^{3+} изображен как оранжевая сфера. Структура цитохромов P450 содержит по крайней мере 12 α -спиралей, которые обозначены буквами от А до L, а также N-концевой β -складчатый домен с последовательной нумерацией цепей (Johnson, Stout, 2013). Кор белка состоит из спиралей С, D, I, К и L, а также β -листов, которые составляют часть сайта связывания гема и прилегающую область, куда подходят белки-партнеры. Субстраты связываются в бороздке над гемом, при этом на поверхность выходят несколько каналов. Каталитически важный остаток цистеина расположен на другой стороне гема, так что его тиолатный фрагмент занимает аксиальный координационный центр железа напротив связанного кислорода. В спиральях В, С, F и G, расположенных больше на периферии белка и образующих внешние границы полости субстрат-связывающего кармана, содержится больше структурных вариаций, и для них характерно более динамичное поведение, чем для структур, формирующих активный центр. (Б) Крупным планом показан активный центр с прогестероном. Отмечены отдельные аминокислотные остатки и α -спирали, образующие активный центр. Все изображения были созданы с помощью программы UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

Спираль I является наиболее структурно консервативной областью и проходит через всю структуру фермента над плоскостью гема. Спирали F и G расположены над I-спиралью и образуют архитектуру V-образной формы. Хотя общая структура у разных ферментов очень сходная, N-концевая петля, петля В-С (петля между спиральями В и С) и петля F-G (петля между спира-

лями F и G) проявляют значительные различия, что обеспечивает высокий уровень функционального разнообразия, наблюдаемый для цитохромов P450. Спираль В' и петля F-G обладают высокой гибкостью и отвечают за распознавание и связывание субстрата (Pettersen *et al.*, 2004).

При использовании метода рационального и полурационального дизайна целевые остатки для мутагенеза часто выбирают в пределах активного (субстрат-связывающего) сайта, субстратного канала, областей взаимодействия с окислительно-восстановительным партнером, а также различных сайтов распознавания субстрата (CPC). CPC были впервые идентифицированы в первой кристаллической структуре цитохрома P450cam (Gotoh, 1992). CPC-1 расположен в петле В-С (эта петля может содержать от одной до трех маленьких спиралей у разных ферментов). CPC-2 расположен на С-концевой стороне F-спирали, CPC-3 находится на N-концевой стороне G-спирали, CPC-4 находится в I-спирали, CPC-5 находится в области, начинающейся с консервативного мотива EXXR и заканчивая β 1-4 складчатой областью, CPC-6 располагается между β -складчатыми областями 4-1 и 4-2 (рис. 9). Субстрат-связывающий активный сайт обычно состоит из β -складчатых структур 1-2, области петли В-С (включая CPC-1), петли F-G (включая CPC-2 и CPC-3), I-спирали (включая CPC-4) и областей CPC-5 и CPC-6. Кроме того, результаты исследования разнообразных представителей P450 свидетельствуют также о ключевых остатках аргинина, расположенных вдоль субстратного канала.

Наиболее часто исследуемым среди всех аминокислотных остатков у цитохромов P450 является остаток, расположенный в CPC-1 (Phe-87 в цитохроме P450BM3), является (Grisman *et al.*, 2015). Область I-спирали активного сайта также находится в центре внимания рациональной инженерии.

Простетическая группа цитохромов P450 представляет собой группировку протопорфирина IX (гем *b*) (Shibata *et al.*, 1995). Гемовый кофактор с железом, расположенным в центре протопорфиринового кольца, расположен в основном между длинной I-спиралью и L-спиралью (Denisov *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). В обычном состоянии гем находится в низко-спиновом состоянии с тиолатом высококонсервативного цистеина и молекулой воды, служащих в качестве пятого (проксимального) и шестого (дистального) соответственно координационного лиганда для Fe^{III} (Lee *et al.*, 2008). Связывание субстрата приводит к сдвигу спинового равновесия из низко-спинового в высоко-спиновое состояние, в котором субстрат смещает молекулу воды (шестой лиганд). Это приводит к вытеснению железа из плоскости порфиринового кольца, что способствует высоко-спиновой конфигурации гемопротейна. Спиновое состояние зависит от температуры. Детергенты могут имитировать мембранную среду и также индуцировать переход к высоко-спиновому состоянию (Noordermeer *et al.*, 2001а,б).

1.8. Пути оксилипинового биосинтеза с участием цитохромов P450

В рамках липоксигеназного каскада растений вторичные превращения гидроперекисей жирных кислот катализируются различными ферментами, в том числе цитохромами P450 семейства CYP74: алленоксидсинтазами (АОС), гидропероксидлиазами (ГПЛ) и дивинилэфирсинтазами (ДЭС) (Blée, 2002; Howe, Schillmiller, 2002; Lee *et al.*, 2008; Matsui, 2006).

АОС (синоним гидропероксиддегидратаза, ЕС 4.2.1.92, подсемейства CYP74A и CYP74C) и ГПЛ (подсемейства CYP74B, CYP74C, CYP74E, CYP74F и CYP74G) широко распространены в растениях. ДЭС (синоним колнелеатсинтаза, ЕС 4.2.1.12, подсемейства CYP74B, CYP74D и CYP74H) выявлены у значительно меньшего числа филогенетически отдаленных видов.

Разнообразие известных генов CYP74 недавно (Lee *et al.*, 2008) распространилось за пределы одного семейства P450 согласно критерию идентич-

ности 40% (Werck-Reichhart, Feyereisen, 2000; Nelson *et al.*, 2013). Поэтому была введена концепция клана CYP74 (Nelson *et al.*, 2013). Гены CYP74 животных и протеобактерий (Lee *et al.*, 2008), а также водорослей (Koeduka *et al.*, 2015) являются членами клана, но не семейства CYP74.

Структура ферментов CYP74 имеет определенные отличия в сравнении с классическими цитохромами P450. Гем-связывающая петля, расположенная над гемом на проксимальной стороне непосредственно перед L-спиралью, содержит типичную консенсусную для цитохромов P450 последовательность F-x-x-G-x-R-x-C-x-G (цистеин – гемовый лиганд) и обычно образует компактную β -складку. Отличием ферментов CYP74 является особая вставка из девяти аминокислотных остатков в середине гем-связывающей петли с консенсусной последовательностью W-S-N-G/E-P/R-E/Q-T-E/G-x-P-x-x-x-N-K-Q-C-A/P-G/A-K-D/N (мотив 4 на рисунке 10). Увеличенная длина позволяет петле выходить на поверхность (Lee *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). Множественный анализ последовательностей CYP74 показал, что первым остатком этой вставки у 13-ГПЛ и 13-АОС является пролин. В отличие от этого, у 9/13-ГПЛ, 9-ДЭС и 9/13-АОС вместо пролина находится заряженный или полярный остаток, в основном аргинин (Fukushige, Hildebrand, 2005).

У ферментов CYP74 есть и другие отличительные мотивы, которые можно использовать для выявления новых ферментов этого семейства (рис. 10). Одним из них является ERR-триада, состоящая из инвариантного мотива E-x-x-R в K-спирали и мотива P-D-R-F в так называемом «изгибе» вблизи L-спирали (мотив 3 на рисунке 10). В последовательностях ферментов CYP74 остатки аргинина и фенилаланина в последнем мотиве высоко консервативны, а пятым остатком после ERR-триады является остаток валина. Считается, что ERR-триада и мотив изгиба участвуют в связывании гема и стабилизации структуры кофа (Hasemann *et al.*, 1995; Fukushige, Hildebrand, 2005).

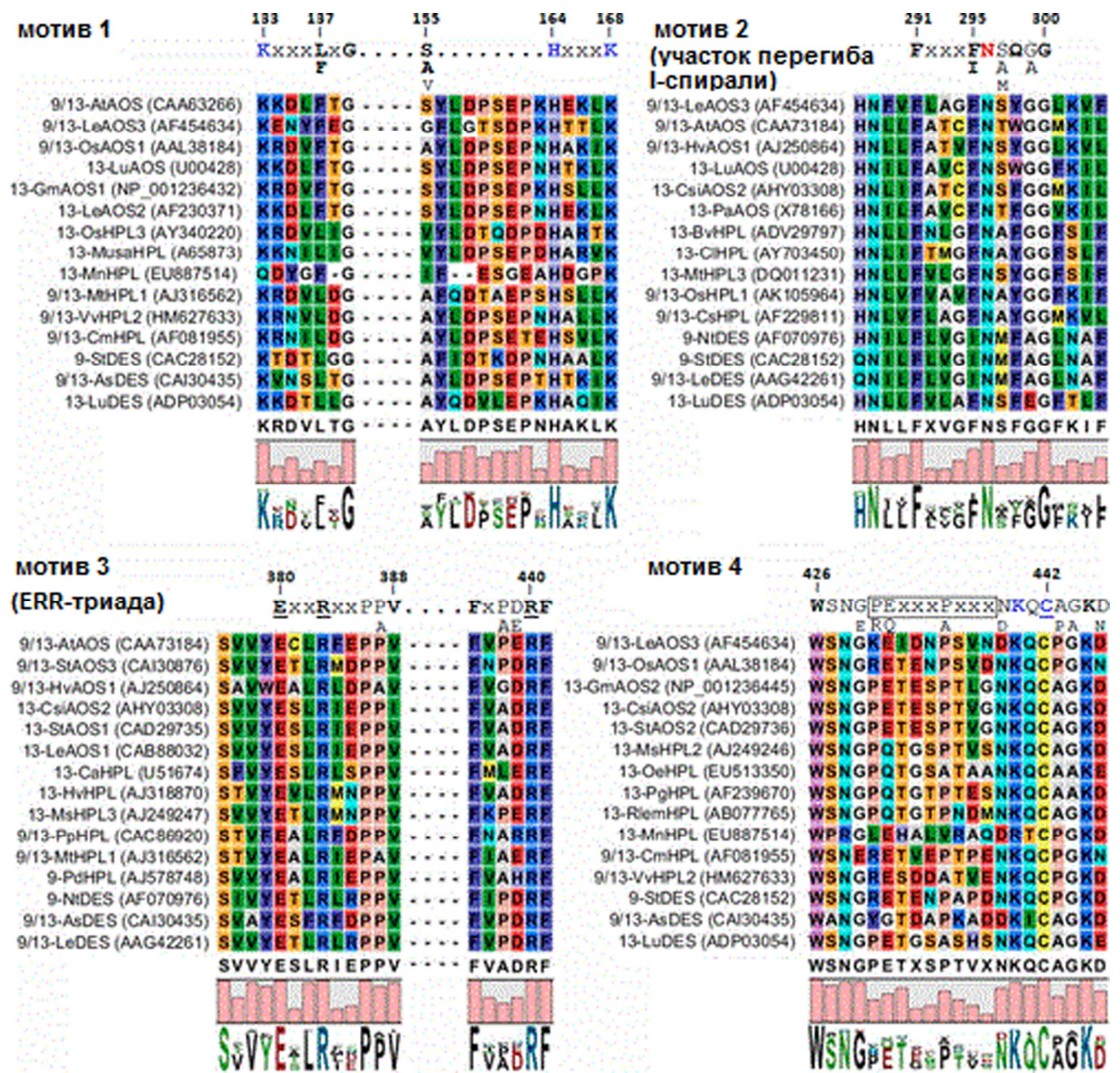


Рис. 10. Множественное выравнивание последовательностей четырех мотивов, характерных для ферментов CYP74 (Stolterfoht *et al.*, 2019). В мотивах **1** и **3** ключевые остатки пронумерованы в соответствии с AtAOS, в мотиве **2** – в соответствии с LeAOS3 томата, в мотиве **4** – в соответствии с MtHPL. Консервативные аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом. Консервативные основные остатки, которые взаимодействуют с группами пропиконата гема, выделены синим цветом. В мотиве **4** консервативный остаток цистеина подчеркнут и также показан синим цветом. Обведена вставка из девяти аминокислотных остатков. Остаток аспарагина в участке перегиба I-спирали (CPC-4) обозначен красным. Используемые сокращения: At, *A. thaliana*; Le, *Solanum lycopersicum*; Os, *Oryza sativa*; Lu, *Linum usitatissimum*; Gm, *Glycine max*; Musa, *Musa* sp. (банан); Mn, *M. nodulans*; Mt, *Medicago truncatula*; Vv, *Vitis vinifera*; Cm, *Cucumis melo*; St, *Solanum tuberosum*; As, *Allium sativum*; Hv, *Hordeum vulgare*; Csi, *Camellia sinensis*; Pa, *Parthenium argentatum*; Bv, *Beta vulgaris*; Cl, *Citrullus lanatus*; Cs, *Cucumis sativus*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Ca, *Capsicum annuum*; Ms, *Medicago sativa*; Pp, *P. patens*; Pd, *Prunus dulcis*; Oe, *Olea europaea*; Pg, *Psidium guajava*; Rlem, *Citrus jambhiri*.

Высоко консервативный остаток фенилаланина (F137 в AtAOS *A. thaliana*) в мотиве K(Q)-x(3)-F/Lx(23-26)-Hx(3)-K (мотив 1 на рис. 10), который подходит близко к сопряженному диену гидро(перо)кси-производного жирной кислоты, определяет специфичность образования окиси аллена. В последовательностях ГПЛ и ДЭС в этом положении содержится остаток лейцина. Остатки лизина и гистидина в составе этого мотива участвуют в координации гем-пропионатов (Lee *et al.*, 2008).

У ферментов CYP74 отсутствует высоко консервативный для цитохромов P450 остаток треонина в мотиве I-спирали A/GGxD/ETT/S, который является критическим для связывания кислорода и доставки протонов к гем-связанному кислороду у классических цитохромов P450. У ферментов CYP74 остаток треонина заменен гидрофобным остатком, который не может формировать водородные связи (мотив 2 на рисунке 10). И, в отличие от большинства цитохромов P450, ферменты CYP74 не используют молекулярный кислород в качестве субстрата (Noordermeer *et al.*, 2001a; Fukushige, Hildebrand, 2005; Brash, 2009). Вместо этого прямо над гемовым железом расположена амидная боковая цепь строго консервативного остатка аспарагина (N321 в AtAOS *A. thaliana*). Было показано, что эта амидная боковая цепь взаимодействует водородной связью с кислородом в составе перокси-группы субстрата (Lee *et al.*, 2008). С помощью сайт-направленного мутагенеза (замены N321Q в AtAOS *A. thaliana* (Lee *et al.*, 2008) и N285A в 9/13-ГПЛ *M. truncatula* (Hughes *et al.*, 2008)) было показано, что остаток аспарагина является необходимыми для катализа. Остатки глицина (G/A-G) в составе кислород-связывающего домена I-спирали классических цитохромов P450 также сохраняются в последовательностях ферментов CYP74; кроме того, каталитически важные остатки ферментов CYP74, по-видимому, сдвинуты на несколько остатков в направлении N-конца в консенсусной последовательности F(Y)-x(3)-F/INS/T/A/M-Ω-G/A(L)-G (мотив 2 на рисунке 10, где Ω представляет собой любую ароматическую аминокислоту). Предполагается, что эта область, называемая участком перегиба I-спирали (CPC-4), играет ключевую

роль во взаимодействиях с гидроперекисной группой субстрата и катализе СУР74 (Hughes *et al.*, 2008). Помимо вышеупомянутого остатка аспарагина (N285), была продемонстрирована важность двух других аминокислотных остатков в структуре 13-ГПЛ *M. truncatula* для катализа (были проанализированы каталитические свойства мутантов MtHPL F287V и G288I). Предполагается, что ароматическая аминокислота (Ω) участвует в гидрофобном взаимодействии между алкоксигруппой(ами) субстрата и фенильной группировкой F287. Остаток глицина (G288), консервативный для всех ГПЛ и АОС, но не ДЭС (в этом положении находится остаток аланина или лейцина), из-за небольшого размера считается критическим для позиционной специфичности. Это было подтверждено результатами сайт-направленного мутагенеза по данной позиции (G324A) в AtAOS *A. thaliana* (Hughes *et al.*, 2008). Кроме того, замены F150L и YS176-177NL в каталазоподобном гидропероксидлиазном домене в составе химерного белка кГПЛ-ЛОГ мягкого коралла *S. imbricata*, вызвали сдвиг в специфичности катализируемой реакции от ГПЛ к АОС (Teder *et al.*, 2017). Точечные мутанты, в которых высококонсервативный остаток цистеина [C442 в последовательность 13-ГПЛ люцерны (*Medicago sativa*)] был заменен на остаток аланина или серина, были неактивными и не содержали гем.

В последовательностях АОС и ГПЛ содержится консервативный остаток фенилаланина (F295 у LeAOS3), в то время как ДЭС содержат остаток изолейцина в данном положении. У АОС за остатком аспарагина содержится остаток серина или треонина, тогда как у ГПЛ в данной позиции содержится остаток аланина, а у ДЭС – остаток метионина (Toporkova *et al.*, 2008). Используя эти данные, можно предсказать тип катализируемой реакции исходя из первичной структуры фермента СУР74.

Механизм катализа всех ферментов СУР74 начинается одинаково. Первая стадия включает гомолитическое расщепление О-О связи гидроперекиси, что приводит к образованию алкоксирадикала, в то время как отщепленный гидроксильный радикал связывается с Fe^{III} с образованием феррил-

гидроксикомплекса ($S\text{-Fe}^{\text{IV}}\text{-OH}$). Алкоксирадикал по-прежнему образует водородную связь с амидом высоко консервативного остатка аспарагина и присоединяется к ближайшей двойной связи (между C11 и C12), образуя эпоксиаллильный радикал (радикал при C11). Этот эпоксиаллильный радикал является общим промежуточным звеном всех реакций, катализируемых ферментами CYP74 (рис. 11).



Рис. 11. Первая стадия механизма превращения гидроперекисей жирных кислот при участии ферментов CYP74. Первая стадия катализа является общей для всех ферментов CYP74: гомолиз гидроперекисной группировки с образованием эпоксиаллильного радикала (Mukhtarova *et al.*, 2018).

1.9. Алленоксидсинтазный путь

Одним из первых хорошо охарактеризованных путей оксипинового биосинтеза был биосинтез фитогормона жасмоновой кислоты (ЖК), которая тесно связана с реакцией растения на стрессовые факторы. Этот фитогормон остается на данный момент самым исследуемым оксипином – продуктом липоксигеназного каскада растений (Zhou, Memelink, 2016; Hu *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2017; Wasternack, Song, 2017; Yu *et al.*, 2018; Ruan *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2019; Zhai, Li, 2019; Hellmann, Helariutta, 2019; Ueda *et al.*, 2020; Wu, Ye, 2020; Gomi, 2020; Griffiths, 2020; Jang *et al.*, 2020; Zhuo *et al.*, 2020; Ali *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020). Алленоксидсинтазный путь начинается с высвобождения α -линоленовой и гексадекатриеновой кислот (16:3) путем гидролиза из пластидиальных липидов, таких как МГДГ и ДГДГ, или же эти липиды служат прямыми субстратами для трансформации *in situ* в циклизированные производные, поскольку (9S,13S)-12-ОФДК и (7S,11S)-динор-ОФДК были выявлены в составе гликолипидов (Böttcher, Weiler, 2007).

В пути биосинтеза ЖК 13-ЛОГ продуцирует (13*S*)-ГПОТ, превращение которой катализируется алленоксидсинтазой (подсемейство CYP74A), которая была выявлена практически у всех зеленых растений (Laudert, Weiler, 1998; Wasternack, 2007). АОС превращает (13*S*)-ГПОТ в окись аллена (9*Z*,11*E*,13*S*,15*Z*)-12,13-эпокси-(9,11,15)-октадекатриеновую кислоту (12,13-ЭОТ), которая циклизуется в *cis*(+)-ОФДК при участии алленоксидциклазы (АОЦ) (рис. 12, 13) (Stenzel *et al.*, 2003). У *A. thaliana* АОС кодируется одним геном; исследования с нокаутным мутантом доказывают его важную роль в отложении запасных белков (Park *et al.*, 2002). При этом у *A. thaliana* четыре гена кодируют четыре функциональных АОЦ (АОС1, АОС2, АОС3 и АОС4).

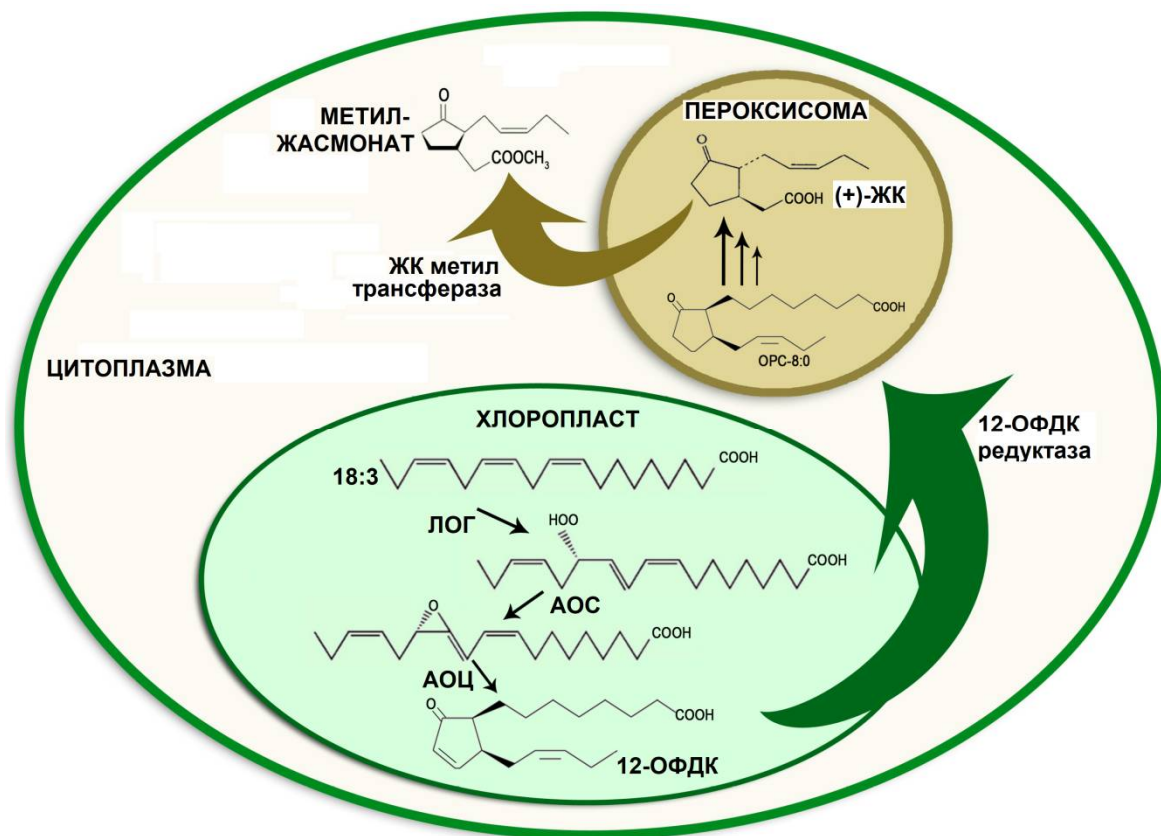


Рис. 12. Биосинтез метилжасмоната в хлоропластах, цитоплазме и пероксисомах. АОС, алленоксидсинтаза; АОЦ, алленоксидциклаза; ЖК, жасмоновая кислота; ЛОГ, липоксигеназа; ОРС, 3-оксо-2-(2'-пентенил)-циклопентан-1-октановая кислота; 12-ОФДК, 12-оксо-10,15-фитодиеновая кислота (Reyes-Díaz *et al.*, 2016).

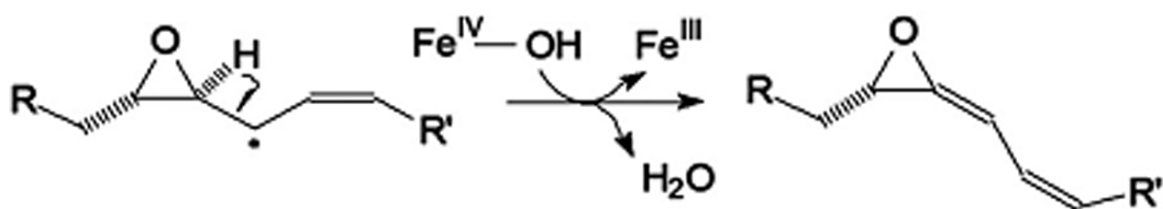


Рис. 13. Механизм превращения эпоксиаллильного радикала в окись аллена при участии АОС.

В полностью развитых листьях промоторная активность генов *AOC1*, *AOC2* и *AOC3* проявляется по всей ткани листьев, однако промоторная активность гена *AOC4* специфична для сосудов. В корнях обнаружена промоторная активность только генов *AOC3* и *AOC4*, а частично специфичные промоторные активности были обнаружены у генов *AOC1* и *AOC4* при развитии цветков. Полученные данные предполагают механизм временной и пространственной регуляции в формировании ЖК путем дифференциальной экспрессии и возможной гетеромеризации четырех АОЦ (Stenzel *et al.*, 2012).

Присутствие как ОФДК, так и динор-ОФДК в составе галактолипидов в довольно большом количестве (7–8% от общего содержания липидов) у *A. thaliana*, по-видимому, играет роль в устойчивости к бактериальным патогенам (Andersson *et al.*, 2006). Восстановление 12-ОФДК до 3-оксо-2(2'[Z]-пентенил)циклопентан-1-октановой кислоты катализируется 12-оксофитодиеноат-10,11-редуктазой (OPR), два изомера которой были идентифицированы у клона *Corydalis A. thaliana*: OPR1, которая использует (9*R*,13*R*)-ОФДК >> (9*S*,13*R*)-ОФДК, но не изомеры с (13*S*)-конфигурацией, тогда как OPR11 эффективно восстанавливает все 4 изомера, включая природную (9*S*,13*S*)-ОФДК (*mus*[+]-ОФДК) (Schaller *et al.*, 1998). В результате недавних исследований с мутантами по генам *OPR* у кукурузы получены убедительные доказательства их участия в развитии и иммунитете к патогенам и насекомым (Carella, 2020; Wang *et al.*, 2020), а ОФДК – в регуляции прорастания семян у *A. thaliana* (Dave *et al.*, 2011). Кроме того, 12-ОФДК запускает экспрессию определенного набора генов и играет роль в индуцированной поранением экспрессии генов у *A. thaliana* (Taki *et al.*, 2005). На за-

ключительных стадиях синтеза ЖК в пероксисомах 12-ОФДК подвергается трем циклам укорочения посредством β -окисления углеродной цепи с карбоксильного конца с образованием ЖК (рис. 12, 13; Wasternack, 2007). Тем не менее, в активную форму ЖК переходит после конъюгации аминокислотными остатками, например, валином, лейцином и изолейцином (Kang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Например, жасмоноил-изолейцин (рис. 13) быстро образуется в ответ на поранение или грибковую инфекцию; кроме того, он является центральным элементом в передаче сигналов. Реакция конъюгации осуществляется глюкозилтрансферазой, которая является участником в перекрестном взаимодействии между салицилатной и жасмонатной сигнальными системами (von Saint Paul *et al.*, 2011). Катаболизм жасмоноил-изолейцина осуществляется недавно идентифицированным ферментом CYP94B3 (Koo *et al.*, 2011). ЖК также может метилироваться до летучего метилжасмоната (рис. 14) – транспортной формой, переносимой по воздуху и между органами растений (Farmer, 2001).

Механизм циклазной реакции изучали следующим образом. 13- ^{18}O Гидроперокси-линоленовую кислоту инкубировали с экстрактом порошка семени льна, в котором содержалась циклазная активность.

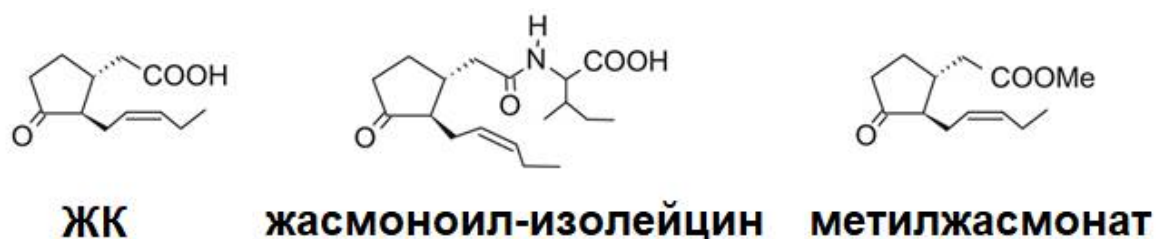


Рис. 14. Жасмоновая кислота и ее производные, участвующие в клеточном сигналинге (Griffiths, 2015).

Полученный продукт, 12-оксо-(10Z,15Z)-фитодиеновая кислота (12-ОФДК), содержал ^{18}O при карбонильном кислороде (C12), что свидетельствует о том, что эпоксид был промежуточным продуктом циклазной реакции. Исследование субстратной специфичности показало, что бета/гамма *цис*-

двойная связь с конъюгированной гидроперекисной группой имеет важное значение для циклизации субстрата этим ферментом (Vick *et al.*, 1980).

Наличие двойной связи в β,γ -положении по отношению к гидроперекисной группировке вызывает сильный эффект анхимерного содействия, увеличивая скорость циклизации на 2-3 порядка. Минорный (15*E*)-изомер образуется из 13-ГПОТ наряду с обычной 12-ОФДК. Сильное (примерно в 2 раза) снижение эффективности образования 12-ОФДК наблюдается в кислых (pH 5,5) условиях по сравнению со щелочными (pH 7,8). Предложен механизм циклизации окиси аллена благодаря двойной связи, включающий замыкание диполярного перициклического кольца в цвиттерионном интермедиате (Grechkin, 1994).

Методом компьютерных расчетов DFT изучали пути перегруппировки *E* и *Z* изомеров аллил- и метилзамещенных винилалленоксидов в определенные стереоизомеры циклопентенонов. Вне зависимости от исходной геометрии, в ходе ступенчатого каскада, включающего в качестве ключевых этапов раскрытие кольца оксирана с образованием оксидопентадиенилдирадикала, его изомеризацию и электроциклизацию, образуются циклопентеноны с *цис*-конфигурацией. Аллильный заместитель у атома C_{sp^3} исходного винилалленоксида оказывает противоположные эффекты на энергию активации для раскрытия кольца: уменьшение движения наружу благодаря способствованию гомоконъюгации и его увеличение за счет стереоэлектронной стабилизации исходного соединения. В результате в аллил- и метилзамещенных винилалленоксидах содержатся сопоставимые энергии активации. Только модельные системы с кротильными заместителями обеспечивают более низкую энергию активации, чем метильные аналоги, из-за дополнительной стабилизации дефицита образующегося заряда на вторичном углероде путем гомоконъюгирования. Более того, предполагается, что при гомоконъюгативном взаимодействии изомеры с *Z* геометрией будут подвергаться циклизации легче, чем *E*-изомеры. Результаты с *Z*-кротильным заместителем согласуются со спонтанной перегруппировкой природного винилалленоксида, полученного

из α -линоленовой кислоты, с образованием рацемического *цис*-циклопентенона 12-ОФДК (González-Pérez *et al.*, 2017).

Помимо 13-специфичных АОС, участвующих в биосинтезе жасмоновой кислоты, были обнаружены 9-специфичные ферменты в нефотосинтезирующих тканях ряда растений: семенах кукурузы (Gardner, 1975), корнях томата (Caldelari, Farmer, 1998), луковицах тюльпана (Grechkin *et al.*, 2000) и столонах, корнях и развивающихся клубнях картофеля (Hamberg, 2000). Аминокислотные последовательности этих ферментов обладают большим сходством с 9/13-специфичными ГПЛ подсемейства CYP74C, чем с 13-специфичными АОС. В отличие от генов 13-специфичных АОС, экспрессия генов 9/13-специфичных АОС является тканеспецифичной и наблюдается в прорастающих семенах и незеленых частях взрослых растений. По-видимому, эти ферменты играют роль в защите против почвенных вредителей, которые действуют на корни или ювенильные ткани, как только они появляются из прорастающих семян. Эта гипотеза подтверждается увеличивающимся количеством доказательств роли 9-ЛОГ пути в защите растений от патогенов (Rancé *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 1999; Kolomiets *et al.*, 2000; Stumpe *et al.*, 2001; Göbel *et al.*, 2001, 2003). Кроме того, они катализируют образование оксипинов, которые играют роль в онтогенезе растения. Так, α -кетол, образующийся из 9,10-ЭОТ (продукта превращения 9-ГПОТ), функционирует как сигнал для развития цветков у *Lemna paucicostata* (Yokoyma *et al.*, 2000). У трансгенных растений картофеля, у которых отсутствует экспрессия гена 9-ЛОГ, наблюдается ненормальное развитие клубней (Kolomiets *et al.*, 2001).

Помимо 9-АОС активности, выявлено участие 9-специфичной StAOS3 картофеля в образовании 10-ОФЕК и 10-ОФДК из 9-гидроперекисей линолевой и α -линоленовой кислот, соответственно. Эти новые циклопентеноны были идентифицированы как продукты 9-ЛОГ/АОС пути картофеля (Hamberg, 2000). Циклопентеноны участвуют в некоторых физиологических процессах растительного метаболизма. Эти соединения играют роль в пере-

даче сигналов, участвующих в формировании ответа на различные типы стресса (Farmer, Ryan, 1992; Peña-Cortés *et al.*, 1995). Исследования *Arabidopsis* (Stintzi *et al.*, 2001) показали, что 12-ОФДК, образуемая в 13-ЛОГ/АОС пути, может активировать экспрессию генов, связанных с защитой, с помощью пути передачи сигнала, включающего белок COI1, необходимый для сигнальной системы, опосредованной жасмонатами (Turner *et al.*, 2002). Также существуют доказательства того, что α,β -ненасыщенные карбонильные группы, расположенные в циклопентеноновом кольце 12-ОФДК, необходимы для активации защитных генов с помощью COI1-независимого сигнального пути (Stintzi *et al.*, 2001). Структурное сходство 9-АОС-производных циклопентенонов с 12-ОФДК, включающее наличие α,β -ненасыщенных карбонильных групп в циклопентеноновом кольце, позволяет предположить роль этих соединений в передаче сигналов (Itoh *et al.*, 2002).

Помимо высших растений, АОС были обнаружены у зеленой водоросли *Klebsormidium flaccidum* (Koeduka *et al.*, 2015), мхов *Physcomitrella patens* (Bandara *et al.*, 2009; Scholz *et al.*, 2012) и *Marchantia polymorpha* (Koeduka *et al.*, 2015), а также у одного из представителей животного царства – *Acropora palmata* (Lee *et al.*, 2008). Алленоксидсинтаза ApAOS *A. palmata* – единственная АОС, обнаруженная у животного и принадлежащая к клану CYP74. Помимо ApAOS, каталазоподобные АОС (Mashhadi *et al.*, 2016) описаны у некоторых мягких кораллов, таких как *Plexaura homomalla* (Koljak *et al.*, 1997), *Gersemia fruticosa* (Varvas *et al.*, 1999), *Capnella imbricata* (Löhelaïd *et al.*, 2014), *Acaryochloris marina* (Gao *et al.*, 2009). Все эти ферменты существуют в виде каталазных доменов в составе химерных белков. Вторым доменом в этих белках является липоксигеназный.

В молодых корнях пшеницы, ячменя и сорго, а также саженцах риса, обработанных метил-жасмонатом, проходит необычный алленоксидсинтазный путь, продуктами которого являются неизвестные ранее оксипирины – продукты перегруппировки по типу Фаворского, а именно – граминоксины (рис. 15): (4Z)-2-пентил-4-тридецен-1,13-диоевая (граминоксин A1), (2'Z)-2-

(2'-октенил)декан-1,10-диоевая (граминоксин В1) и (2'Z,5'Z)-2-(2',5'-октадиенил)декан-1,10-диоевая (граминоксин В2) кислоты, которые имеют карбоксильную группировку в боковой цепи.

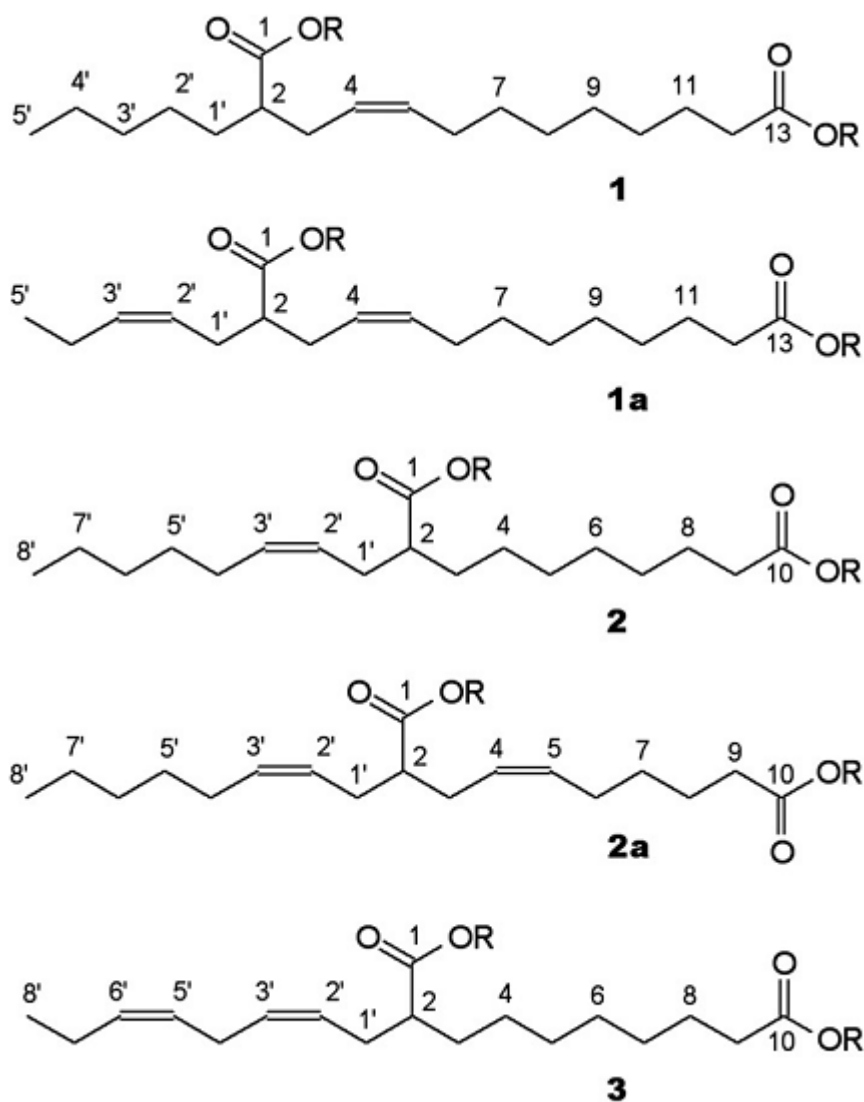


Рис. 15. Структурная формула граминоксинов с углеродной системой нумерации (Grechkin *et al.*, 2018): **1**, граминоксин А1; **1a**, граминоксин А2; **2**, граминоксин В1; **2a**, продукт перегруппировки по типу Фаворского, синтезируемый из (9S)-гидроперекиси γ -линоленовой кислоты (Grechkin *et al.*, 2011); **3**, граминоксин В2.

Эти соединения синтезируются из 13-ГПОД, 9-ГПОД и 9-ГПОТ соответственно через соответствующие окиси аллена и циклопропаноны. Данные указывают на то, что превращение окиси аллена в циклопропанон катализируется при участии растворимой циклазы. Короткоживущие циклопропаноны гидролизуются до граминоксинов (Grechkin *et al.*, 2018).

Разветвленные граминоксины с боковой карбоксиметильной группировкой известны в литературе как продукты перегруппировки по типу Фаворского с участием промежуточных циклопропанонов (Guijarro, Yus, 2005). Циклопропанон, оксиаллил и окись аллена считаются триадой валентных таутомеров (Turro, 1969; Wasserman *et al.*, 1974; Chan, Ong, 1980).

Предполагаемая схема АОС пути образования граминоксинов представлена на рисунке 16. Первая стадия – образование окиси аллена в результате дегидратации 9-ГПОД. Затем окись аллена претерпевает два конкурирующих превращения: гидролиз (в основном в α -кетол) или перегруппировку в циклопропанон. Последний продукт является нестабильным и подвергается нуклеофильному расщеплению трехуглеродного кольца, что приводит к образованию продукта перегруппировки по типу Фаворского. Еще одной особенностью этого пути является высокий выход изомерного α -кетола **2**, который предположительно образуется в результате гидролиза циклопропанона. Этот кетол ранее описывался как минорный продукт 9-АОС пути (Grechkin *et al.*, 2000).

Механизм превращения окисей аллена в циклопропаноны предложен на рисунке 16б. Раскрытие напряженного оксиранового кольца приводит к образованию оксиаллильного цвиттериона, который существует в равновесии с оксиаллильным бирадикалом. Существование последнего было недавно подтверждено прямыми спектроскопическими наблюдениями (Ichino *et al.*, 2009, 2011; Bettinger, 2010). Интересно, что в настоящее время считается, что не только 1,3-циклическое замыкание в циклопропаноне, но также 1,5-замыкание в циклопентеноне происходит по бирадикальному механизму. Согласно последним расчетам методом DFT (Hebert *et al.*, 2016; González-Pérez *et al.*, 2017) электроциклизации не происходит, как это предполагалось ранее (Corey *et al.*, 1985, 1987a, б).

АОС путь широко распространен в растениях (Brash, 2009; Hamberg, 1987). Однако до настоящего времени не было доказательств одновременного присутствия циклопропанонов и окисей аллена. Единственными исключениями были второстепенные побочные продукты некоторых превращений окиси аллена – продукта превращения γ -линоленовой кислоты (Grechkin *et al.*, 2011), образующиеся через промежуточные циклопропаноновые соединения. Тем не менее, продукты перегруппировки по типу Фаворского, описанные в работе (Grechkin *et al.*, 2011), содержатся в 50 раз меньше, чем аналогичные циклопентеноны. В отличие от этого, в корнях злаков граминоксины являются основными оксипинами наряду с α -кетолами. Образование граминоксина В1 непосредственно коррелирует с концентрацией белкового препарата; низкая концентрация благоприятствует образованию α -кетола.

Эта зависимость указывает на то, что превращение окиси аллена в циклопропанон зависит от присутствия некой циклазы. В отсутствие циклазы окись аллена спонтанно гидролизуется до α -кетола. Кроме того, при инкубации денатурированного температурой белкового препарата из корней пшеницы с 9-ГПОД в присутствии активного рекомбинантного ZmAOS1, синтезируется только α -кетол, но не граминоксин В1. Этот результат свидетельствует, что превращение окиси аллена в циклопропанон происходит в результате ферментативной реакции. Хорошо известен только один фермент, контролирующий превращение окиси аллена, а именно – алленоксидциклаза (EC 5.3.99.6) (Hamberg, 1988; Ziegler *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 2006; Schaller, Stintzi, 2009). Этот фермент специфически превращает окись аллена, образованную из 13-ГПОТ – (9Z,11,15Z)-12,13-эпокси-9,11,15-октадекатриеновой кислоты (12,13-ЭОТ) – в циклопентенон (9S,13S)-12-ОФДК, предшественник синтеза жасмоновой кислоты. Еще одна недавно описанная (Ogorodnikova *et al.*, 2015a) циклаза корней кукурузы катализирует циклизацию окиси аллена 9,10-ЭОД в циклопентенон (9S,13S)-10-оксо-11-фитоеновую кислоту (10-ОФЕК) – цитотоксический фитоалексин и медиатор транскрипции (Christensen *et al.*, 2015).

1.10. Гидропероксидлиазный путь

Гидропероксидлиазы (ГПЛ) – широко распространенные ферменты CYP74 высших растений, ответственные за образование стресс-индуцируемых биологически активных оксокислот и летучих компонентов зеленых листьев (green leaf volatiles, GLV) – C6 и C9 альдегидов, спиртов и их сложных эфиров, которые, как было показано, играют ключевую роль в передаче сигналов между растениями и другими организмами, а также непосредственно обладают антимикробными свойствами (Vancanneyt *et al.*, 2001; Matsui, 2006; Arimura *et al.*, 2009; Holopainen, Blande, 2012; Sugimoto *et al.*, 2014). Синтезируемая при участии 13-ЛОГ (13*S*)-ГПОТ метаболизируется 13-гидропероксидлиазой с образованием полуацетала, который спонтанно распадается на (3*Z*)-гексеналь и 12-оксо-(9*Z*)-додеценую кислоту (Matsui, 2006). Из 13-ГПОД образуется гексеналь. В случае 9-ГПЛ летучими продуктами реакции превращения 9-ГПОД и 9-ГПОТ являются (3*Z*)-ноненаль и (3*Z*,6*Z*)-нонадиеналь, соответственно, тогда как образующийся нелетучий продукт реакции представляет собой 9-оксононановую кислоту в обоих случаях. β,γ-Ненасыщенный карбонил склонен к изомеризации как неферментативным, так и ферментативным путем, что приводит к образованию (2*E*)-изомеров альдегидов и 12-оксо-(10*E*)-додеценной кислоты, которая получила название раневого гормона – травматина (Matsui, 2006). У *A. thaliana* был обнаружен один ген ГПЛ, но в сорте Колумбия, одном из наиболее часто используемых экотипов, делеция 10 нуклеотидов в первом экзоне приводит к образованию уменьшенного нефункционального фермента (Salas *et al.*, 2006).

Гены ГПЛ конститутивно экспрессируются в листьях и обеспечивают быстрое высвобождение GLV после разрушения тканей. Ранее предполагалось, что при участии галактолипаз происходит высвобождение α-линоленовой кислоты и линолевой кислоты из состава галактолипидов, однако впоследствии в поврежденных листьях *A. thaliana*, капусты, табака, томатов и бобов были идентифицированы МГДГ, содержащие C12 ГПЛ продукты (Nakashima *et al.*, 2013), что позволяет предположить, что они образуются

непосредственно в составе галактолипидов. Таким образом, предложен новый путь биосинтеза оксипинов, не требующий присутствия липаз (Nakashima *et al.*, 2011).

Опосредованное антисмысловой РНК уменьшение содержания ГПЛ в листьях картофеля приводит к большей восприимчивости растений к тле, что предполагает непосредственную роль ГПЛ в борьбе с травоядными насекомыми (Vancanneyt *et al.*, 2001). У травоядных насекомых существует множество стратегий для управления защитными реакциями растений-мишеней. Грызущие насекомые по-разному изменяют профили оксипинов, продуцируемые двумя основными и конкурирующими между собой ветвями защитного ответа – АОС и ГПЛ ветвями, ответственными за индуцируемую продукцию жасмонатов и GLV соответственно. Выделение GLV стимулируется поранением, нанесенным, например, тлей. Одновременно, однако, эти грызущие насекомые стимулируют выработку жасмоновой кислоты, демонстрируя целенаправленное подавление насекомыми ГПЛ ветви оксипинового пути. Гусеницы предпочитают поедать листья растений, в которых заранее не происходило активации ГПЛ ветви (Savchenko *et al.*, 2013). Также была описана защита растений через путь образования GLV, привлекающих насекомых-хищников (Matsui, 2006).

(2E)-Гексеналь обладает сильными бактерицидными свойствами в основном благодаря α,β -ненасыщенному карбонильному фрагменту, который обладает высокой реакционной способностью при образовании аддуктов с нуклеофилами, такими как SH-группы, посредством реакций присоединения типа Михаэля (Farmer, Davoine, 2007). Соответствующие С6 спирты также являются мощными антибактериальными соединениями и могут действовать синергетически с соответствующими альдегидными аналогами, образуя смесь защитных веществ. Было проведено большое исследование более 40 растительных оксипинов, и было обнаружено, что α,β -ненасыщенный карбонил является важной химической группировкой антимикробной активности (Prost *et al.*, 2005). Такой вывод сделан, например, на основе высокой ак-

тивности, проявляемой 12-ОФДК, содержащей эту группировку, по сравнению с жасмоновой кислотой, в которой она отсутствует и которая не проявляет антимикробную активность. Это наблюдение использовалось для поиска и создания новых летучих антимикробных соединений. Из ряда синтезированных соединений с α,β -ненасыщенной карбонильной группировкой оптимальным синтезированным соединением против ряда распространенных патогенных микроорганизмов растений стал 4-октилциклопентенон. Более короткие боковые цепи снижают гидрофобность молекулы (по данным $\log P$) и антимикробную активность (Zhou *et al.*, 2011).

Кроме того, у грибов и бриофитов описаны C8 летучие соединения, способные индуцировать окислительный взрыв и экспрессию некоторых защитных генов у *A. thaliana* (Kishimoto *et al.*, 2007; Splivallo *et al.*, 2007).

Помимо ЛОГ и ГПЛ, в синтезе GLV участвуют (3Z,2E)-енол-изомераза (Phillips *et al.*, 1979; Noordermeer *et al.*, 1999; Kunishima *et al.*, 2016; Spyropoulou *et al.*, 2017), алкогольдегидрогеназа (Salas, Sánchez, 1998; Bate *et al.*, 1998б), ацетилтрансфераза (D'Auria *et al.*, 2007) и гексеналь-редуктаза (Tanaka *et al.*, 2018). Альдегиды могут быть изомеризованы при участии s1-изомераз или спонтанно (Hatanaka *et al.*, 1989; Németh *et al.*, 2004; Allmann, Baldwin, 2010), что приводит к синтезу различных продуктов. Кроме того, они могут быть восстановлены до соответствующих спиртов при участии НАДН-зависимой алкогольдегидрогеназы (Noordermeer *et al.*, 1999; Fauconnier *et al.*, 1999; Noordermeer *et al.*, 2001а,б) либо образовывать сложные эфиры (например, (3Z)-гексенилацетат) при участии ацетилтрансферазы (D'Auria *et al.*, 2007).

Исходя из гомологии последовательностей, ГПЛ группируются в пять подсемейств: CYP74B, CYP74C, CYP74E, CYP74F и CYP74G. Интересно, что ГПЛ подсемейства CYP74C обладают большей гомологией аминокислотных последовательностей к 9/13-АОС, чем к 13-ГПЛ (Stumpe, Feussner, 2006; Tijet *et al.*, 2001).

Оксилипины, синтезируемые в ГПЛ ветви, широко распространены в растениях, включая мхи (Stumpe *et al.*, 2006) и водоросли (Vick, Zimmerman, 1989; Andrianarison *et al.*, 1989; Boonprab *et al.*, 2003). Тем не менее, на данный момент остается не ясным, имеют ли водоросли ГПЛ или нет. Некоторые летучие оксилипины могут образовываться в результате самопроизвольного распада гидроперекисей жирных кислот. Кроме того, ГПЛ были обнаружены у бактерии *M. nodulans* в составе химерного белка (ЦОГ-ГПЛ), а также ГПЛ активность была недавно обнаружена в мягких кораллах *Capnella imbricata* (Lee *et al.*, 2008; Brash *et al.*, 2014; Teder *et al.*, 2015). Однако фермент метиловых бактерий является членом не семейства, а клана СУР74, а фермент *C. imbricata* является каталазой, а не цитохромом Р450. Имеются сообщения о 10-гидропероксид-специфичных ГПЛ у различных грибов, ответственных за образование 1-октен-3-ола (наиболее важного летучего соединения грибов) (Wurzenberger, Grosch, 1984а,б; Mau *et al.*, 1992; Assaf *et al.*, 1995; Kermasha *et al.*, 2002), и ГПЛ лейкоцитов кролика, утилизирующей 15-ГПЭТЕ (Lam *et al.*, 1987), распространение ГПЛ в царствах животных и грибов остается под сомнением, поскольку кДНК соответствующих генов так и не были выявлены.

Предполагается, что нативные ферменты ГПЛ существуют в виде тримеров или тетрамеров с субъединицами 55–72 кДа (Vick, Zimmerman, 1976; Schreier, Lorenz, 1982; Olias *et al.*, 1990; Matsui *et al.*, 1991; Shibata *et al.*, 1995; Fauconnier *et al.*, 1997; Itoh, Vick, 1999; Tijet *et al.*, 2000). Большинство ГПЛ являются мембраносвязанными белками. Некоторые из них содержат N-концевые последовательности, транспортирующие к хлоропластам (Blée, Joyard, 1996; Bate *et al.*, 1998а,б; Froehlich *et al.*, 2001; Stumpe *et al.*, 2006; Chehab *et al.*, 2006; Padilla *et al.*, 2010). В то же время, у других ГПЛ отсутствует выраженная транзитная последовательность (Noordermeer *et al.*, 2000; Howe *et al.*, 2000). Предполагается, что такие ферменты локализуются в микросомах (Riley *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1999; Mita *et al.*, 2005). Миндальная 9-ГПЛ связана с эндомембранной системой и липидными тельцами (Mita *et al.*,

2005); 9/13-ГПЛ люцерны *Medicago truncatula* локализована в липидных тельцах и в цитоплазме (De Domenico *et al.*, 2007). Для экстракции и солюбилизации ГПЛ зачастую необходимо присутствие детергента (Noordermeer *et al.*, 2001a,б). Однако ГПЛ из этиолированных гипокотилей проростков подсолнечника и арбуза экстрагируются в буферах без детергента (Vick, Zimmerman, 1976; Itoh, Vick, 1999). Из этого был сделан вывод, что ГПЛ в этиолированных гипокотилеях, где зрелых хлоропластов и мембранных липидов меньше по сравнению с зелеными листьями, находится либо в растворимой форме, либо слабосвязанной с мембранами форме, тогда как ГПЛ в листьях – это мембраносвязанная форма, требующая высоких концентраций детергентов для солюбилизации (Itoh, Vick, 1999). В проростках *M. sativa* большая часть ГПЛ активности была обнаружена в растворимой фракции (Noordermeer *et al.*, 2000). В то же время, 9/13-ГПЛ (CYP74C3) *M. truncatula*, скорее всего, является мономерным мембранным белком, поскольку для его экстракции и очистки требуется наличие детергента. При этом этот белок остается растворимым и активным мономером после удаления детергента и солей (Hughes *et al.*, 2006a,б).

Поскольку до настоящего времени не существует кристаллографических данных ни для одной ГПЛ, имеющаяся информация о структуре ГПЛ (Hughes *et al.*, 2008) основана на моделировании на основе гомологичных АОС (Oldham *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008) и других цитохромов P450 (Williams *et al.*, 2000; Denisov *et al.*, 2005). Кроме того, по результатам спектроскопических исследований методом кругового дихроизма была получена информация о вторичной структуре 13-ГПЛ зеленого перца и люцерны (Noordermeer *et al.*, 2001a,б; Santiago-Gómez *et al.*, 2008, 2010; Panagakou *et al.*, 2013). С одной стороны, большинство классических цитохромов P450, структура которых была расшифрована, очень отличается от ГПЛ, которые имеют очень низкую идентичность последовательностей с классическими цитохромами. Кроме того, цитохромы P450 являются либо водорастворимыми (микробные ферменты), либо имеют поверхностные элементы для взаи-

модействия с мембранами (ферменты млекопитающих) и, следовательно, для улучшения растворимости в воде при кристаллизации их структуру значительно модифицируют (Williams *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2003). Структура алленоксидсинтазного домена в составе химерного белка АОС-ЛОГ кораллов также не подходит для экстраполяции на структуру ГПЛ или других АОС, поскольку имеет каталазоподобную структуру (Oldham *et al.*, 2005). Тем не менее, было показано, что все цитохромы P450 имеют высококонсервативную структуру, несмотря на низкую идентичность последовательностей (Graham, Peterson, 1999; Noordermeer *et al.*, 2001a,б), и модель 9/13-ГПЛ *M. truncatula*, построенная по имеющимся структурным данным по цитохромам P450, была валидирована результатами сайт-направленного мутагенеза. Таким образом, ферменты CYP74 имеют сопоставимую с классическими цитохромами P450 структуру (Hughes *et al.*, 2008). Наиболее подходящими для сопоставления с ГПЛ являются структуры 13-АОС *Parthenium argentatum* и 9/13-АОС *A. thaliana* (Lee *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008).

Ранее считалось, что ГПЛ расщепляют углеродную цепь гидроперекисей жирных кислот на две части, а именно – альдегид и альдокислоту. Название «гидропероксидлиаза» было впервые введено в 1976 году (Vick, Zimmerman, 1976), хотя ранее его называли «фермент гидроперекисного расщепления» (Grosch, Schwarz, 1971; Jadhav *et al.*, 1972; Hatanaka, Harada, 1973; Galliard *et al.*, 1976). Несмотря на давность открытия, ГПЛ по-прежнему не зарегистрирована ферментной комиссией (ЕС). Отсутствие регистрации не случайно, поскольку механизм ГПЛ реакции до недавних пор был не ясен. Конечными продуктами ГПЛ являются два короткоцепочечных фрагмента гидроперекисного субстрата жирной кислоты, а именно – альдегид и альдокислота. Таким образом, учитывая общую механистическую схему, ГПЛ действуют как лиазы. Точный механизм расщепления цепи в течение долгого времени был предметом споров. Однако в 2004 году было определено, что ГПЛ фактически катализируют изомеризацию гидроперекисей жирных кислот в короткоживущие полуацетали (Grechkin, Hamberg, 2004; Grechkin *et*

al., 2006). В свою очередь, полуацетали спонтанно разлагаются на два короткоцепочечных фрагмента. Таким образом, фактически, ГПЛ являются изомерами. И недавно впервые было проведено микропрепаративное выделение и ЯМР-структурное исследование полуацетала жирных кислот (ТМС/ТМС) – короткоживущего истинного продукта ГПЛ (Mukhtarova *et al.*, 2018). Анализ с помощью ГХ-МС и ЯМР-спектроскопии выявил основной продукт – ТМС/ТМС-производное полуацетала, 9-гидрокси-9-[(1'E,3'Z)-нонадиенилокси]-нонановой кислоты. Детальная структура полуацетала была определена с использованием [¹³C₁₈]9(S)-ГПОД в качестве субстрата для его получения. Полученные результаты являются неопровержимым доказательством того, что настоящие продукты ГПЛ являются полуацеталами и что альдегиды с короткой цепью образуются в результате быстрого вторичного разрыва цепи. Вследствие чего было предложено заменить название «гидропероксидлиазы», которое не отражает фактическую активность изомеразы (внутримолекулярной оксидоредуктазы), на «полуацетальсинтазу» (ПАС). Таким образом, в ГПЛ реакции эпоксиаллильный радикал подвергается расщеплению по оксирановой связи С-С, и полученный радикал при С13 способен восстанавливать кислород. При этом катализируемом железом переносе кислорода радикал рекомбинирует с гидроксильным радикалом S-Fe^{IV}-ОН, образуя нестабильный полуацеталь, и железо при этом восстанавливается до Fe^{III}. Впоследствии полуацеталь самопроизвольно диссоциирует на С6-альдегид и С12-енол. С12-енол далее превращается в ω-оксокислоту путем кето-енольной таутомеризации (рис. 17) (Lee *et al.*, 2008; Noordermeer *et al.*, 2001a; Grechkin *et al.*, 2006).

Присутствие полуацетала в реакции расщепления гидроперекисей жирных кислот было первоначально предложено Гарднером и Платтнером (Gardner, Plattner, 1984). Эта гипотеза была основана на исследовании химического расщепления 13-ГПОТ в присутствии кислоты Льюиса. Был предложен гетеролитический механизм нуклеофильного замещения промежуточного карбокатиона водой (Gardner, Plattner, 1984). Тот же механизм был предло-

жен для ГПЛ реакции (Gardner, Plattner, 1984; Hatanaka, 1993), хотя было высказано предположение о формировании полуацетала и его немедленном распаде в активном сайте ГПЛ (Hatanaka, 1993).

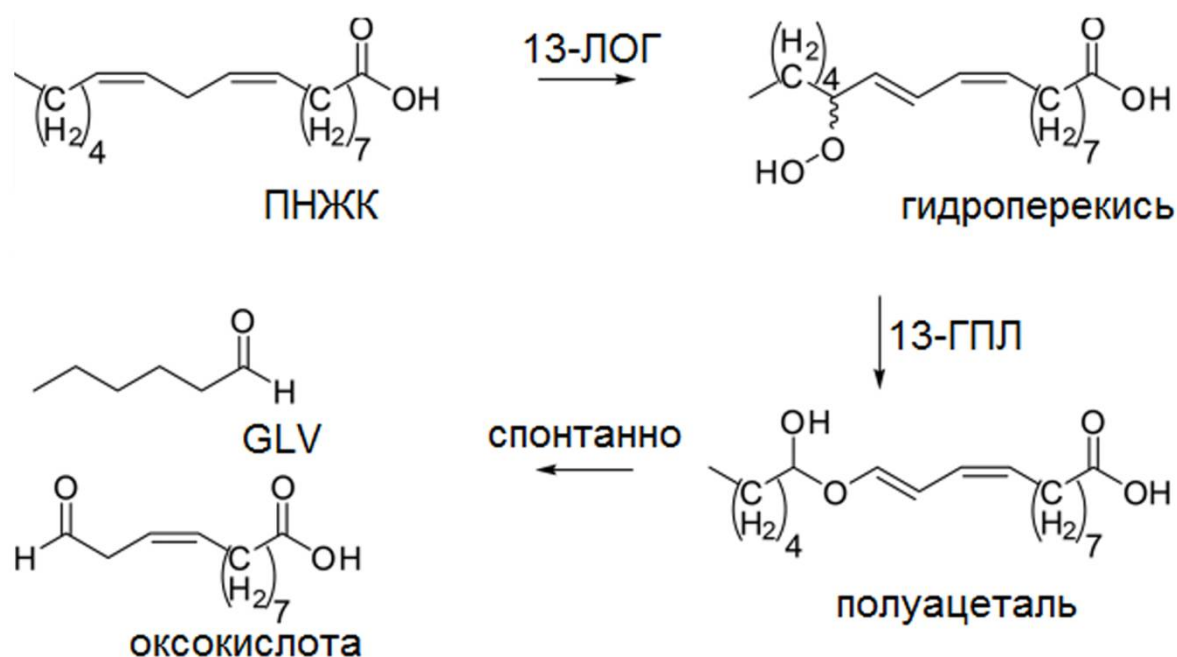


Рис. 17. Превращение линолевой кислоты при участии последовательно ЛОГ и ГПЛ (Stolterfoht *et al.*, 2019).

Обнаружение и описание (Grechkin, Hamberg, 2004; Grechkin *et al.*, 2006; Mukhtarova *et al.*, 2018) полуацетала выявило два факта. Во-первых, ГПЛ реакция происходит по механизму гомолитической перегруппировки через эпоксиаллильный радикал (рис. 18); и эфирный, и гидроксильный атомы кислорода происходят из гидропероксигруппы субстрата. Во-вторых, полуацеталь является истинным продуктом, который синтезируется ГПЛ и высвобождается из активного сайта. Полуацеталь представляет собой короткоживущую молекулу, спонтанно распадающуюся на две части: альдегид и енол. Енол (ТМС) также был обнаружен ранее (Grechkin *et al.*, 2003). Таким образом, ГПЛ катализирует изомеризацию гидроперекиси, а не расщепление его цепи. Следовательно, ГПЛ представляет собой изомеразу, действующую как внутримолекулярная оксидоредуктаза (EC 5.3.99.-).

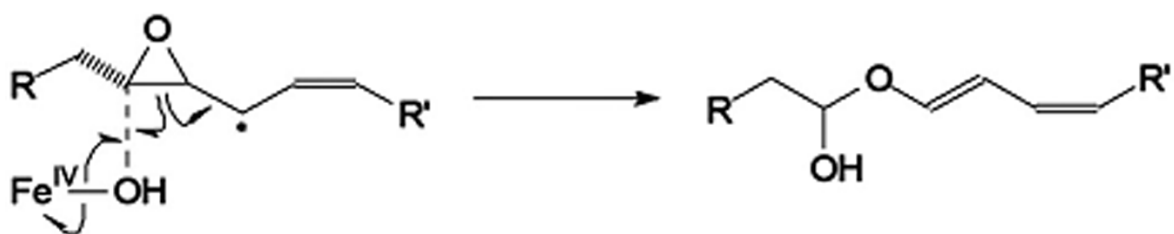


Рис. 18. Перегруппировка эпоксиаллильного радикала с последующей рекомбинацией с гидроксильным радикалом в ГПЛ реакции с образованием полуацетала (Mukhtarova *et al.*, 2018).

Несколько ферментов оксипинового метаболизма официально отнесены к этой группе: простаглицинсинтаза (ПЦС, CYP8A, EC 5.3.99.4) и тромбоксансинтаза (ТКС, CYP5A, EC 5.3.99.5), которые изомеризуют простаглицин H2 и другие простаглициновые эндоперекиси (рис. 19). ПЦС и ТКС являются неклассическими цитохромами P450. В частности, продукт ТКС, тромбоксан A2, представляет собой сопряженный бициклический ацеталь, сходный с полуацеталем, продуцируемым ГПЛ. ПЦС и ТКС, а также ГПЛ катализируют образование нестабильных продуктов изомеризации. Таким образом, ГПЛ являются родственными упомянутым ферментам группы EC 5.3.99.- как механистически, так и филогенетически, а также с учетом родства их субстратов и продуктов. За исключением упомянутых цитохромов P450, есть некоторые не-P450 члены группы EC 5.3.99.-, которые катализируют дальнейшую конверсию нестабильных продуктов, включая простаглицин D синтазу (EC 5.3.99.2), простаглицин E синтазу (EC 5.3.99.3), а также алленоксидциклазу (EC 5.3.99.6). В целом, существует много изомераз группы EC 5.3.99.-, участвующих в оксипиновом метаболизме, которые функционально связаны с ГПЛ. С другой стороны, целое семейство дегидраз (EC 4.2.1.-) включает в себя только два родственных ГПЛ фермента: АОС и ДЭС. Несмотря на филогенетическое родство с АОС и ДЭС, ГПЛ катализирует реакцию, механизм которой не имеет отношения к лиазам (дегидратазам) и сходен с другими изомеразми группы EC 5.3.99.-. Факты доказывают, что ГПЛ были неправильно отнесены к лиазам, вследствие чего было предложено заменить название «гидропероксидлиаза» на «полуацетальсинтазу».

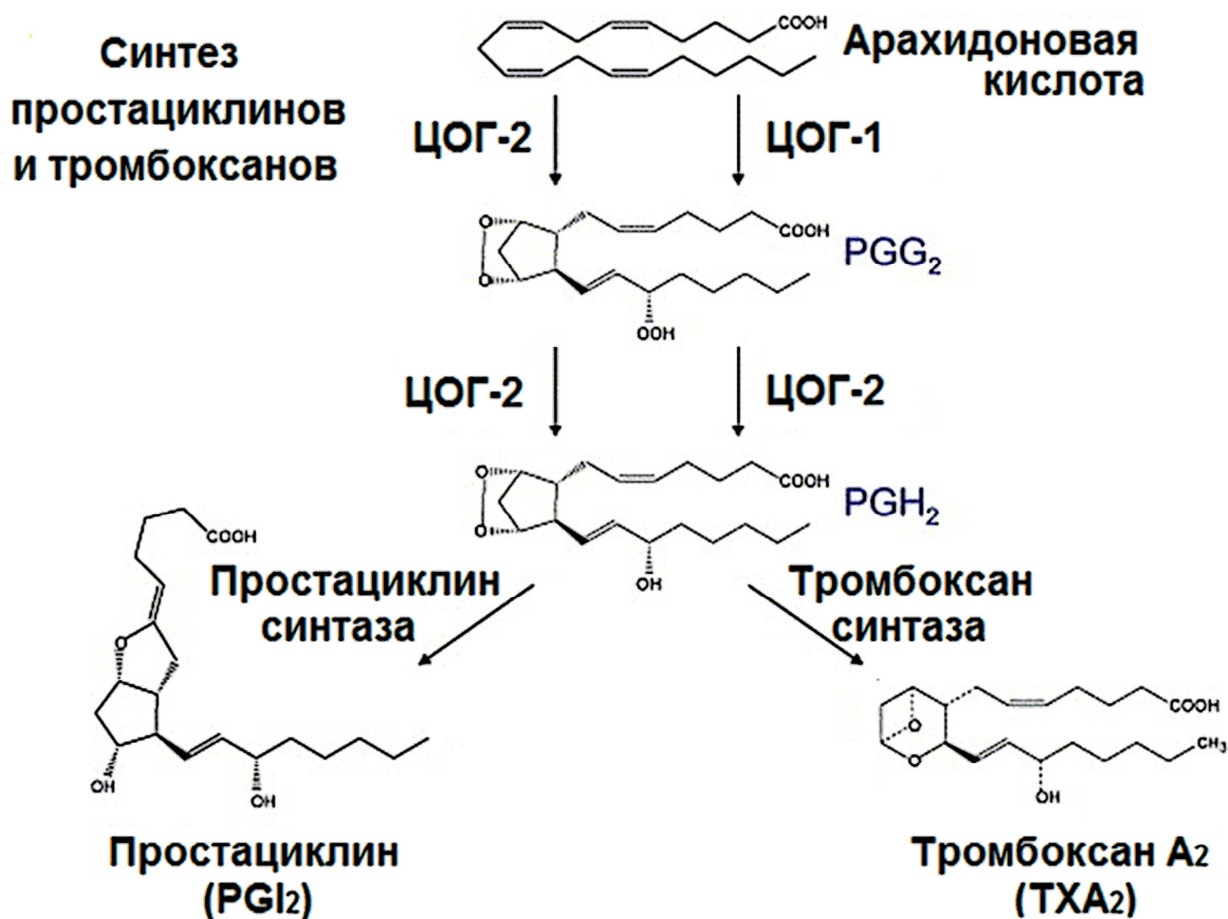


Рис. 19. Синтез простацклина и тромбосана. TXA₂ и PGI₂ синтезируются в результате превращения арахидоновой кислоты при участии цикло-оксигеназы через промежуточные продукты – простагландин G₂ (PGG₂) и простагландин H₂ (PGH₂). PGH₂ затем превращается в простацклин (PGI₂) при участии простацклинсинтазы в клетках эндотелия или тромбосан (TXA₂) при участии тромбосансинтазы в тромбоцитах (Fetalvero *et al.*, 2007).

1.11. Дивинилэфирсинтазный путь

В то время как алленоксидсинтазная и гидропероксидлиазная ветви хорошо изучены и описаны у многих видов растений, дивинилэфирсинтазная ветвь является гораздо менее изученной, особенно касательно ферментов, катализирующих образование дивиниловых эфиров – ДЭС. После заражения патогенами у многих видов растений образуются дивиниловые эфиры (рис. 20) – продукты превращения 9- или 13-гидроперекисей линолевой и α-линоленовой кислот. Так, в инфицированных листьях картофеля продуцируются колнелевая и колнеленовая кислоты – соединения, которые формируются при участии дивинилэфирсинтазы из (9*S*)-гидроперекисей линолевой и

α -линоленовой кислот соответственно (Weber *et al.*, 1999), и обладают фунгицидными свойствами (Fammartino *et al.*, 2007; Hamberg, 2004).

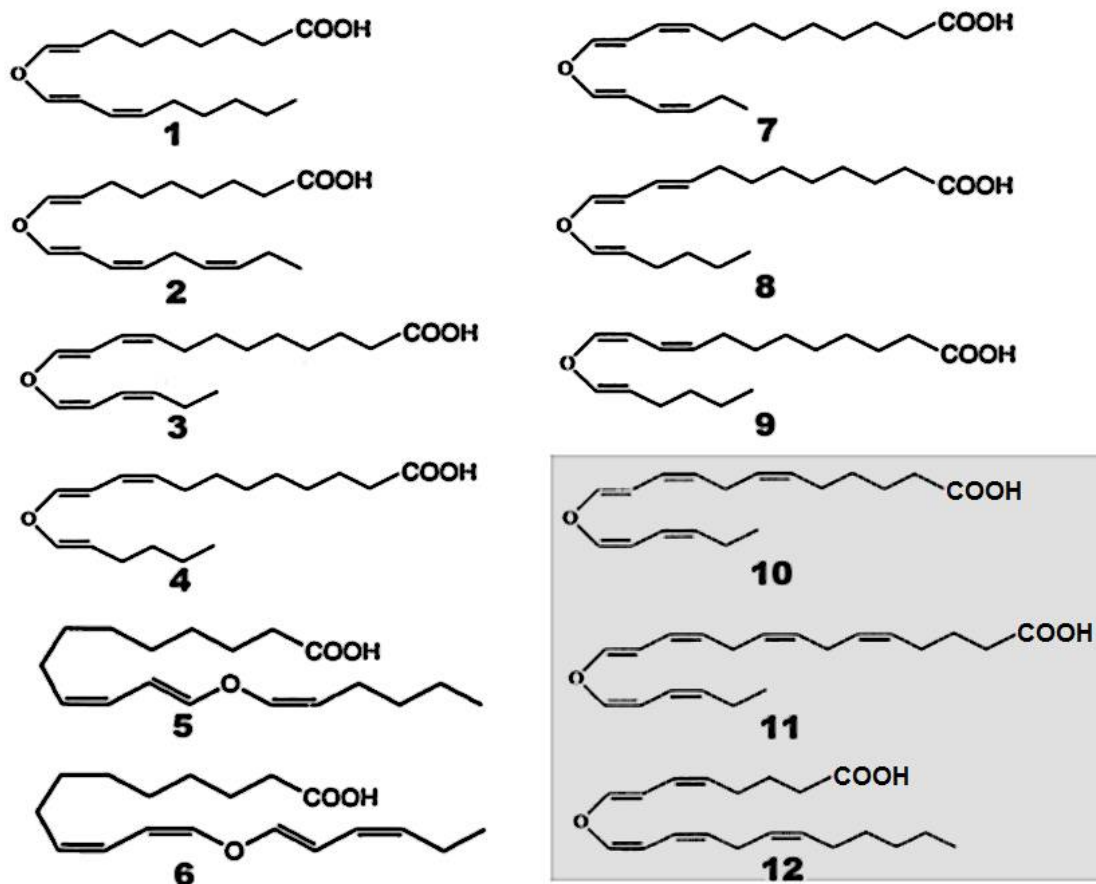


Рис. 20. Дивиниловые эфиры, обнаруженные у различных видов растений: колнелевая кислота (1), колнеленовая кислота (2), ($\omega 5Z$)-этероленовая кислота (3), этеролева кислота (4), ($\omega 5Z$)-этеролева кислота (5), (11Z)-этероленовая кислота (6), этероленовая кислота (7), all-*транс*-этеролева кислота (8), (11Z)-этеролева кислота (9). Соединения, обнаруженные у водорослей, выделены серым цветом: 10, 11 были обнаружены только у бурой водоросли *L. sinclairii*, соединение 12 – только у *Polyneura latissima*.

9-Специфичные дивинилэфирсинтазы выявлены у ряда филогенетически отдаленных видов растений: томата (LeDES, CYP74D1, Itoh, Howe, 2001), картофеля (StDES, CYP74D2, Stumpe *et al.*, 2001), табака (NtDES, CYP74D3, Fammartino *et al.*, 2007), перца (CaDES, CYP74D4, Gullner *et al.*, 2010) и клематиса виноградолистного (Hamberg, 2005). В листьях льна (*Linum usitatissimum* L.) при инфицировании бактериальными клетками *Pectobacterium atrosepticum* продуцируются (9Z,11E,1'Z)-12-(1'-гексенилокси)-9,11-додекадиеновая [($\omega 5Z$)-этеролева] и (9Z,11E,1'Z,3'Z)-12-

(1',3'-гексадиенилокси)-9,11-додекадиеновая [(ω5Z)-этероленовая] кислоты (Hamberg, 2005; Chechetkin *et al.*, 2008).

Детальные исследования с использованием дейтерированных субстратов показали, что биосинтез дивиниловых эфиров из 9- и 13-гидроперекисей линолевой кислоты проходит по механизму, который включает стереоспецифический отрыв одного из двух атомов водорода в положении α по отношению к углероду гидроперекиси (рис. 21). Более того, установлена четкая взаимосвязь между абсолютной конфигурацией удаляемого атома водорода (*R* или *S*) и конфигурацией введенной двойной связи винилового эфира (*E* или *Z*). Таким образом, независимо от того, какой региоизомер гидроперекиси является субстратом, дивинилэфирсинтазы, отрывающие про-*R* водород, продуцируют дивиниловые эфиры, имеющие *E* двойную связь винилового эфира, тогда как ферменты, отрывающие про-*S* водород, образуют дивиниловые эфиры, имеющие *Z* двойную связь винилового эфира (Hamberg, 2005).

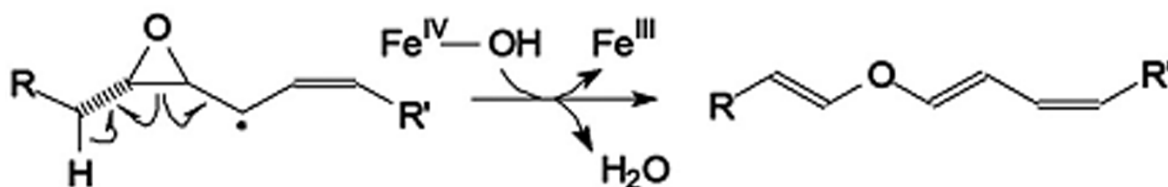


Рис. 21. Превращение эпоксиаллильного радикала в ДЭС реакции (дегидратаза) (Mukhtarova *et al.*, 2018).

1.12. Субстратная специфичность ферментов СУР74

Результатом каталитического действия липоксигеназ, различающихся по региоспецифичности, является образование (9*S*)- и (13*S*)-гидроперекисей линолевой и α-линоленовой кислот, которые служат субстратами для ферментов СУР74. Следовательно, СУР74 можно разделить на 9-, 13- или 9/13-специфичные ферменты. Алленоксидсинтаза льна была первым членом семейства СУР74, ген которого был клонирован (Song *et al.*, 1993). Этот 13-специфичный фермент, а также все последующие 13-специфичные АОС бы-

ли объединены в подсемейство CYP74A (рис. 22). 13-Специфичные гидропероксидлиазы – вторая распространенная группа ферментов CYP74 – составили подсемейство CYP74B. В отличие от этого, 9- и 9/13-специфичные АОС, выявленные у томата и картофеля (Itoh *et al.*, 2002; Stumpe *et al.*, 2006), были сгруппированы в подсемейство CYP74C. Это подсемейство также содержит 9- и 9/13-специфичные ГПЛ (Matsui *et al.*, 2000; Mita *et al.*, 2005).

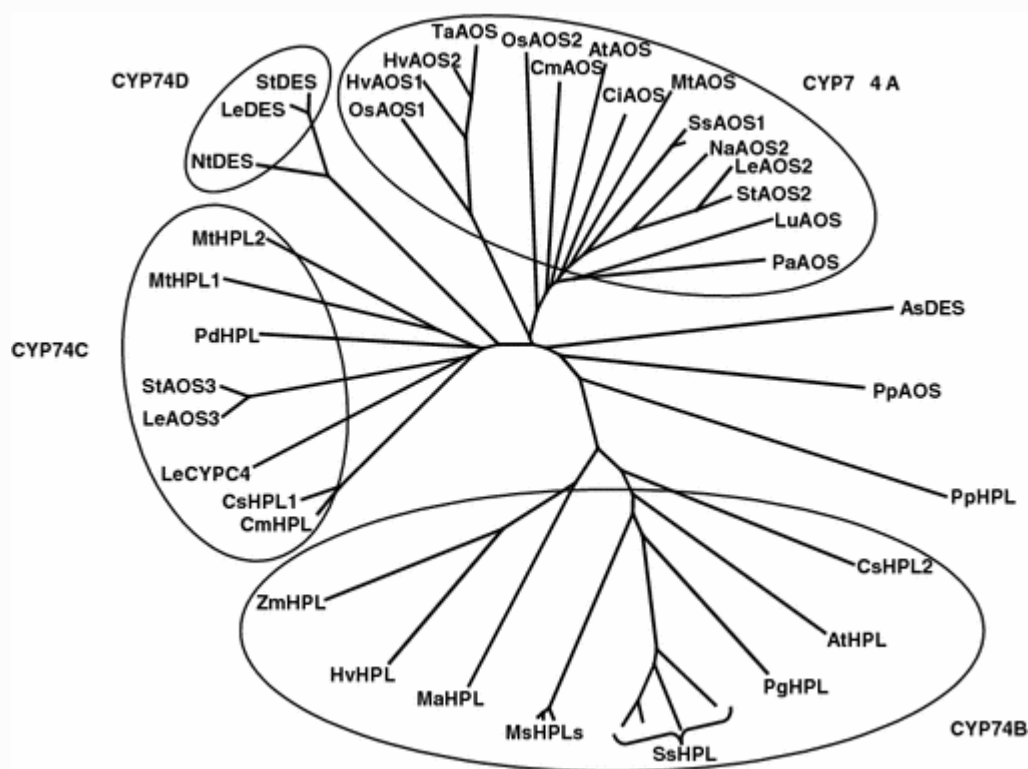


Рис. 22. Филогенетическое древо семейства CYP74 (Stumpe, Feussner, 2006).

В отличие от АОС и ГПЛ, до настоящей работы было охарактеризовано лишь пять дивинилэфирсинтаз: четыре 9-специфичных фермента растений семейства Solanaceae (томат (Itoh, Howe, 2001), картофель (Stumpe *et al.*, 2001), табак (Fammartino *et al.*, 2007), перец (Gullner *et al.*, 2010)), объединенные в подсемейство CYP74D, а также 9/13-специфичный фермент AsDES чеснока (Stumpe *et al.*, 2008). Помимо этого, несколько ферментов не попали ни в одно подсемейство из-за требований номенклатуры (наличие 55% идентичности аминокислотных последовательностей). К таким ферментам отно-

сятся дивинилэфирсинтаза AsDES (CYP74H1) чеснока и ферменты мха *Physcomitrella patens* (рис. 22).

Все приведенные выше данные указывают на относительно хорошую изученность алленоксидсинтаз, гидропероксидлиаз и дивинилэфирсинтаз, в отличие от эпоксиалкогольсинтаз. К настоящему времени описана единственная эпоксиалкогольсинтаза BfEAS (CYP440A1) ланцетника *B. floridae* (Lee *et al.*, 2008).

1.13. Структура ферментов CYP74

Хотя внутри суперсемейства P450 наблюдается не более 20% идентичности последовательностей, все цитохромы P450 имеют сходную третичную структуру, что было выявлено в результате анализа кристаллических структур нескольких десятков ферментов бактерий, растений и человека (Denisov *et al.*, 2005; Poulos, Johnson, 2005; Lee *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). К настоящему времени проведен рентгеноструктурный анализ только двух ферментов CYP74 – алленоксидсинтаз AtAOS *A. thaliana* (рис. 23, Lee *et al.*, 2008) и гваюлы *P. argentatum* (Li *et al.*, 2008). Сопоставление последовательностей фермента с известной вторичной и третичной структурой с неизученными ферментами позволяет оценить структуру последних (рис. 24).

Мембраносвязывающий участок идентифицирован по связанным молекулам детергента и по его довольно обширной неполярной поверхности (~2400Å²; рис. 23а, 25а,б). Он также является входом субстратного канала глубиной 22 Å (рис. 25в). АОС лишена характерного N-концевого трансмембранного домена микросомального цитохрома P450 (Williams *et al.*, 2000) и, тем не менее, очень плотно ассоциируется с хлоропластными мембранами (Froehlich *et al.*, 2001) и пластоглобулами (Vidi *et al.*, 2006). Сравнение кристаллических структур AtAOS и CYP2C5 млекопитающих (Williams *et al.*, 2000) показывает, что у обоих цитохромов поверхности взаимодействия с мембраной являются сходными.

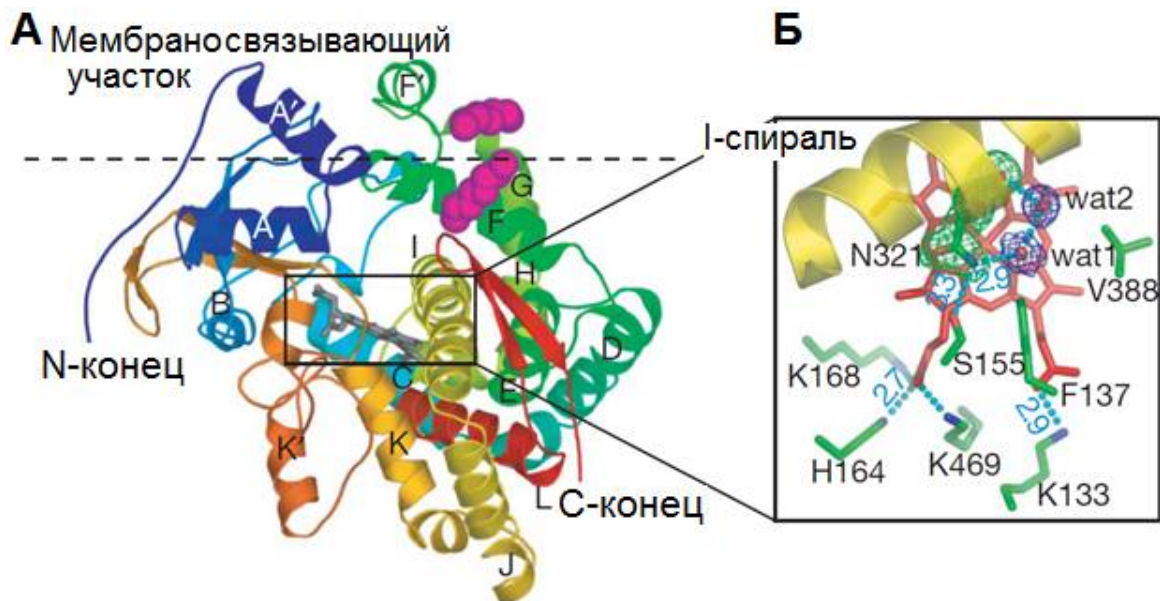


Рис. 23. Третичная структура и сайт связывания субстрата AtAOS (Lee *et al.*, 2008). **А**, ленточная диаграмма AtAOS, окрашенная в цвета радуги от N-конца (синий) до С-конца (красный). Пурпурным цветом обозначены гидрофобные хвосты двух молекул детергента, взаимодействующих со спиралью F, F' и G, которые являются частью мембраносвязывающей неполярной поверхности. Области выше и ниже пунктирной линии обращены к мембране и цитоплазме соответственно. **Б**, область около гема, обозначенного красным цветом.

Гемовый кофактор AtAOS находится между I- и L-спиралью и, так же как у классического цитохрома P450s (Denisov *et al.*, 2005; Poulos, Johnson, 2005), его пропионатные группы взаимодействуют со строго консервативными основными остатками через водородные связи (рис. 23б). Гем находится в низкоспиновом состоянии, при этом остаток цистеина Cys471 и молекула воды служат проксимальным и дистальным координационными лигандами Fe (III) соответственно (рис. 23б и 26а).

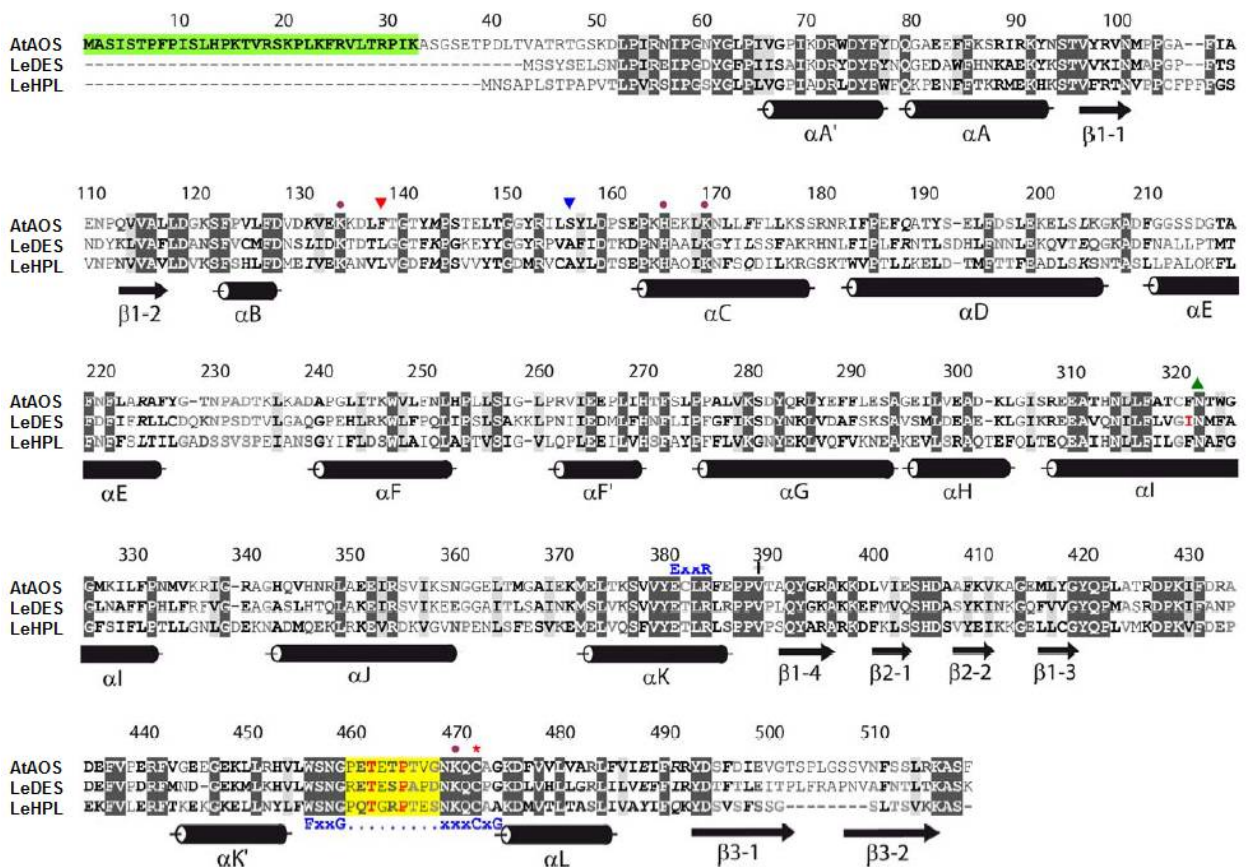


Рис. 24. Сопоставление первичной и вторичной структур AtAOS, LeDES и LeHPL (Lee *et al.*, 2008). Зеленым цветом выделена N-концевая последовательность транспорта в хлоропласты, желтым цветом – вставка из девяти аминокислотных остатков в гем-связывающей петле (мотив FxxGx3CxG). Строго консервативные остатки лизина и гистидина, взаимодействующие с пропионатами гема, отмечены фиолетовыми стрелками; аминокислотные остатки, составляющие активный центр – зелеными стрелками; инвариантный аксиальный остаток цистеина отмечен красной звездочкой. Спирали и складки представлены в виде цилиндров и блок-стрелок соответственно.

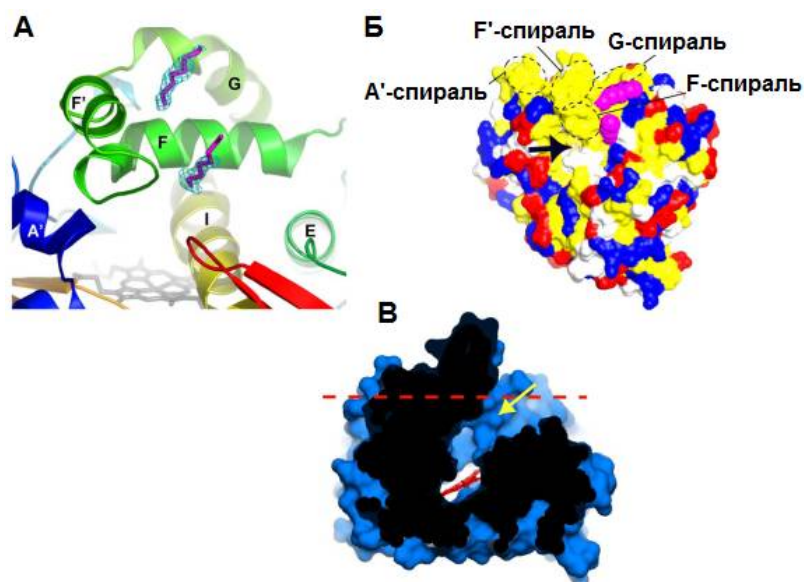


Рис. 25. Мембраносвязывающий участок AtAOS (Lee *et al.*, 2008). **А**, идентификация сайтов связывания детергента (показан сиреневым цветом, его электронная плотность показана голубой сеткой) возле спиралей F и G в структуре AtAOS. **Б**, на молекулярной поверхности AtAOS видна большая неполярная область (желтый цвет) в непосредственной близости от связанных молекул детергента (сиреневый цвет). Положительно и отрицательно заряженные области показаны синим и красным цветом соответственно. Нейтральные области отображаются белым цветом. **Б'**, срез макромолекулярной поверхности открывает канал активного центра, вход которого отмечен стрелкой. Область над пунктирной линией (красный цвет) – участок связывания с мембраной. Гем показан в конце канала красным цветом. Области связывания детергента AtAOS могут также функционировать при распознавании компонентов пластоглобул, таких как триглицериды и/или токоферолы.

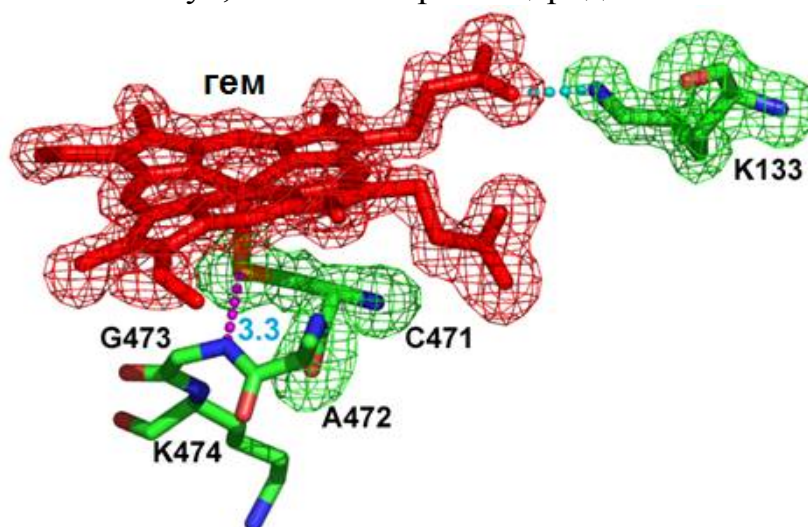


Рис. 26. Гемовый карман AtAOS (Lee *et al.*, 2008). Электронная плотность показана для гема (красная сетка), проксимального остатка цистеина (зеленая сетка) и боковой цепи одного из остатков лизина, которая взаимодействует с одним из пропионатов.

Однако есть три основных отличия структуры AtAOS от всех других известных цитохромов P450. В первую очередь, вставка из девяти аминокислотных остатков в середине гем-связывающей петли, содержащей в том числе лиганд железа – остаток цистеина Cys471 (рис. 27). В 8000 последовательностей цитохромов P450 не наблюдается вставки даже одного аминокислотного остатка. Эта модификация, характерная для всех представителей семейства CYP74, не только изменяет топологию проксимального участка, но также вызывает обширное изменение макромолекулярной поверхности, необходимой для окислительно-восстановительных взаимодействий партнеров в случае классических цитохромов P450. Кроме того, длина связи Fe–S существенно больше (2,4 Å против 2,2 Å) в состоянии без субстрата. Во-вторых, изгиб, центрированный на втором остатке глицина в мотиве GxxT I-спирали (A/G) (Denisov *et al.*, 2005) в классических цитохромах P450, у AtAOS смещен на три остатка в сторону N-конца и локализуется на остатке аспарагина Asn321, располагающего амидную группу непосредственно над гемовым железом (4,4 Å; рис. 23б). В-третьих, остаток изолейцина Ile328 заменяет остаток треонина в I-спирали, который является критическим для обеспечения доставки протонов к связанному с гемом молекулярному кислороду в классических цитохромах P450 (Denisov *et al.*, 2005; Poulos, Johnson, 2005). В целом, эти структурные модификации препятствуют монооксигеназной активности AtAOS.

В расшифрованной структуре комплекса AtAOS с 13(S)-ГОТ, близким аналогом субстрата (ОН вместо ООН), четко выявляется электронная плотность как самой жирной кислоты, так и отдельно ее гидроксильной группировки (рис. 28). (13S)-ГОТ хорошо соответствует форме и физико-химическим свойствам активного центра AtAOS. Его гидроксильный кислород занимает место молекулы воды (wat1, рис. 23б) в структуре без субстрата и взаимодействует с амидной боковой цепью остатка аспарагина Asn321 посредством водородной связи.

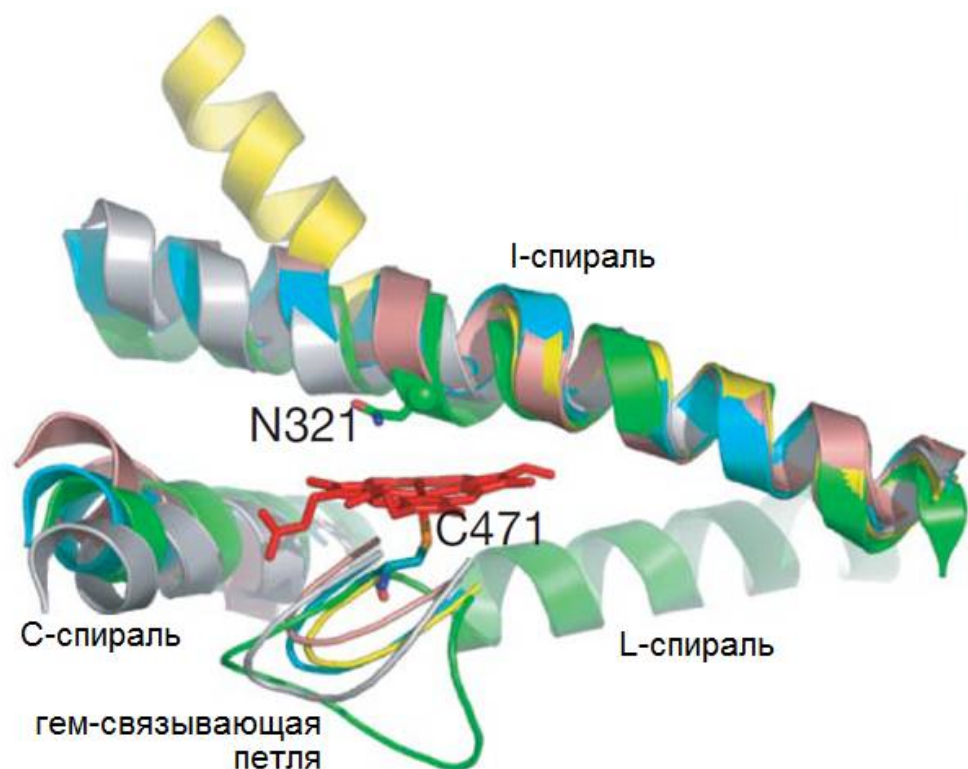


Рис. 27. Трехичная структура субстрат-связывающего сайта ферментов AtAOS (зеленый цвет), CYP102A1 (розовый цвет, PDB ID: 1BVY), CYP3A4 (голубой цвет, PDB ID: 1TQN), CYP51 (желтый цвет, PDB ID: 1EA1) и CYP152B1 (серый цвет, PDB ID: 1IZO) (Lee *et al.*, 2008).

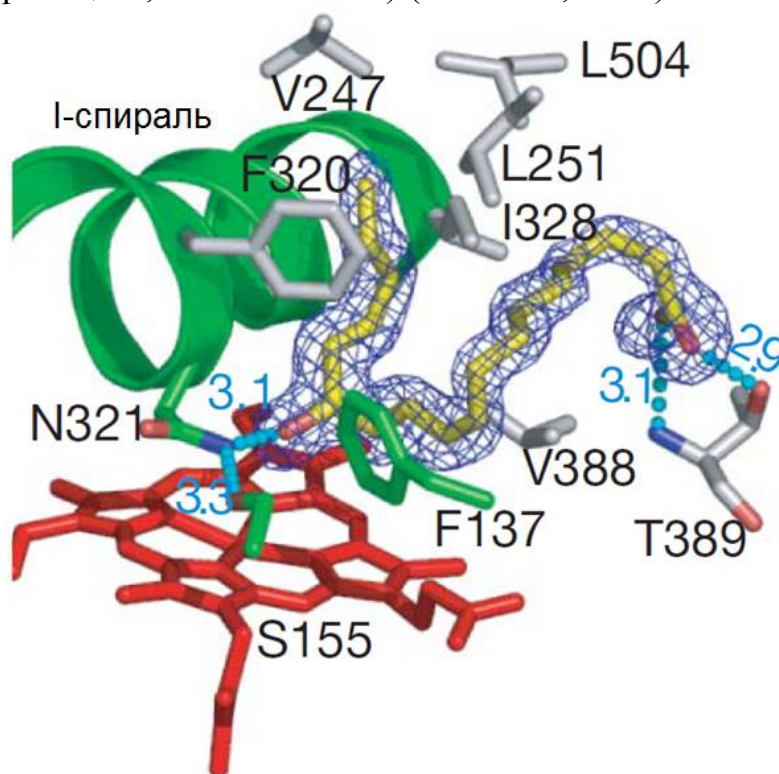


Рис. 28. Конфигурация активного сайта AtAOS (Lee *et al.*, 2008). Желтым цветом показана (13S)-ГОТ, синим цветом – ее электронная плотность. Голубые пунктирные линии обозначают водородные связи (донорно-акцепторные расстояния указаны в Å).

Карбоксильная группа участвует в водородной связи с остатком треонина Thr389, а алифатические участки поддерживают гидрофобные контакты с соседними неполярными боковыми цепями. Этот способ связывания объясняет, почему линейное координирование железа двухатомными (CO) и другими аксиальными гемовыми лигандами затруднено – из-за расположения карбоксида непосредственно над плоскостью гема. Напротив, пероксигруппа субстрата приближается сбоку и успешно лигирует гем, продуктивно взаимодействуя с каталитически важным остатком аспарагина Asn321.

Результаты рентгеноструктурного анализа AtAOS с (12*R*,13*S*)-вернолевой кислотой, аналогом предполагаемого промежуточного эпоксиаллильного продукта реакции (Song *et al.*, 1993) свидетельствуют, что способ связывания (12*R*,13*S*)-вернолевой кислоты очень похож на способ связывания (13*S*)-ГОТ; при этом C11 находится вблизи ароматической части остатка фенилаланина Phe137, находящегося в сайте «F/L toggle» (рис. 29). Эти наблюдения определяют важную роль сайта «F/L toggle» (Phe137 в AtAOS). Он стабилизирует углерод-центрированный радикал и взаимодействует с образующимся карбкатионом посредством катион- π -взаимодействий.

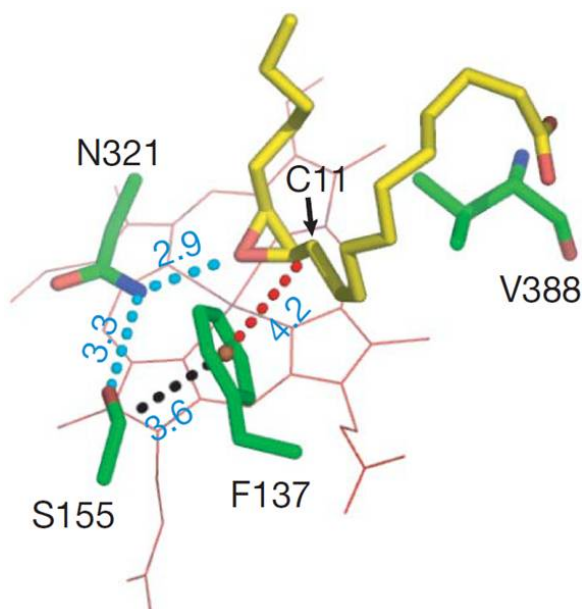


Рис. 29. Структура активного сайта AtAOS с (-)-вернолевой кислотой (желтый цвет) (Lee *et al.*, 2008).

В случае АОС и ГПЛ концевой гидроперекисный кислород субстрата координирует трехвалентное гемовое железо (2) (рис. 30) после вытеснения двух связанных молекул воды (wat1 и wat2; см. (1)) из активного центра. В результате электростатического содействия карбоксиамида происходит гомолиз O-O (White, Coon, 1980), в результате чего образуется алкоксильный радикал (RO·) и протонированные феррильные частицы (S-Fe(IV)-OH) (3) (рис. 30). RO·, сохраняя водородную связь с амидом, присоединяется к ближайшей двойной связи (C11-C12) с образованием эпоксида и углерод-центрированного радикала (C·) при C11 (4). Водородная связь с RO· предпочтительно циклизуется, а не отдает аллильный водород. На этом этапе АОС и ГПЛ механизмы расходятся. В случае АОС окисление C· S-Fe(IV)-OH (5, слева) возможно благодаря Phe137, который также стабилизирует образующийся карбокатион (C⁺) (при C11; 6, слева) посредством взаимодействий катион-π. При отщеплении β-протона рядом с эпоксидом вводится связь C=C, и образуется оксид аллена. В случае с ГПЛ есть два принципиальных отличия. Во-первых, перенос электрона не происходит из-за трудности стабилизации радикала в этом положении. Следовательно, в эпоксикарбинильном радикале подвергается расщеплению связь C-C (Smith *et al.*, 1998), образуя радикал при C13, который способен связывать кислород (катализируемый железом перенос кислорода с участием радикальной рекомбинации) (5, справа), учитывая близость к феррильному центру (3,3 Å). Во-вторых, отсутствие остатка фенилаланина Phe137 у ГПЛ (5, справа) препятствует стабилизации промежуточного карбокатиона при C11. Эти условия способствуют образованию нестабильного полуацетала (Grechkin, Hamberg, 2004), который самопроизвольно диссоциирует на короткоцепочечные альдегиды (6, справа).

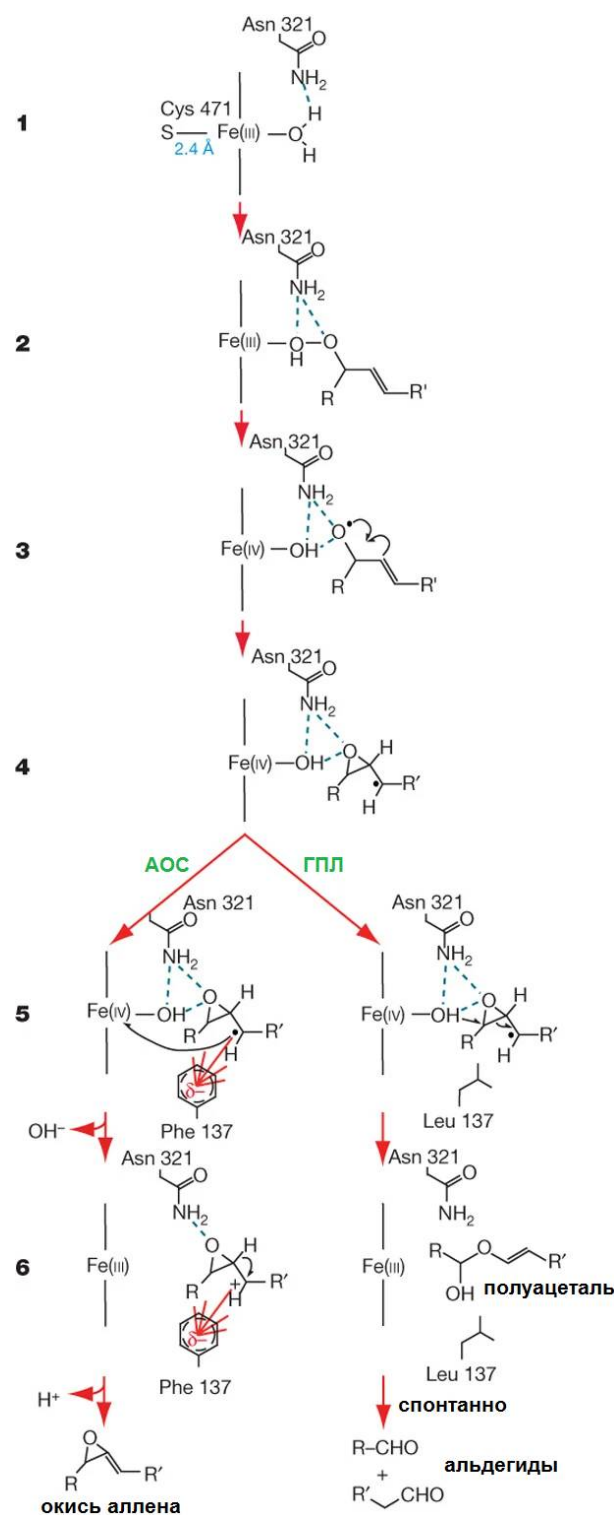


Рис. 30. Предполагаемые пути АОС и ГПЛ реакции (Lee *et al.*, 2008). Промежуточный эпоксиаллильный радикал, образующийся на стадии 4, может подвергнуться окислению одним электроном с последующей потерей протона (АОС) или удалением кислорода (ГПЛ). Структура субстрата сокращена, чтобы выделить область, подвергающуюся химическому преобразованию. Связь Fe–S между гемовым железом и остатком цистеина Cys471 показана только на этапе 1. Она остается неизменной на протяжении всего каталитического цикла. Водородные связи показаны синими пунктирными линиями.

Хотя ферменты CYP74 не являются монооксигеназами, они используют путь перекисного шунта (White, Coon, 1980). Механизм их реакций имеет как сходства, так и различия с консенсусным механизмом гидроксирования монооксигеназ P450 (Groves, 2003). Протонированный феррильный центр, S–Fe(IV)–OH (3), является общим промежуточным продуктом в обеих системах. В случае ферментов CYP74 вставка из девяти аминокислотных остатков в проксимальной гем-связывающей петле вносит значительный вклад в снижение донорной силы тиолата (рис. 27), способствуя образованию комплекса S–Fe(IV)–OH, который может легко участвовать в переносе электронов (АОС) или удалении кислорода (ГПЛ). Напротив, для монооксигеназ P450 (Green *et al.*, 2004) передача электронов от проксимального тиолата к гемовому железу позволяет катион-радикалу феррил-порфирина (S–Fe(IV)=O⁺) отрывать атом водорода от субстрата. Образующийся высокореакционный S–Fe(IV)–OH ($pK_a > 8,2$) гидроксилирует радикал субстрата (дополнительное обсуждение). Сильный донорный эффект тиолата также не позволяет S–Fe(IV)–OH служить хорошим акцептором электронов (Ogliaro *et al.*, 2002).

Одним из наиболее распространенных методов для изучения взаимосвязи структуры и каталитических свойств ферментов является сайт-направленный мутагенез. На сегодняшний день опубликовано несколько сообщений о результатах экспериментов по сайт-направленному мутагенезу ферментов CYP74. Было описано получение и изучение каталитических свойств мутантных форм алленоксидсинтазы AtAOS *A. thaliana* (Lee *et al.*, 2008), PpAOS1 мха *P. patens* (Scholz *et al.*, 2012) и гидропероксидлиаз CYP74C3 (Hughes *et al.*, 2008) и PpHPL1 мха *P. patens* (Scholz *et al.*, 2012). Участки, выбранные для мутирования, локализованы внутри или вблизи сайта «F/L toggle» (CPC-1) и участка перегиба I-спирали (CPC-4). В целом, результаты сайт-направленного мутагенеза ферментов одного типа были сходными. Описанные мутантные формы сохранили способность утилизировать те же субстраты, что и ферменты дикого типа. АОС частично или полностью

превращались в ГПЛ, в то время как ГПЛ оставались неизменными (таблица 1). В случае мутантных форм фермента СУР74С3 (в данной работе СУР74С13_МТ (присвоено Д. Нельсоном, личное сообщение)) F287V, N285A и G288I кинетические параметры были значительно ниже, чем у фермента дикого типа (Hughes *et al.*, 2008). О кинетике реакций, катализируемых другими мутантными формами, сведений нет.

Таблица 1. Данные о результатах превращений разных ферментов СУР74 в результате сайт-направленного мутагенеза.

Фермент дикого типа	Мутантная форма	Домен	Результат сайт-направленного мутагенеза
AtAOS <i>A. thaliana</i>	F137L	“F/L toggle”, сайт в СРС-1	ГПЛ/АОС
	F137L/S155A	“F/L toggle” сайт в СРС-1	ГПЛ/АОС
СУР74С13_МТ <i>M. truncatula</i>	G288I	I-спираль, СРС-4	ГПЛ (изменений нет)
	N285A	Участок перегиба I-спирали, СРС-4	ГПЛ (изменений нет)
	F287V	Участок перегиба I-спирали, СРС-4	ГПЛ (изменений нет)
PpAOS1 мха <i>Physcomitrella patens</i>	F93L	“F/L toggle”, СРС-1	ГПЛ

РрНРL1 мха <i>Physcomitrella patens</i>	F151L	“F/L toggle”, СРС-1	ГПЛ (изменений нет)
	A169S	Сайт около СРС-1	ГПЛ (изменений нет)
	F151L / A169S	“F/L toggle”/ сайт около СРС-1	ГПЛ (изменений нет)

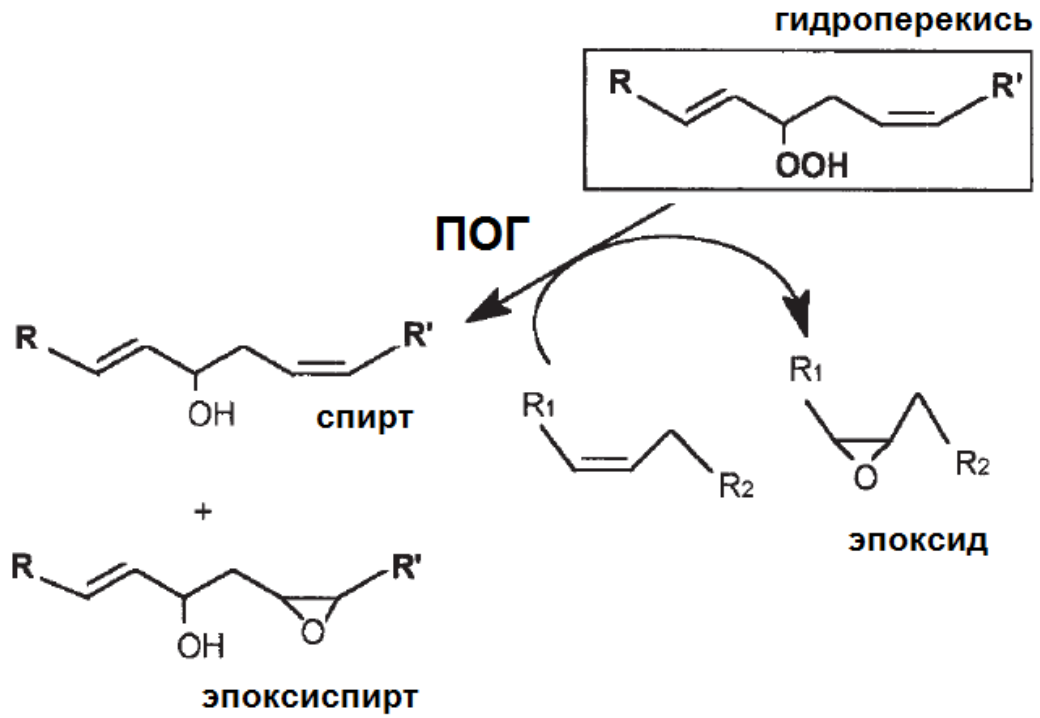
1.14. Пути образования эпокиспиртов и тригидрокислот

Образование эпокиспиртов (эпоксигидроксипроизводных жирных кислот) может происходить различными путями. Так, первоначально было показано формирование эпокиспиртов в результате присоединения эпокси-группы к токоферолу (Gardner *et al.*, 1972), а также образование эпокиспиртов в процессе нагревания гидроперекисей жирных кислот (Hamberg, Gotthammar, 1973; Grechkin *et al.*, 2005), под воздействием кислот (Gardner *et al.*, 1984а,б), металлов с переходной валентностью (Gardner *et al.*, 1974; Gardner, 1975; Gardner, Crawford, 1981; Gardner, Kleiman, 1981; Dix, Marnett, 1985), а также в присутствии гемопротеинов (Gardner, 1989).

Один из ферментативных путей образования эпокиспиртов у растений осуществляется пероксигеназами (Hamberg, Hamberg, 1990); при участии пероксигеназы происходит превращение гидроперекиси жирной кислоты в ряд продуктов: эпоксипроизводное, эпокиспирт и спирт путем межмолекулярного переноса кислорода (рис. 31А; Blée, 1998; Hamberg, 1995).

Соевая пероксигеназа (ПОГ) катализирует превращение 13-ГПОТ в 15,16-*цис*-эпокси-13-ГПОТ, который является продуктом гетеролитического расщепления О-О связи (Blée *et al.*, 1993).

А



Б

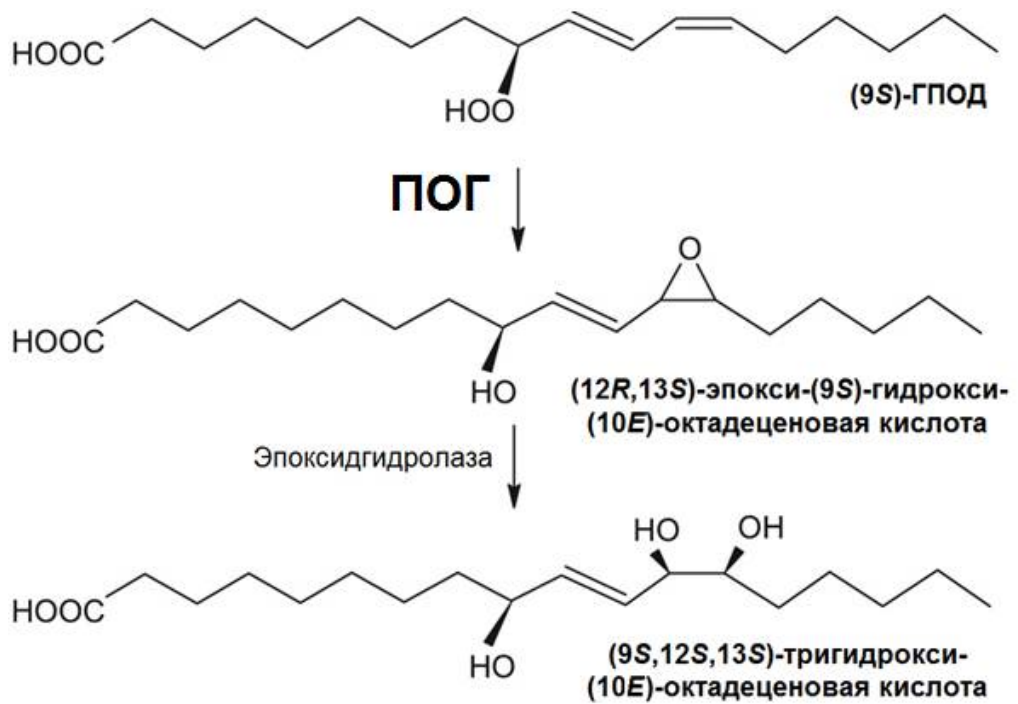


Рис. 31. Биосинтез эпоксиспиртов (А) и тригидроксикислот (Б) в пероксигеназном пути (Blee, 1998; Griffiths, 2015).

В семенах овса есть два пути, в ходе одного из которых линолевая кислота превращается в (9*S*,12*S*,13*S*)-тригидрокси-(10*E*)-октадеценовую кислоту путем последовательного действия ЛОГ, ПОГ и эпоксидгидролазы (Hamberg, Hamberg, 1996; Piazza *et al.*, 1999). Пероксигеназа катализирует (9*S*)-ГПОД-зависимое эпоксидирование либо двойной связи Δ^9 , либо Δ^{12} линолевой кислоты с образованием смеси 9,10-эпокси-(12*Z*)-октадеценовой кислоты и 12,13-эпокси-(9*Z*)-октадеценовой кислоты; оба имеют в основном конфигурацию (*R*),(*S*). (9*Z*,12*R*,13*S*)-12,13-Эпокси-9-октадеценовая кислота, образующаяся в пероксигеназной реакции, ингибирует АОС (Ziegler *et al.*, 1999). По другому пути ПОГ катализирует превращение (9*S*)-ГПОД в (12*R*,13*S*)-эпокси-(9*S*)-гидрокси-(10*E*)-октадеценовую кислоту. Эпоксидная группа превращается с помощью эпоксидгидролазы в две гидроксильные группы (рис. 31Б). Таким образом, этот фермент играет важную роль в образовании тригидроксикислот, обладающих фунгицидными свойствами (Hamberg, Hamberg, 1996). Недавно было установлено, что ПОГ проявляет сходство с белком калеозином (Hanano *et al.*, 2006).

Другой, менее известный, путь образования эпокиспиртов осуществляется ферментом эпоксиалкогольсинтазой. Эпоксиспирты формируются путем внутримолекулярной перегруппировки гидроперекиси жирной кислоты, катализируемой ЭАС (Hamberg, 1999). Продукты эпоксиалкогольсинтазной реакции могут быть по региоспецифичности идентичны продуктам пероксигеназной реакции, но будут отличаться по стереохимическим показателям (Göbel *et al.*, 2001).

Эпоксиспирты, содержащие одну или более двойных связей, являются общими для животных и растений метаболитами (Gardner, 1980). Тригидрокси-производные жирных кислот, по-видимому, являются результатом гидролиза эпокиспиртов и у растений (Graveland, 1970), и у животных (Falardeau *et al.*, 1976). Эпоксиспирты могут быть образованы из алкоксильных радикалов, образуемых в результате гомолитического разрезания гидроперекисной

группировки. Оксирадикалы имеют склонность циклизоваться с вицинальной двойной связью (рис. 32).

Эпоксиаллильный радикал, образуемый в результате циклизации, может либо присоединить кислород (Gardner *et al.*, 1978), либо вступить в реакцию с гидроксильным радикалом, что непосредственно приводит к образованию эпоксигидрокси-производных жирных кислот (Dix, Marnett, 1983). Эпоксигидроперокси-производные жирных кислот после присоединения кислорода распадаются на эпоксиспирты и эпоксико-производные (Gardner, Kleiman, 1981). Среди этих соединений аллильные эпоксиды, такие как 12,13-эпокси-9-гидрокси-(10*E*)-октадеценовая кислота, гидролизуются при очень мягких условиях в тригидрокси кислоты. Как показано на рис. 33, гидролиз эпоксидов протекает как по SN1, так и по SN2 механизмам (Gardner *et al.*, 1984а,б).

Эпоксиспирты и тригидрокси-производные могут быть образованы как в результате ферментативного (например, Pace-Asciak *et al.*, 1983а), так и псевдоферментативного катализа. Например, в определенных условиях соевая липоксигеназа катализирует превращение 13-гидроперокси-(9*Z*,11*E*)-октадекадиеновой кислоты в (12*E*,13)-эпокси-11-гидрокси-(9*Z*)-октадеценовую кислоту (Garssen *et al.*, 1976). Гемоглобин катализирует сходное превращение гидроперекиси в три изомера эпоксигидрокси-кислот (Hamberg, 1975). И липоксигеназа, и гемоглобин могут обуславливать железо-зависимый гомолиз гидроперекиси.

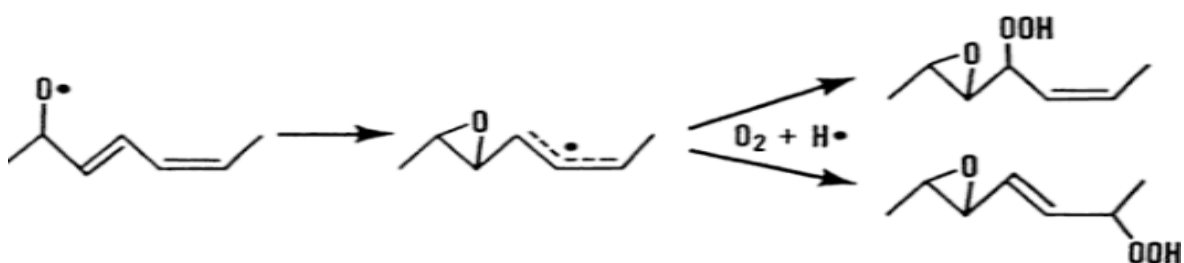


Рис. 32. Образование эпоксидов путем перегруппировки оксирадикала, образующегося в результате гомолитического разрезания гидроперекиси линолевой кислоты. Структуры показаны в сокращенном виде (C8-C14) (Gardner *et al.*, 1984б).

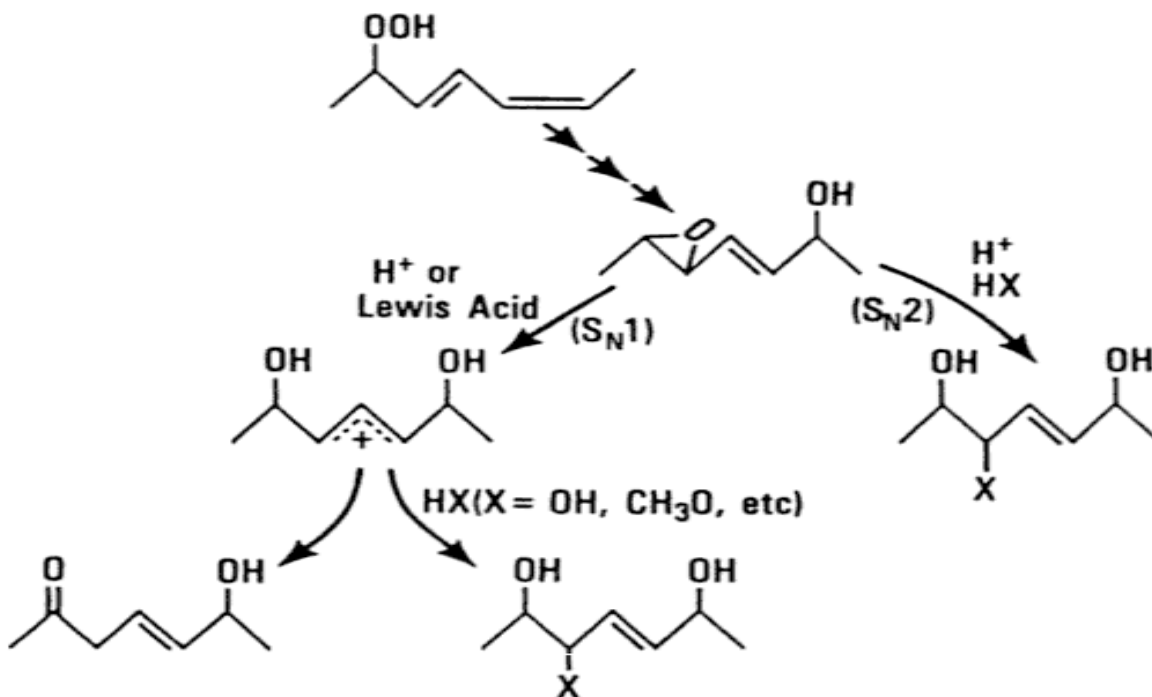


Рис. 33. Образование тригидрокси- и гидроксиоксо-производных из 13-гидроперокси-линолевой кислоты через эпоксигидрокси-кислоту. Структуры показаны в сокращенном виде (C8-C14). HX – протонный растворитель, в биологических системах – вода (Gardner *et al.*, 1984б).

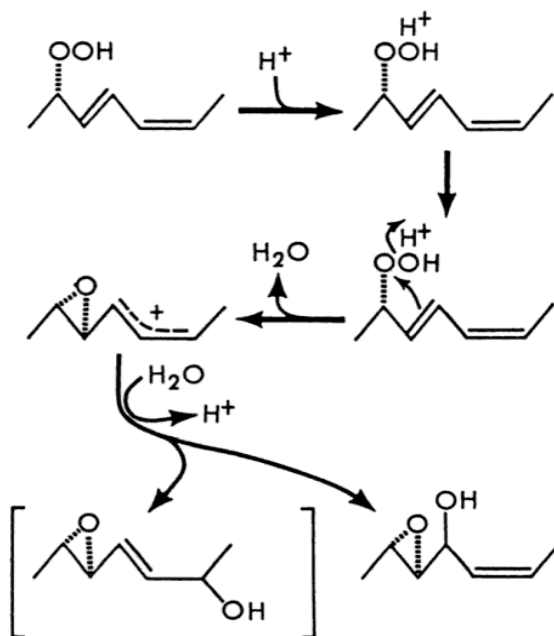


Рис. 34. Гетеролитическое образование эпоксиалкоголей из (13S)-ГПОД в водной кислой среде. Структуры показаны в сокращенном виде (C8-C14). Скобки указывают на то, что этот эпоксид очень склонен к сольволизу (Gardner *et al.*, 1984б).

Было показано, что эпокиспирты и тригидрокси-производные могут образовываться в результате гетеролитической перегруппировки гидроперекисей. Хотя гидроперекиси разрезаются кислотой Льюиса в непротонированном растворителе, протонированные кислоты (например, серная кислота) в протонированном растворителе (вода) смещают реакцию к образованию в основном эпокиспиртов (рис. 34) и продуктов их гидролиза – тригидрокси-кислот (Gardner *et al.*, 1984б).

1.15. Эпоксиспирты и тригидрокси-кислоты высших растений

Тригидрокси-производным как линолевой, так и α -линоленовой кислот приписывают рост-ингибирующее влияние на фитопатогенные грибы. Первое сообщение о присутствии в зернах пшеницы эпокиспиртов и тригидрокси-производных линолевой кислоты, а именно – 9-гидрокси-(10*E*,12,13*Z*)-эпокси-октадеценовой, (9,10*Z*)-эпокси-13-гидрокси-(11*E*)-октадеценовой, 9,12,13-тригидрокси-(10*E*)-октадеценовой и 9,10,13-тригидрокси-(11*E*)-октадеценовой кислот, было опубликовано в 1970 году (Graveland, 1970). В дальнейшем, подобные соединения были обнаружены во многих организмах.

Биосинтез эпокси-производных жирных кислот у растений был впервые продемонстрирован в гомогенатах шпината (Croteau, Kolattukudy, 1975). 18-Гидрокси-олеиновая кислота при инкубации с препаратом шпината превращалась в 18-гидрокси-*цис*-9,10-эпокси-октадекановую кислоту. Необходимость для осуществления реакции НАДФН и молекулярного кислорода и тот факт, что реакция ингибировалась моноокисью углерода, говорят о том, что эпоксигеназа, катализирующая реакцию превращения, является цитохромом P450, но не представителем семейства CYP74. Более того, для протекания реакции требовалось присутствие АТФ и коэнзима А, что позволило предположить, что в действительности субстратом являлся 18-гидроксиолеил-коэнзим А.

В 1985 году из лука (*Allium cepa*) были выделены смеси изомеров 9,10,13-тригидрокси-11-октадеценовой и 9,12,13-тригидрокси-10-

октадеценовой кислот, обладающих простагландин-PGE₂-подобной активностью и ингибирующих слипание тромбоцитов (Ustünes *et al.*, 1985). Видимо, в связи с этим, лук издавна используется в народной медицине для лечения атеросклероза и желудочно-кишечной язвы – патологий, в которых участвуют простаноиды (Lau *et al.*, 1983; Bolton *et al.*, 1982; Wang, Wang, 1996). Путь биосинтеза этих тригидроксикислот (рис. 35) детально исследован у зерновых (Graveland, 1970; Heimann, Dresen, 1973) и в лейкоцитах свиньи (Claeys *et al.*, 1984). Ряд изомеров тригидрокси-октадекадиеновых кислот, также обладающих простагландин-подобной активностью, был выделен из корней брионии белой (*Bryonia alba*), которая используется для тех же целей в медицине, что и лук (Panossian *et al.*, 1983).

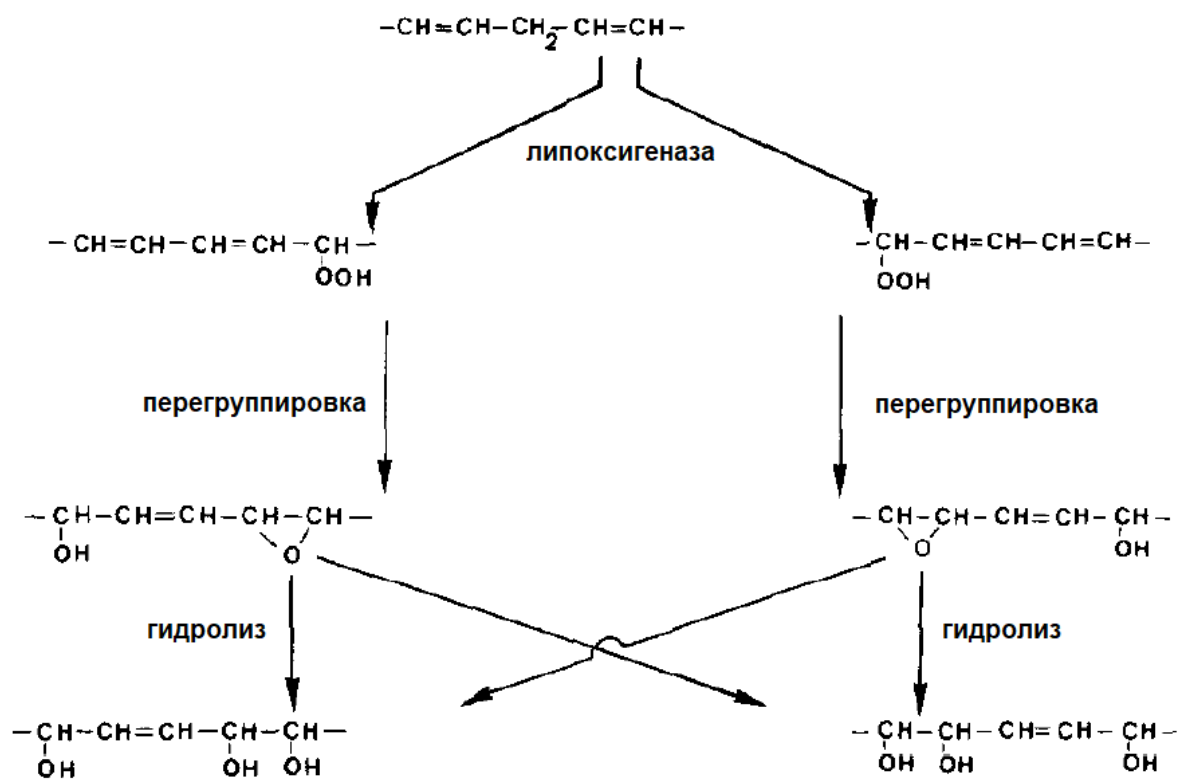


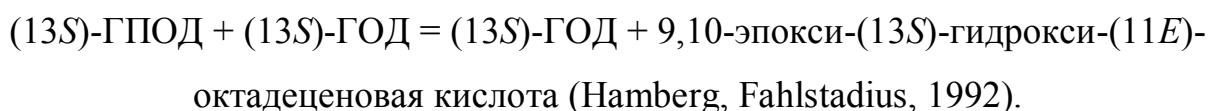
Рис. 35. Биосинтез 9,10,13-тригидрокси-11- и 9,12,13-тригидрокси-10-октадеценовых кислот из линолевой кислоты (Üstünes *et al.*, 1985).

В более поздних исследованиях на гомогенатах топинамбура было показано эпексидирование *цис*- и *транс*-изомеров 9-додеценовой кислоты в *цис*- и *транс*-изомеры эпокси-додеценовой кислоты соответственно (Salaün

et al., 1989). Реакции биосинтеза эпоксикислот, не зависимые от цитохромов P450, у растений были описаны в разных работах (Hamberg, Hamberg, 1990; Blee, Schuber, 1990). Эта реакция, катализируемая эпоксигеназой, присутствующей в микросомальной фракции гомогената семян конских бобов (Hamberg, Hamberg, 1990), и микросомальной пероксигеназой соевых бобов (Blée, Schuber, 1990), заключалась в эпоксидировании ненасыщенных жирных кислот посредством гидропероксид-зависимого механизма.

Эпоксигеназа конских бобов и пероксигеназа сои имеют много общего, включая зависимость от присутствия гидроперекиси, механизм эпоксидирования, включающий прямой перенос кислорода от гидроперекиси на *Z*-двойную связь субстрата, образуя *цис*-эпоксидную группировку продукта (Hamberg, Hamberg 1990), и отсутствие ингибирования антиоксидантами и ингибиторами цитохромов P450 (Hamberg, Fahlstadius, 1992).

Инкубация линолевой и α -линоленовой кислот с гомогенатом семян конских бобов приводит к образованию эпоксигидрокси-производных как в присутствии, так и в отсутствии гидроперекисей. Во втором случае, липоксигеназа, содержащаяся в семенах, превращает часть жирной кислоты в гидроперекись, а эпоксигеназа катализирует перенос кислорода от гидроперекисной группировки на оставшуюся часть линолевой кислоты (Hamberg, Fahlstadius, 1992). При этом эпоксигеназа катализирует образование 9,10-эпокси-(13*S*)-гидрокси-(11*E*)-октадеценовой кислоты из (13*S*)-ГПОД отчасти посредством внутримолекулярного, отчасти – межмолекулярного эпоксидирования, в соответствии с реакцией:



При этом инкубация (13*S*)-гидрокси-(9*Z*,11*E*)-октадекадиеновой кислоты с эпоксигеназой приводила к образованию в качестве основного продукта (9*S*,10*R*)-эпокси-(13*S*)-гидрокси-(11*E*)-октадеценовой кислоты, и в качестве

минорных продуктов – диастереоизомера (9*R*,10*S*)-эпокси-(13*S*)-гидрокси-(11*E*)-октадеценовой кислоты и α,β -эпоксиспирта (11*R*,12*R*)-эпокси-(13*S*)-гидрокси-(9*Z*)-октадеценовой кислоты. Эпоксигеназа может также использовать перекись водорода как источник кислорода, при этом образуя аналогичные продукты, что и в присутствии гидроперекисей жирных кислот (Hamberg, Fahlstadius, 1992).

Растворимая фракция гомогената конских бобов содержала эпоксид-гидролазную активность, которая катализировала превращение *цис*-9,10-эпокси-октадекановой кислоты в *трео*-9,10-дигидроксиоктадекановую кислоту (Hamberg, Fahlstadius, 1992).

Изомеры тригидрокси-октадеценовой и тригидрокси-октадекадиеновой кислот образуются путем гидролиза аллильных эпоксиспиртов (Hamberg, 1991), которые в свою очередь формируются в процессе эпоксидирования гидрокси-кислот (Hamberg, Fahlstadius, 1992, рис. 36) или путем внутримолекулярного эпоксидирования гидроперекисей жирных кислот (Hamberg, Hamberg, 1990).

В плодах томата (*Solanum lycopersicum* L. cv Balkonstar) обнаружены пространственно-временные изменения эндогенного уровня 9,12,13-тригидрокси-(10*E*)-октадеценовой кислоты и временные вариации продуктов ее превращения. Эта тригидрокси-кислота накапливается в мезокарпе и эндокарпе плодов томата на ранних стадиях развития; содержание ее в ходе созревания снижается вследствие ее деградации или превращения в новые продукты. До сих пор не ясна физиологическая роль 9,12,13-тригидрокси-(10*E*)-октадеценовой кислоты; показано, что часть ее разрушается в результате β -окисления с образованием ацетил-коэнзима А, используемого в цикле Кребса. Однако значительного изменения концентрации лимонной кислоты в результате введения раствора этой тригидрокси-кислоты в плоды томата не выявлено (Aghofack-Nguemezi, Schwab, 2013).

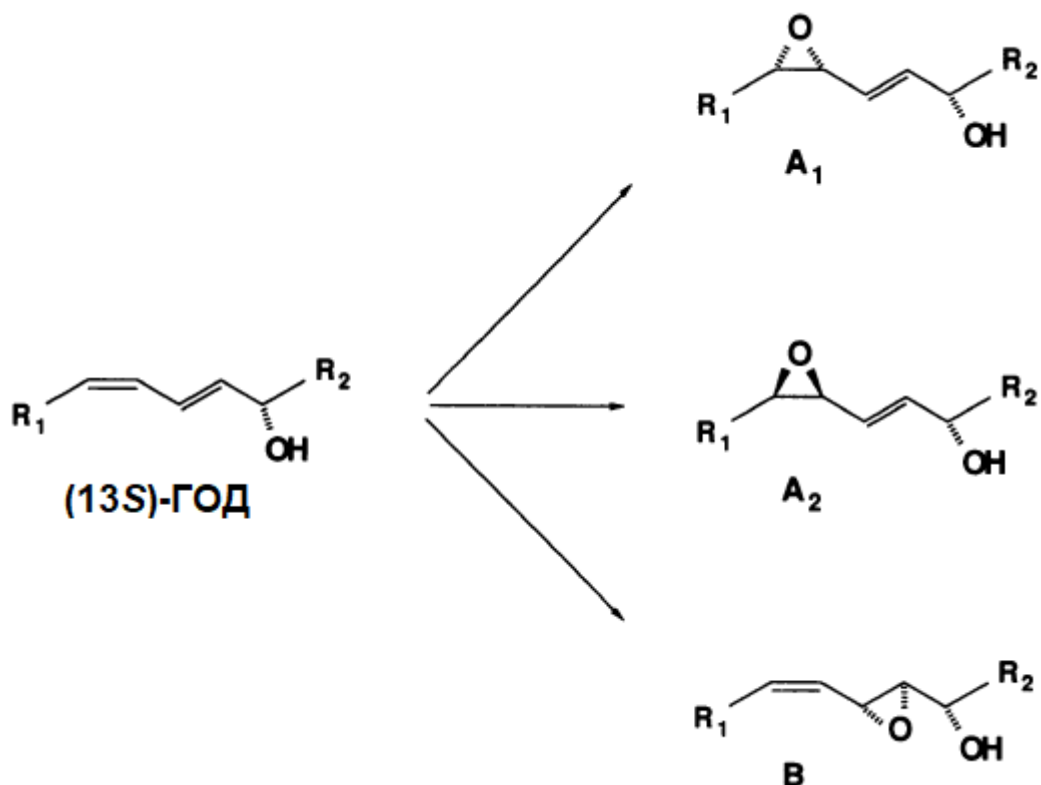


Рис. 36. Структуры эпокси спиртов, образуемых в результате ферментативного эпоксирирования (13*S*)-ГОД. R₁ = (CH₂)₇-COOH; R₂ = (CH₂)₄-CH₃ (Hamberg, Fahlstadius, 1992).

В листьях картофеля происходит последовательное окисление линолевой и α -линоленовой кислот в эпокси спирты и тригидроксикислоты (Hamberg, 1999). Первую стадию трансформации жирных кислот катализирует 9-специфичная липоксигеназа, которая является основной липоксигеназой листьев картофеля. С использованием гомогената листьев картофеля, в которых отсутствовала каталитическая активность, разрушающая эпокси спирты, была показана ферментативная изомеризация (9*S*)-ГПОД, приводящая к образованию α,β -эпокси спирта – (10*S*,11*S*)-эпокси-(9*S*)-гидрокси-(12*Z*)-октадеценовой кислоты и γ,δ -эпокси спирта – (12*R*,13*S*)-эпокси-(9*S*)-гидрокси-(10*E*)-октадеценовой кислоты (рис. 37, Hamberg, 1999).

При участии фермента эпоксидгидролазы, сходной с таковой семян овса (Hamberg, Hamberg, 1996), эпокси спирты преобразуются в тригидроксикислоты. Эпоксидгидролаза (водорастворимый белок с молекулярной массой 47 кДа) катализирует регио- и стереоспецифичный гидролиз (12*R*,13*S*)-

эпокси-(9*S*)-гидрокси-(10*E*)-октадеценовой кислоты в (9*S*,12*S*,13*S*)-тригидрокси-(10*E*)-октадеценовую кислоту (Hamberg, 1999). Эпоксидгидролазная реакция заключается в стереоспецифической атаке водой аллильного эпоксида по углероду C11 в α,β - или C12 в γ,δ -эпокси спиртах с последующим раскрытием эпоксидного кольца по SN2-механизму (Hamberg, 1999).

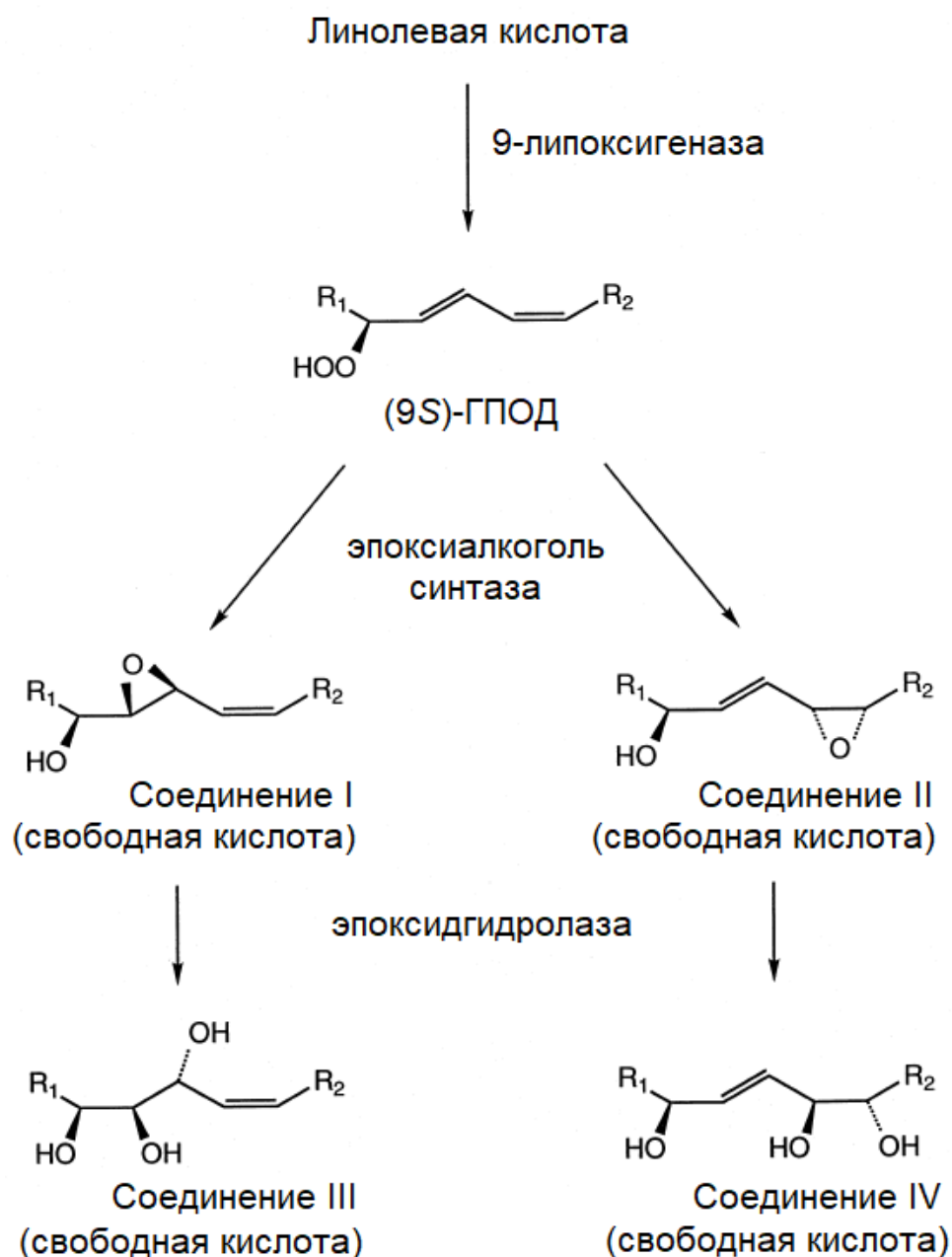


Рис. 37. Схема образования и дальнейшего превращения эпокси спиртов в листьях картофеля. R1 = (CH₂)₇ – COOH. R2 = (CH₂)₄ – CH₃ (Hamberg, 1999).

В семенах риса присутствует фермент, который катализирует превращение 9-ГПОД в смесь 9-ГОД и 9,12,13-тригидрокси-10-октадеценовой кислоты, проявляющих фунгицидные свойства (Ohta *et al.*, 1990). Исследование растений риса показало, что (9*S*,12*S*,13*S*)-тригидрокси-(10*E*)-октадеценовая и 11,12,13-тригидрокси-(9*Z*,15*Z*)-октадекадиеновая кислоты продуцируются в растениях, больных пирикулярриозом, и что она ингибирует рост грибка, вызывающего пирикулярриоз (*Pyricularia oryzae*) (Kato *et al.*, 1985, 1986, 1991; Suemune *et al.*, 1988; Gossé-Kobo *et al.*, 1989; Masui *et al.*, 1989; Walters *et al.*, 2006). Более того, 9,12,13-тригидрокси-(10*E*)-октадеценовая кислота (стереохимия не определена) была выделена в качестве фунгицидного соединения из клубней таро (*Colocasia esculenta*), инфицированного грибом *Ceratocystis fimbriata* – возбудителем черной корневой гнили (Masui *et al.*, 1989). Позже (9*S*,12*S*,13*S*)-тригидрокси-10-октадеценовая кислота была выделена из клубней *Pinellia ternata* и получила тривиальное название – пинеллевая кислота (Nagai *et al.*, 2002). Биосинтез пинеллевой кислоты начинается с окисления линолевой кислоты при участии липоксигеназы с образованием (9*S*)-гидроперекиси, которая в дальнейшем превращается в эпокиспирт (12*R*,13*S*)-эпокси-(9*S*)-гидрокси-(10*E*)-октадеценовую кислоту при участии ЭАС (Hamberg, 1999) либо пероксигеназы (Hamberg, Hamberg, 1996). Пинеллевая кислота образуется из эпокиспирта при участии эпоксидгидролазной активности, которая катализирует раскрытие эпоксида в C12 (Hamberg, Hamberg, 1996). Тригидрокси кислоты участвуют в формировании защитного ответа растений против возбудителя настоящей мучнистой росы (Cowley, Walters, 2005). Эти соединения ингибируют рост грибов и прорастание спор (Masui *et al.*, 1989; Walters *et al.*, 2006) и могут играть роль в защите растений от патогенов. Тригидрокси кислоты оказывают воздействие на развитие ржавчинной инфекции у растений, ингибируя развитие гриба *Uromyces fabae* (Walters *et al.*, 2006). Превращение гидроперекиси линолевой кислоты в 9,12,13-тригидрокси-октадеценовую кислоту было впервые показано в химической модельной системе (Gardner *et al.*, 1984).

9,10,18-Тригидрокси-октадеценовая и 9,10,18-тригидрокси-октадекановая кислоты являются компонентами растительных полимеров кутина и суберина (Espelie *et al.*, 1979; Graça, Pereira, 2000), а также входят в состав масла семян чертополоха (*Chamaepeuce afra*) (Mikolajczak, Smith, 1967). В кутинах и суберинах, богатых С18 ω -гидрокси-кислотами, средне-цепочечные эпокси- и вициналь-дигидрокси-мономеры часто представлены в большом количестве. При участии цитохромов Р450 происходит синтез эпоксидов, которые в дальнейшем могут превращаться в дигидрокси-производные при участии эпоксидгидролаз (Kolattukudy, 2001), либо в эфиры, участвующие в процессе формирования кутина, при участии других апопластных ферментов (Villena *et al.*, 1999). Цитохром СYP77A4 *A. thaliana* может катализировать *in vitro* превращение линолевой кислоты преимущественно в (12*S*,13*R*)-эпокси-производные (Sauveplane *et al.*, 2009). Другую возможную реакцию синтеза эпокси-мономеров кутина катализирует пероксигеназа (Lequeu *et al.*, 2003).

ЭАС свеклы обыкновенной трансформирует (9*S*)-ГПОД в (12*R*,13*S*)-эпокси-(9*S*)-гидрокси-(10*E*)-октадеценовую кислоту (рис. 38, Hamberg, Olsson, 2011; Wennman, Oliw, 2013). Реакционный механизм, по-видимому, сходен с таковым пероксигеназ и эпоксигеназ и связан с гетеролитическим разрезанием О-О связи, и может отличаться от последовательного радикального механизма липоксигеназ (Poulos, 2010; Jin *et al.*, 2012).

Наличие различающихся путей биосинтеза эпокиспиртов и тригидроксикислот у растений свидетельствует о принципиальном физиологическом значении этих оксилипинов.

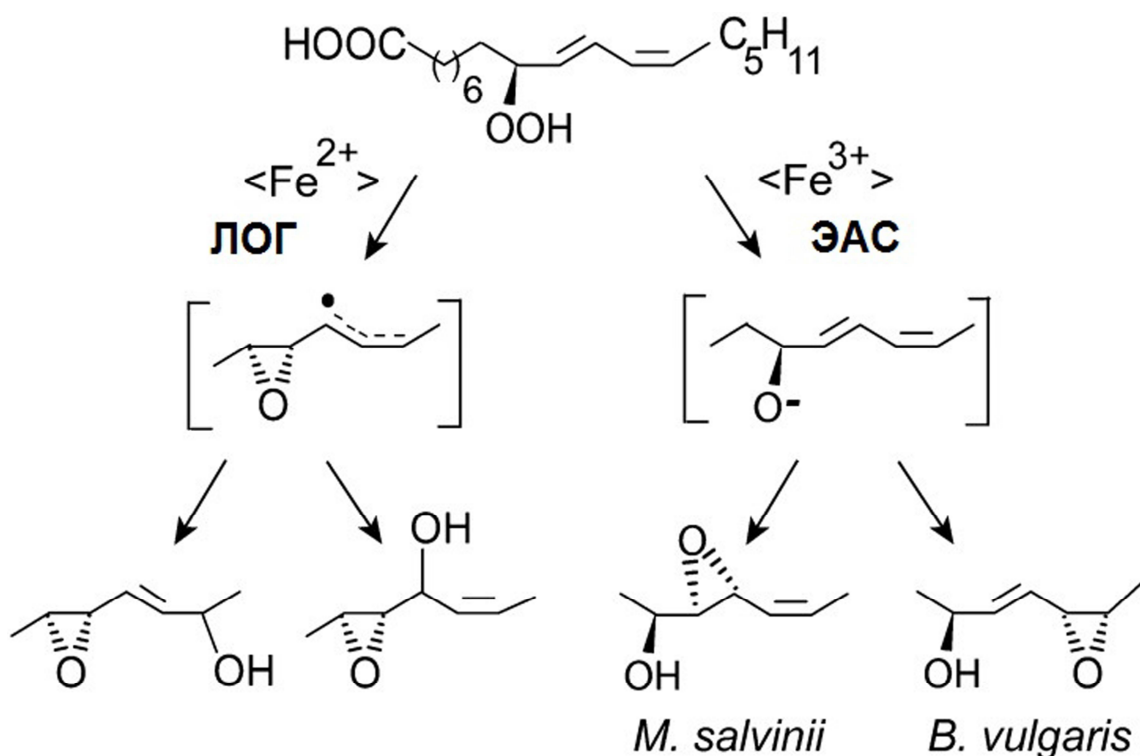


Рис. 38. Схема образования эпокиспиртов из 9-ГПОД (Wennman, Oliw, 2013). Эпоксиспирты могут образовываться при участии белков с зарядом железа Fe^{II} и Fe^{III} , например, некоторых ЛОГ и ЭАС. На схеме в скобках справа показано гетеролитическое расщепление связи O-O, возможно, сопровождающееся формированием гидроксил аниона и $\text{Fe}^{\text{VI}}-\text{O}\cdot$ (не показано) по аналогии с пероксидазами (Poulos, 2010), и слева – гомолитическое расщепление с образованием *транс*-эпоксида и смещенного радикала от C-11 к C-13 [или в крайнем случае формирование *цис*-эпоксида и смещенного радикала (Jin *et al.*, 2012)]. В последнем случае формируется из перокси-радикала C9 (не показано). При участии ЭАС *M. salvinii* образуется (10*R*,11*R*)-эпокси-(9*S*)-гидрокси-(12*Z*)-октадеценовая кислота, тогда как при участии ЭАС свеклы (*Beta vulgaris*) – (12*R*,13*S*)-эпокси-(9*S*)-гидрокси-(10*E*)-октадеценовая кислота (Hamberg, Olsson, 2011; Wennman, Oliw, 2013).

1.16. Эпоксиспирты и тригидроксикислоты грибов

Мицелий патогена риса (*Magnaporthe salvinii*) секретирует (9*S*)-специфичную ЛОГ и ЭАС. ЭАС быстро превращает (9*S*)-ГПОД в *трео*-10,11-эпокси-(9*S*)-гидрокси-(12*Z*)-октадеценовую кислоту, однако не катализирует превращения других гидроперекисей жирных кислот (рис. 37, Wennman, Oliw, 2013). Реакционный механизм, по-видимому, сходен с таковым ЭАС свеклы (Poulos, 2010; Jin *et al.*, 2012).

8,9,13-Тригидрокси-докозановая (C21) кислота является компонентом экстраклеточных липидов дрожжей рода *Rhodotorula* (Stodola *et al.*, 1967). 8,9-Гидроксильные группировки имеют *эритро*-конфигурацию.

Из экстракта плодового тела аскомицета китайского трюфеля *Tuber indicum*, который широко известен под названием «черный бриллиант», была выделена неизвестная ранее 9,10,11-тригидрокси-(12*Z*)-12-октадеценовая кислота (Gao *et al.*, 2001).

У высших грибов основными ненасыщенными жирными кислотами являются линолевая и/или олеиновая; в клетке они находятся в связанном состоянии (Mau *et al.*, 1991; Bonzom *et al.*, 1999). Некоторые высшие грибы также содержат полигидроксилированные жирные кислоты в свободной форме (Stadler *et al.*, 1994; Anke *et al.*, 1996). Гидроперекиси линолевой кислоты метаболизируются рядом ферментов до моно-, эпокси- и тригидрокси-кислот.

Было показано, что в присутствии гомогенатов оомицета *Saprolegnia parasitica* происходит преобразование 9- и 13-гидроперекисей линолевой кислоты в α,β - и γ,δ -эпоксиспирты посредством внутримолекулярного эпоксидирования α,β - и γ,δ -двойных связей соответственно (Hamberg, 1989).

Превращение арахидоновой кислоты в присутствии гомогената *S. parasitica* приводит к образованию (15*S*)-гидроперокси-(5*Z*,8*Z*,11*Z*,13*E*)-эйкозатетраеновой кислоты (15-ГПЭТЕ), которая, в свою очередь, преобразуется в два эпоксиспирта, а именно – (11*S*,12*R*)-эпокси-(15*S*)-гидрокси-(5*Z*,8*Z*,13*E*)-эйкозатриеновую (I) и (13*R*,14*R*)-эпокси-(15*S*)-гидрокси-(5*Z*,8*Z*,11*Z*)-эйкозатриеновую (II) кислоты (рис. 39). Первая реакция катализируется липоксигеназой, тогда как образование эпоксиспиртов происходит при участии гидропероксид-изомеразной активности (Hamberg, 1986; Hamberg *et al.*, 1986а,б). Позднее было определено, что 15-липоксигеназа *S. parasitica* (размером 145 кДа), использующая в качестве субстрата арахидоновую кислоту (Herman, Hamberg, 1987), является бифункциональным ферментом, как и PpLOX1 (Senger *et al.*, 2005).

Ее дополнительная активность является эпоксиалкогольсинтазной, в результате которой происходит превращение промежуточного продукта 15-гидроперекиси эйкозатетраеновой кислоты в два эпокиспирта: (11*S*,12*R*)-эпокси-(15*S*)-гидроперокси-(5*Z*,8*Z*,13*E*)-эйкозатриеновую и (13*R*,14*R*)-эпокси-(15*S*)-гидроперокси-(5*Z*,8*Z*,11*Z*)-эйкозатриеновую кислоты (рис. 40, Andreou *et al.*, 2009).

γ,δ -Эпоксиспирты, образуемые в гомогенатах листьев картофеля (Hamberg, 1999), идентичны γ,δ -эпоксиспиртам, образуемым из (9*S*)-ГПОД в препаратах *S. parasitica*, тогда как биосинтез α,β -эпоксиспиртов в двух системах различается по стереохимии эпоксидной группы, а именно – (10*S*,11*S*)-эпоксиспирт в случае листьев картофеля и (10*R*,11*R*)-эпоксиспирт – в случае *S. parasitica* (Hamberg *et al.*, 1986а,б; Hamberg, 1989, 1999). Эпоксиспирты *транс*-9,10-эпокси-*трео*-11-гидрокси-(12*Z*)-октадеценовая и *транс*-12,13-эпокси-*трео*-11-гидрокси-(9*Z*)-октадеценовая кислоты образуются при участии 9-липоксигеназ из 9- и 13-ГПОД, соответственно (Grechkin *et al.*, 1995), либо посредством «псевдо-ферментативной» реакции, имеющей место в препаратах клубней картофеля (Galliard *et al.*, 1975). Эти эпокиспирты химически отличаются от таковых, синтезируемых в *S. parasitica* или листьях картофеля, где эпокиспирты образуются из гидроперекисей посредством механизма, включающего циклизацию алкоксильного радикала, но не механизма эпоксидирования двойных связей (Hamberg, 1999).

Одним из описанных ферментов, продуцирующих эпокиспирты, является марганец-содержащая ЛОГ патогена пшеницы *Gaeumannomyces graminis* (MnLOX, Su, Oliw, 1998). С помощью сайт-направленного мутагенеза был обнаружен каталитически важный остаток Gly-316 этой последовательности (Cristea, Oliw, 2006), консервативный для всех липоксигеназ, продуцирующих *R*-стереоизомеры гидроперекисей (*R*-ЛОГ). Липоксигеназы, продуцирующие *S*-стереоизомеры гидроперекисей (*S*-ЛОГ), в норме содержат остаток аланина в этом положении (Coffa, Brash, 2004; Andreou *et al.*, 2008; Boeglin *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008). Замена G316A у MnLOX приводит к изменению

региоспецифичности окисления линолевой кислоты с C13 на C11 и C9, а также к приобретению данным ферментом способности изомеризовать 13-гидроперекиси в эпокиспирты и кето-производные; при этом оба атома кислорода гидроперекиси сохраняются в эпокиспиртах (Cristea, Oliw, 2006).

Недавно ЭАС активность была описана у одного из доменов в составе химерного белка (10*R*)-ДОГ-ЭАС у грибка *Magnaporthe oryzae*, поражающего рис, а также у *F. oxysporum*, *G. graminis* и *C. graminicola* (Oliw, Hamberg, 2017; Oliw, 2021). Этот фермент трансформирует линолевую кислоту последовательно в (10*R*)-гидроперокси-(8*E*,12*Z*)-октадекадиеновую кислоту ((10*R*)-ГПОД) и (12*S*,13*R*)-эпокси-(10*R*)-гидрокси-(8*E*)-октадеценовую кислоту в качестве конечного продукта. Для ЭАС активности требуется цистеинил – гомовый лиганд домена P450, а остаток аспарагина обеспечивает образование эпокиспирта. (10*R*)-ДОГ-ЭАС является первым членом нового подсемейства химерных белков ДОГ-СYP фитопатогенов (Hoffmann *et al.*, 2014). Экспрессия гена фермента (10*R*)-ДОГ-ЭАС усиливается во время образования апресорий у *M. oryzae*, что может указывать на биологическую функцию образующегося эпокиспирта (Soanes *et al.*, 2012, Wennman *et al.*, 2015).

У патогенов человека *Histoplasma capsulatum* и *Blastomyces dermatitidis* выявлен еще один необычный тип эпоксиалкогольсинтаз, продуцирующих 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовую кислоту, однако обладающих сходством с линолеат диосинтазами (Oliw, 2020).

1.17. Эпоксиспирты и тригидроксикилоты животных

Тригидроксикилоты также синтезируются в клетках животных. Например, в организме пчелы из линолевой кислоты синтезируется 9,10,11-тригидрокси-12-*транс*-октадеценовая кислота, которая является геометрическим изомером тригидроксикилоты, обнаруженной у китайского трюфеля (Esterbauer, Schauenstein, 1977).

Было описано двухстадийное превращение арахидоновой кислоты через промежуточное соединение эпокиспирт в 8,11,12-тригидрокси-

эйкозатриеновую кислоту в присутствии гомогената, полученного из легких крысы (Pace-Asciak *et al.*, 1982); образование эпокиспирта может быть связано с активностью ЭАС. Кроме того, та же тригидроксикислота образуется в тромбоцитах различных видов животных (Falardeau *et al.*, 1976; Jones *et al.*, 1978; Bryant, Bailey, 1979). В тромбоцитах выявлена группа тригидроксикислот, образуемых как из эйкозатриеновой, так и из арахидоновой кислот: 8,11,12-тригидрокси-9,14-эйкозодиеновая и 8,9,12-тригидрокси-10,14-эйкозодиеновая кислоты (Falardeau *et al.*, 1976), 8,9,12-тригидрокси-5,10,14-эйкозатриеновая и 8,11,12-тригидрокси-5,9,14-эйкозатриеновая кислоты (Jones *et al.*, 1978). Позже в тромбоцитах была обнаружена 10-гидрокси-11,12-эпокси-5,8,14-эйкозатриеновая кислота (Walker *et al.*, 1979). Образование тригидроксикислот из арахидоновой кислоты может происходить в результате превращения сходной эпоксигидрокси-кислоты – 8-гидрокси-11,12-эпокси-5,9,14-эйкозатриеновой кислоты, которая является менее стабильной, чем 10-гидрокси-11,12-эпокси-кислота. В тромбоцитах липоксигеназы окисляют арахидоновую кислоту до 12-гидроперекиси эйкозатетраеновой кислоты (12-ГПЭТЕ) (Hamberg, Samuelsson, 1974; Nugteren, 1975). Это соединение в норме восстанавливается до 12-гидрокси-эйкозатетраеновой кислоты (12-ГЭТЕ), но при определенных условиях оно может подвергаться перегруппировке с образованием эпокиспиртов, которые гидролизуются с образованием тригидроксикислот (Falardeau *et al.*, 1976; Jones *et al.*, 1978; Walker *et al.*, 1979; Bryant, Bailey, 1979, 1981; Bryant *et al.*, 1982; Pace-Asciak *et al.*, 1983а,б).

У млекопитающих описана эпидермальная липоксигеназа-3, которая превращает (9*R*)-гидроперекись в (9*R*,10*R*)-*транс*-эпокси-13*R*-гидрокси-октадеценовую кислоту, которая в дальнейшем является субстратом для специфических гидролаз. Образующиеся соединения участвуют в формировании защитной барьерной функции кожи (Chiba *et al.*, 2016; Yamanashi *et al.*, 2018; Edin *et al.*, 2021). Гидроперекиси эйкозатетраеновой кислоты (ГПЭТЕ), которые не метаболизируются глутатион-пероксидазами, восстанавливаются

при участии ионов металлов до алкоксильных радикалов, которые подвергаются перегруппировке с образованием эпоксиаллильных радикалов, которые могут преобразовываться в эпокиспирты (Gardner, 1975; Gardner *et al.*, 1978; Gardner, Kleiman, 1981). Эпокиспирты и соответствующие тригидроксикислоты являются основными продуктами окисления арахидоновой кислоты в тромбоцитах, инкубируемых в безглюкозной среде, в которой снижается активность глутатион-пероксидазы (Walker *et al.*, 1979).

1.18. Эпокиспирты и тригидроксикислоты бактерий

Клетки штамма *Clavibacter* sp. ALA2, выделенного из сухого грунта, превращают линолевую кислоту в 12,13,17-тригидрокси-(9Z)-октадеценовую кислоту, дальнейшую трансформацию которой катализировать не могут (Нои, 1996).

При выращивании клеток штамма *Pseudomonas* 42A2 в жидкой среде, содержащей линолевую кислоту, в супернатанте накапливаются некоторые гидрокси-производные жирных кислот, в том числе 9,10,13-тригидрокси-11-октадеценовая и 9,12,13-тригидрокси-10-октадеценовая кислоты (Espinel-Ingroff, 2003). Клетки штамма *Pseudomonas aeruginosa* PR3 превращают линолевую кислоту с образованием 16 изомеров тригидрокси-додеценовой кислоты. Тригидрокси-додеценовые кислоты могут образовываться из 9- и 13-гидроперекисей линолевой кислоты как химическим (спонтанным) путем, через алкоксильный радикал или путем гетеролитической перегруппировки, так и с помощью гидропероксид-зависимой пероксигеназы или ЭАС. В случае штамма *Pseudomonas aeruginosa* PR3 синтез тригидроксикислот может происходить путем стереохимического неспецифического диоксигенирования, либо путем автоокисления линолевой кислоты (Kim *et al.*, 2000). Кроме того, клетки штамма *Pseudomonas aeruginosa* PR3 могут превращать рицинолевую кислоту в 7,10,12-тригидрокси-(8E)-октадеценовую кислоту, с выходом около 35% (Kuo *et al.*, 1998).

У протеобактерии *Mycobacterium xanthus* описаны (9*S*)-липоксигеназа и эпоксидгидролаза, которые участвуют в образовании 12,13-эпокси-14-гидрокси-(9*Z*,15*Z*)-октадекадиеновой, 9,10,11-тригидрокси-(6*Z*,12*Z*)-октадекадиеновой и 12,13,14-тригидрокси-(9*Z*,15*Z*)-октадекадиеновой кислот (An *et al.*, 2018, 2019).

Все приведенные данные указывают на широкое распространение эпокиспиртов и тригидрокси кислот в организмах разных таксонов, что подтверждает актуальность данного исследования.

1.19. Физиологическое значение оксилипинов

Перекисное окисление липидов характерно для всех биологических систем; оно протекает в процессе развития и в ответ на изменения окружающей среды. Растения лишены большинства сложных защитных механизмов, свойственных иммунной системе животных. Тем не менее, у них обнаружены эффективные механизмы защиты от патогенов или других факторов, угрожающих жизнедеятельности. Одной из систем, участвующих в формировании ответа на стрессовые факторы, является липоксигеназная сигнальная система.

Растительные оксилипины составляют обширную и разнообразную группу биологически активных компонентов (Mosblech *et al.*, 2009). В ходе эволюции оксилипины приобрели биологические функции в качестве вторичных посредников и защитных метаболитов (Gullner *et al.*, 2010). Они являются посредниками в осуществлении реакции ответа на повреждения и воздействие патогенов (León *et al.*, 2001; Browse, 2005; Schilmiller, Howe, 2005; Wasternack *et al.*, 2006; Wasternack, 2007; Savchenko *et al.*, 2014), а также участвуют в регуляции роста, морфогенеза и в формировании системной устойчивости к экстремальным факторам (Тарчевский, 2001). Участие оксилипинов в формировании защитного ответа у растений может осуществляться с помощью сигнальных молекул, индуцирующих экспрессию генов защиты и регулирующих локальную гибель клеток (La Camera *et al.*, 2004). Наше-

ствии растительноядных насекомых или некротрофных патогенов приводит к синтезу различных оксипинов, которые участвуют в регуляции защитного ответа с помощью сигнальных молекул (Blée, 2002; Browse, 2005).

В отличие от животных, оксипины наземных растений представляют собой производные C18 и C16 жирных кислот (Weber, 2002), тогда как у бурых и красных водорослей, рано отделившихся от животных и зеленых растений (Baldauf *et al.*, 2000), встречаются оксипины как эйкозановой, так и октадекановой природы (Gerwick *et al.*, 1999). Эта дуалистичность метаболизма оксипинов находит отражение также в клетках млекопитающих, где в качестве защитных соединений функционируют производные как C20, так и C18 жирных кислот (Ishizaki *et al.*, 1995а,б). Оксипины растений включают гидроперокси-, гидрокси-, оксо- и эпокси-производные жирных кислот, дивиниловые эфиры, летучие альдегиды, жасмонаты, циклопентеноны, а также конъюгаты с другими соединениями и др. (Mosblech *et al.*, 2009).

Ряд оксипинов представляют собой летучие соединения, которые обеспечивают взаимодействие между растениями и другими обитателями биосферы, в том числе участвуют в коммуникации между отдельными растениями (Farmer, Ryan, 1990; Bouwmeester *et al.*, 2019). Летучие оксипины обладают фунгицидными свойствами (Kishimoto *et al.*, 2007). Кроме того, выделение растением этих соединений способно привлекать врагов растительноядных насекомых (Van Poecke *et al.*, 2001; D'Alessandro, Turlings, 2005; Fatouros *et al.*, 2005; Shiojiri *et al.*, 2006). Привлечение хищников с помощью летучих сигнальных оксипинов, выделяемых соседними поврежденными растениями, помогает растению заранее подготовиться к защите (Engelberth *et al.*, 2004). C6- и C9 альдегиды являются сигналами взаимодействия растения с насекомыми; C12- и ω -оксокислоты участвуют в заживлении ран (Kallenbach *et al.*, 2011). Еще одна функция оксипинов состоит в осуществлении межвидовой коммуникации между растением и грибами при формировании симбиозов (Schüßler *et al.*, 2001).

Некоторые оксипилены образуются в ответ на воздействие патогенов и обладают антимикробной активностью (Granér *et al.*, 2003), например, дивиниловые эфиры обладают бактерицидными и фунгицидными свойствами. Оксипилены обладают ингибирующей рост активностью, однако эти соединения не оказывают воздействия на жизнеспособность клеток, а только приостанавливают рост. В некоторых случаях оксипилены способны вызывать гибель спор патогена. Оксипилены, обладающие антимикробной активностью, обнаружены во всех ветвях оксипиленового пути, и не отделимы от синтеза сигнальных оксипиленов (Deboever *et al.*, 2020). Так, некоторые антимикробные оксипилены были изначально идентифицированы как сигнальные молекулы и/или вещества, индуцирующие клеточную гибель (Prost *et al.*, 2005). Раневой стресс, патогенные инфекции, или обработка элиситорами заметно увеличивают концентрацию ряда оксипиленов в растительных тканях, что позволяет провести их идентификацию и характеристику (Gullner *et al.*, 2010; De Domenico *et al.*, 2019).

Наиболее изученной группой растительных оксипиленов являются жасмонаты. Они участвуют в регуляции прорастания семян, развития пыльцы, формирования клубней, синтеза этилена, старения растения (Ballaré, 2011; Piotrowska, Bajguz, 2011); жасмоновая кислота отвечает за передачу сигналов в ответ на различные биотические и абиотические стрессоры (Piotrowska *et al.*, 2009). Повреждения механические или наносимые насекомыми приводят к быстрому локальному накоплению жасмонатов в районе повреждения.

ГПЛ и их продукты – в первую очередь, GLV – играют важную роль в передаче сигналов и защите растительных клеток (Hatanaka, 1993; Grechkin, 2002; Matsui, 2006). GLV представляют собой С6- и С9-альдегиды, спирты и их сложные эфиры и обычно используются в качестве ароматических и вкусовых соединений благодаря свежему запаху срезанной травы, фруктов и овощей (Fukushige *et al.*, 2005; Gigot *et al.*, 2010; Matsui, 2006). Поскольку GLV выполняют важные биологические функции в защите растений, комму-

никации и реакции на стрессовые факторы (Prost *et al.*, 2005; Baldwin *et al.*, 2006; Shiojiri *et al.*, 2006; Wasternack, Hause, 2013; ul Hassan *et al.*, 2015), эти соединения могут также использоваться в борьбе с вредителями, в защите продуктов питания при хранении и в косметической и личной гигиене (Nakamura, Hatanaka, 2002; Hubert *et al.*, 2008; Gigot *et al.*, 2010; Buchhaupt *et al.*, 2012; Joo, Oh, 2012).

Растительные GLV действуют как сигнальные молекулы и функционируют в защите растений и стрессовой реакции на насекомых, травоядных животных или механические повреждения. Кроме того, известно, что GLV обладают бактерицидными и фунгицидными свойствами (Nakamura, Hatanaka, 2002; Matsui *et al.*, 2006; ul Hassan *et al.*, 2015). С6-альдегиды, *n*-гексаналь, (3*Z*)-гексеналь и (2*E*)-гексеналь обладают свежим зеленым, яблочным, травянистым, фруктовым, сладким или горьким цитрусовым запахом (Krumbein, Auerswald, 1998; Salas *et al.*, 2005; Gigot *et al.*, 2010), в то время как соответствующие им спирты гексанол, (3*Z*)-гексенол и (2*E*)-гексенол обладают зеленым и фруктовым запахом, а также запахом незрелого банана. (3*Z*)-Гексенилацетат обладает банановым/зеленым запахами (Salas *et al.*, 2005), а С9-альдегиды (3*Z*)-ноненаль, (2*E*)-ноненаль, (3*Z*,6*Z*)-нонадиеналь и (2*E*,6*Z*)-нонадиеналь обладают характерным запахом огурца (Gardner *et al.*, 1991; Noordermeer *et al.*, 2001a). Ароматические свойства спиртов (3*Z*)- и (2*E*)-ноненола были описаны как зеленый, свежий или дынный (Gigot *et al.*, 2010). Альдегиды (гексаналь и ноненаль) и кетоны также ответственны за неприятный запах, приобретаемый соевыми бобами при хранении; поэтому были получены сорта сои, дефицитные по генам ЛОГ, чтобы уменьшить неприятные запахи, связанные с активностью ЛОГ (Iassonova *et al.*, 2009; Mellor *et al.*, 2010).

У диатомовых водорослей выявлены оксилипины, сходные с таковыми высших растений: гидрокси-, кето-, оксо- и эпоксигидрокси-производные жирных кислот, а также летучие альдегиды. Летучие альдегиды – продукты гидропероксидлиазного пути – впервые выявлены у *Thalassiosira rotula*

(Miralto *et al.*, 1999). Оксипирины у диатомовых водорослей играют сигнальную роль во взаимодействии с морскими беспозвоночными животными (Ruocco *et al.*, 2020).

Несмотря на то, что физиологическое значение многих оксипиринов хорошо изучено, подобной информации в отношении эпоксиспиртов и тригидроксикислот относительно немного. Показано, что устойчивый к пирикулярнозу сорт риса продуцирует несколько изомеров эпоксиспиртов и тригидроксикислот в качестве защитных веществ против возбудителя пирикулярноза – гриба *Pyricularia oryzae* (Kato *et al.*, 1983, 1984, 1985). Кроме того, были описаны антимикробные и фунгицидные свойства двух эпоксиспиртов (9-гидрокси-10,11-эпокси-октадекадиеновая и 11,12-эпокси-13-гидрокси-октадекадиеновая кислоты) и образующихся из них тригидроксикислот (Prost *et al.*, 2005). Однако эти соединения были синтезированы не ферментативным путем, а с помощью химического синтеза (Piazza *et al.*, 1997).

1.20. Оксипирины в промышленности

Для производства оксипиринов описано много разных биотехнологических подходов. Например, до недавнего времени в качестве источника ферментов биосинтеза соединений GLV использовали главным образом растительные экстракты, такие как листья сои, листья клубники, яблочный жмых или листья арбуза (Almosnino *et al.*, 1996). Кроме того, использовали неочищенные ферментные экстракты, например, из томата, смесь лепестков гвоздики и листьев клубники и томатов, соевая мука и гомогенат гуавы, листья сахарной свеклы, или листья шпината (Cass *et al.*, 2000; Schade *et al.*, 2003; Rabetafika *et al.*, 2008; Márczy *et al.*, 2002). В большинстве промышленных производств GLV в качестве источника ЛОГ для получения гидроперекисей из гидролизованных растительных масел с высоким выходом предпочтительно использовали соевую муку (Fauconnier, Marlier, 1996). Однако использование неочищенных экстрактов, содержащих другие (изо)ферменты, приводит к образованию также и нецелевых продуктов. Кроме того, выход про-

дуктов для промышленных целей является низким, потому что активность ГПЛ в растительных экстрактах очень нестабильна и варьируется от растения к растению. Требуется большое количество растительного материала, доступность которого ограничена вегетационным периодом растения (Gigot *et al.*, 2010). Использование рекомбинантных ЛОГ и ГПЛ в качестве биокатализаторов для крупномасштабного производства GLV представляет собой подходящую альтернативу. Оба фермента можно получать с использованием микроорганизмов. Были опубликованы исследования, описывающие эффективный синтез GLV при участии рекомбинантных ферментов (Noordermeer *et al.*, 2002; Bourel *et al.*, 2004; Fukushige, Hildebrand, 2005а,б; Buchhaupt *et al.*, 2012; Gigot *et al.*, 2012; Jacopini *et al.*, 2016). Большинство сообщений о гетерологически экспрессируемых генах ЛОГ и ГПЛ сфокусировано на экспрессии кДНК в *Escherichia coli* и очистки ферментов до гомогенного состояния в целях исследования структурно-функциональных свойств. Растущее число хорошо охарактеризованных ферментов, которые можно эффективно получать в микроорганизмах, поможет в разработке новых биокаталитических подходов для производства GLV.

Эпоксиспирты и тригидроксикислоты 9,10,13-Тригидрокси-(11*E*)-октадеценовая и 9,12,13-тригидрокси-(10*E*)-октадеценовая кислоты были обнаружены в пиве (Graveland *et al.*, 1970). Эти тригидроксикислоты формируются из линолевой кислоты во время процесса гидратирования 10-кетостеариновых кислот в бактериях и при ослаживании и сминании ячменя. Пинеллевая кислота, присутствующая в пиве (Esterbauer, Schauenstein, 1977; Hamberg, 1991), определяет горький вкус этого напитка (Baur, Grosch, 1977). Изменяя количество пинеллевой кислоты, можно производить пиво с необходимыми вкусовыми качествами. Кроме того, пинеллеву кислоту предполагается использовать как вспомогательное вещество при гриппе (Nagai *et al.*, 2002). Пинеллевая кислота обнаружена также в экстракте коры стебля и корня *Ulmus davidiana* var. *japonica* (семейство *Ulmaceae*), который используется для лечения воспалительных заболеваний, включая маститы, риниты, синус-

ситы и энтериты (Nagai *et al.*, 2004). Показано, что эта кислота ингибирует образование простагландина D2 (Choi *et al.*, 2013).

11,12,13-Тригидрокси-октадеценовая и 11,12,13-тригидрокси-октадекановая кислоты входят в состав триацилглицеридов касторового масла (Lin, Chen, 2010), которое широко используется в промышленности. Тригидроксикислоты и триацилглицериды, содержащие тригидроксикислоты, обладают физическими свойствами, отличающимися от таковых рицинолевой кислоты и дигидроксикислот, поэтому могут быть использованы для производства продуктов, сходных с рицинолевой кислотой, но отличающихся от нее по физическим свойствам (Lin, Chen, 2010).

1.21. Постановка цели исследования

Обзор литературы свидетельствует о длительной истории исследований всех компонентов липоксигеназного каскада, в первую очередь, ферментов и продуктов их каталитического действия. Наиболее подробно были исследованы алленоксидсинтазы и гидропероксидлиазы. Эти ферменты, а также продукты их каталитического действия – жасмонаты, кетолы и циклопентеноны (АОС продукты), альдокислоты и летучие соединения (ГПЛ продукты) выявлены у всех изученных к настоящему времени цветковых растений. Дивинилэфирсинтазы – третий тип ферментов липоксигеназного каскада – встречаются значительно реже. Эти ферменты описаны только у нескольких видов, в то время как продукты их каталитического действия – дивиниловые эфиры – у большего числа видов, филогенетически отдаленных друг от друга. Кроме того, у большого числа видов растений были описаны эпокиспирты и тригидроксикислоты. Некоторые изомеры эпокиспиртов являются одними из продуктов пероксигеназной активности (наряду с эпоксипроизводными и спиртами), в то время как другие – продуктами эпоксиалкогольсинтазной активности. При этом эпоксиалкогольсинтазы до настоящего времени практически не выявлены. Единственным представителем этой группы ферментов до настоящей работы является эпоксиалкогольсинтаза VfEAS

(СУР440А1) ланцетника *B. floridae*. У растений эпоксиалкогольсинтазы вообще не были описаны, несмотря на то, что эпокиспирты – продукты эпоксиалкогольсинтазной активности – обнаружены у растений разных видов.

На предварительном этапе работы проводили профилирование оксипинов у разных видов растений с расшифрованным геномом, в том числе у *Arabidopsis thaliana*, огурца (*Cucumis sativus* L.) и сои (*Glycine max* L.) с целью поиска эпокиспиртов – продуктов эпоксиалкогольсинтазной активности для последующего выявления ферментов, катализирующих их биосинтез, у растений, в тканях которого обнаруживаются эти соединения. Для выявления ферментов, вероятно, катализирующих образование эпокиспиртов, будет проведен анализ аминокислотных последовательностей. Семейство СУР74 включает ферменты с разными типами каталитической активности, что отражается в последовательностях каталитически важных доменов, определенных ранее методом рентгеноструктурного анализа. При этом в целом, последовательности и пространственные структуры ферментов СУР74 являются достаточно сходными. Сопоставление последовательностей каталитически важных доменов и типа каталитической активности позволяет выявить сайты, в которых у ферментов с разными типами активности содержатся несинимичные аминокислотные остатки, что указывает на их возможное участие в катализируемой реакции. В целом, последовательности каталитически важных доменов можно использовать в качестве своеобразных «отпечатков пальцев» для предсказания типа каталитической активности. Впоследствии проверку этой гипотезы проводили методом сайт-направленного мутагенеза. Этот метод позволяет изучать взаимосвязь особенностей первичной структуры и каталитической активности ферментов. В результате сайт-направленного мутагенеза могут произойти изменения каталитической активности, в том числе в сторону эпоксиалкогольсинтазной активности. Отдельная часть работы посвящена сравнению эпоксиалкогольсинтаз растений и животных, а также продуктов их каталитического действия. Обнаружение эпоксиалкогольсинтаз – цитохромов Р450 клана СУР74 – у растений, живот-

ных, а также бурых водорослей может свидетельствовать о том, что эпокси-алкогольсинтазы имеют древнее происхождение, позволить сделать предположение об эволюции цитохромов P450 в целом и ферментов CYP74 в частности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Методы биоинформатики

Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей представителей клана CYP74 проводили с использованием баз данных National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) и Online Resource for Community Annotation of Eukaryotes (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/orcae/>). Сопоставление нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с базами данных проводили с использованием программы BLAST. Множественное выравнивание последовательностей ферментов CYP74 для определения их гомологии, анализ нуклеотидных последовательностей, а также конструирование олигонуклеотидных праймеров проводили с помощью программы Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen, США). Поиск последовательностей для транспорта в хлоропласты проводили с помощью программы ChloroP 1.1. Нуклеотидные последовательности, кодирующие ферменты CYP5164B1 бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* и CYP440A18 ланцетника азиатского (*Branchiostoma belcheri*), а также олигонуклеотидные праймеры синтезировали синтезировали в ЗАО «Евроген» (Россия).

Филогенетические деревья конструировали с использованием программы MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) методом «Neighbor-Joining». Деревья строили с учетом эволюционных расстояний, которые рассчитывали методом p-distance (Kumar *et al.*, 2016). Топологию деревьев оценивали по 1000 бутстреп-репликам (Felsenstein, 1985). Ветви деревьев, имеющие бутстреп-поддержку менее 50%, удаляли из анализа. Исходные деревья получали автоматически путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрицам попарных расстояний, оцененных с использованием модели JTT и затем выбора топологии с более высоким значением логарифмической вероятно-

сти. Все позиции, содержащие пробелы, исключали. Деревья визуализировали с помощью программного обеспечения iTOL v4. Interactive Tree Of Life, режим отображения – Circular.

2.2. Материалы

Зерна кукурузы обыкновенной (*Zea mays* L.) сорта «Катерина» обрабатывали в течение 5-10 минут раствором гипохлорида натрия (2%) с добавлением 0,5% додецилсульфата натрия (ДСН), а затем 30 минут раствором перманганата калия и замачивали на 24 часа в дистиллированной воде. Для проращивания семена кукурузы оставляли в стеклянном сосуде при комнатной температуре 20-25°C, ежедневно меняя воду, ополаскивая зерна. Через трое суток проростки помещали в среду Кнопа, содержащую на 1 л дистиллированной воды 1 г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,25 г KH_2PO_4 , 0,25 г MgSO_4 , 0,25 г KNO_3 , 0,125 г KCl . После образования второго листа растения использовали для выделения тотальной РНК.

Семена льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) сорта «Новоторжский», семена огурца (*Cucumis sativus* L.) сорта «Малышок», семена сои (*Glycine max* L.) сорта «Скульптор», семена табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта «Hawana Petite 1» и семена моркови (*Daucus carota* L.) сорта «Нантская» обрабатывали в течение 5-10 мин раствором гипохлорида натрия (2 %) с добавлением 0,5 % ДСН, после чего промывали дистиллированной водой. Семена льна-долгунца, огурца, сои и моркови замачивали на 6 часов в дистиллированной воде. Для проращивания семена помещали в термостат и инкубировали при температуре 28°C. Семена табака помещали на агаризованную среду MS (Murashige – Skoog) (Murashige, Skoog, 1962), в состав которой входили (на 1л): 825 мг NH_4NO_3 ; 950 мг KNO_3 ; 850 мг KH_2PO_4 ; 0,83 мг KJ ; 6,3 мг H_3BO_3 ; 22,3 мг $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 8,6 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,25 мг $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,025 мг $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,025 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 185 мг $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 220 мг $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 100 мг мезоинозита; 1 мг тиамина; 2 мг пиридоксина. Раствор хелатного железа готовили в виде концентрата из $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ (3,73 г/л) и

FeSO₄•7H₂O (2,78 г/л) и добавляли в среду из расчета 1/100. В среду также добавляли 30 г/л сахарозы и агарозу до 0,4% (Ахуген, Испания). Стерилизацию среды проводили в течение 45 мин при 0,8 атм. Проростки после появления семядольных листьев рассаживали в стерильные банки со средой MS, после чего выращивали в климат-камере при 22°C, 16-ти часовом световом дне и освещении 5000 люкс. Растения огурца, сои, картофеля, табака и моркови выращивали в течение 21 дня на коммерческой почве Terra Vita (ЗАО «МНПП ФАРТ», Россия) в климат-камере при тех же условиях. Растения льна выращивали в течение 35 дней в открытом грунте при ежедневном поливе и естественном освещении.

Растения картофеля сорта Дезире стерильно размножали черенкованием и культивировали на агаризованной среде MS. Через 10 суток проростки пересаживали в стерильные банки с вермикулитом, куда добавляли среду MS, не содержащую агарозу и сахарозу. Культивирование растений проводили в течение 21 дня при 22°C, 16-ти часовом световом дне и освещении 5000 люкс в климат-камере.

Дикорастущие взрослые растения лютика едкого (*Ranunculus acris* L.) собирали в районе озера Средний Кабан в 2012 и 2013 гг. Дикорастущие взрослые растения лютика японского (*Ranunculus japonicus* Thunb.) собирали в ходе экспедиции в Хасанском районе Приморского края.

Растения плаунка *Selaginella moellendorffii* Hieron были предоставлены Университетом Пердью (Уэст-Лафейетт, США). В лаборатории оксипиринов ФИЦ КИББ КазНЦ РАН растения выращивали в течение 60 дней в условиях повышенной влажности и естественного освещения.

Взрослые особи роющей литоральной актинии *Nematostella vectensis* Stephenson, 1935 были любезно предоставлены доктором И. Козевичем (МГУ). В лаборатории оксипиринов ФИЦ КИББ КазНЦ РАН животных помещали в стеклянные чашки и содержали в нециркулирующей среде, содержащей искусственную морскую воду (морскую соль) (12:1000) при 17°C.

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

2.3. Выделение образцов тотальной РНК

Для выделения тотальной РНК использовали зеленые части растений, а также целые взрослые особи *N. vectensis*. Образцы (100 мг) собирали, замораживали и гомогенизировали, растирая в фарфоровой ступке в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с помощью коммерческого набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. После выделения препарат подвергали обработке ДНКазой (Qiagen, США) также согласно протоколу производителя. Качество выделенной РНК оценивали по спектрам электрофоретического разделения в агарозном геле после окрашивания бромистым этидием (Раздел 2.6). Концентрацию РНК определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США) с использованием программного обеспечения прибора. Выделенную тотальную РНК растворяли в воде до конечной концентрации 50 нг/мкл, аликвотировали и немедленно использовали в реакции обратной транскрипции либо хранили при -80°C .

2.4. Реакция обратной транскрипции

Для постановки реакции обратной транскрипции и получения двуцепочечной кДНК (дц-кДНК) использовали коммерческий набор MINT (Евроген, Россия). В основе используемого метода синтеза дц-кДНК лежит свойство ревертазы MMLV (Fermentas, Канада) добавлять нематрично на 3'-конец синтезированной первой цепи кДНК несколько нуклеотидных остатков, преимущественно dC (Schmidt, Mueller, 1999). Первую цепь кДНК синтезировали на матрице РНК с использованием 3'-прайма, который содержал последовательность олиго-(dT) и адаптера. Образующаяся цепь содержала последовательность 3'-прайма на 5'-конце и последовательность олиго-(dC) на 3'-конце, на которой происходил отжиг адаптера длиной 30 нуклеотидов, содержащего последовательность олиго-(dG) на 3'-конце. После получения одноцепочечной кДНК проводили синтез дц-кДНК с использованием универсального праймера M1 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3', местом отжига которого являлись адаптерные последовательности на 3'- и 5'-концах. В результате получали дц-кДНК, фланкированную с обеих сторон известными адаптерными последовательностями.

2.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Данный метод использовали для проверки наличия вставки целевых генов и амплификации ОРС целевых генов (Zoller, Smith, 1982). Матрицей для ПЦР служили плазмидные ДНК, выделенные из клеток бактериальных штаммов с использованием набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия).

Наличие вставок целевых генов проверяли методом ПЦР, реакционная смесь которой содержала буфер для Таq-полимеразы (Евроген, Россия), 0,2 mM смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ), 20 нг ДНК-матрицы, 0,1 мкМ прямого и обратного олигонуклеотидного праймеров. Таq-полимеразу (Евроген, Россия) добавляли в реакционную смесь непосредственно перед реакцией в концентрации, рекомендуемой производителем. Конечный объем реакционной смеси составлял 10 мкл. Режим реакции контро-

лировали с помощью амплификатора T-100 (Bio-Rad, США). Использовали следующие параметры реакции: первоначальная денатурация ДНК при 95°C – 5 мин; далее 24 цикла в следующем режиме: денатурация ДНК при 95°C – 30 с, отжиг праймеров при 61°C – 15 с, синтез новой цепи ДНК при 72°C – 1 мин.

Для амплификации ОРС целевых генов проводили ПЦР в реакционной смеси, в составе которой были реакционный буфер для высокоточной полимеразы Q5 (New England Biolabs, Великобритания), 50 нг плазмидной ДНК-матрицы, 0,6 мкМ прямого и обратного олигонуклеотидного праймеров, 0,5 мМ смеси дНТФ. ДНК-полимеразу Q5 добавляли в реакционную смесь непосредственно перед реакцией в концентрации, рекомендуемой производителем. Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Режим реакции контролировали с помощью амплификатора T-100 (Bio-Rad, США). Использовали следующие параметры реакции: первоначальная денатурация ДНК при 98°C – 1 мин, далее 34 цикла в следующем режиме: денатурация ДНК при 98°C – 15 с, отжиг праймеров при 55°C – 30 с, синтез новой цепи ДНК при 68°C – 2,5 мин. Анализ продуктов ПЦР проводили с помощью электрофоретического разделения фрагментов ДНК в агарозном геле (Раздел 2.6).

2.6. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле (Маниатис и др., 1984)

Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот проводили в агарозных гелях в горизонтальных блоках при напряженности электрического поля 5-10 В/см. Электролитом являлся трис-ацетатный буфер (40 мМ трис-ацетат, рН 8,0; 20 мМ ацетат натрия, 2 мМ динатриевой соли этилендиамина-тетрауксусной кислоты (ЭДТА)). О ходе электрофореза судили по миграции окрашенного буфера 4X Gel Loading Dye Blue (Евроген, Россия), который добавляли в пробы непосредственно перед их нанесением в лунки геля. Нуклеиновые кислоты регистрировали с помощью установки видеодокументации Gel-Doc (Bio-Rad, США) по флуоресценции образца в ультра-

фиолетовом свете после экспозиции геля в растворе бромистого этидия (10 мкг/мл). Размер нуклеиновых кислот определяли в результате сопоставления с маркерами длин 1 kb DNA Ladder (Евроген, Россия), GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder и DNA Ladder Mix (Fermentas, Канада).

2.7. Молекулярное клонирование целевых генов

Для экспрессии генов целевых ферментов в клетках *E. coli* проводили клонирование соответствующих ОРС в бактериальных плазмидных векторах системы рЕТ (Novagen, США): рЕТ-23а (рис. 41), рЕТ-32 Ек/ЛІС (рис. 42) и рЕТ-40b (рис. 43). Кроме того, ряд рекомбинантных плазмид был нам любезно предоставлен из разных лабораторий (Раздел 2.1). Для клонирования ОРС целевых генов в векторах рЕТ-23а и рЕТ-40b использовали метод рестрикции-лигирования с использованием рестриктаз, указанных в таблице 3 приложения. ОРС целевых генов амплифицировали в ПЦР (Раздел 2.5), используя праймеры, перечисленные в таблице 3 приложения. Первоначально ампликоны клонировали в векторе рGem-Т (рис. 44, Promega, США), используя метод лигазного ТА-клонирования. Полученные конструкции, а также экспрессирующие вектора рЕТ-23а и рЕТ-40b обрабатывали рестриктазами в концентрации 5 ед. на 1 мкг плазмидной ДНК. После электрофоретического разделения целевые фрагменты вырезали из геля, очищали с помощью коммерческого набора Cleanup Standard (Евроген, Россия) по рекомендованному производителем протоколу. Очищенные фрагменты лигировали с помощью набора Blunt/ТА Ligase Master Mix (New England Biolabs, Великобритания).

Для клонирования ОРС целевых генов в векторе рЕТ-32Ек/ЛІС использовали метод безлигазного клонирования. Для того, чтобы получить комплементарные одноцепочечные концы ампликонов, их обрабатывали Т4 ДНК-полимеразой (Invitrogen, США).

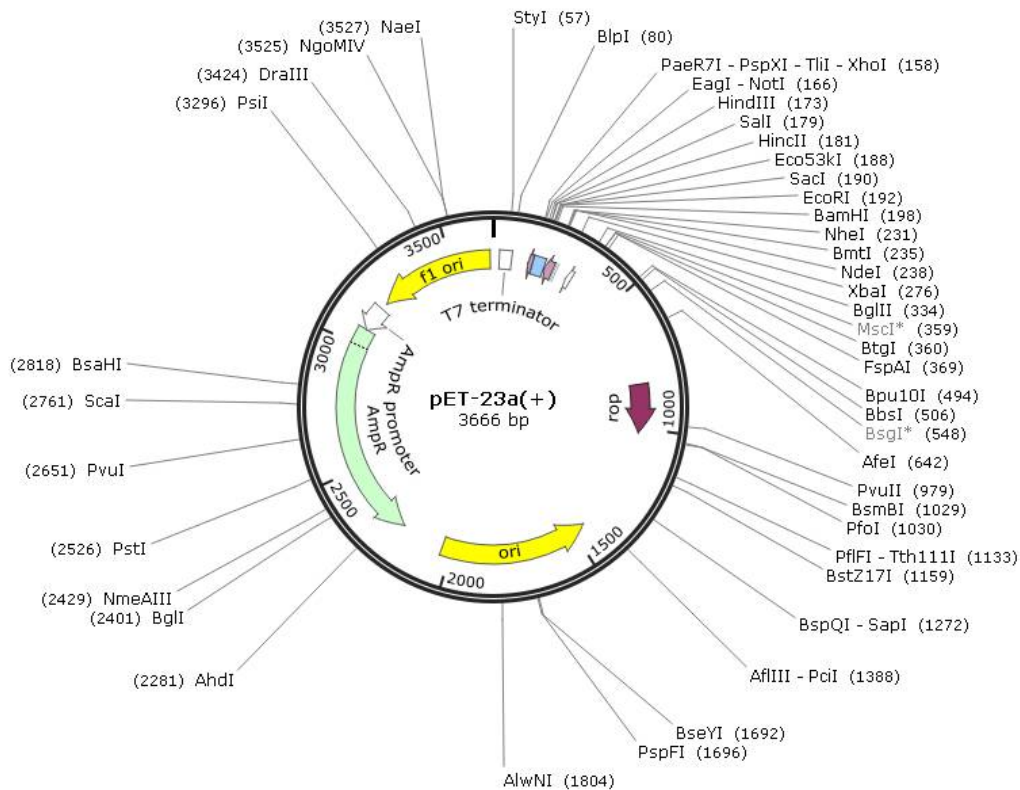


Рис. 41. Схема вектора рЕТ-23а (Novagen, США).

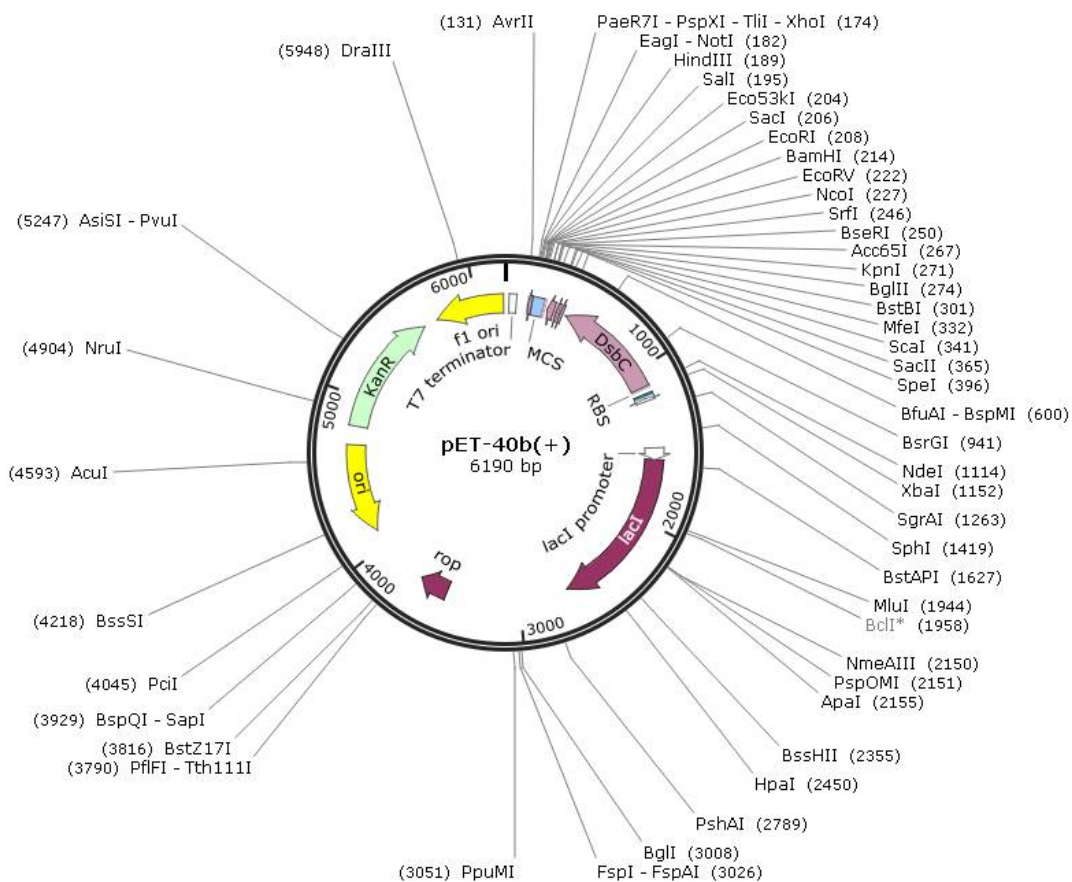


Рис. 42. Схема вектора рЕТ-32 Ек/ЛІС (Novagen, США).

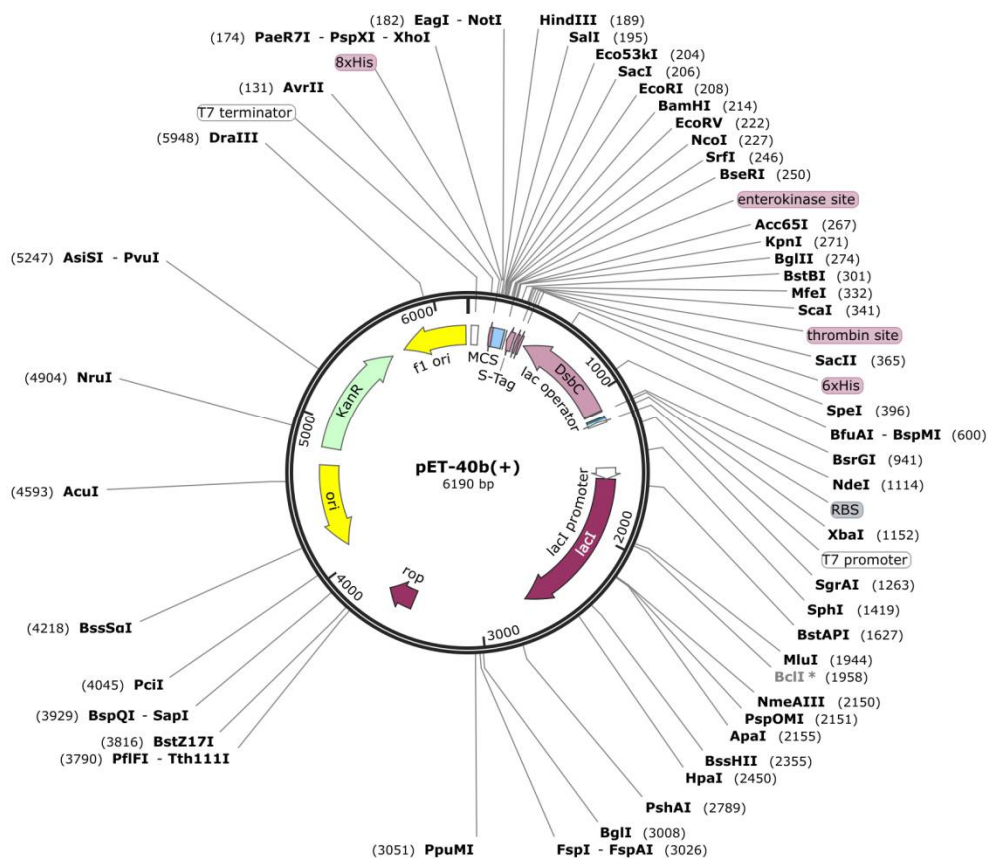


Рис. 43. Схема вектора pET-40b (Novagen, США).

Created with SnapGene®

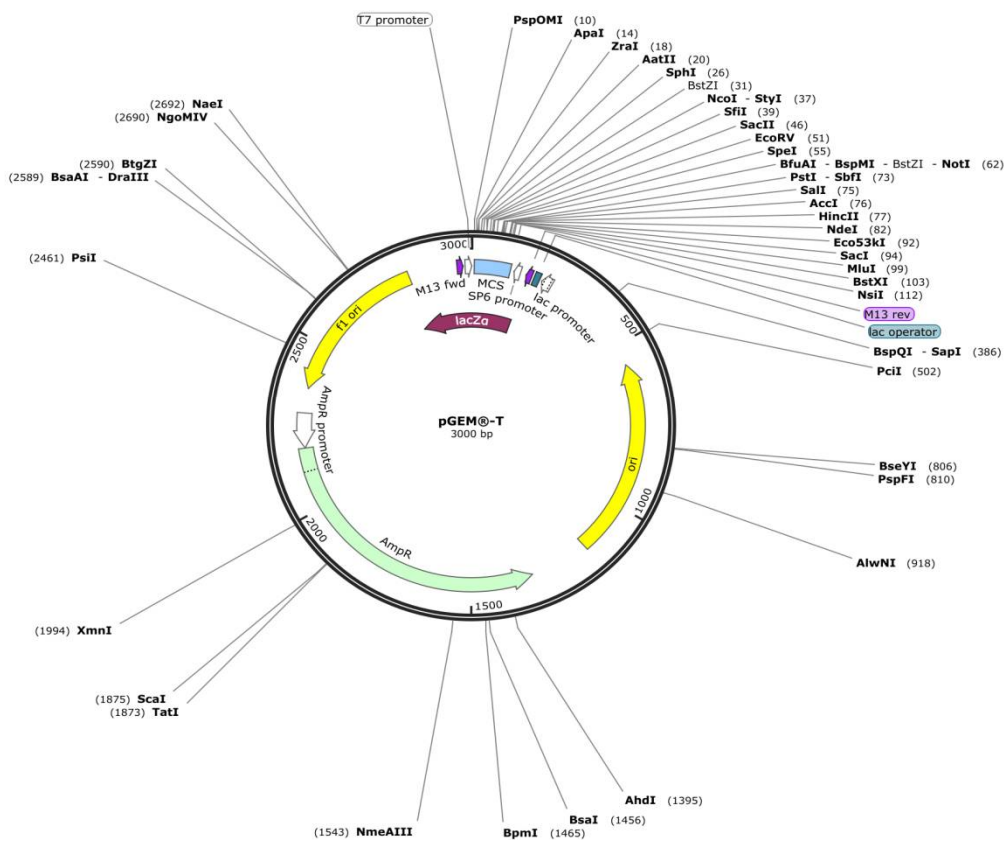


Рис.44. Схема вектора pGem-T (Promega, США).

В состав реакционной смеси входили буфер для T4 ДНК-полимеразы (Invitrogen, США), 100 мМ ДТТ, 25 мМ дАТФ, 0,2 пкМ очищенного продукта ПЦР. T4 ДНК-полимеразу добавляли в реакционную смесь непосредственно перед реакцией в концентрации, рекомендуемой производителем. Полученную смесь инкубировали при 22°C 30 мин, после чего фермент инактивировали инкубацией в течение 20 мин при 75°C. Обработанный ампликон (0,02 пкМ) смешивали с 50 нг вектора рЕТ-32 Ek/LIC и инкубировали 5 мин при 22°C. Затем к реакционной смеси добавляли ЭДТА в концентрации 25 мМ и инкубировали 5 мин при 22°C. Полученный препарат использовали для трансформации компетентных клеток (Раздел 2.12) *E. coli* штамма NovaBlue (Раздел 2.9).

2.7.1. Характеристика используемых векторов

Вектор рGem-T является линейаризованным вектором, содержащим 3'-концевой тимин на обоих концах. Данная конструкция вектора значительно повышает эффективность лигирования ПЦР-продукта в плазмиду, предотвращая рециркуляцию вектора и обеспечивая совместимые липкие концы для продуктов ПЦР, полученные с использованием термостабильных полимераз.

Конструкция вектора рЕТ-23 включает в себя следующие компоненты: T7 промотор, сайт мультиклонирования, содержащий несколько уникальных сайтов рестрикции, последовательность T7•Tag, последовательность His•Tag, T7 терминатор, точку начала репликации из вектора рBR322, последовательность, кодирующую ген устойчивости к ампициллину, и точку начала репликации фага f1. Область клонирования кодирующей цепи транскрибируется с помощью T7 РНК-полимеразы с T7 промотора. Сайт f1 origin ориентирован таким образом, что при заражении фагом-помощником образуются вирионы, содержащие одноцепочечную ДНК, соответствующую кодирующей цепи. Концевые последовательности, присоединяемые к целевому белку, используются для следующих целей: T7•Tag – для очистки с помощью монокло-

нальных антител, His•Tag – для очистки с помощью нативной или денатурирующей металлоаффинной хроматографии или моноклональных антител.

Конструкция вектора pET-32 Ek/LIC имеет сходное строение и включает в себя следующие компоненты: T7-промотор, сайт мультиклонирования, последовательности Trx•Tag, His•Tag, S•Tag, T7-терминатор, точку начала репликации из вектора pBR322, последовательность, кодирующую ген устойчивости к ампициллину, точку начала репликации фага f1 и последовательность гена *lacI*. Специфические для вектора pET-32Ek/LIC концевые последовательности, присоединяемые к целевому белку, используются для следующих целей: S•Tag – для очистки с помощью аффинной хроматографии, Trx•Tag способствует повышению гидрофильности белка и образованию дисульфидных связей.

Конструкция вектора pET-40b также имеет сходное строение и включает в себя следующие компоненты: T7-промотор, сайт мультиклонирования, последовательность DsbC•Tag, который повышает растворимость и обеспечивает правильный фолдинг целевого фермента в периплазматическом пространстве, точку начала репликации из вектора pBR322, последовательность, кодирующую ген устойчивости к канамицину, точку начала репликации фага f1 и последовательность гена *lacI*.

2.8. Определение нуклеотидной последовательности ДНК

Для проверки первичной структуры клонированных рекомбинантных генов проводили определение их последовательностей с использованием автоматического капиллярного ДНК-анализатора ga3130 (Applied Biosystems, США). Первым этапом этой процедуры является проведение модифицированной реакции Сэнгера. Реакционная смесь состояла из специализированного буфера BrightDye Terminator Sequencing Buffer (5X) (Nimagen, Голландия), 150 нг целевой плазмидной ДНК в качестве матрицы, 0,5 мкМ праймера (прямого или обратного), 1 мкл смеси BrightDye v. 3.1 (Nimagen, Голландия). Конечный объем реакционной смеси составлял 10 мкл. Режим реакции (25

циклов) контролировали с помощью амплификатора DNA Engine (Bio-Rad, США). Использовали следующие параметры реакции: денатурация ДНК при 96°C – 10 с, отжиг праймера при 55°C – 5 с, синтез цепи ДНК при 60°C – 4 мин. В первом цикле время денатурации увеличивали до 1 мин.

После проведения реакции Сэнгера конденсат осаждали, и в реакционную смесь добавляли 0,1 объема ацетата аммония (10 М), 3 объема 96% этилового спирта (–15°C), тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. ДНК осаждали центрифугированием (13500 об/мин, 4°C, 30 мин) после чего промывали 70% этанолом. Осадок ДНК тщательно сушили, после чего растворяли в 10 мкл буфера для нанесения проб, содержащего формамид (Applied Biosystems, США). Полученные в реакции Сэнгера флуоресцентно меченные одноцепочечные фрагменты ДНК анализировали с помощью ДНК-анализатора в соответствии с рекомендуемыми производителем алгоритмами. Секвенированные последовательности анализировали с использованием программы Sequencing Analysis 5.3.1 (Applied Biosystems, США).

2.9. Характеристика используемых бактериальных штаммов

Для клонирования всех рекомбинантных генов использовали неэкспрессирующий штамм *E. coli* NovaBlue (Novagen, США) со следующим генотипом: *endA1 hsdR17 (r_{KI}²⁻m_{KI}²⁺) supE44 thi⁻¹ recA1 gyrA96 relA1 lacF'* [*proA⁺B⁺ lacIqZ ΔM15 :: Tn10(Tc^R)*], являющийся производным штамма *E. coli* K-12. В связи с тем, что данный штамм обладает высокой эффективностью трансформации, он подходит для первоначального клонирования целевых плазмид. Штамм содержит мутацию гена *rec⁻*, которая нарушает общую рекомбинацию и ингибирует формирование плазмидных мультимеров, и мутацию гена *endA⁻*, которая ингибирует специфическую эндонуклеазу I, улучшая тем самым выход и качество плазмиды.

Для экспрессии рекомбинантных генов ферментов CYP74C1_CS, CYP74C4_ST, CYP74C13_MT, CYP74C31, LeAOS3, ZmAOS1, PpAOS2,

LuAOS, StHPL, MsHPL, CsHPL, LeDES, CYP74M1, CYP74A88, CYP5164B1, CYP443C1 использовали бактериальный штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen, США) со следующим генотипом: *F- ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3)pLysS (Cam^R)*. Для экспрессии рекомбинантных генов ферментов CYP74C13_GM, CYP74B33, NtDES, CYP74Q1, CYP74B16, CYP74M2 и CYP74M3 использовали бактериальный штамм *E. coli* Rosetta-gami(DE3)pLysS В (Novagen, США) со следующим генотипом: *F ompThsdS_B(r_B⁻m_B⁻)gal dcm lacYI(DE3) pLysSRARE, lacY (Cm^RTc^RKm^R)*. Для получения белка CYP443D1 использовали бактериальный штамм *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Agilent Technologies, США) со следующим генотипом: *F ompThsdS_B(r_B⁻m_B⁻)dcm⁺ Tc^R gal λ(DE3) endA Hte (argU ileY leuW Cm^R)*. Все три штамма являются лизогенными по фагу λ-DE3 и содержат копию гена T7 РНК-полимеразы под контролем *lacUV5*-промотора в хромосоме, что делает эти штаммы подходящими для экспрессии генов с T7- или T7lac-промоторов. Штаммы BL21(DE3)pLysS и Rosetta-gami(DE3)pLysS В содержат плазмиду pLysS, которая несет ген T7 лизоцима – естественного ингибитора T7 РНК-полимеразы, что до определенного момента предупреждает экспрессию генов целевых белков. Это имеет большое значение в случае, если данные белки обладают токсическими для клеток свойствами. Присутствие плазмиды pLysS имеет дополнительное преимущество. После накопления целевого белка простое замораживание и оттаивание клеток приводит к тому, что синтезированный в клетке T7 лизоцим эффективно разрушает клетки, что значительно облегчает приготовление клеточных экстрактов для дальнейшей очистки. Кроме того, у всех трех описанных экспрессирующих штаммов снижена активность *lon*-протеазы и отсутствует *ompT*-протеаза на наружной мембране, что снижает степень деградации целевых белков во время очистки (Grodberg *et al.*, 1988). Таким образом, целевые белки остаются в этих штаммах более стабильными.

Rosetta-gami(DE3)pLysS В является производным штамма *E. coli* BL21. Этот штамм позволяет экспрессировать гены, содержащие кодоны, тРНК для

которых в клетках *E. coli* являются редкими, а именно – аргинина AGA, AGG и CGA, глицина GGA, изолейцина AUA, лейцина CUA и пролина CCC. Эти гены расположены на плазмиде pLysS и считываются со своих собственных промоторов. Штамм также содержит мутацию в гене *lac*-пермеазы (*lacY*), что позволяет получать одинаковый уровень синтеза целевого белка во всех клетках при введении в культуру индуктора экспрессии рекомбинантных генов – изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозида – (ИПТГ). Регулируя уровень ИПТГ, можно контролировать уровень экспрессии. Низкий уровень экспрессии может повысить растворимость и каталитическую активность целевых ферментов. Кроме того, у этого штамма содержатся мутации в генах глутатион-редуктазы (*gor*) и тиоредоксин-редуктазы (*trxB*), что улучшает формирование дисульфидных мостиков в цитоплазме (Aslund *et al.*, 1999; Prinz *et al.*, 1997).

BL21-CodonPlus(DE3)-RIL также является производным штамма *E. coli* BL21. Наличие фенотипа Hte увеличивает эффективность трансформации этих клеток до $> 1 \times 10^8$ КОЕ / мкг ДНК. Штамм содержит мутацию гена *endA*, которая ингибирует специфическую эндонуклеазу I, разрушающую плазмиду. Кроме того, штамм содержит дополнительные копии генов тРНК аргинина, изолейцина и лейцина. Эти гены кодируют тРНК, которые распознают кодоны аргинина AGA и AGG, кодон изолейцина AUA и кодон лейцина CUA, наиболее часто ограничивающие трансляцию гетерологичных белков из организмов, которые имеют АТ-богатые геномы.

Для длительного хранения исходных и рекомбинантных штаммов *E. coli* использовали замораживание клеток в 10% глицерине в жидком азоте с последующим содержанием при -70°C .

2.10. Среды для культивирования бактерий

В работе использовали следующие среды для выращивания культуры клеток *E. coli*:

1. SOC (Маниатис и др., 1984): 2% пептона, 0,5% дрожжевого экс-

тракта, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄ и 20 мМ глюкозы. Для приготовления среды SOC пептон, дрожжевой экстракт, NaCl и KCl растворяли в воде и стерилизовали автоклавированием в течение 30-40 мин. Перед использованием в среду SOC добавляли предварительно стерилизованные фильтрованием через нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0,22 мкм растворы MgCl₂ (0,1 мМ), MgSO₄ (2 мМ) и глюкозы (20 мМ) (БиоХимФарм, Россия). pH раствора составлял 6,8-7,0.

2. Luria-Bertani(LB) (Гловер, 1988): 1% пептона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl. pH доводили до 7,5 с помощью NaOH и стерилизовали автоклавированием.

3. M9 (Маниатис и др., 1984): 0,6% Na₂HPO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,05% NaCl, 0,1% NH₄Cl. С помощью NaOH pH доводили до 7,4, стерилизовали автоклавированием и добавляли предварительно стерилизованные фильтрованием через нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0,22 мкм растворы MgSO₄ (2 мМ) и CaCl₂ (0,1 мМ).

Агаризованные питательные среды содержали 1,5% бактоагара.

2.11. Приготовление компетентных клеток *E. coli*

Методику получения компетентных клеток *E. coli* разработали на основе протоколов, описанных ранее (Гловер, 1988; Inoue *et al.*, 1990). С помощью стерильной вольфрамовой петли отбирали колонии трансформантов *E. coli*, выращенных на чашках Петри с агаризованной средой LB (Раздел 2.10), содержащей антибиотика, устойчивость к которым проявляют клетки данного штамма. Затем суспендировали их в 1 мл среды LB, содержащей те же антибиотики, и выращивали при 250 об/мин, 37°C до достижения клетками стационарной фазы роста, после чего данной культурой инокулировали свежую среду LB, содержащую те же антибиотики, в соотношении 1 : 100 (по объему) и инкубировали при 180 об/мин, 37°C до достижения культурой значения оптической плотности OD₆₀₀ = 0,5, что соответствовало титру 4 – 7 × 10⁷ жизнеспособных клеток/мл. Оптическую плотность измеряли с помощью

спектрофотометра РВ 2201 В (Солар, Беларусь). После этого культуру переносили в стерильные центрифужные пробирки и охлаждали на ледяной бане. Клетки осаждали центрифугированием (8000 об/мин, 5 мин, 4°C) в центрифуге Z36НК (Hermle, Германия) и суспендировали в 1/3 исходного объема буфера ТВ (10 мМ PIPES, 15 мМ CaCl₂, 250 мМ KCl, 55 мМ MnCl₂), стерилизованного фильтрованием через нитроцеллюлозную мембрану, диаметр пор которой составлял 0,22 мкм. Клетки инкубировали на ледяной бане 15 мин и осаждали центрифугированием, как описано выше. Осадок суспендировали в 1/12,5 исходного объема буфера ТВ, содержащего дополнительно 7% диметилсульфоксида, стерилизованного фильтрованием через нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,22 мкм, и инкубировали на ледяной бане 15 мин, после чего использовали для трансформации.

2.12. Трансформация компетентных клеток *E. coli* **(Маниатис и др., 1984)**

Полученные компетентные клетки *E. coli* использовали для трансформации рекомбинантными плазмидами, содержащими целевые вставки. Для первоначального клонирования использовали клетки штамма *E. coli* NovaBlue (Раздел 2.7). Плазмидную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. В качестве отрицательного контроля использовали одну трансформацию, проведенную без добавления плазмидной ДНК. После добавления к клеткам плазмиды (1 нг на 50 мкл клеток) их инкубировали на ледяной бане 15 мин, после чего нагревали до 42°C ровно на 30 с и сразу переносили на ледяную баню. К каждой трансформации добавляли 5 объемов среды SOC (Раздел 2.10) комнатной температуры, после чего инкубировали клетки 1 ч при 37°C. Отбор трансформантов, содержащих целевую плазмиду, несущую ген устойчивости к ампициллину (на основе векторов pGemT, pET-23a и pET-32 Ek/LIC) либо канамицину (на основе вектора pET-40b), проводили посевом на чашки Петри с агаризованной средой LB (Раздел 2.10), содержа-

щей соответствующий антибиотик. Кроме того, добавляли специфические антибиотики для поддержания признаков реципиента. Инкубацию проводили в течение 14 ч при 37°C. Отбирали отдельные колонии трансформантов и суспендировали их в 2 мл среды LB. Культуры инкубировали при 37°C с умеренной аэрацией до достижения клетками стационарной фазы роста. Полученную культуру использовали для хранения (Раздел 2.9). Для проверки качества плазмидную ДНК выделяли из культуры клеток и анализировали по результатам электрофоретического разделения в агарозном геле и окраски бромистым этидием (Раздел 2.5). Наличие целевой вставки в плазмиде определяли по результатам ПЦР (Раздел 2.4) со специфичными праймерами. Для проверки первичной структуры клонированных ОРС проводили определение их последовательностей с помощью автоматического капиллярного ДНК-анализатора ga3130 (Applied Biosystems, США) (Раздел 2.7).

2.13. Индукция синтеза рекомбинантных белков

На основе нескольких общепринятых протоколов была разработана следующая методика. Культуру клеток *E. coli* (5-10 мл) выращивали до стационарной фазы роста в среде LB (Раздел 2.10), содержащей антибиотика, соответствующие выбранной системе экспрессии (вектор и клетки продуцента) в следующих концентрациях: либо 500 мг/л ампициллина, 35 мг/л хлорамфеникола, 12,5 мг/л тетрациклина и 50 мг/л канамицина. Оптимальные концентрации используемых антибиотиков были подобраны нами в отдельных экспериментах. После этого культурой инокулировали 25 мл свежей среды LB из расчета 1 : 50 (по объему), содержащей те же антибиотики, и выращивали при интенсивной аэрации (250 об/мин) и 37 °С до достижения культурой значения оптической плотности OD₆₀₀ 2,0 – 2,5. Культурой инокулировали свежую среду LB, разведенную 1 объемом среды M9 (Раздел 2.10) из расчета 1 : 40 (по объему), и выращивали при 37 °С и интенсивной аэрации (250 об/мин) до достижения культурой значения оптической плотности OD₆₀₀ 0,4 – 1,0, после чего клеточную суспензию быстро охлаждали до 20°C на ле-

дьяной бане. К охлажденной культуре немедленно добавляли индуктор синтеза белков – ИПТГ из расчета 115 мг/л – и предшественник гема – 5-аминолевулиновую кислоту – из расчета 100 мг/л. Кроме того, при использовании ампициллина вносили его дополнительное количество из расчета 100 мг/л для компенсации разрушения β -лактамазой бактерий в процессе роста культуры. Индуцированные таким образом клетки инкубировали в течение 8-14 часов при умеренной аэрации (180 об/мин) и пониженной температуре (18 °С). Для анализа эффективности наработки целевого белка в культуре клеток перед индукцией и перед сбором клеток после индукции отбирали по 1 мл культуры. Клетки осаждали центрифугированием и использовали непосредственно для приготовления образцов для электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле (Раздел 2.14).

2.14. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле (Остерман, 1981)

Электрофоретическое разделение белков проводили в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН) по Лэмли (Остерман, 1981) с использованием системы PowerPac Universal MiniProtean (Bio-Rad, США). К белковым образцам добавляли Sample Buffer (2,5% ДСН, 2,5 мМ β -меркаптоэтанола, 12,5% глицерина, 0,005% красителя бромфенолового синего). Образцы выдерживали 5 мин при 100°C, охлаждали и наносили на полиакриламидный гель (18% акриламида, 0,5% метилен-бисакриламида, 0,375 М трис-НСl (рН 8,9) – разделяющий гель; 3% акриламида, 0,08% метилен-бисакриламида, 0,125 М трис-НСl (рН 6,8) – концентрирующий гель; оба геля содержали 0,1% персульфата аммония, 0,05% TEMED, 0,1% ДСН). На границе между концентрирующим и разделяющим гелями происходило концентрирование образцов. В разделяющем геле происходило разделение образцов по молекулярным массам и зарядам. Разделение проводили при напряженности электрического поля 10 В/см в трис-глициновом буфере (25 мМ трис, 192 мМ глицина, 0,02% ДСН, рН 8,3) до выхода красителя бромфенолового синего.

го из геля. Размеры белков определяли, сравнивая с маркером молекулярного веса Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Fischer Scientific, США). Белки визуализировали окрашиванием в растворе, содержащем 0,2% Coomassie R-250, 45,4% C₂H₅OH, 45,4% CH₃COOH, после чего избавлялись от избытка красителя, выдерживая гель в отмывающем растворе (10% C₂H₅OH, 10% CH₃COOH).

2.15. Выделение и очистка рекомбинантных ферментов

Очистку рекомбинантных ферментов проводили методом металлоаффинной хроматографии на колонках Bio-Scale Mini Profinity IMAC 5 мл в хроматографической системе BioLogic LP (Bio-Rad, США) по следующему протоколу. Клетки осаждали центрифугированием (8000 об/мин, 4°C, 5 мин). Осадок суспендировали в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,5), содержащем 100 мМ NaCl и 0,3% полиоксиэтилен-10-тридецилэфира (ПОЭТЭ), из расчета 5 мл на 1 г клеток и механически разрушали с помощью системы French Press Cell Disrupter (Thermo Scientific, США). К осветленному центрифугированием (18000 об/мин, 30 мин, 4°C) лизату добавляли 200 мМ NaCl и наносили на колонку Bio-Scale Mini Profinity IMAC 5 мл (Bio-Rad, США), уравновешенную 10 объемами 50 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7,5), содержащего 300 мМ NaCl и 0,3% ПОЭТЭ, после чего промывали этим же буфером до достижения устойчивого минимума оптической плотности раствора при 280 нм. Для того чтобы снять белок с колонки в щадящих условиях, его вытесняли из комплексов с ионами никеля раствором гистидина. Предварительную промывку колонки проводили 10 объемами 50 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7,5), содержащего 100 мМ NaCl и 3 мМ гистидина, для освобождения от неспецифически связанных белков. Целевой белок элюировали из сорбента 10 объемами того же буфера, содержащего 30 мМ гистидина и 0,3% ПОЭТЭ. Полученную фракцию элюата концентрировали, пропуская через центрифужный фильтр Vivaspin20 50 кДа (Sartorius stedim biotech, Германия).

Качество очистки в полученных нами препаратах определяли методом электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле (Раздел 2.14). Концентрацию белка в элюате измеряли с использованием флуориметра Qubit (Invitrogene, США) по прилагаемой инструкции. Поскольку фермент после металлоаффинной хроматографии содержал примеси других белков, для кинетических исследований необходимо было знать точную концентрацию цитохрома, которую можно определить по концентрации гема в полученной фракции элюата (Schenkman, Jansson, 2006). Для этого 1 мкл элюата, содержащего не менее 3 нмоль/мл белка, разводили в 2 мл раствора, содержащего 0,2 М NaOH и 20% пиридина. Полученный раствор разливали в две кюветы, затем прописывали базовую линию при поглощении от 600 до 500 нм на спектрофотометре Lambda 25 (Perkin-Elmer, США). Затем к одной из кювет добавляли несколько мг дитионита натрия на кончике шпателя и прописывали спектр поглощения от 600 до 500 нм. Вычисляли разницу в измерениях поглощения при длине волны 557 нм относительно таковых при длине волны 575 нм ($\Delta A_{557-575}$). Для расчета концентрации гема использовали закон Бера:

$$A = \varepsilon * c * L,$$

где ε – коэффициент экстинкции ($\varepsilon_{557-575}$), $32,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для гема, c – концентрация гема и L – длина пути световых волн в кювете. Концентрацию цитохрома вычисляли из расчета, что один миллиграмм фермента связывает от 17 до 20 нмоль гема.

2.16. Получение гидроперекисей жирных кислот

(9*S*,10*E*,12*Z*)-9-Гидроперокси-10,12-октадекадиеновую, (9*S*,10*E*,12*Z*,15*Z*)-9-гидроперокси-10,12,15-октадекатриеновую и (6*Z*,9*S*,10*E*,12*Z*)-9-гидроперокси-6,10,12-октадекатриеновую кислоты (9-ГПОД, 9-ГПОТ и γ -9-ГПОТ соответственно), а также [$1\text{-}^{14}\text{C}$]9-ГПОД (57,6 кБк/мкмоль) получали в результате инкубации линолевой, α -линоленовой, γ -линоленовой (Sigma-Aldrich, США) и [$1\text{-}^{14}\text{C}$]линолевой (2,072 МВq/мкмоль,

Perkin Elmer, Великобритания) кислот соответственно с рекомбинантной липоксигеназой ZmLOX3 кукурузы (*Z. mays*) (GeneBank: AAG61118.1) (Wilson *et al.*, 2001) в 100 мМ Na-фосфатном буфере (pH 6,0) при 0°C и постоянном кислородном барботаже. (9Z,11E,13S)-13-Гидроперокси-9,11-октадекадиеновую, (9Z,11E,13S,15Z)-13-гидроперокси-9,11,15-октадекатриеновую, (5Z,8Z,11Z,13E,15S)-15-гидроперокси-5,8,11,13-эйкозатетраеновую и (5Z,8Z,11Z,13E,15S,17Z)-15-гидроперокси-5,8,11,13,17-эйкозапентаеновую кислоты (13-ГПОД, 13-ГПОТ, 15-ГПЭТЕ и 15-ГПЭПЕ соответственно), а также [1-¹⁴C]13-ГПОД (5,78 кБк/мкмоль) получали в результате инкубации линолевой, α-линоленовой, эйкозатетраеновой, эйкозапентаеновой и [1-¹⁴C]линолевой кислот соответственно с соевой липоксигеназой V типа (Sigma-Aldrich, США) в 50 мМ трис-HCl буфере (pH 9,0) при 20 °C и постоянном кислородном барботаже. Реакции останавливали внесением ледяной уксусной кислоты до установления pH реакционной смеси 4,0 – 5,0. Продукты реакции экстрагировали смесью этилацетата и гексана (1 : 1 по объему). Растворители испаряли под струей азота, жирные кислоты растворяли в метаноле. Гидроперекиси дважды очищали от побочных продуктов ферментативной реакции и от остатка непрореагировавшей кислоты при помощи ВЭЖХ на нормальной фазе на двух последовательно соединенных колонках Kromasil Si (7 мкм, 3,2 × 150 мм, Elscico, Россия) в изократическом режиме, используя смесь гексана, изопропанола и уксусной кислоты (98,1 : 1,8 : 0,1 по объему). Скорость потока составляла 0,4 мл/мин. Чистота гидроперекисей составляла 98%, что определяли по результатам разделения методом хирально-фазовой ВЭЖХ на колонках Chiralcel OD-H и Chiralcel OB-H (Daicel Chemical Industries, Япония). Гидроперекиси после упаривания растворителя перерастворяли в 96% этиловом спирте и хранили при –20°C.

2.17. Кинетические исследования рекомбинантных ферментов

Активность очищенных рекомбинантных ферментов определяли по снижению оптической плотности в минуту при 234 нм. Измерения проводи-

ли с использованием спектрофотометра РВ 2201 В (Солар, Беларусь). Концентрация субстрата составляла от 5 до 150 мкмоль. Анализ проводили при 25°C в 100 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,5). Для расчета скорости реакций использовали первоначальные линейные участки кинетических кривых. Коэффициент молярной экстинкции для 9- и 13-гидроперекисей жирных кислот при 234 нм составляет $25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Кинетические параметры рассчитывали по установке наборов данных для насыщающей модели с одним сайтом связывания простого лиганда с помощью программного обеспечения SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., США). Для каждого варианта проводили не менее пяти измерений.

2.18. Инкубация рекомбинантных ферментов с гидроперекисями

Процедуру подготовки образцов для анализа методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) проводили по протоколу, описанному ранее (Grechkin *et al.*, 2006). Гидроперекись (100 мкг) инкубировали 15 мин при 25°C в 10 мл 100 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7,5) в присутствии 10 мкг очищенного рекомбинантного фермента. Перед инкубацией смесь тщательно перемешивали на вортексе Heidolph Reax Top (Heidolph, Германия). После инкубации реакцию смесь экстрагировали смесью гексана с этилацетатом (1 : 1 по объему) при комнатной температуре (три раза, равным объемом). Затем растворитель выпаривали в вакуумном испарителе, а продукты реакции растворяли в 1,5 мл метанола (Sigma-Aldrich, США) и (в ряде случаев) восстанавливали, выдерживая в течение 30 мин в присутствии NaBH_4 (Fluka, Buch, Швейцария). Затем проводили метилирование продуктов диазومتаном (Fluka, Buch, Швейцария), выпаривание (для удаления диазومتана), перерастворение в метаноле и (в ряде случаев) гидрирование над платиновым катализатором. После удаления катализатора продукты снова высушивали и силилировали смесью пиридина, гексаметилдисилазана и триметилхлорсилана (2 : 1 : 2 по объему) в течение 15 минут. После упаривания силилирующей смеси готовые продукты растворяли в гексане. Продукты

(после или без предварительного гидрирования и восстановления NaBH_4) анализировали в виде метиловых эфиров (Me) или триметилсилилпроизводных (TMC-производных) метиловых эфиров (Me/TMC) методом ГХ-МС, как описано в разделе 2.22.

Для микропрепаративного выделения продуктов рекомбинантные ферменты (25 мкг) инкубировали с $[1\text{-}^{14}\text{C}]13\text{-ГПОД}$ (5,78 кБк/мкмоль) либо $[1\text{-}^{14}\text{C}]9\text{-ГПОД}$ (57,6 кБк/мкмоль в аналогичных условиях. Продукты экстрагировали и метилировали диазометаном, растворенным в диэтиловом эфире. Полученные метиловые эфиры разделяли и очищали методом ВЭЖХ на обращенной и нормальной фазах. Инкубацию рекомбинантных ферментов с $[^{18}\text{O}_2\text{-гидроперокси}]9\text{-ГПОД}$ либо с немеченой 9-ГПОД в $^{18}\text{O}_2$ атмосфере (88% ^{18}O , ЗАО «Неогаз», Россия) или $[^{18}\text{O}]$ воде (1 мл, 95% ^{18}O , ЗАО «Неогаз», Россия) проводили по той же схеме. Продукты (Me/TMC) анализировали методом ГХ-МС (селективным сканированием ионов, SIM).

2.19. Профилирование оксипинов

Листья и корни растений огурца (по 3 г) растирали в жидком азоте, после чего добавляли ледяную смесь гексана и этилацетата (1 : 1 по объему). Полученные гомогенаты центрифугировали (8000 g, 20 мин, 4°C), супернатанты отбирали, растворитель упаривали в вакууме. Полученные экстракты растворяли в смеси хлороформ-изопропанол (2 : 1 по объему) и пропускали через картриджи Supelclean LC-NH2 (3 мл, Supelco, США). Свободные карбоновые кислоты элюировали смесью этилацетата и уксусной кислоты (98 : 2 по объему). Восстановление, метилирование и триметилсилилирование продуктов проводили, как описано в разделе 2.18. Продукты (Me/TMC без или после восстановления NaBH_4) анализировали методом ГХ-МС, как описано в разделе 2.22.

2.20. Анализ продуктов реакций методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Для ВЭЖХ использовали градиентную хроматографическую систему производства Gilson (Франция) с использованием различных колонок.

2.20.1. Хроматография на обращенной фазе

Во всех экспериментах в качестве первого этапа разделения окисленных жирных кислот использовали хроматографию на колонках с обращенной фазой. После высушивания экстрактов в потоке азота жирные кислоты перерастворяли в метаноле и разделяли на колонке Nucleosil 5 ODS (250 × 4,6 мм) (Macherey-Nagel, Германия) с обращенной фазой. Раствор окисленных жирных кислот (10 – 50 мкл) вводили в колонку, предварительно уравновешенную смесью метанола и воды (76 : 24 по объему). Для элюирования использовали линейный градиент смеси метанола и воды от 76 : 24 до 94 : 4 (по объему) за 55 мин, затем элюировали в течение 25 мин в изократическом режиме. Скорость потока составляла 0,4 мл/мин. Необходимые для дальнейшего анализа фракции собирали на выходе из колонки; растворитель высушивали в струе азота. Сухой остаток перерастворяли в гексане для дальнейшей очистки на колонке с нормальной фазой.

2.20.2. Хроматография на нормальной фазе

Продукты (Me эфиры) разделяли на колонках Nucleodur 100-3 (250 × 4,6 мм, 3 мкм) (Macherey-Nagel, Германия), элюируя смесью гексана и изопропанола (98 : 2 по объему). Для протонирования разделяемых на нормальной фазе жирных кислот в систему растворителей добавляли ледяную уксусную кислоту в количестве 0,1 объема CH_3COOH на 100 объемов растворителя. Анализ проводили в изократическом режиме. Скорость потока растворителей составляла 0,4 мл/мин. УФ детекцию (190 – 370 нм) проводили с использованием диодно-матричного детектора SPD-M20A (Shimadzu, Япония). Радиоактивность определяли с помощью ВЭЖХ-радиомонитора модели 171

(Beckman Instruments, США) с твердой сцинтиляционной ячейкой (125 мкм). Разделенные продукты собирали, перерастворяли в [$^2\text{H}_6$]бензоле (99,5% ^2H , Прикладная химия, Россия) и подвергали анализу методом ЯМР.

2.21. Стерический анализ

Отдельные аликвоты метиловых эфиров продуктов каталитического действия некоторых рекомбинантных ферментов гидрировали с помощью PtO_2 , после чего удаляли кислород с помощью $\text{Rh}_3\text{P}=\text{Se}$. Полученную 11-гидрокси-9-октадеценовую кислоту (Me) превращали в МС-производное, после чего озонировали и метилировали. Полученное 2-ОМС-С9-Me производное анализировали методами ГХ-МС и газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ).

Метиловые эфиры продуктов превращали в (–)-ментоксикарбонил производные, очищали методом тонкослойной хроматографии и подвергали окислительному озонолузу, как описано ранее (Hamberg, 1992). Метилэтерифицированные продукты, содержащие (–)-ментоксикарбонил производные короткоцепочечных 2-гидроксиэфиров анализировали методом ГХ-МС, используя соответствующие производные 2(*S*)- и 2(*R,S*)-гидроксиэфиры в качестве стандартов (Hamberg, 1991, 1992). Для определения *эритро/трео* конфигурации вицинальных метил-дигидроксиоктадеценовых кислот образцы превращали в *бис*-ТМС эфирные производные и записывали время удерживания в ГХ-МС.

2.22. Спектральные исследования

Продукты инкубаций (после или без предварительного гидрирования и восстановления NaBH_4) анализировали в виде Me/ТМС методом ГХ-МС путем полного спектрального сканирования ионов в диапазоне отношений массы к заряду от 50 до 650. Анализ ГХ-МС проводили с помощью масс-спектрометра QP5050A (Shimadzu, Япония), соединенного с газовым хроматографом GC-17A (Shimadzu, Япония). Исследуемый образец в режиме деле-

ния вводили в кварцевую колонку MDN-5S (5% фенил и 95% метилполисилоксан) длиной 30 м, диаметром 0,25 мм и толщиной пленки 0,25 мкм при программировании температуры от 120°C до 240°C по 10°C/мин, подавая в систему в качестве газа-носителя гелий с линейной скоростью 30 см/с. Полное сканирование или мониторинг селективных ионов проводили, используя электронную ионизацию (70 eV) (Grechkin *et al.*, 2006). ¹H-ЯМР, 2D-COSY, HSQC и HMBC спектры записывали с помощью спектрометра Bruker Avance III 600 (600 МГц, [²H₆]бензол, 296 К).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение профилей оксипинов огурца

Оксипины – это обширная группа окисленных производных жирных кислот, разнообразных по своей структуре. Одними из оксипинов, распространенных в организмах, принадлежащих разным таксонам, являются эпокси-гидрокси-производные жирных кислот (эпокси-спирты) и продукты их гидролиза – тригидрокси-производные жирных кислот (тригидрокси-кислоты). Эпокси-спирты могут быть продуктами каталитического действия различных ферментов: пероксигеназ, липоксигеназ, эпоксиалкогольсинтаз и др. К настоящему времени описан ряд пероксигеназ и липоксигеназ (Blée, Schuber, 1990; Hamberg, Hamberg, 1996; Yu *et al.*, 2003; Blée *et al.*, 2012). В то же время, единственной эпоксиалкогольсинтазой, охарактеризованной *in vitro* до настоящей работы, является фермент VfEAS (CYP440A1) ланцетника *B. floridae* (Lee *et al.*, 2008). При этом эпокси-спирты – продукты каталитического действия эпоксиалкогольсинтаз – к настоящему времени обнаружены у большого числа видов, включая растения.

На первом этапе выполнения настоящей работы в профилях оксипинов корней (рис. 45А) и листьев огурца (рис. 45Б) были выявлены соединения **1** и **2**. Их масс-спектры и схемы фрагментации представлены на рисунке 46.

Масс-спектр продукта **1** (Me/TMC) содержал M^+ при m/z 398 (0,1%), $[M - Me]^+$ при m/z 383 (0,7%), $[M - C1/C8]^+$ при m/z 241 (4%), $[M - C1/C9]^+$ при m/z 212 (4%) и $[M - C1/C10]^+$ при m/z 199 (97%). Характерный основной фрагмент при m/z 199 свидетельствовал о присутствии оксиранил карбинольной группировки с оксираном при C9,C10 и вторичной спиртовой группировки (TMC) при C11. В результате каталитического гидрирования соединения **1** с последующим метилированием и триметилсилилированием образовывался продукт, масс-спектр которого содержал следующие фрагменты: $[M - Me]^+$ при m/z 385 (4%), $[M - MeO]^+$ при m/z 369 (1%), $[M - Me - MeOH]^+$ при m/z 353 (1%), $[M - C12/C18]^+$ при m/z 301 (10%), $[M - C11/C18 + TMC -$

Me]⁺ при m/z 257 (15%), m/z 215 (19%), [M – C1/C10]⁺ при m/z 201 (61%), [TMS]⁺ при m/z 73 (100%). Масс-спектр этого продукта указывал на структуру 9,10-эпокси-11-гидроксиоктадекановой кислоты (Me/TMS). Таким образом, масс-спектральные данные позволили идентифицировать соединение **1** как 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценую кислоту.

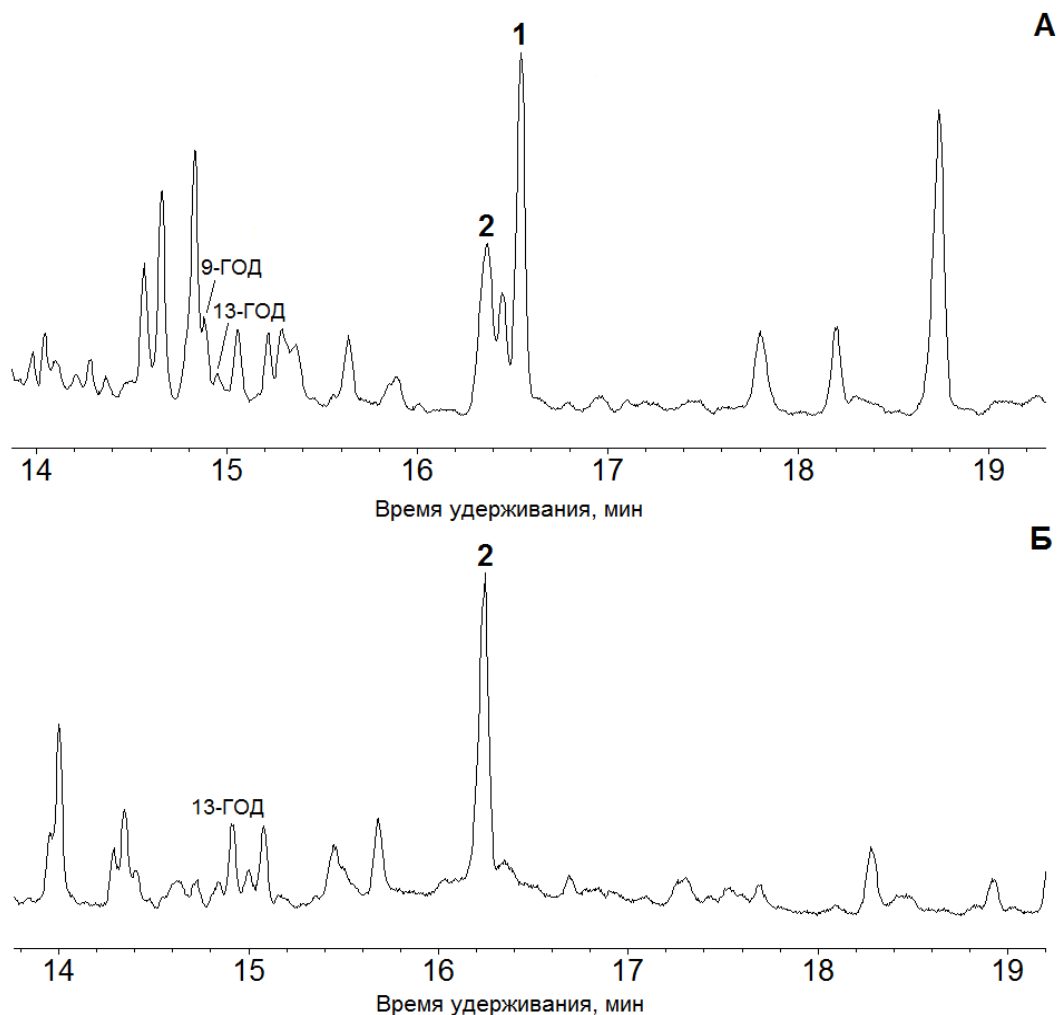


Рис. 45. Профили оксилипинов корней (А) и листьев (Б) огурца. **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценая кислота (Me/TMS); **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценая кислота (Me/TMS); 9-ГОД, (9*S*,10*E*,12*Z*)-9-гидрокси-(10,12)-октадекадиеновая кислота (Me/TMS); 13-ГОД, (9*Z*,11*E*,13*S*)-13-гидроперокси-(9,11)-октадекадиеновая кислота (Me/TMS).

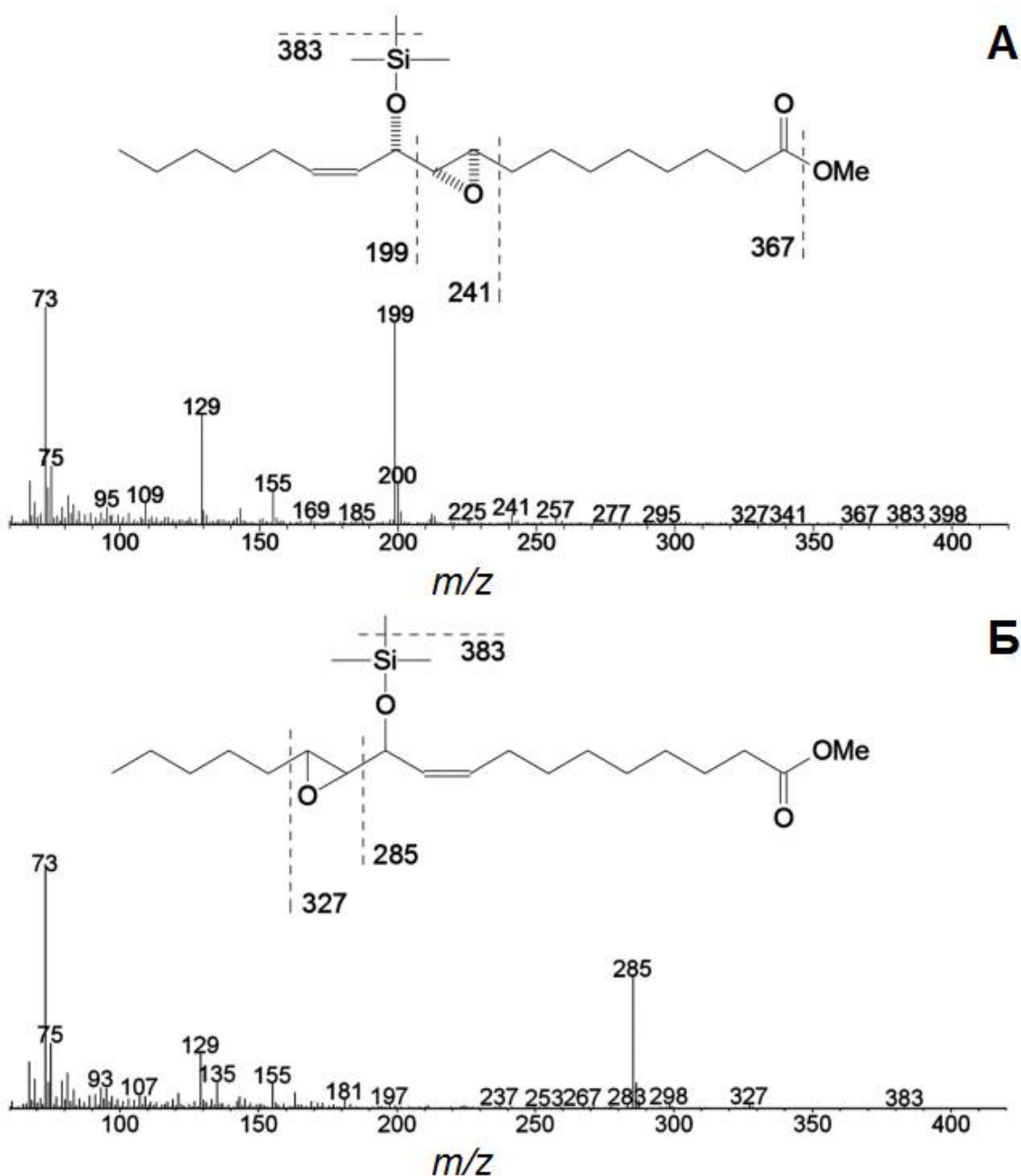


Рис. 46. Масс-спектры и схемы фрагментации продуктов **1** (А) и **2** (Б) – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой и 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислот (Ме/ТМС) соответственно.

Масс-спектр соединения **2** (Ме/ТМС) содержал M^+ при m/z 398 (0,1%), $[M - Me]^+$ при m/z 383 (2%), $[M - n\text{-пентил}]^+$ при m/z 327 (3%), $[M - C_{12}/C_{18}]^+$ при m/z 285 (89%) и $[TMS]^+$ при m/z 73 (100%). Заметный фрагмент $[M - C_{12}/C_{18}]^+$ при m/z 285 образуется в результате расщепления между оксираном и C11. Масс-спектр свидетельствовал о том, что соединение **2** имеет структуру 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты

(Hamberg, 1987). Гидрирование соединения **2** с последующим метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию насыщенного аналога, масс-спектр которого содержит $[M - Me]^+$ при m/z 385 (8%), $[M - MeO]^+$ при m/z 369 (0,3%), $[M - C_{13}/C_{18}]^+$ при m/z 301 (8%), $[M - C_{12}/C_{18}]^+$ при m/z 287 (44%), m/z 271 (14%), $[M - (CH_2)_9COOMe]^+$ при m/z 215 (8%); m/z 129 (21%), m/z 95 (27%), m/z 81 (36%), m/z 75 (51%), $[TMS]^+$ при m/z 73 (100%). Этот спектр соответствовал таковому 11-гидрокси-12,13-эпоксипоктадекановой кислоты (Me/TMS), что подтвердило структуру 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценной кислоты для соединения **2**.

Таким образом, соединения **1** и **2** являются оксиранил карбинолами – эпокиспиртами, структура которых предполагает наличие в тканях огурца эпоксиалкогольсинтазной активности. Однако к настоящему времени эпоксиалкогольсинтаз у этого растения выявлено не было. До настоящей работы единственной охарактеризованной ЭАС был фермент VfEAS (CYP440A1) ланцетника *B. floridae*. Этот фермент согласно требованиям номенклатуры (критерий 40% идентичности) не входит в состав семейства CYP74, однако по структурным особенностям, механизму каталитического действия и филогенетическому положению относится к клану CYP74. Это позволяет предположить, что следующие выявленные ЭАС будут также относиться если не к семейству, то хотя бы к клану CYP74.

Геном огурца расшифрован полностью. У него выявлено четыре фермента семейства CYP74, два из которых описаны как 9- и 13-специфичные ГПЛ (CYP74C1_CS и CYP74B6 соответственно; в (Matsui *et al.*, 2000) C15 и C17 соответственно). Третий фермент, исходя из структуры его каталитически важных доменов, является 13-специфичной АОС (CYP74A) (CsAOS, рис. 47). (У всех ферментов CYP74 выявлены особенности первичной структуры каталитически важных доменов, характерные для определенных типов каталитической активности (рис. 1 приложения)).

CYP74C1_CS	(7)	-----ELPLKPIPGGYGFPIFGPIKDRYDYFYFQGRDEFF
CYP74B6	(17)	IS-----PPVSLPLRNI PGSYGLPLLGSI GDRLDYYWFQGPDKFF
CsAOS	(51)	SLRVPQRIVSPPEPIKLP LIRKIPGDYGPPEFGALKDRQDYFYNQGREEYL
CYP74C31	(8)	-----HFQIP LPLKPIPGSYGFPIFGPI IDRYHYFYIQGRETFE
CYP74C1_CS	(42)	RSRITKYNSTVFHANMPP-GPFISSDSRVVLLDALSFPILFDTTKVEKR
CYP74B6	(58)	RTRMEKNRSTVFRITNVPPSEPFISADPRVAVLDCKSFAHLFDMEIVEKN
CsAOS	(101)	KSRMLRYESTVYRTNMPP-GPFITSDSRVVLLDGKSFVPLFDHASKVEKK
CYP74C31	(47)	RSRMAKYNSTVFRITNMPP-GPFISSNSKVI VLLDALTFPILFDTTKVEKR
		★
CYP74C1_CS	(91)	NILDGTYPMSLSFTGGIRTCAYLDPSETEHTV LKRF LSF LASRHDRFIP
CYP74B6	(108)	NVLVGDFMPSISFTGNMRCAYLDTSEPNH SKVKNFTDILRRSSRIWIS
CsAOS	(150)	DLFTGTYPVTEL TGGYRVL SYIDPSEPDHAKL KQLV FFLKHKRRDKIMP
CYP74C31	(96)	NVLDGTYPMSLAFTGGIRTC AFLDPSETEHSV LKRHF LKFLASRHHQFIP
CYP74C1_CS	(141)	LFRSSLSEMFVKLEDKLADKNKIADFNSISDAMSFDYVFR-LES DGT PDS
CYP74B6	(158)	ELESNLSTMWDGTELEMAK-NKQSGFRN FLPALFN FSKTLAGADTAKS
CsAOS	(200)	EFHSTFSELFETLEKDLAA-SGRAEYNAPGEQA AENELARS LFGADPVDS
CYP74C31	(146)	LFRTSISEMFDKLEKELQN-NNVANFNPI SDYASDFDFR-LLSDRSPDK
CYP74C1_CS	(190)	-TLAADGPGMFDLWLGLQLAPLASIGLPKIFSV EDLIIHTIPLPFFPVK
CYP74B6	(207)	PEVAKSGYIDV I IWLGLQLVPTIHI GVLQPL ---EELFLHSERLPFFPIA
CsAOS	(249)	-KLGRDAPKLIARVWVLFQLGPVLSLGLPKVV ---EELLLRTVRLPPALIK
CYP74C31	(194)	-NFSSEGPGLVDRWLTMLAPLATLGLPKIFSC FEDLIIHTFRLPFALVK
		123456VV
CYP74C1_CS	(239)	SRYRKLYKAFYSS-SGSFLDEAEKQGI DREKACHNLV LAGFNAYGGMKV
CYP74B6	(254)	SRYQRLYDF FQKEGAEVVERGVTEFGLTKEEAIHNLIFTMGNAYGGFSL
CsAOS	(295)	ADYRRLYEFFYKS-SEAVFEEADRLGISREEACHNLLETTTCFNSFGGMKI
CYP74C31	(243)	SAYRKLYESFYES-SGSFLDEAEKQGINREKACHNLV LAGFNAYAGMKV
CYP74C1_CS	(288)	LFPTILKWVGTGGEDLHRKLAEEV RTTVKEEGG-LTFSALEKMSLLKSVV
CYP74B6	(304)	FFPVLLDRILNDKTGLQORILEEVRSKS--SSG-LTFESVKEMDLIYSIV
CsAOS	(344)	FFPNMIKWIGRAGVNLHTQLAREIRTAVKANGGKITMGAMEQMLMKSVV
CYP74C31	(292)	LLPILLNWVGSAGEELHRKLVGEIRA AVKIDGG-LTFGALEKMSLLKSVV
		↓ ↓
CYP74C1_CS	(337)	YEALRIEPPVPEQY GKAKEDIVI QSHDSCFKIKKGETIFGYQPFATKDPK
CYP74B6	(351)	YETLRLDPPVPSQYARARKDFKLTSYNSTYNIKKGELL CGYQPLVMRDPE
CsAOS	(394)	YEAFLRIEPPVPEQYGRACKDLV VESHDAAFEIKEGEMTCGYQPFATRDPK
CYP74C31	(341)	YEVLRIDPPVPEQYAKAKQDIVIESHDSAFEIKKEMTIFGYQPIATKDPK
		↓
CYP74C1_CS	(387)	IFKDSEK FV GDRFV GEEGKLLKYVYWSNERETVEPTAENKQC PGKNL VV
CYP74B6	(401)	VFDEPEAFNPDRFERGEKGAALLDYLFWSNGPQTGTPSEKNKQCAGKDLVV
CsAOS	(444)	IFDRADEFVDPDRFTG-DGEELLKHV LWSNGPQTQSPSQNKQCAGKDFIV
CYP74C31	(391)	VFENAEFVGERFVGEKGEKLLKYVYWSNGRETVEPTAENKQC PARDLVV
		C
CYP74C1_CS	(437)	MMGRIIVVEFFLRYDTFTVDVADLALGPAVKFKSLTRATASV-
CYP74B6	(451)	LTCVVFVAYIFKRYDSIAGEGG-----SITAFQAN----
CsAOS	(493)	FISRLMVVELFLRYDSEDI EASNTPLGAAVTVTS LKKASF---
CYP74C31	(441)	LMCRVVLVELFLRYETFTVEGTRSSLGWSVKVKS LTKA-----

Рис. 47. Множественное выравнивание последовательностей ферментов CYP74 огурца. Выделены следующие каталитически важные участки: сайт «F/L toggle» (CPC-1) отмечен звездочкой; участок перегиба I-спирали, соответствующий кислород-связывающему домену у классических монооксигеназ, пронумерован; следующие за ним два остатка глицина отмечены треугольниками; ERR-триада и консервативный остаток цистеина – гемовый лиганд – отмечены стрелками и символом C соответственно.

Один из каталитически важных сайтов, расположенный в СРС-1 недалеко от N-конца последовательности, назван сайтом «F/L toggle». Этот сайт был выявлен в ходе рентгеноструктурного анализа алленоксидсинтазы AtAOS (CYP74A1) *A. thaliana* (Lee *et al.*, 2008). В молекуле белка этот сайт расположен на дистальной поверхности гемового железа. В сайте «F/L toggle» у алленоксидсинтаз содержится остаток фенилаланина, тогда как у гидропероксидлиаз и дивинилэфирсинтаз – остаток лейцина. Замена остатка фенилаланина в последовательности фермента AtAOS привела к частичному превращению этой АОС в ГПЛ (Lee *et al.*, 2008). У АОС остаток фенилаланина контролирует реакционную способность эпоксиаллильного радикала и его катиона посредством взаимодействия с π -системой ароматического кольца (Lee *et al.*, 2008). У трех ферментов, кроме предполагаемой CsAOS, в данном сайте расположен остаток лейцина, что указывает на отсутствие алленоксидсинтазной активности у этих ферментов.

Вторым каталитически важным доменом является участок перегиба I-спирали (ранее «гидропероксид-связывающий домен» или «центральный домен I-спирали», IHCD), соответствующий кислород-связывающему домену классических мнооксигеназ P450. В первом сайте участка перегиба I-спирали у АОС подсемейства CYP74A в основном содержится остаток треонина или валина. У ГПЛ подсемейства CYP74B в данном сайте в основном находится остаток лейцина, при этом у АОС и ГПЛ подсемейства CYP74C – остаток аланина. У ДЭС подсемейства CYP74D в этом сайте находится преимущественно остаток валина, у ДЭС чеснока (CYP74H1) – остаток триптофана. Во втором сайте участка перегиба I-спирали гидропероксидлиаз и дивинилэфирсинтаз (за исключением ДЭС чеснока) содержится остаток глицина. У АОС все не так однозначно. В этом сайте у АОС подсемейства CYP74A находится преимущественно остаток цистеина, у АОС подсемейства CYP74C – остаток глицина. При этом у АОС кукурузы (ZmAOS1) в данном сайте находится остаток треонина, у АОС риса (OsAOS1) – остаток валина, а у АОС арабидопсиса (AtAOS) – остаток серина. В третьем сайте участка перегиба I-спирали

почти все ГПЛ и АОС содержат остаток фенилаланина. У ДЭС в этом сайте находится остаток изолейцина. В четвертом положении этого участка все ферменты семейства СУР74 содержат консервативный остаток аспарагина. В пятом сайте большая часть АОС содержит остаток серина; исключения составляют ферменты льна (LuAOS) и гваюлы (PaAOS). У ГПЛ в этом сайте находится остаток аланина, также как у ДЭС чеснока (AsDES), структура участка перегиба I-спирали которого не типична для ДЭС. Остальные ДЭС в этом сайте содержат остаток метионина. В последнем сайте участка перегиба I-спирали у ферментов семейства СУР74 в основном находится остаток ароматической аминокислоты. После этого участка у всех АОС и ГПЛ содержатся два остатка глицина, первый из которых у ДЭС заменен на другой аминокислотный остаток.

Четвертый фермент СУР74 огурца – СУР74С31 – к настоящему времени не охарактеризован, а структура его каталитически важных доменов не позволяет однозначно предсказать тип его каталитической активности. Сходный с ферментом СУР74С31 по последовательностям каталитически важных доменов фермент СУР74С1_CS огурца описан ранее, как 9-специфичная ГПЛ (Matsui *et al.*, 2000). В описанной работе для определения продуктов СУР74С1_CS огурца был использован метод ВЭЖХ, позволяющий только проверить присутствие ожидаемой активности. И поскольку авторы не предполагали присутствие ЭАС активности у этого белка, они ее наличие не проверяли. Для того чтобы выявить все продукты каталитической активности и их реальное соотношение, необходимо использовать другие методы, такие как, например, ГХ-МС. Последовательности ферментов СУР74С1_CS и СУР74С31 довольно сходны (рис. 46). Наиболее значимое различие между последовательностями каталитически важных доменов этих ферментов заключается в замене первого консервативного остатка глицина у фермента СУР74С31. Такая замена обычно встречается у дивинилэфирсинтаз. Вследствие этого, проверку наличия эпоксиалкогольсинтазной активности мы начали именно с этих ферментов – СУР74С1_CS и СУР74С31 огурца.

Эти ферменты относятся к подсемейству СУР74С, которое является одним из крупнейших подсемейств и включает 9/13-АОС (Hamberg, 2000; Itoh *et al.*, 2002) и 9/13-ГПЛ (Matsui *et al.*, 2000; Tijet *et al.*, 2001; Mita *et al.*, 2005; Grechkin *et al.*, 2006; Hughes *et al.*, 2006а,б). Кроме того, согласно требованиям номенклатуры, предъявляемым к подсемействам СУР74 (55% идентичности аминокислотных последовательностей), в подсемейство СУР74С должны входить 9-специфичные ДЭС растений семейства Solanaceae, которые, согласно современной классификации, выделены в отдельное подсемейство СУР74D.

Для изучения каталитических свойств ферментов СУР74С1_CS и СУР74С31 первым необходимым этапом работы было получение соответствующих рекомбинантных ферментов, поскольку использование растительного материала как источника ферментов нерационально вследствие низкого выхода ферментов, низкой стабильности и быстрой потери активности (Gigot *et al.*, 2010). Продукция рекомбинантных ферментов микроорганизмами имеет ряд преимуществ перед экстракцией из растительных источников: (1) независимость от сельскохозяйственных условий, времени года, возраста растений и изменчивости, (2) отсутствие нежелательных компонентов, таких как полифенолы и ДНК, (3) практически нулевые количества других ферментов, метаболизирующих гидроперекиси, и (4) хорошо отработанные методы очистки для получения гомогенного фермента с желаемой специфичностью. Гены ферментов СУР74 успешно экспрессируются в бактериях, дрожжах и растительных клетках. Помимо растительных ферментов СУР74, в бактериях были получены, например, ГПЛ цианобактерии *N. punctiforme* (Brash *et al.*, 2014), химерный белок метиловых бактерий, состоящий из ЦОГ-подобного белка и ГПЛ (Lee *et al.*, 2008), и химерный белок коралла, состоящий из ГПЛ и ЛОГ (Teder *et al.*, 2015).

В ряде исследований показано, что добавление детергента важно для выделения нативного фермента, а также для очистки и повышения растворимости рекомбинантных ферментов СУР74. Кроме того, некоторые авторы

также сообщали о положительном влиянии детергента на активность и стабильность фермента. В качестве детергента в основном используется Triton X-100 (Gardner *et al.*, 1991; Fauconnier *et al.*, 1997; Tijet *et al.*, 2000; Suurmeijer *et al.*, 2000; Koeduka *et al.*, 2003; Santiago-Gómez *et al.*, 2007; Mu *et al.*, 2012), поливинилполипирролидон (Matsui *et al.*, 1991; Shibata *et al.*, 1995; Santiago-Gómez *et al.*, 2007; Hornostaj, Robinson, 1999, 2000; Xiong *et al.*, 2012), полиоксиэтилен-10-тридециловый эфир (Emulphogene) (Hughes *et al.*, 2006а,б,в; De Domenico *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2006, 2008) и додецилмальтозид (Panagakou *et al.*, 2013). Помимо детергентов используются добавки для улучшения каталитической активности и/или стабильности, такие как глицерин (Padilla *et al.*, 2010; Salas, Sánchez, 1998; Long *et al.*, 2010), сахароза (Suurmeijer *et al.*, 2000; Long *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2008), дитиотреитол (ДТТ) (Fukushige, Hildebrand, 2005; Hornostaj, Robinson, 2000; Xiong *et al.*, 2012; Matsui *et al.*, 1992), соли NaCl, Na₂SO₄ и KCl (Koeduka *et al.*, 2003; Mu *et al.*, 2012; Hall *et al.*, 2008; Jacopini *et al.*, 2017) и глицин (Hall *et al.*, 2008; Jacopini *et al.*, 2017). Реакции, катализируемые ферментами CYP74, являются очень быстрыми, однако скорость каталитической реакции может быстро снижаться из-за инактивации. Считается, что инактивация, описанная также для других цитохромов P450, вызвана промежуточным продуктом – алкоксирадикалом, повреждающим сульфгидрильную группу фермента, необходимую для каталитической активности (Santiago-Gómez *et al.*, 2007; Matsui *et al.*, 1992). Было изучено влияние добавления инактиватора радикалов или антиоксидантов для предотвращения необратимой инактивации ферментов CYP74 на протяжении всей реакции (Noordermeer *et al.*, 2001a; Xiong *et al.*, 2012; Āinčala *et al.*, 2015). Было показано, например, что добавление бутилгидрокситолуола и ДТТ к реакции ГПЛ сохраняет активность фермента и улучшает выход (2E)-гексенала (Xiong *et al.*, 2012). Кроме того, были описаны процедуры поиска оптимальных условий для стабилизации и длительного хранения ферментов CYP74. Оказалось, что для ГПЛ сублимационная сушка в отсутствие детергента является лучшим способом сохранить активность

почти на 100% минимум до 15 недель (Hughes *et al.*, 2009). Неблагоприятное влияние детергента в процессе сублимационной сушки объясняется нарушением конформации гема предположительно вследствие денатурации или необратимых изменений конформации белка. Для повышения стабильности ферментов CYP74 также было исследовано влияние иммобилизации фермента (Liu *et al.*, 2013; Simon *et al.*, 1998; Rehbock, Berger, 1998).

3.2. Получение рекомбинантных ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 огурца

Для клонирования ОРС генов ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 тотальную РНК выделяли из фотосинтезирующих органов (стеблей и листьев) 21-дневных растений огурца. Полученную в результате реакции обратной транскрипции кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами CYP74C1_CS_{cF}/CYP74C1_CS_{cR} и CYP74C31_{cF}/CYP74C31_{cR}, представленными в таблице 3 приложения. Полученные продукты ПЦР длиной около 1500 п.н. (рис. 48) первоначально клонировали в векторе pGEM-T (Promega, США), после чего проверяли их последовательность с помощью ДНК-анализатора ga3130 (Applied Biosystems, США). Последовательности соответствовали генам ферментов CYP74C1_CS (NP_001274399 GI:101211324) и CYP74C31 (XP_004137005 GI: 101211574). ОРС обоих генов включают по 1434 нуклеотидных остатков и кодируют полипептиды длиной 478 аминокислотных остатков. У обоих генов отсутствуют какие-либо последовательности, обеспечивающие транспорт к хлоропластам. После проверки ОРС переклонировали в экспрессирующем векторе pET-23a (Novagen, США) для получения рекомбинантных белков с дополнительными полигистидиновыми последовательностями на С-концах. Для этого прямой и обратный праймеры для амплификации ОРС генов CYP74C1_CS и CYP74C31 сконструировали содержащими сайты рестрикции NdeI и XhoI соответственно.

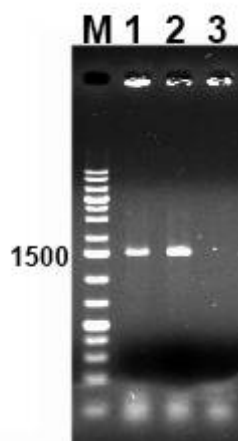


Рис. 48. Электрофореграмма продуктов амплификации, полученных в ПЦР с праймерами CYP74C1_CScF/CYP74C1_CcR и CYP74C31cF/CYP74C31cR и кДНК, полученной в результате реакции обратной транскрипции тотальной РНК, выделенной из фотосинтезирующих органов 21дневных растений огурца.

Рекомбинантные ферменты CYP74C1_CS и CYP74C31 получали в гетерологичных системах экспрессии с использованием клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS). Оба фермента одинаково хорошо нарабатывались в *E. coli* (рис. 49А). Рекомбинантные белки очищали методом металлоаффинной хроматографии (рис. 49Б). Ферментативную активность контролировали с помощью ультрафиолетовой спектроскопии по уменьшению поглощения субстратов – гидроперекисей жирных кислот – при 234 нм.

Рекомбинантные ферменты CYP74C1_CS и CYP74C31 эффективно использовали в качестве субстратов 9-ГПОД, 13-ГПОД, 9-ГПОТ и 13-ГПОТ (таблица 2). Значения константы каталитической активности (k_{cat}) ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 в отношении всех субстратов представлены в таблице 2.

3.3. Идентификация продуктов инкубации ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 с гидроперекисями жирных кислот

Продукты превращения гидроперекисей при участии целевых ферментов анализировали методом ГХ-МС в виде Me эфиров или Me/TMC после или без восстановления NaBH_4 , как описано в разделах 2.18 и 2.20. Струк-

турные формулы продуктов превращения 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ при участии целевых ферментов подсемейства CYP74C представлены на рисунке 50.

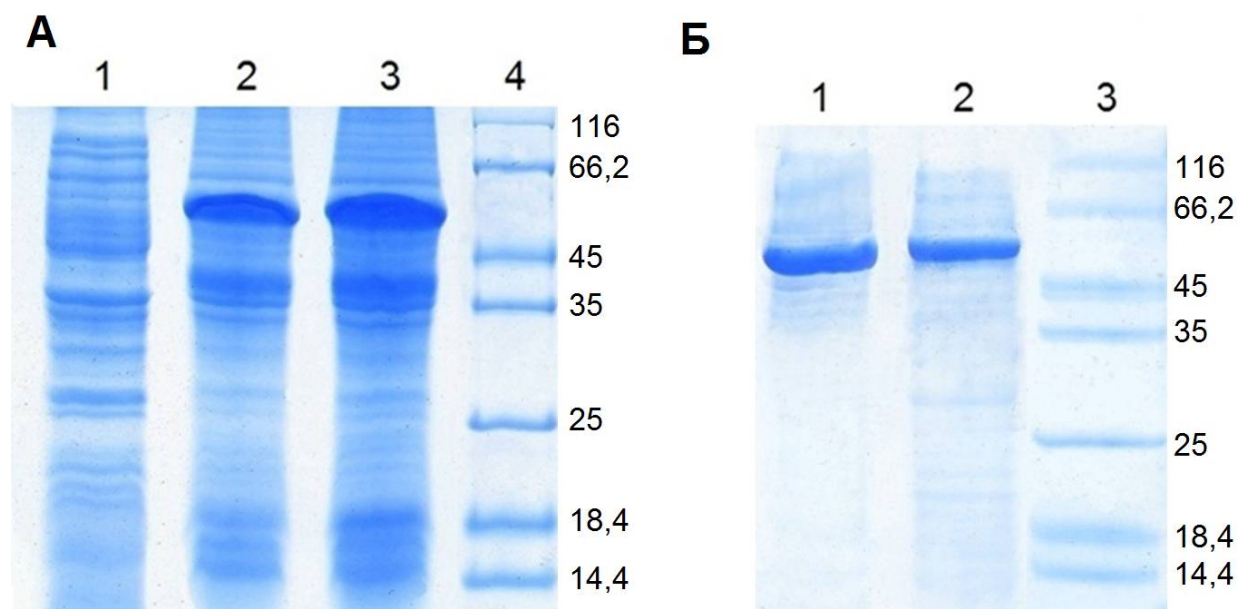


Рис. 49. Результат электрофоретического разделения целевых белков в клетках после индукции (А) и после металлоаффинной хроматографии (Б). (А), Лизат клеток BL21(DE3)pLysS до добавления ИПТГ (1), лизат клеток BL21(DE3)pLysS, трансформированных плазмидами, содержащими ОРС генов *CYP74C1_CS* (2) и *CYP74C31* (3), после добавления ИПТГ; маркер белкового веса SDS-PAGE standards Low Range Protein Ladder (Bio-Rad, USA) (4). (Б), очищенные методом металлоаффинной хроматографии ферменты *CYP74C1_CS* (1), *CYP74C31* (2), маркер белкового веса SDS-PAGE standards Low Range Protein Ladder (Bio-Rad, USA) (3).

Таблица 2. Значения константы каталитической активности (k_{cat} , s^{-1}) ферментов *CYP74C1_CS* и *CYP74C31* в отношении разных субстратов.

Фермент	9-ГПОД	9-ГПОТ	13-ГПОД	13-ГПОТ
<i>CYP74C1_CS</i>	676,4	375,4	596,4	530,9
<i>CYP74C31</i>	455,3	337,6	752,4	377,2

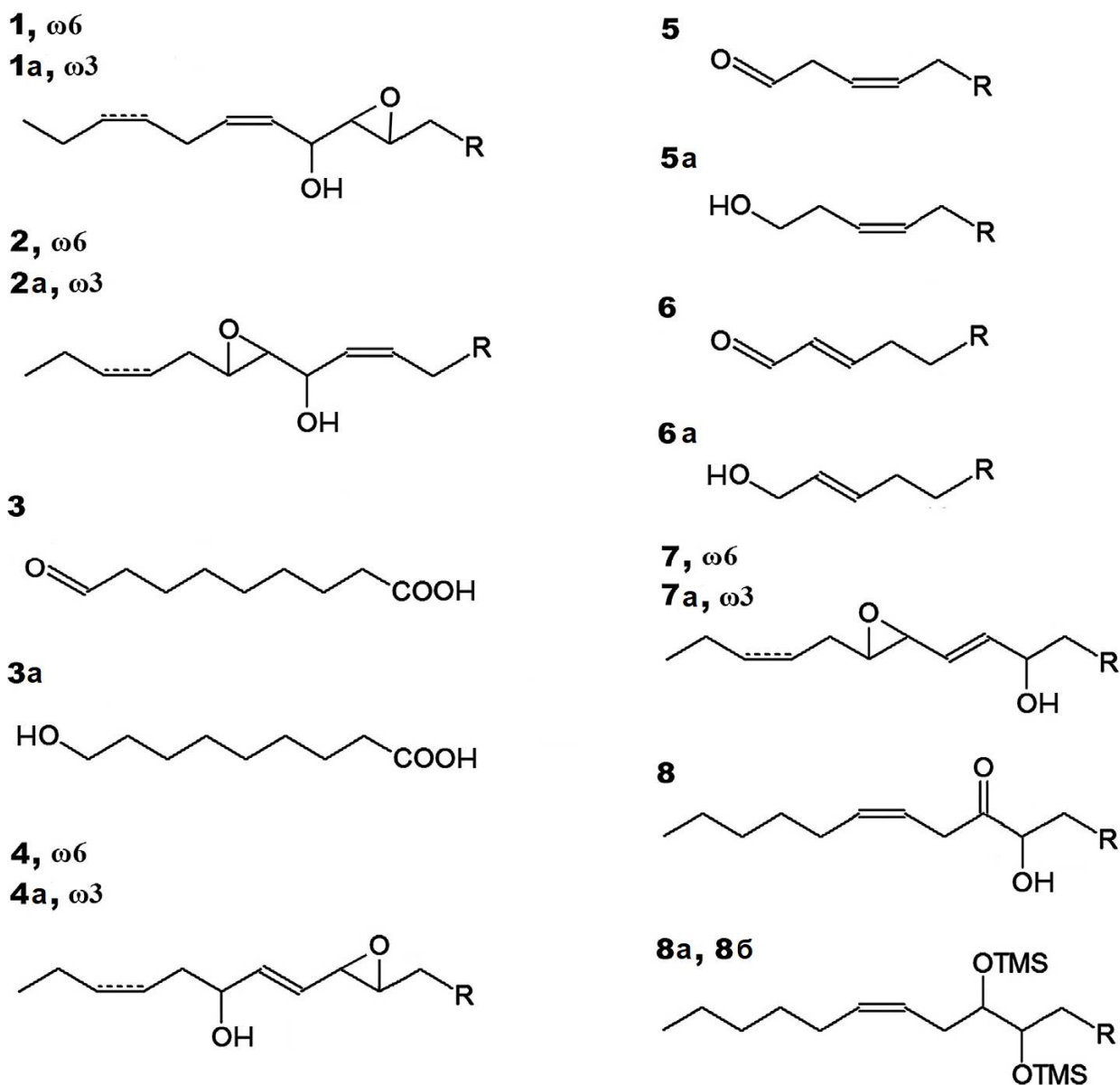


Рис. 50. Структурные формулы продуктов инкубации целевых ферментов подсемейства CYP74C с различными субстратами. **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; **1a**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; **2a**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота; **3**, 9-оксононановая кислота; **3a**, 9-гидроксинонановая кислота; **4**, 9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовая кислота; **4a**, 9,10-эпокси-13-гидрокси-11,15-октадекадиеновая кислота; **5**, (9*Z*)-12-оксо-9-додеценовая кислота; **5a**, (9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценовая кислота; **6**, (10*E*)-12-оксо-10-додеценовая кислота; **6a**, (10*E*)-12-гидрокси-10-додеценовая кислота; **7**, 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота; **7a**, 9-гидрокси-12,13-эпокси-10,15-октадекадиеновая кислота; **8**, 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовая кислота; **8a-8b**, 9,10-дигидрокси-12-октадеценовая кислота (Me/TMC).

На хроматограмме продуктов (Me/TMC, после восстановления NaBH_4) инкубации CYP74C1_CS с 9-ГПОД (рис. 51А) выявили преобладающий продукт **1** (9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота (Me/TMC), масс-спектр которой приведен выше, рис. 46) и два небольших пика **3a** и **4** (масс-спектры и схемы фрагментации представлены на рисунке 52). Соотношение разных соединений в профилях продуктов превращения разных субстратов при участии ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 представлено в таблице 3.

Соединение **1** является 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислотой. Для выяснения детальной структуры соединения **1** (Me эфир) очищали с помощью радио-ВЭЖХ на нормальной фазе после инкубации фермента CYP74C1_CS с $[1-^{14}\text{C}]9$ -ГПОД и регистрировали его спектры ^1H -ЯМР и ^1H - ^1H -COSY. Спектр ^1H -ЯМР (600 МГц, $[^2\text{H}_6]$ бензол, 303 К) имел следующие сигналы: 5,49 ppm {H13, 1H, dt, 11,0 Гц (H12), 7,0 Гц (H14)}, 5,46 ppm {H12, 1H, dd, 7,3 Гц (H11)}, 4,52 ppm {H11, 1H, ddd, 3,3 Гц (H10), 2,7 Гц (OH)}, 3,37 ppm {COOMe, 3H, c}, 2,93 ppm {H9, 1H, ddd 6,1 Гц (H8a), 4,8 (H8b), 2,3 Гц (H10)}, 2,70 ppm {H10, 1H, dd}. Данные соответствовали описанным ранее (Mercier, Agoh, 1974; Thomas *et al.*, 2013) и указывали на *цис*- и *транс*-конфигурацию двойной связи и оксирана соответственно и *эритро* расположение C10 и C11. В целом, полученные данные позволили сделать вывод, что соединение **1** имеет структуру (9*S*,10*S*,11*S*,12*Z*)-9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислоты (Me), продукта эпоксиалкогольсинтазной реакции.

Масс-спектр продукта **3a** (Me/TMC) содержал следующие фрагменты: $[\text{M} - \text{Me}]^+$ при m/z 245 (22%), $[\text{M} - \text{MeO}]^+$ при m/z 229 (4%), при m/z 213 $[\text{245} - \text{MeOH}]^+$ (42%), m/z 138 (6%), m/z 107 (8%), $[\text{CH} = \text{O} - \text{SiMe}_3]^+$ при m/z 103 (23%), m/z 89 (30%), m/z 75 (74%), $[\text{TMC}]^+$ при m/z 73 (100%), m/z 69 (57%) – и точно соответствовал спектру 9-гидроксинонановой кислоты (Me/TMC) (Mukhtarova *et al.*, 2011), что свидетельствовало о ферментативном образовании 9-оксононановой кислоты – продукта спонтанного распада полуцеталя – первичного продукта 9-ГПЛ реакции.

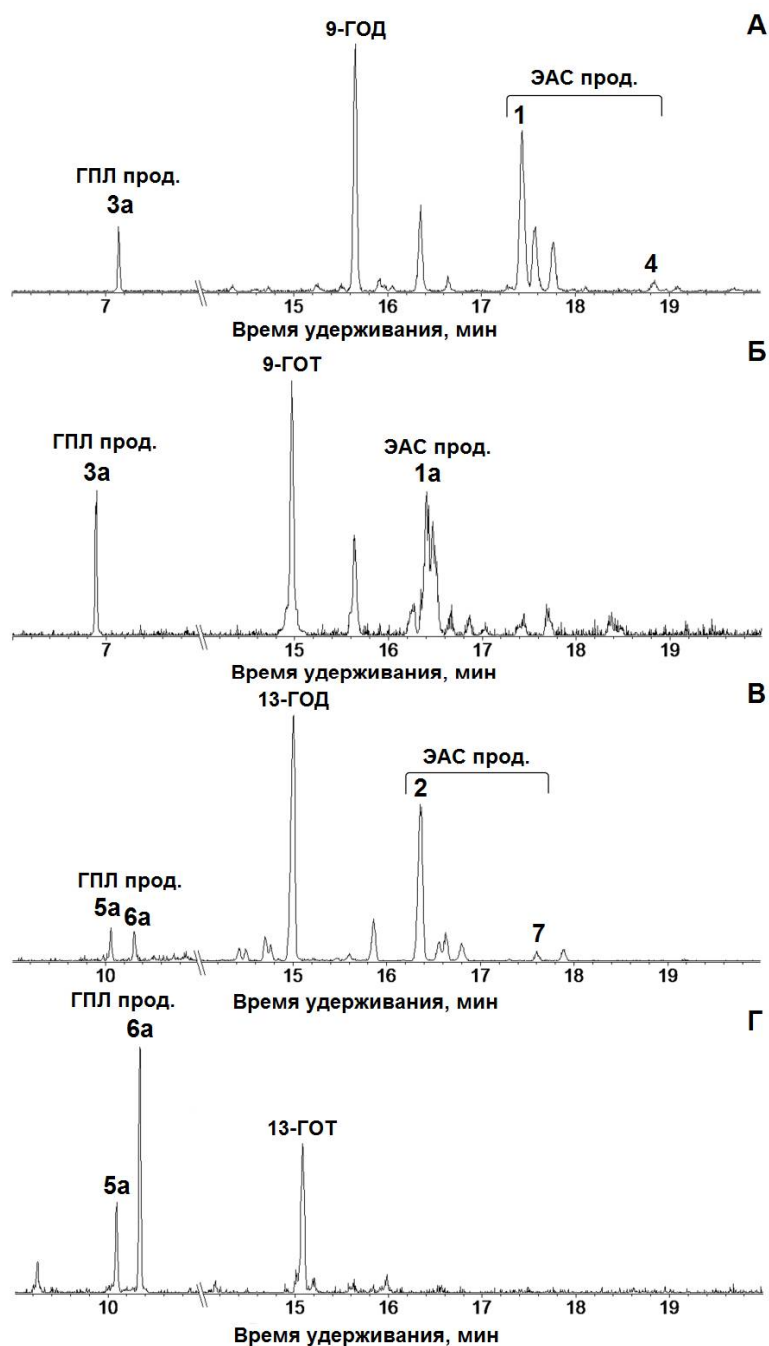


Рис. 51. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS) после восстановления NaBH₄) превращения 9-ГПОД (А), 9-ГПОТ (Б), 13-ГПОД (В) и 13-ГПОТ (Г) при участии фермента CYP74C1_CS: **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота (Me/TMS); **1a**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота (Me/TMS); **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота (Me/TMS); **3a**, 9-гидроксинонановая кислота (Me/TMS); **4**, 9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовая кислота (Me/TMS); **5a**, 12-гидрокси-9-додеценовая кислота (Me/TMS); **6a**, 12-гидрокси-10-додеценовая кислота (Me/TMS); **7**, 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота (Me/TMS). Структурные формулы представлены на рисунке 50.

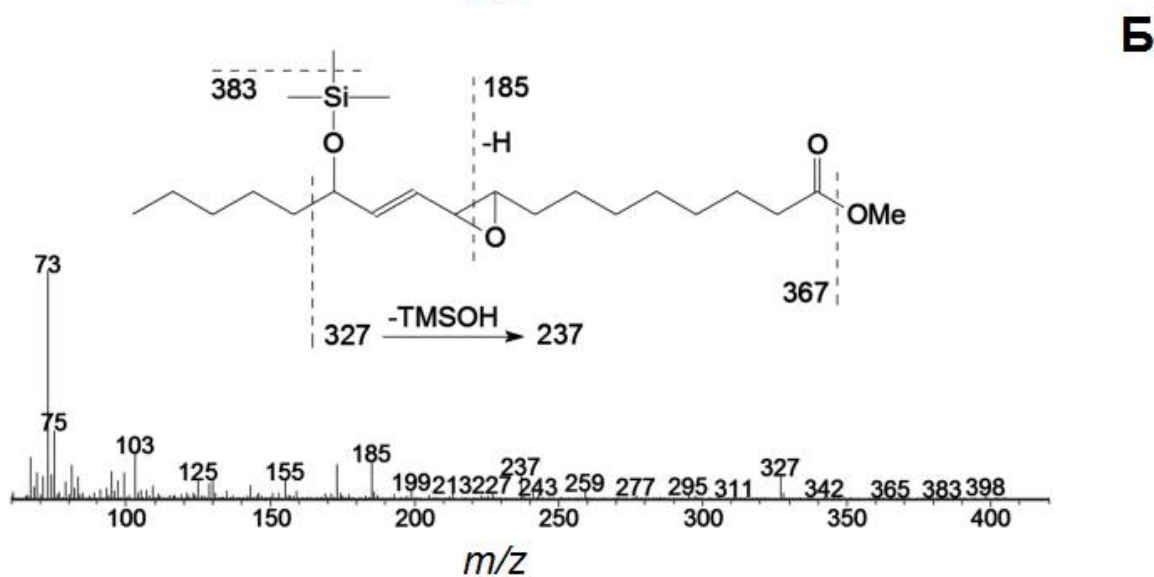
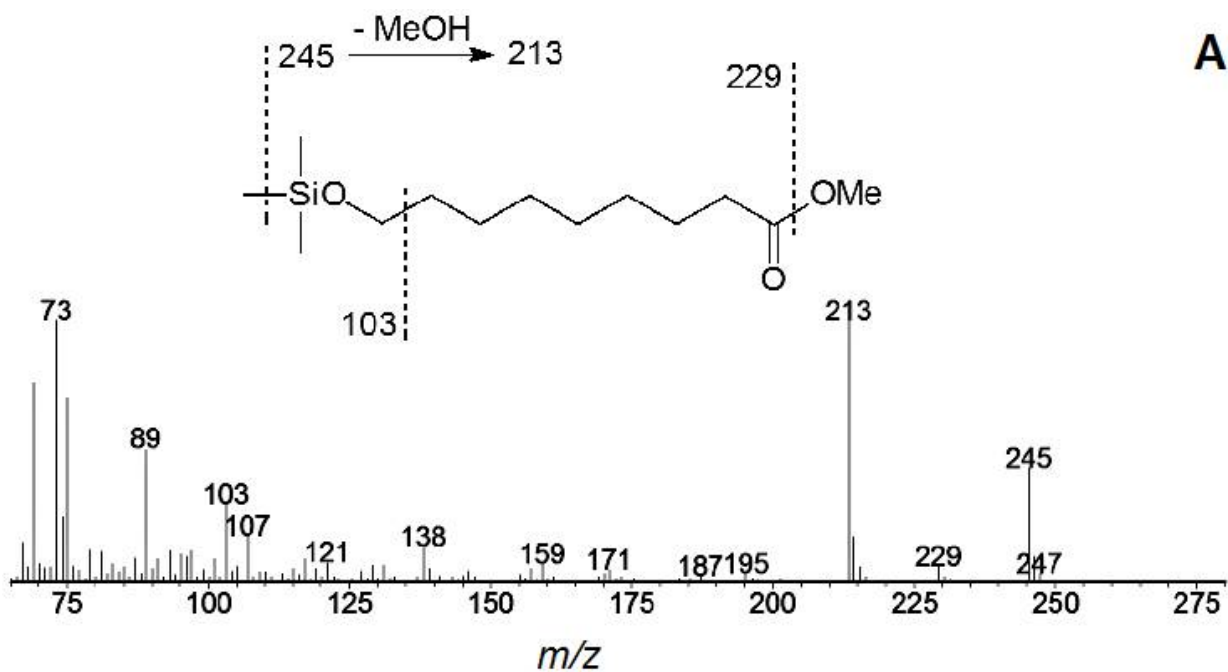


Рис. 52. Масс-спектры и схемы фрагментаций соединений **3a** (А) и **4** (Б) – 9-гидроксинонановой и 9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовой кислот (Me/TМС) соответственно.

Таблица 3. Количественное соотношение (%) ЭАС, ГПЛ и АОС продуктов, образующихся при участии ферментов CYP74C31 и CYP74C1_CS. Оценку проводили, исходя из площадей пиков эпокси спиртов (ЭАС продукты), 9-гидроксинонановой кислоты (восстановленный NaBH₄ 9-ГПЛ продукт), (9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценон и (10*E*)-12-гидрокси-10-додеценон кислоты (восстановленные NaBH₄ 13-ГПЛ продукты), а также 9,10- и 12,13-диола (восстановленные NaBH₄ АОС продукты) в хроматограммах по полному ионному току.

Субстрат	Тип активности	CYP74C31, %	CYP74C1_CS, %
9-ГПОД	АОС	34	Следовая активность
	ГПЛ	8	26
	ЭАС	58	74
9-ГПОТ	АОС	0	0
	ГПЛ	27	38
	ЭАС	73	62
13-ГПОД	АОС	0	Следовая активность
	ГПЛ	85	21
	ЭАС	15	79
13-ГПОТ	АОС	0	0
	ГПЛ	100	100
	ЭАС	0	0

Кроме того, когда продукты (Me/TMC) инкубации фермента CYP74C1_CS с 9-ГПОД анализировали методом ГХ-МС без предварительного восстановления NaBH₄, продукт **3a** отсутствовал. Вместо этого был обнаружен более летучий продукт **3**. Масс-спектр продукта **3** (Me) содержал [M⁺ – H] при *m/z* 185 (0,2%), [M – CO]⁺ при *m/z* 158 (7%), [M – OMe]⁺ при *m/z* 155 (9%), [M – C8/C9]⁺ при *m/z* 143 (21%), 87 (53%), а также ион перегруппиров-

ки метилового эфира Маклафферти при m/z 74 (95%). Спектр соответствовал таковому 9-оксононановой кислоты (Me) (Mukhtarova *et al.*, 2011), таким образом, подтверждая структуру 9-гидроксинонановой кислоты (Me) для соединения **3a**.

Масс-спектр последнего (в порядке элюирования) продукта **4** (Me/TMC) содержал M^+ при m/z 398 (0,1%), $[M^+ - Me]$ при m/z 383 (0,7%), $[M^+ - MeO]$ при m/z 367 (0,5%), $[M^+ - Me(CH_2)_4]$ при m/z 327 (14%), $[M^+ - TMSOH]$ при m/z 308 (2%), $[327 - TMSOH]^+$ при m/z 237 (14%), $[M^+ - C_{10}/C_{18}]$ при m/z 185 (22%), $[M^+ - C_{11}/C_{12}]$ при m/z 173 (10%), m/z 125 (12%), m/z 97 (16%), m/z 75 (39%), $[TMC]^+$ при m/z 73 (100%). Фрагменты при m/z 185 и 173 указывали на присутствие оксирана при C₉,C₁₀ и вторичной спиртовой группировки (TMC) при C₁₃. Таким образом, спектр соответствовал таковому оксиранил винил карбинола (эпоксиспирту, ЭАС продукту) – 9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовой кислоты (Me/TMC). Разделение продуктов (Me) с помощью ВЭЖХ на нормальной фазе позволило очистить продукт **4**, который состоял из двух равных пиков энантиомеров. Их спектры ¹H-ЯМР (таблица 4 приложения) были практически идентичны. Все соотнесенные сигналы подтверждены спектральными данными ¹H-¹H-COSY. Константы спин-спинового взаимодействия $J_{9,10} = 2,0$ Гц и $J_{11,12} = 15,7$ Гц указывали на *транс*-конфигурации оксирана при C₉/C₁₀ и двойной связи при C₁₁/C₁₂ соответственно. В целом, данные подтвердили структуру 13*S* и 13*R* эпимеров эпоксиспирта (9*S*,10*S*,11*E*)-9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовой кислоты (Me) для разделенных продуктов. Таким образом, в результате превращения 9-ГПОД при участии фермента CYP74C1_CS образовывалось два продукта ЭАС активности, один из которых был представлен двумя изомерами.

ГХ-МС профиль продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH₄) превращения 9-ГПОТ при участии фермента CYP74C1_CS практически не отличался от профиля продуктов превращения 9-ГПОД (рис. 51Б). Отличие заключалось в соотношении пиков. Пик **3a** был относительно выше, чем в ре-

зультате превращения 9-ГПОД. Кроме того, в профиле продуктов (Me/TMC), анализируемых без восстановления NaBH_4 , пик **3** (9-оксононановая кислота (Me)) был также выше. Таким образом, фермент CYP74C1_CS в отношении 9-ГПОТ проявлял большую 9-ГПЛ активность, чем в отношении 9-ГПОД.

Помимо продукта **3a**, после 9-ГОТ элюировал дополнительный продукт **1a** (Me/TMC), высота пика которого была чуть выше, чем высота пика **3a**. Его масс-спектр (Me/TMC, рис. 53) содержал следующие фрагменты: M^+ при m/z 396 (0,2%), $[\text{M}^+ - \text{Me}]$ при m/z 381 (0,4%), $[\text{M}^+ - \text{MeO}]$ при m/z 365 (0,1%), $[\text{M}^+ - \text{TMSOH}]$ при m/z 306 (3%), $[\text{M}^+ - \text{C1/C8}]$ при m/z 239 (3%), $[\text{M}^+ - \text{C1/C10}]$ при m/z 197 (23%), m/z 131 (32%), $[197 - \text{TMSOH}]^+$ при m/z 107 (65%), $[\text{TMC}]^+$ при m/z 73 (100%). Масс-спектральные данные, в частности, характерный фрагмент при m/z 197, указывали на структуру оксиранил карбинола со спиртовой группировкой (TMC) при C11 и оксираном при C9/C10, то есть 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновой кислоты (Me/TMC). Каталитическое гидрирование продукта **1a** с последующим метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию описанной выше 9,10-эпокси-11-гидрокси-октадекановой кислоты (Me/TMC), что подтвердило идентификацию соединения **1a**.

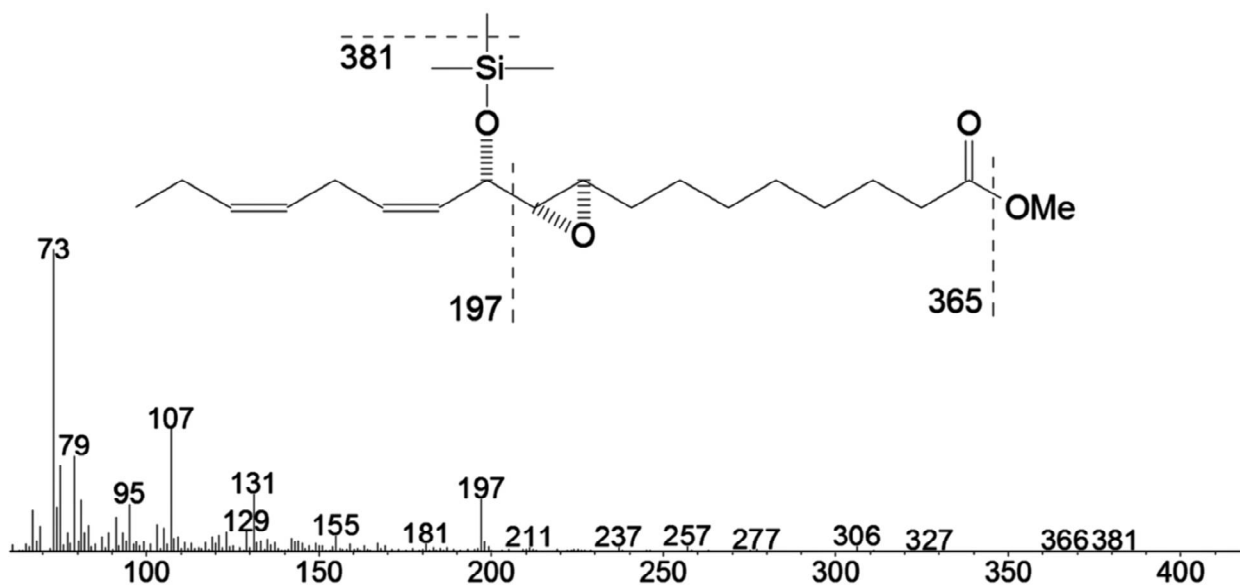


Рис. 53. Масс-спектр и схема фрагментации продукта **1a** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновой кислоты (Me/TMC).

Присутствие этого продукта указывало на ЭАС активность, проявляемую ферментом CYP74C1_CS в отношении к 9-ГПОТ.

Инкубация CYP74C1_CS с 13-ГПОД приводила к образованию двух относительно летучих соединений **5a** и **6a** (Me/TMS после восстановления NaBH₄), см. рисунок 51В. Масс-спектры продуктов **5a** и **6a** (Me/TMS), а также схемы их фрагментации представлены на рисунке 54. Масс-спектр продукта **5a** (Me/TMS) содержал [M – H]⁺ при *m/z* 299 (0,1%), [M – Me]⁺ при *m/z* 285 (1%), [285 – MeOH]⁺ при *m/z* 253 (6%), [M – TMSOH]⁺ при *m/z* 210 (4%), [210 – MeOH]⁺ при *m/z* 178 (12%), *m/z* 159 (11%), [CH₂=O–TMS]⁺ при *m/z* 103 (100%) и [TMS]⁺ при *m/z* 73 (100%). В целом, спектр соответствовал таковому (9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценовой кислоты (Me/TMS), гидроксикислоты, образуемой в результате восстановления NaBH₄ альдокислоты (9*Z*)-12-оксо-9-додеценовой кислоты (**5**), результата спонтанного распада первичного продукта 13-ГПЛ – полуацеталя (Mukhtarova *et al.*, 2011). Каталитическое гидрирование продукта **5a** с последующим метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию соединения, идентифицированного как 12-гидроксидодекановая кислота (Me/TMS) по масс-спектру с выраженными фрагментами [M – Me]⁺ при *m/z* 287 и [M – Me – MeOH]⁺ при *m/z* 255 (Mukhtarova *et al.*, 2011).

Масс-спектр продукта **6a** (Me/TMS), элюируемого почти сразу после пика **5a**, содержал M⁺ при *m/z* 300 (0,6%), [M – Me]⁺ при *m/z* 285 (1%), [285 – MeOH]⁺ при *m/z* 253 (7%), [M – TMSOH – MeOH]⁺ при *m/z* 178 (1%), *m/z* 159 (7%), *m/z* 143 (7%), *m/z* 129 (29%), *m/z* 75 (22%) и [TMS]⁺ при *m/z* 73 (83%). Спектр соответствовал таковому (10*E*)-12-гидрокси-10-додеценовой кислоты (Me/TMS), образованной в результате восстановления NaBH₄ травматина – (10*E*)-12-оксо-10-додеценовой кислоты (**6**) – продукта аллильной изомеризации альдокислоты **5**. Таким образом, соединение **6a** также является продуктом 13-ГПЛ активности. Каталитическое гидрирование продукта **6a** с последующим метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию 12-гидроксидодекановой кислоты (Me/TMS), описанной выше. Помимо

соединений **5a** и **6a** были обнаружены два дополнительных пика менее летучих продуктов **2** и **7** (Me/TMC). Соединение **2** имело структуру 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты. Описание его дано выше.

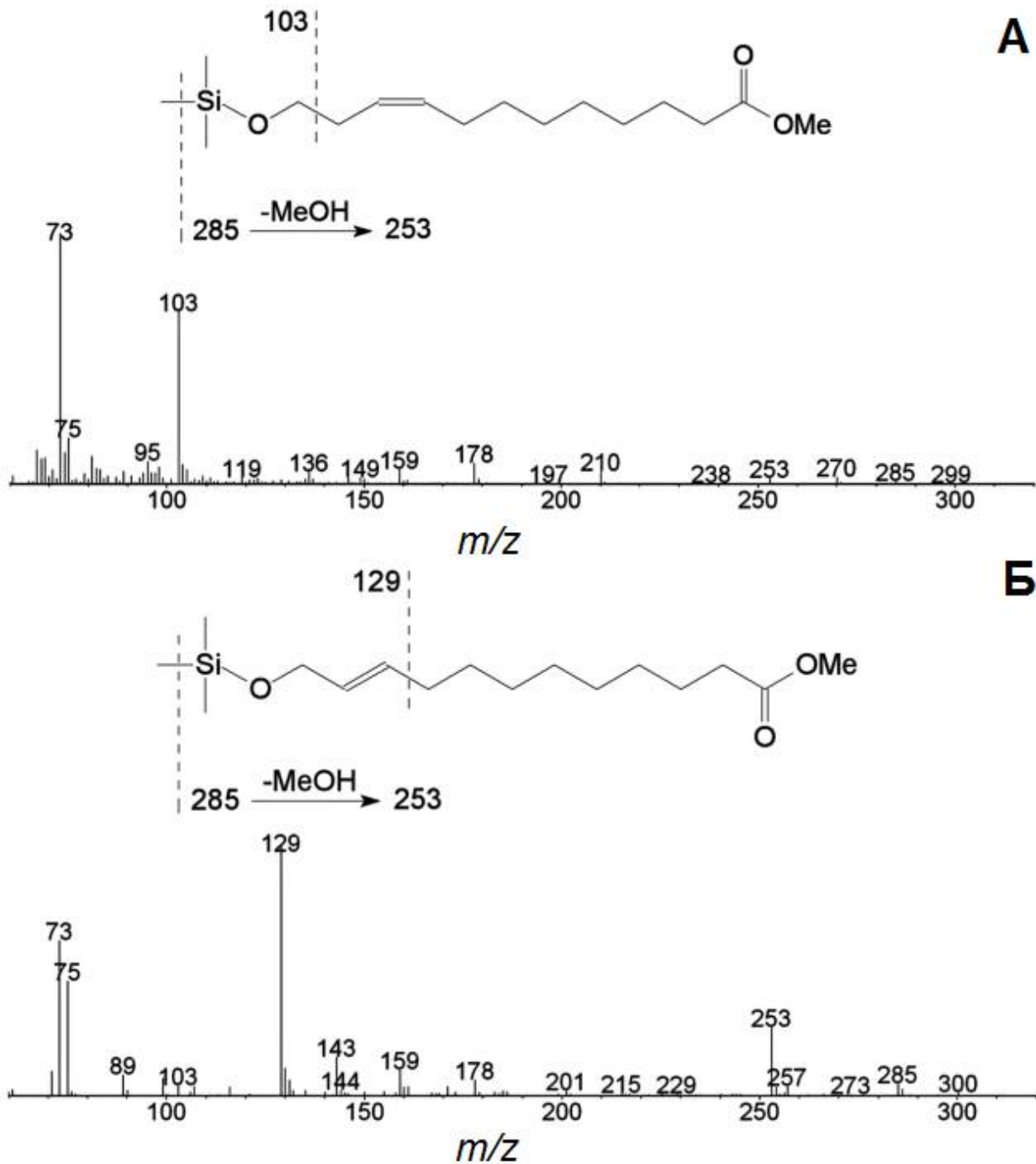


Рис. 54. Масс-спектры и схемы фрагментации продуктов **5a** (А) и **6a** (Б) – (9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценовой и (10*E*)-12-гидрокси-10-додеценовой кислот (Me/TMC) соответственно.

Масс-спектр продукта **7** (Me/TMC) и схема его фрагментации представлены на рисунке 55. Спектр содержал M^+ при m/z 398 (0,5%), $[M - Me]^+$ при m/z 383 (0,5%), $[M - C_{14}/C_{18}]^+$ при m/z 327 (1%), $[M - C_1/C_8]^+$ при m/z 241 (19%), $[TMC - O^+ = CH_2]$ при m/z 103 (44%), m/z 99 (расщепление оксирана при C12/C13) (26%) и $[TMC]^+$ при m/z 73 (100%). Характерный фрагмент при m/z 241 указывал на присутствие вторичной спиртовой группировки (TMC) при C9. Более того, данные указывали на присутствие оксирана в соединении **7** при C12/C13. Каталитическое гидрирование с последующим метилированием и триметилсилилированием превращало продукт **7** в насыщенный аналог, масс-спектр которого содержал $[M - Me]^+$ при m/z 385 (3%), $[M - C_{10}/C_{18}]^+$ при m/z 259 (46%), $[M - C_1/C_8]^+$ при m/z 243 (43%), $[TMC]^+$ при m/z 73 (100%). Этот спектр указывал на структуру 9-гидрокси-12,13-эпоксиоктадекановой кислоты (Me/TMC) для гидрированного продукта и оксиранил винил карбинола – (10*E*)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценной кислоты для соединения **7** (Hamberg, 1996).

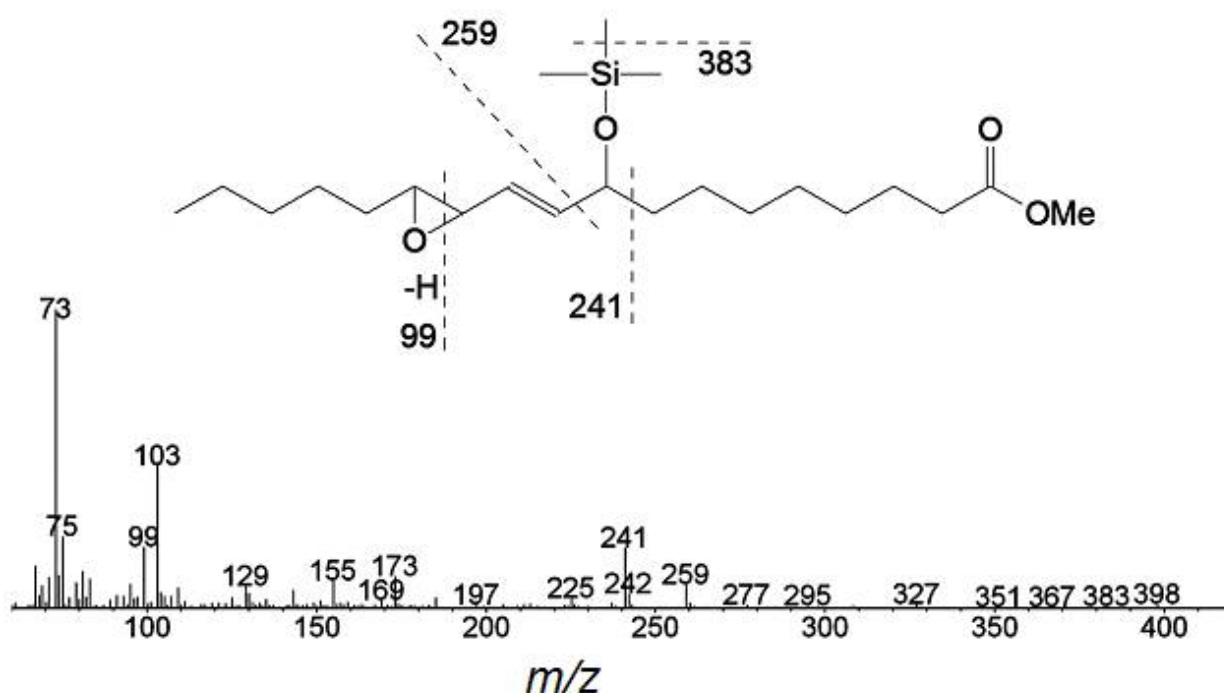


Рис. 55. Масс-спектр и схема фрагментации продукта **7** – 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценной кислоты (Me/TMC).

В результате превращения 13-ГПОТ при участии фермента CYP74C1_CS образовывались описанные выше 13-ГПЛ продукты **5a** и **6a** (рис. 51Г, таблица 3).

Результаты превращения гидроперекисей жирных кислот при участии фермента CYP74C31 были сходными с таковыми превращения при участии фермента CYP74C1_CS с некоторыми отличиями. Во-первых, хроматограмма продуктов превращения 9-ГПОД при участии фермента CYP74C31 (Me/TMS после восстановления NaBH₄) содержала, помимо ЭАС и ГПЛ продуктов, два дополнительных пика **8a** и **8b**, масс-спектры которых были практически идентичными. Масс-спектр соединения **8a** (Me/TMS, рис. 56) содержал M⁺ при *m/z* 472 (0,1%), [M – Me]⁺ при *m/z* 457 (1%), [M – MeO]⁺ при *m/z* 441 (3%), [M – C11/C18]⁺ при *m/z* 361 (12%), [M – C10/C18 + TMS]⁺ при *m/z* 332 (4%), [361 – TMSOH]⁺ при *m/z* 271 (66%), [M – C10/C18]⁺ при *m/z* 259 (66%), [M – C1/C9]⁺ при *m/z* 213 (40%), *m/z* 155 (65%), *m/z* 129 (33%), *m/z* 109 (25%) [CH₂O⁺ – TMS] при *m/z* 103 (34%) и [TMS]⁺ при *m/z* 73 (100%). Масс-спектры соответствовали таковым *эритро* и *трео* стереоизомеров 9,10-диола – 9,10-дигидрокси-12-октадеценовой кислоты (Me/TMS), продукта восстановления NaBH₄ α-кетола **8** – (12*Z*)-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. Кроме того, когда продукты превращения 9-ГПОД при участии фермента CYP74C31 анализировали без восстановления NaBH₄, описанные пики отсутствовали. Вместо этого, присутствовал единственный пик соединения **8** (Me/TMS), масс-спектр (рис. 56) которого содержал следующие фрагменты: M⁺ при *m/z* 398 (0,4%), [M – Me]⁺ при *m/z* 383 (3%) и базовый пик [M – C10/C18]⁺ при *m/z* 259 (100%). Этот спектр соответствовал таковому α-кетола, 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовой кислоты (Me/TMS). Таким образом, фермент CYP74C31 превращал 9-ГПОД в смесь ЭАС, АОС и ГПЛ продуктов в соотношении 58: 34: 8.

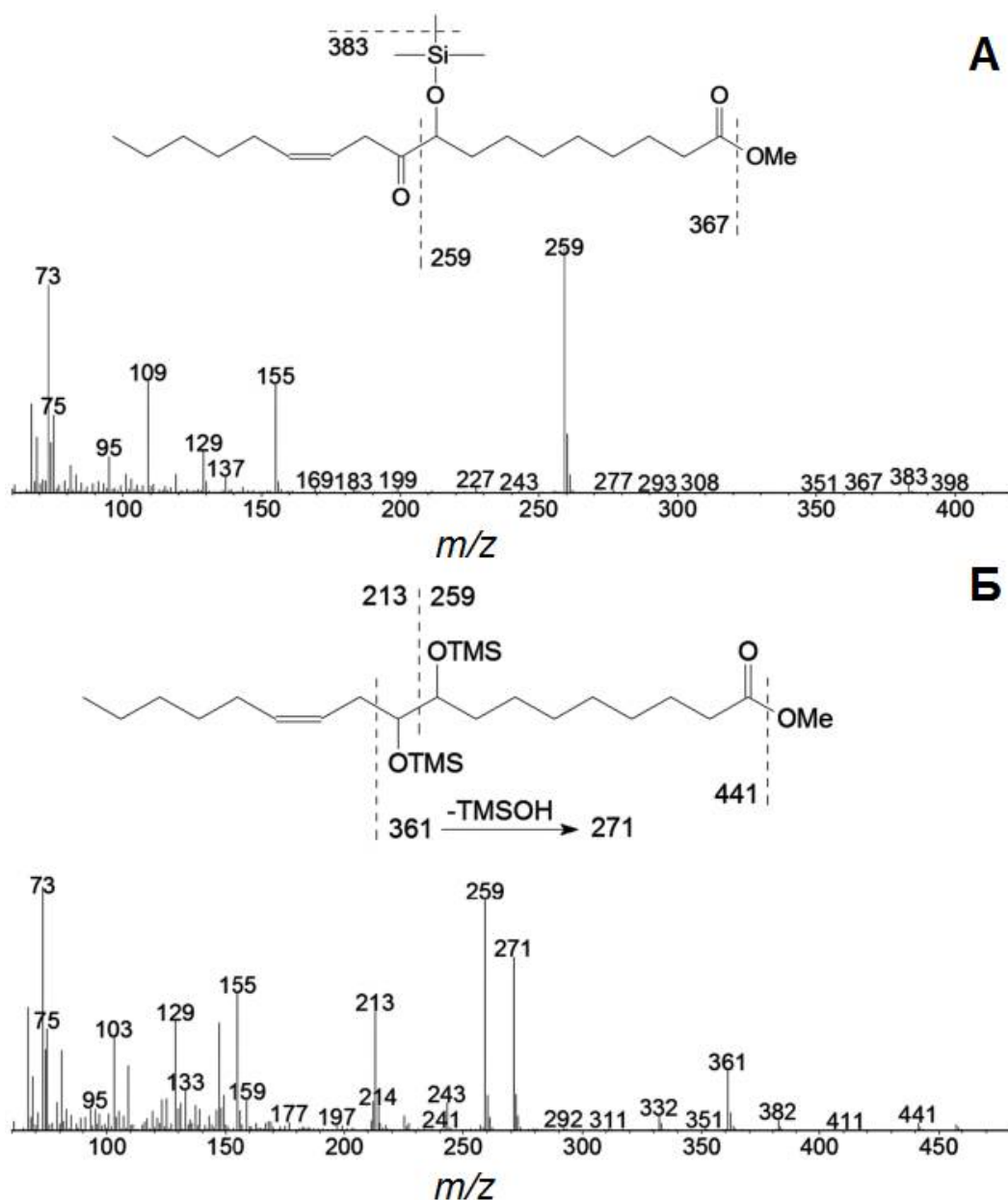


Рис. 56. Масс-спектры и схемы фрагментации продукта **8** (А) и **8а** (Б) – (12Z)-9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовая и 9,10-дигидрокси-12-октадеценовая кислоты (Me/ТМС) соответственно.

Как видно из таблицы 3, соотношения ЭАС и ГПЛ продуктов, образующихся в ходе превращений гидроперекисей при участии ферментов СУР74С1_CS и СУР74С31, немного различаются. Однако сохраняется определенная тенденция – в ряду 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ ЭАС активность падает, тогда как ГПЛ активность возрастает. Ферменты СУР74С1_CS и СУР74С31 проявляют 100% ГПЛ активность в отношении 13-ГПОТ. Таким образом, оба фермента СУР74С1_CS и СУР74С31 продуци-

руют эпокиспирты – оксиранил карбинолы и оксиранил винил карбинолы – в качестве основных или минорных продуктов превращения гидроперекисей жирных кислот (Торопкива *et al.*, 2018а). Для того чтобы понять, является ли это качество описанных выше ферментов характерным только для них, были выбраны дополнительно пять ферментов подсемейства CYP74C, последовательности каталитически важных доменов которых были сходными с таковыми ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31, а именно – ферменты CYP74C2 дыни (*Cucumis melo*), CYP74C4_ST картофеля (*Solanum tuberosum*), CYP74C13_GM сои (*Glycine max*), CYP74C43 табака (*Nicotiana tabacum*) и CYP74C13_MT люцерны (*Medicago truncatula*).

3.4. Получение ферментов CYP74C2, CYP74C4_ST, CYP74C13_GM, CYP74C13_MT и CYP74C43 и изучение их каталитических свойств

Клонирование ОРС гена *CYP74C4_ST* (XP_006365486 GI:102588560) проводили с использованием вектора pET-23a и праймеров CYP74C4cF и CYP74C4cR (таблица 3 приложения), как описано выше. Тотальную РНК выделяли из фотосинтезирующих органов (стеблей и листьев) 21-дневных растений картофеля. ОРС гена *CYP74C4_ST* включает 1365 нуклеотидных остатков и кодирует полипептид длиной 455 аминокислотных остатков. Клонирование ОРС генов *CYP74C13_GM* (XP_00108: 8908: 10037) сои и *CYP74C43* (LOC107825278) табака проводили с использованием вектора pET-32 Ek/LIC и праймеров CYP74C13_GMcF/CYP74C13_GMcR и CYP74C43cF/CYP74C43cR (таблица 3 приложения) методом безлигазного клонирования. Рекомбинантная плазмида pDEST17 (Thermo Fisher Scientific, США), содержащая ОРС гена *CYP74C13_MT* (XP_003606860 GI:11407666), была любезно предоставлена нам доктором Р. Хьюзом (Центр Дж. Иннеса, Великобритания). Получение рекомбинантных ферментов CYP74C4_ST, CYP74C13_GM и CYP74C13_MT с использованием клеток *E. coli* штаммов BL21(DE3)pLysS и Rosetta-gami(DE3)pLysS В соответственно и их очистку проводили, как описано выше (рис. 57).

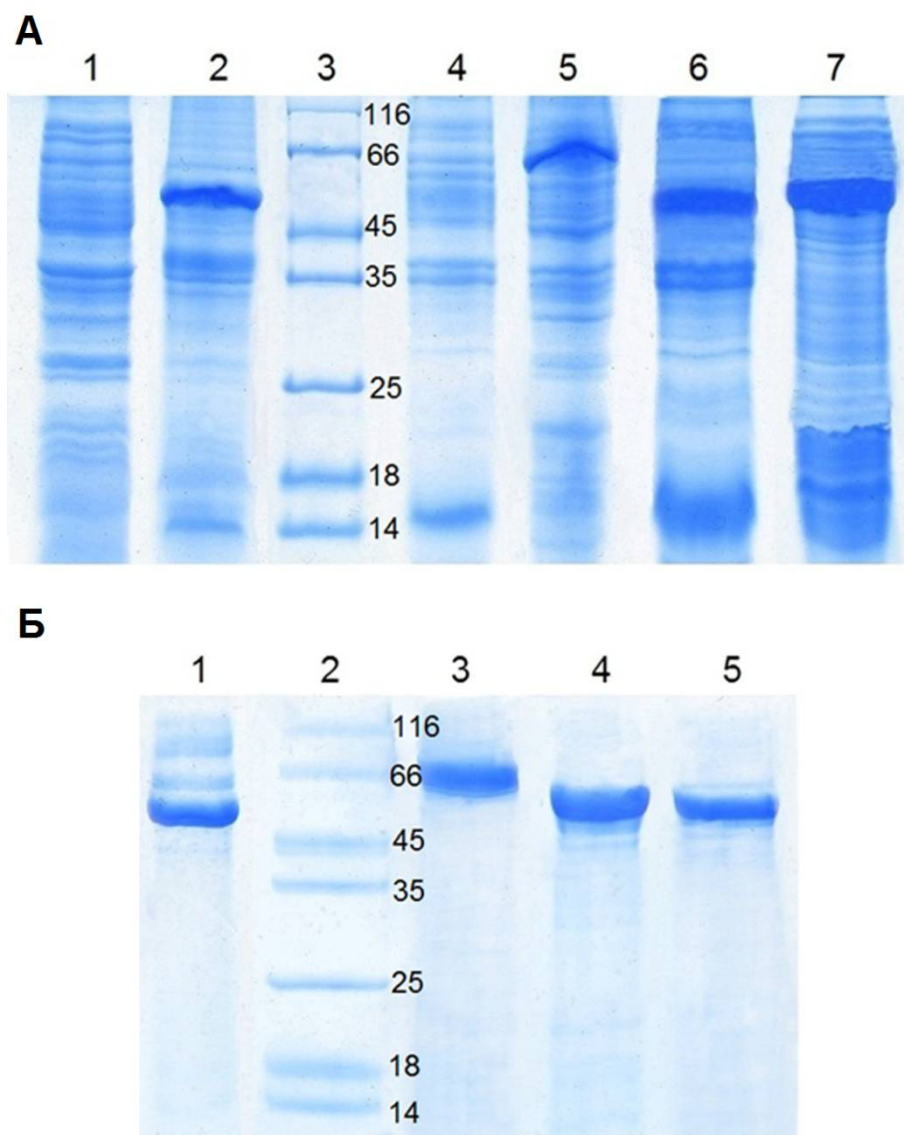


Рис. 57. Результат электрофоретического разделения целевых белков в клетках после индукции (А) и после металлоаффинной хроматографии (Б). (А), Лизат клеток BL21(DE3)pLysS до добавления ИПТГ (1), лизат клеток BL21(DE3)pLysS, трансформированных плазмидой, содержащей ОРС гена *CYP74C4_ST* (2), после добавления ИПТГ; маркер белкового веса SDS-PAGE standards Low Range Protein Ladder (Bio-Rad, USA) (3); лизат клеток Rosetta-gami(DE3)pLysS В до добавления ИПТГ (4), лизат клеток Rosetta-gami(DE3)pLysS В, трансформированных плазмидами, содержащими ОРС генов *CYP74C13_GM* (5) и *CYP74C13_MT* (6), после добавления ИПТГ, предоставленный нам препарат фермента *CYP74C2* (7). (Б), Очищенные методом металлоаффинной хроматографии ферменты *CYP74C2* (1), *CYP74C13_GM* (3), *CYP74C4_ST* (4), *CYP74C13_MT* (5), маркер белкового веса SDS-PAGE standards Low Range Protein Ladder (Bio-Rad, USA) (2).

Полные аминокислотные последовательности целевых ферментов представлены на рисунке 2 приложения. Кроме того, в работе использовали препарат фермента СУР74С2 дыни, любезно предоставленный нам доктором Ф. Брюльманном (Фирмених, Швейцария), который в ходе работы очищали методом металлоаффинной хроматографии (рис. 57), как описано выше.

Рекомбинантный фермент СУР74С13_МТ эффективно использовал в качестве субстрата все четыре гидроперекиси: 9-ГПОД, 13-ГПОД, 9-ГПОТ и 13-ГПОТ (таблица 4). В отличие от этого, ферменты СУР74С2 и СУР74С4_СТ эффективно утилизировали 9-ГПОД, 13-ГПОД и 9-ГПОТ, при этом не катализируя превращения 13-ГПОТ. Фермент СУР74С13_ГМ проявлял в отношении 13-ГПОТ следовую активность. Значения константы каталитической активности (k_{cat}) ферментов СУР74С4_СТ, СУР74С13_ГМ и СУР74С13_МТ в отношении всех субстратов представлены в таблице 4. Значения константы каталитической активности (k_{cat}) фермента СУР74С2 не представлены, так как были определены ранее, не в рамках данной работы (Grechkin *et al.*, 2006).

Анализ продуктов (в виде Me эфиров и Me/ГМС без или после восстановления NaBH_4) превращения гидроперекисей при участии рекомбинантных ферментов СУР74С2, СУР74С4_СТ, СУР74С13_ГМ, СУР74С43 и СУР74С13_МТ, проводили методом ГХ-МС, как описано в разделах 2.18 и 2.20. Все ферменты катализировали образование ЭАС и ГПЛ продуктов. При этом профили продуктов каталитического действия ферментов СУР74С2, СУР74С4_СТ, СУР74С13_ГМ и СУР74С13_МТ были сходными с описанными выше для ферментов СУР74С1_СС и СУР74С31, но соотношение образующих оксипинов варьировалось в зависимости от фермента и субстрата (таблица 5).

Для примера на рисунке 58 приведены хроматограммы разделения продуктов каталитического действия фермента СУР74С13_МТ. Инкубация 9-ГПОД со всеми изученными ферментами (кроме фермента СУР74С2) приводила к образованию в основном эпокси спирта **1** и, в меньшем количестве, 9-

оксононановой кислоты. Фермент СУР74С2 катализировал образование сопоставимых количеств ГПЛ и ЭАС продуктов из 9-ГПОД.

Таблица 4. Значения константы каталитической активности (k_{cat} , с⁻¹) ферментов СУР74С1_CS, СУР74С13_GM и СУР74С31 в отношении разных субстратов.

Фермент	9-ГПОД	9-ГПОТ	13-ГПОД	13-ГПОТ
СУР74С4_ST	1115,9	600,0	1011,6	Не активен
СУР74С13_GM	228,6	173,8	290,0	Следовая активность*
СУР74С13_MT	773,3	867,7	913,3	768,9

Таблица 5. Количественное соотношение (%) ЭАС и ГПЛ продуктов, образующихся при участии ферментов СУР74С2, СУР74С4_ST, СУР74С13_GM и СУР74С13_MT. Оценку проводили, исходя из площадей пиков эпокиспиртов (ЭАС продукты), 9-гидроксинонановой кислоты (восстановленный NaBH₄ 9-ГПЛ продукт) и (9Z)-12-гидрокси-9-додеценон и (10E)-12-гидрокси-10-додеценон кислоты (восстановленные NaBH₄ 13-ГПЛ продукты) в хроматограммах по полному ионному току.

Фермент	9-ГПОД		9-ГПОТ		13-ГПОД		13-ГПОТ	
	ЭАС	ГПЛ	ЭАС	ГПЛ	ЭАС	ГПЛ	ЭАС	ГПЛ
СУР74С2	<u>53</u>	47	0	<u>100</u>	9	<u>91</u>	Следовая активность*	
СУР74С4_ST	<u>82</u>	18	0	<u>100</u>	7	<u>93</u>	Следовая активность*	
СУР74С13_GM	68	32	54	46	47	53	9	91
СУР74С13_MT	<u>84</u>	16	27	<u>73</u>	29	<u>71</u>	2	<u>98</u>

*более 90% субстрата остается непревращенным.

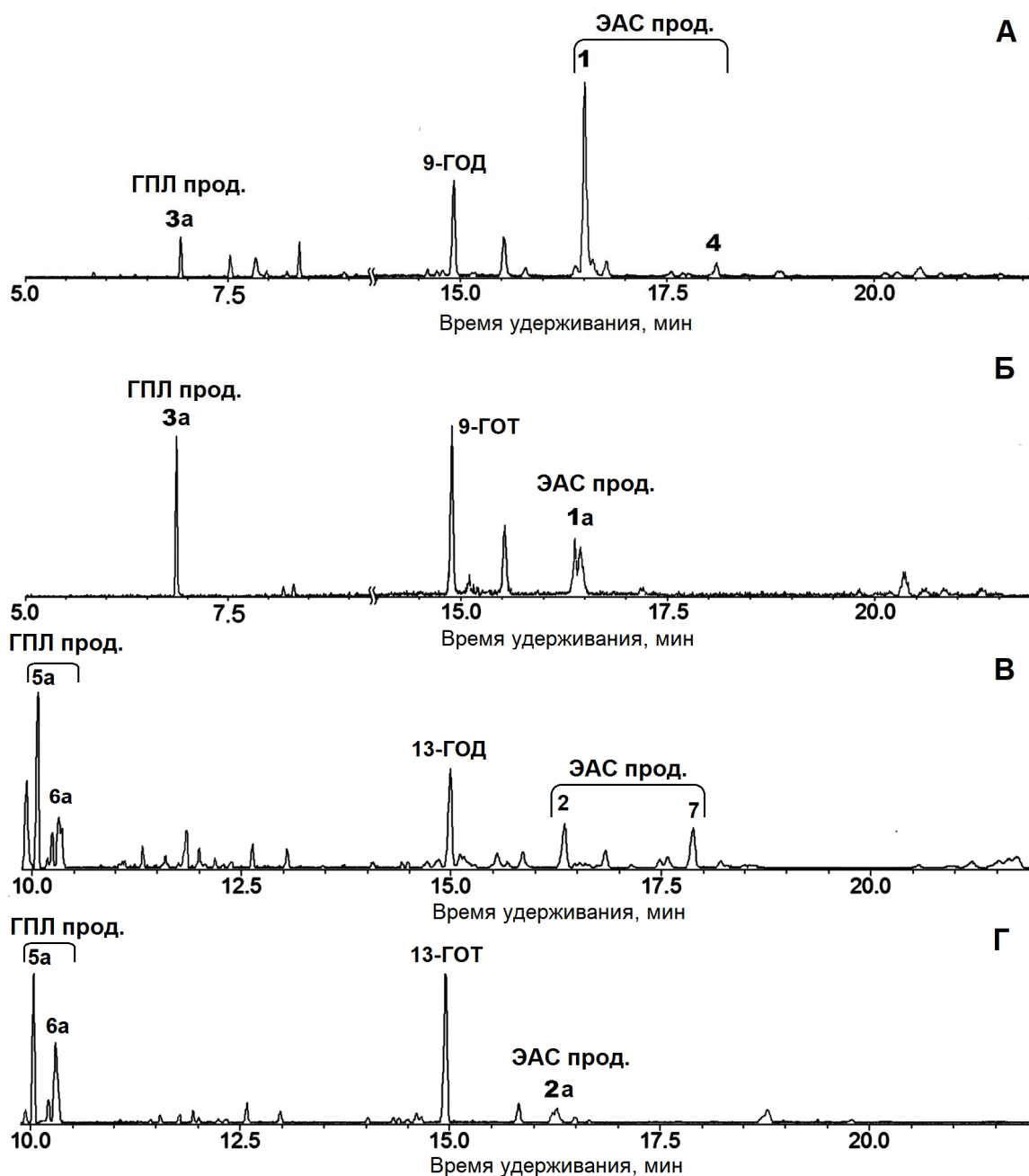


Рис. 58. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC) после восстановления NaBH_4 превращения 9-ГПОД (А), 9-ГПОТ (Б), 13-ГПОД (В) и 13-ГПОТ (Г) при участии фермента СУР74С13_МТ: **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота (Me/TMC); **1a**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота (Me/TMC); **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота (Me/TMC); **2a**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота (Me/TMC); **3a**, 9-гидроксинонановая кислота (Me/TMC); **4**, 9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовая кислота (Me/TMC); **5a**, 12-гидрокси-9-додеценовая кислота (Me/TMC); **6a**, 12-гидрокси-10-додеценовая кислота (Me/TMC); **7**, 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота (Me/TMC). Структурные формулы представлены на рисунке 50.

Превращения других гидроперекисей (9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ) при участии ферментов CYP74C2, CYP74C4_ST и CYP74C13_MT, в отличие от ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31, приводили к образованию в основном ГПЛ продуктов. В некоторых реакциях образовывались эпокиспирты, описанные выше, в минорных количествах (таблица 5). Профили продуктов фермента CYP74C13_GM были наиболее сходными с таковыми ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 (таблица 5), за исключением слабого превращения 13-ГПОТ.

Помимо ГПЛ продуктов, в результате превращения 13-ГПОТ при участии ферментов CYP74C13_GM CYP74C13_MT образовывался минорный продукт **2a**. Масс-спектр соединения **2a** (Me/TMC, рис. 59) содержал $[M - Me]^+$ при m/z 383 (0,3%), $[M - \text{пентенил}]^+$ при m/z 327 (1%), $[M - C_{12}/C_{18}]^+$ при m/z 285 (60%), m/z 155 (10%), m/z 129 (26%) и $[TMC]^+$ при m/z 73 (100%). Каталитическое гидрирование соединения **2a** с последующим метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию описанного выше насыщенного аналога продукта **2** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-октадекановой кислоты (Me/TMC). Все полученные результаты позволили определить соединение **2a** как оксиранил карбинол 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновую кислоту.

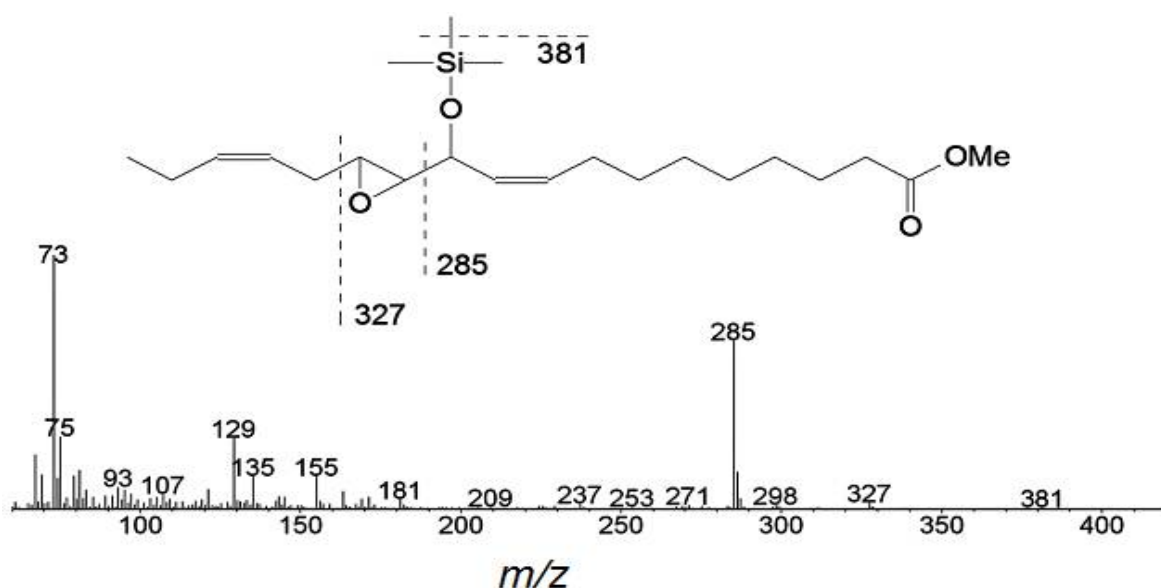


Рис. 59. Масс-спектр и схема фрагментации продукта **2a** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновой кислоты (Me/TMC).

Фермент CYP74C43 отличался от описанных выше. Фермент проявлял наибольшее предпочтение к 9-гидроперекисям жирных кислот (таблица 6). Кроме того, соотношение ГПЛ и ЭАС продуктов, образуемых в результате инкубации фермента CYP74C43 табака с гидроперекисями, отличалось от таковых, образуемых в результате инкубации описанных выше ферментов с гидроперекисями (рис. 60). В реакциях в основном образовывались альдо-кислоты – продукты ГПЛ активности, в то время как оксиранил карбинолы (эпоксиспирты, ЭАС продукты) синтезировались либо в сопоставимом, либо в меньшем количестве. Полученные результаты свидетельствуют, что практически все изученные в данной работе ферменты подсемейства CYP74C, ранее описанные или аннотированные как ГПЛ, проявляют двойную ГПЛ/ЭАС активность. Некоторые из них, такие как фермент CYP74C31, проявляют дополнительную АОС активность (Toporkova *et al.*, 2018a), либо являются ГПЛ с дополнительной ЭАС активностью (например, фермент CYP74C43 табака) (Gorshkov *et al.*, 2021). Описанные ферменты получили следующие тривиальные названия: CYP74C1_CS огурца – CsHPL/EAS (ГПЛ/ЭАС *C. sativus*), CYP74C2 дыни – CmHPL/EAS (ГПЛ/ЭАС *C. melo*), CYP74C4 картофеля – StHPL/EAS (ГПЛ/ЭАС *S. tuberosum*), CYP74C13_GM сои – GmHPL/EAS (ГПЛ/ЭАС *G. max*), CYP74C13_MT люцерны – MtHPL/EAS (ГПЛ/ЭАС *M. truncatula*), CYP74C31 огурца – CsHPL/EAS/AOS (ГПЛ/ЭАС/АОС *C. sativus*) и CYP74C43 табака – NtHPL (ГПЛ *N. tabacum*).

Таблица 6. Кинетические параметры реакций, катализируемых ферментом CYP74C43 табака, и его субстратная специфичность.

Субстрат	$k_{cat}, \text{сек}^{-1}$	$K_M, \text{мкМ}$	$k_{cat}/K_M, \text{мкМ}^{-1} \text{сек}^{-1}$	Субстратная специфичность, %
9-НРОД	1590	73,9	21,5	100
9-НРОТ	1324,6	62,5	21,2	98,6
13-НРОД	704,3	89,3	7,9	36,7
13-НРОТ	610,9	136,6	4,5	20,9

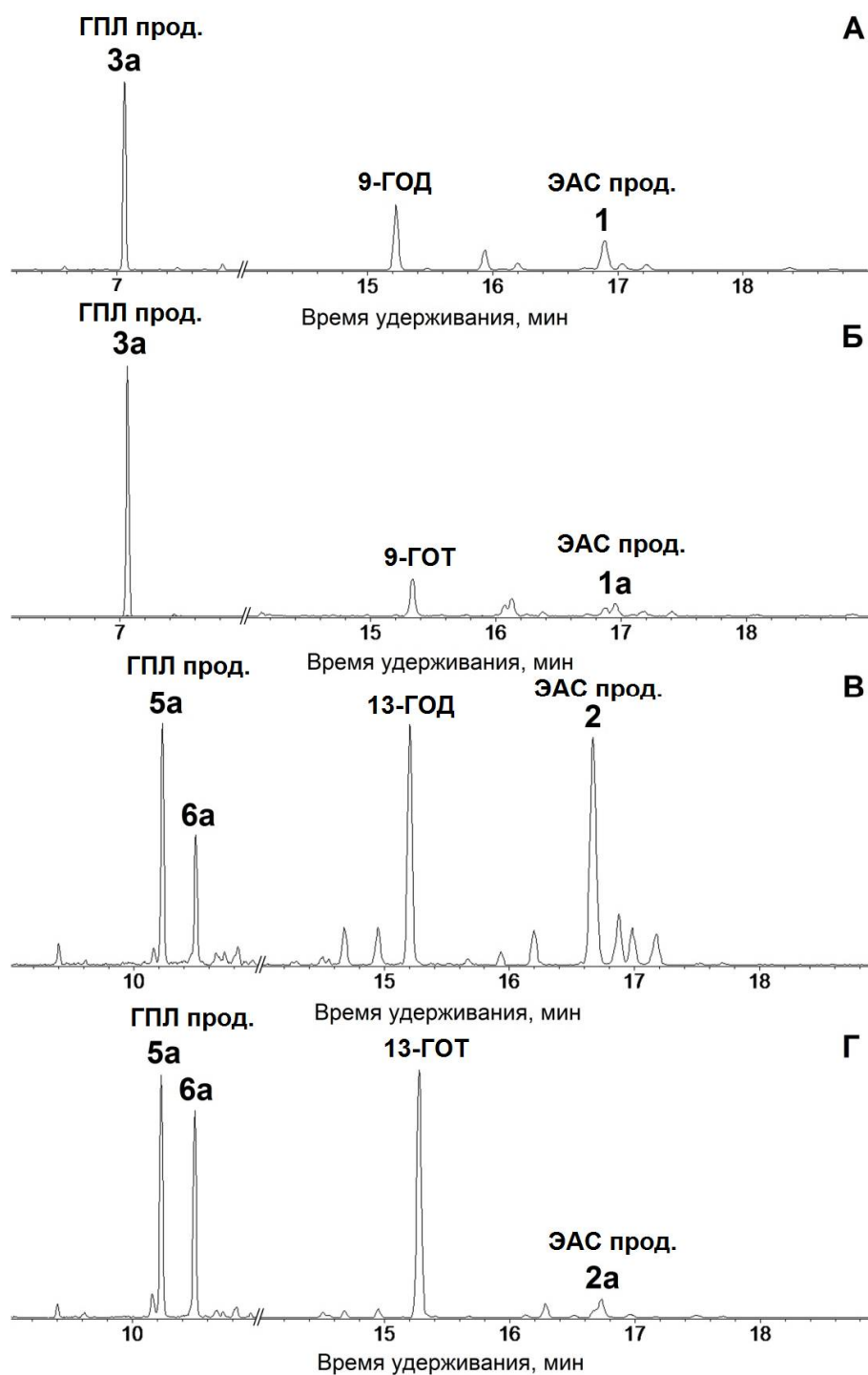


Рис. 60. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А), 9-ГПОТ (Б), 13-ГПОД (В) и 13-ГПОТ (Г) при участии фермента CYP74C43 табака: **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота (Me/TMS); **1a**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота (Me/TMS); **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота (Me/TMS); **2a**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота (Me/TMS); **3a**, 9-гидроксинонановая кислота (Me/TMS); **5a**, 12-гидрокси-9-додеценовая кислота (Me/TMS); **6a**, 12-гидрокси-10-додеценовая кислота (Me/TMS). Структурные формулы представлены на рисунке 50.

Согласно существующим литературным данным, подсемейство CYP74C включает два типа ферментов, а именно – ГПЛ и АОС (Hughes *et al.*, 2009; Matsui *et al.*, 2000; Tijet *et al.*, 2001; Mita *et al.*, 2005; Grechkin *et al.*, 2006; Hughes *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2013). Результаты настоящей работы указывают на двойственное поведение ГПЛ подсемейства CYP74C. В зависимости от субстрата эти ферменты ведут себя в основном как ЭАС или ГПЛ. Один из исследованных ферментов, а именно – фермент CYP74C31, также обладает значительной АОС активностью в отношении 9-ГПОД (таблица 3). Родственный фермент CYP74C1_CS также продуцирует следовые количества α -кетолов **8** и **9** в результате превращения 9-ГПОД и 13-ГПОД (таблица 3). Интересно, что ферменты CYP74C31 и CYP74C1_CS филогенетически удалены от охарактеризованных к настоящему времени АОС подсемейства CYP74C, таких как фермент CYP74C3 (LeAOS3) томата. В целом, изученные ферменты CYP74C демонстрируют универсальный каталитический механизм с возможностью синтеза продуктов ЭАС, АОС и ГПЛ реакции.

После первоначального обнаружения ЭАС активности, проявляемой отдельными ферментами подсемейства CYP74C, мы не были уверены, что образование эпокиспиртов не является случайным. Чтобы избавиться от сомнений, мы расширили количество изученных ферментов CYP74C до семи. Все изученные ферменты стабильно продуцировали эпокиспирты из 9-гидроперекисей и иногда из 13-гидроперекисей, особенно из 13-ГПОД. Таким образом, ЭАС активность является неотъемлемым и неслучайным свойством этих ферментов.

Известны прецеденты образования эпокиспиртов другими ферментами CYP74 высших растений. Например, продуктами превращения 9-ГПОД при участии AtAOS (CYP74A1) *A. thaliana* являются эпокиспирты (Hughes *et al.*, 2008). Однако AtAOS, как и другие ферменты подсемейства CYP74A, представляет собой 13-специфичную АОС, для которой 9-ГПОД не является предпочтительным субстратом. Другими словами, синтез эпокиспиртов не является существенным свойством AtAOS. В отличие от AtAOS, ферменты с

двойной ГПЛ/ЭАС активностью подсемейства CYP74C одинаково эффективны в отношении 9- и 13-гидроперекисей (таблицы 2 и 4). Все они катализируют превращение 9-гидроперекисей в основном в эпокиспирты (таблицы 3 и 5). Следовательно, синтез эпокиспиртов является значимым свойством этих ферментов.

Помимо ферментов, ранее описанных как ГПЛ и охарактеризованных в данной работе как ферменты с двойной активностью ГПЛ/ЭАС, к подсемейству CYP74C относится ряд алленоксидсинтаз. Поэтому следующим этапом необходимо было проверить, присуща ли эпоксиалкогольсинтазная активность алленоксидсинтазам подсемейства CYP74C, как ферментам, обладающим максимальным сходством аминокислотной последовательности с ферментами с двойной активностью ГПЛ/ЭАС. Помимо подсемейства CYP74C, алленоксидсинтазы входят в другое подсемейство – CYP74A. Поэтому для проверки наличия ЭАС активности у алленоксидсинтаз были выбраны следующие ферменты подсемейств CYP74A и CYP74C: LeAOS3 (CYP74C3) томата (*Solanum lycopersicum*), ZmAOS1 (CYP74A19) кукурузы (*Zea mays*), LuAOS (CYP74A1) льна-долгунца (*Linum usitatissimum*) и PrAOS2 (CYP74A8) мха *Physcomitrella patens*.

3.5. Получение алленоксидсинтаз подсемейств CYP74A и CYP74C и изучение их каталитических свойств

Рекомбинантная плаزمида pET-23a, содержащая ОРС гена алленоксидсинтазы LeAOS3 (CYP74C3) томата, любезно предоставлена профессором Г. Хоу (Университет Мичигана, США). Клонирование ОРС генов алленоксидсинтазы ZmAOS1 (CYP74A19) кукурузы, LuAOS (CYP74A1) льна-долгунца и PrAOS2 (CYP74A8) мха *P. patens* проводили с использованием праймеров ZmAOS1cF/ZmAOS1cR, LuAOScF/LuAOScR и PrAOS2cF/PrAOS2cR (таблица 3 приложения). ОРС гена *ZmAOS1* клонировали в векторе pET-32 Ek/LIC методом безлигазного клонирования (Ogorodnikova *et al.*, 2015a), как описано выше; ОРС генов *LuAOS* и *PrAOS2* – в векторе pET-23a по сайтам рестрик-

ции NdeI и XhoI, как описано выше. Получение рекомбинантных ферментов LeAOS3, ZmAOS1, LuAOS и PpAOS2 с использованием клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS и их очистку проводили, как описано выше (раздел 3.2). Анализ продуктов (в виде Me эфиров или Me/TMC без или после восстановления NaBH₄) превращения гидроперекисей жирных кислот при участии LeAOS3, ZmAOS1, LuAOS и PpAOS2 проводили, как описано выше.

По результатам ГХ-МС анализа (рис. 61) основным регистрируемым продуктом превращения предпочтительного субстрата – 9-ГПОД – при участии LeAOS3 был α -кетол **8**, который в результате восстановления с помощью NaBH₄ превращался в соответствующие виц-диолы **8a** и **8b** (рис. 61A, 62). Описание α -кетола **8**, а также соответствующих виц-диолов дано выше (раздел 3.3, рис. 56). α -Кетол **8** является продуктом гидролиза окиси аллена (12Z)-9,10-эпокси-(10,12)-октадекадиеновой кислоты (9,10-ЭОД) – первичного короткоживущего продукта АОС. Описать это соединение удалось с помощью технологии метанольного траппинга, в результате которого окись аллена превращалась в метоксикетон (рис. 63). С помощью метода хирально-фазовой ВЭЖХ показано, что образующийся α -кетол **8** на 93% является (9R)-энантиомером, то есть его образование протекает ферментативно (Grechkin *et al.*, 2008; Toporkova *et al.*, 2020a).

Дополнительным продуктом превращения 9-ГПОД при участии LeAOS3 был циклопентенон – *цис*-10-оксо-11-фитоеновая кислота (*цис*-10-ОФЕК, рис. 64), восстановленным с помощью NaBH₄ производным которой, выявляемым на хроматограмме, был циклопентанол 10-гидроксифитоеновая кислота (Me/TMC, рис. 64). 10-Гидроксифитоеновая кислота представлена на хроматограмме в виде пары пиков диастереомеров со временем удерживания около 15 минут (рис. 61A). При этом по результатам стерического анализа показано, что *цис*-10-ОФЕК, образуемая при участии LeAOS3, представляет собой рацемическую смесь 9S,13S- и 9R,13R энантиомеров. Впоследствии, *цис*-10-ОФЕК нами также была обнаружена в корнях кукурузы, причем в данном случае образование 10-ОФЕК протекало стереоспецифически, по-

скольку на 93% она представляла собой 9*S*,13*S*-энантиомер (рис. 65, Ogorodnikova *et al.*, 2015). Способность LeAOS3 производить циклопентенон 10-ОФЕК может быть объяснено двумя различными причинами: во-первых, способностью самого фермента катализировать циклизацию окиси аллена (Grechkin *et al.*, 2008), во-вторых, образованием необычного (10*Z*)-изомера окиси аллена, способного к циклизации (Brash *et al.*, 2013).

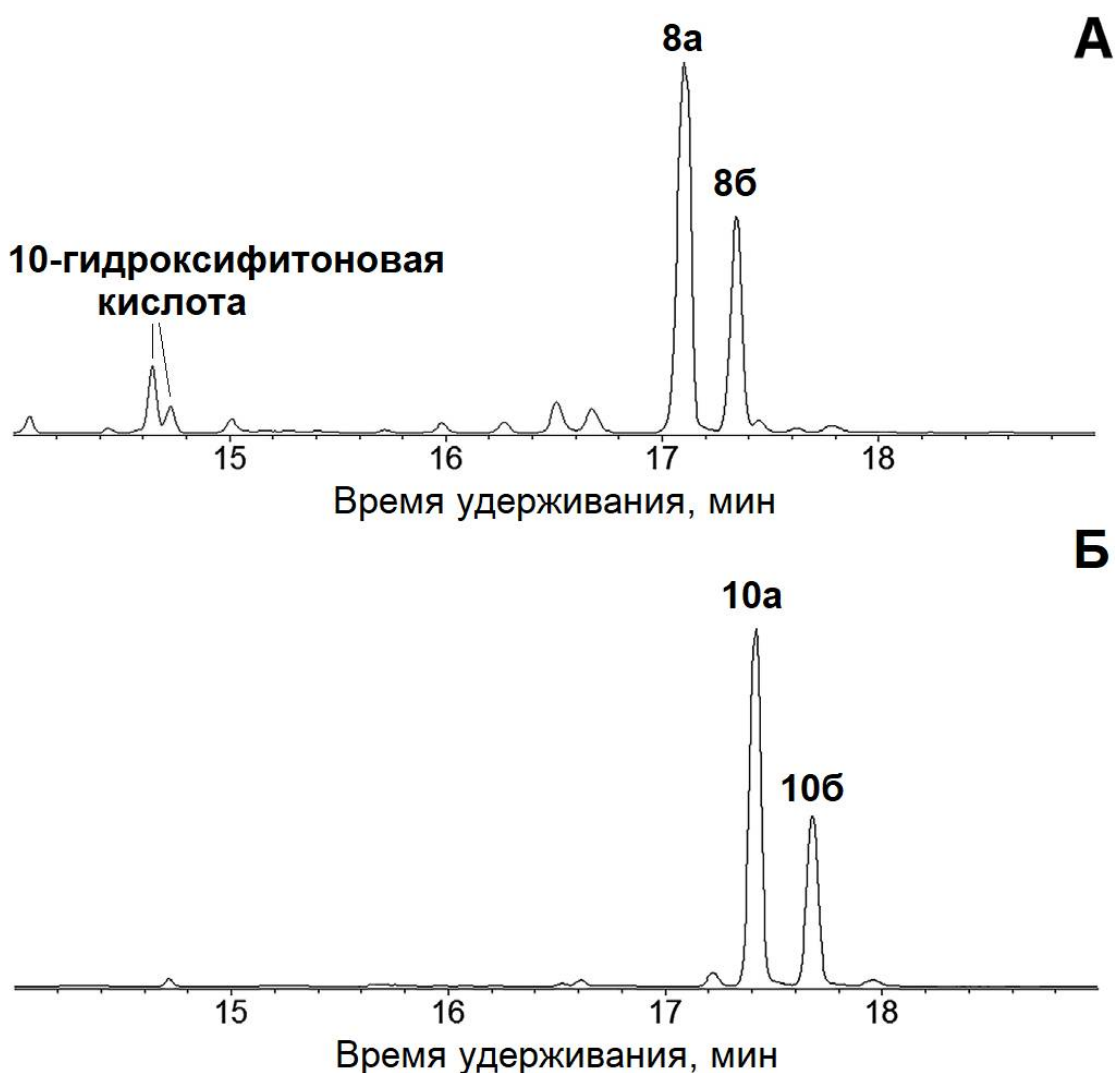


Рис. 61. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А) и 13-ГПОД (Б) при участии LeAOS3. **8a-8b**, 9,10-дигидрокси-12-октадеценовая кислота (Me/TMS); **10a-10b**, 12,13-дигидрокси-9-октадеценовая кислота (Me/TMS). Структурные формулы представлены на рисунке 63.

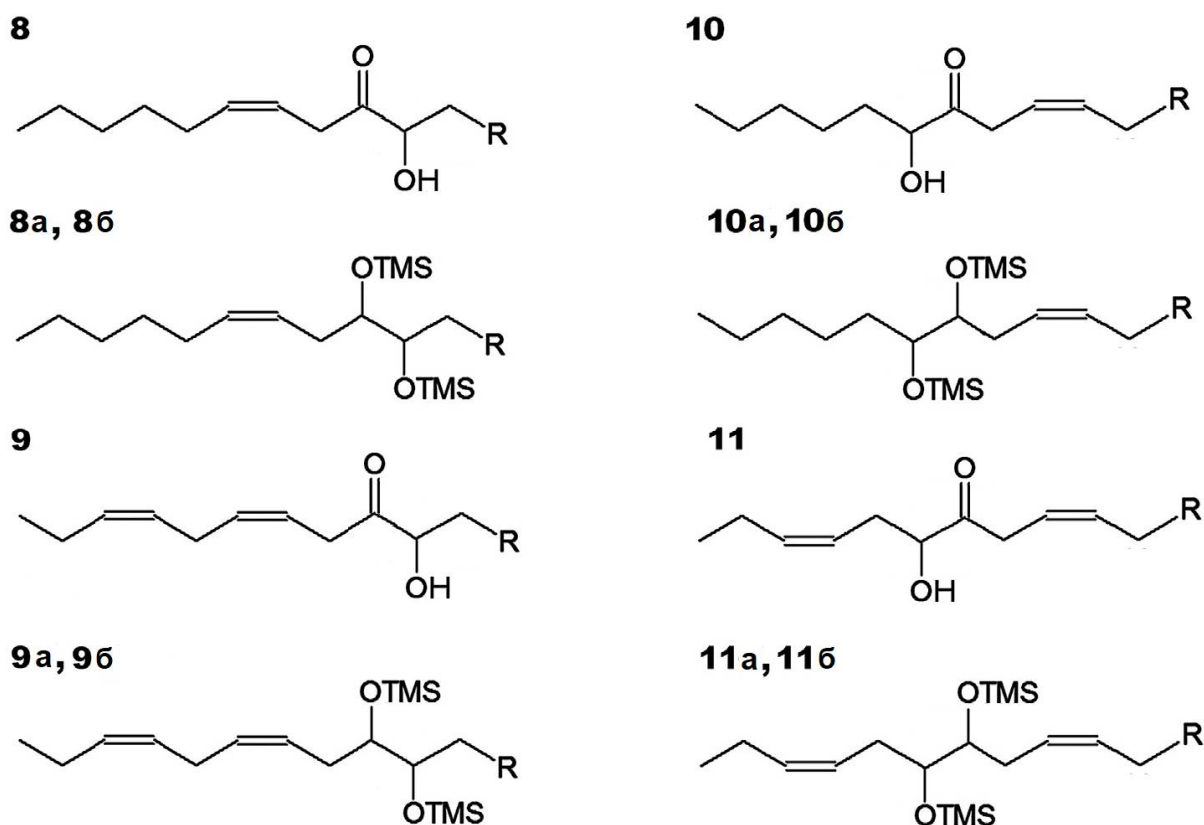


Рис. 62. Структурные формулы продуктов алленоксидсинтазной активности. **8**, 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовая кислота; **8a-8b**, 9,10-дигидрокси-12-октадеценовая кислота (Me/TMS); **9**, 9-гидрокси-10-оксо-12,15-октадекадиеновая кислота; **9a-9b**, 9,10-дигидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота (Me/TMS); **10**, 12-оксо-13-гидрокси-9-октадеценовая кислота; **10a-10b**, 12,13-дигидрокси-9-октадеценовая кислота (Me/TMS); **11**, 12-оксо-13-гидрокси-9,15-октадекадиеновая кислота; **11a-11b**, 12,13-дигидрокси-9,15-октадекадиеновая кислота (Me/TMS).

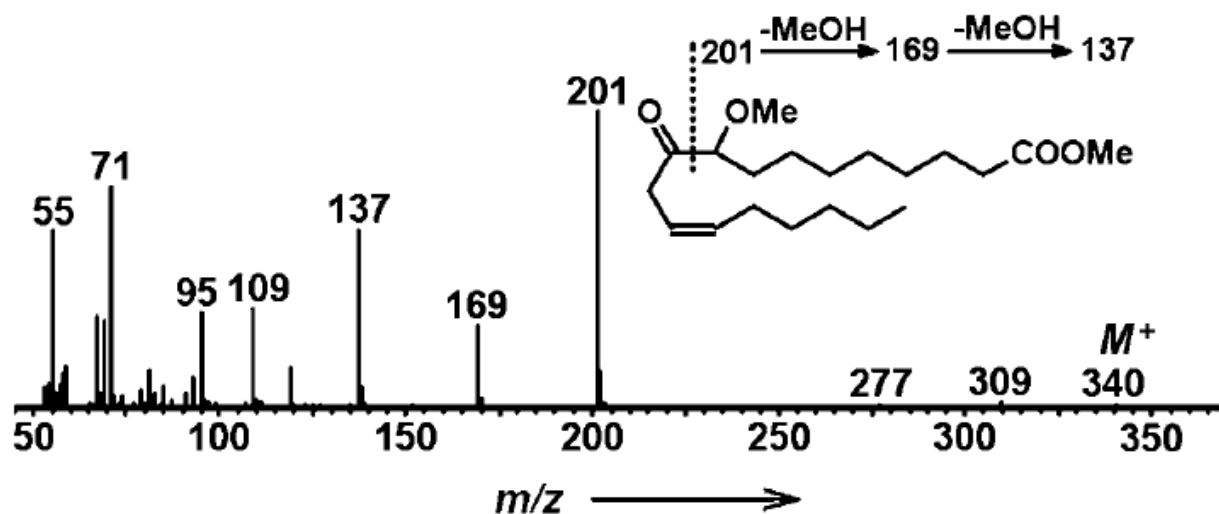


Рис. 63. Масс-спектр и схема фрагментации метоксикетона (Me) – производного 9,10-ЭОД.

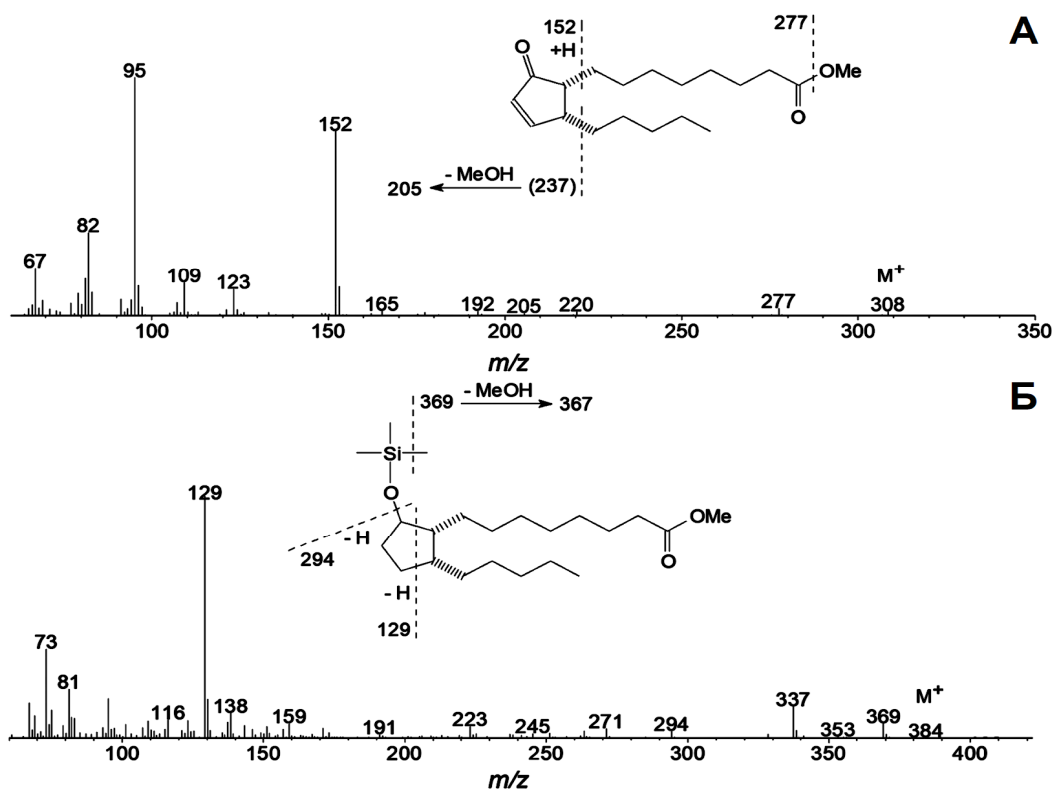


Рис. 64. Масс-спектры и схемы фрагментаций (А) *цис*-10-оксофитоеновой кислоты (Me), (Б) 10-гидроксифитоеновой кислоты (Me) – продукта восстановления NaBH_4 *цис*-10-ОФЕК.

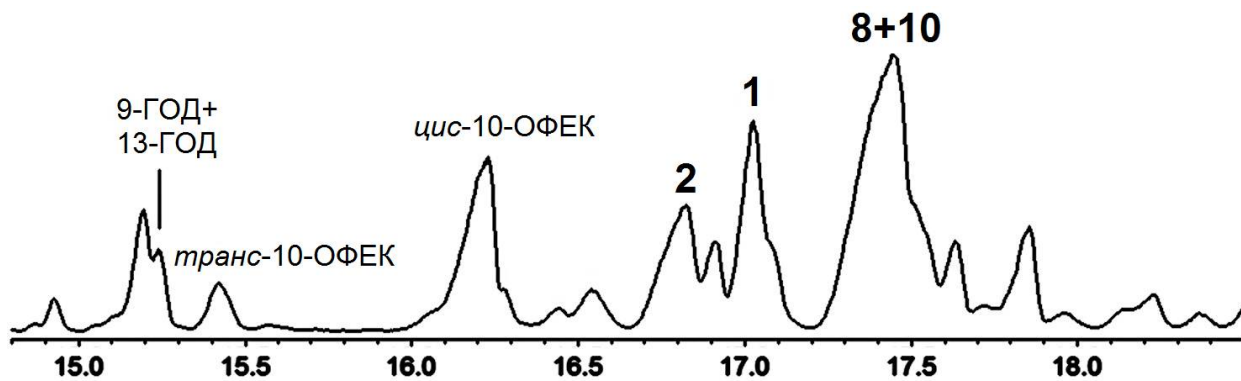


Рис. 65. Хроматограмма по полному ионному току продуктов инкубации (Me/TМС без восстановления с помощью NaBH_4) линолевой кислоты с бесклеточным препаратом корней семидневных проростков кукурузы. **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; **8**, 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовая кислота; **10**, 12-оксо-13-гидрокси-9-октадеценовая кислота.

Таким образом, в отношении 9-ГПОД LeAOS3 является мультифункциональным ферментом, катализирующим не только синтез, но также гидролиз и циклизацию 9,10-ЭОД (Grechkin *et al.*, 2008). При этом циклизация протекает нестереоспецифически. Дополнительным минорным продуктом в описываемой реакции была 9-оксононановая кислота (**3a**) – продукт 9-ГПЛ активности (Toporkova *et al.*, 2008).

Превращение 13-ГПОД при участии LeAOS3 (рис. 61Б) приводило к образованию только α -кетола **10** – (9Z)-12-оксо-13-гидрокси-9-октадеценовой кислоты (рис. 66, Hamberg, 1987), которая в результате восстановления с помощью NaBH₄ превращалась в соединения **10a** и **10b**, имеющие одинаковые масс-спектры (Me/TMC, рис. 66): M⁺ при *m/z* 472 (0,1%), [M – Me]⁺ при *m/z* 457 (0,5%), [M – MeOH]⁺ при *m/z* 441 (2%), [M – TMSOH – H]⁺ при *m/z* 381 (0.6%), [M – C13/C18]⁺ при *m/z* 299 (32%), [M – C1/C11]⁺ при *m/z* 275 (40%), [M – C12/C18 + TMS]⁺ при *m/z* 270 (15%), [275 – TMSOH]⁺ при *m/z* 185 (27%), [M – 299]⁺ при *m/z* 173 (61%), *m/z* 143 (4%) и [TMC]⁺ при *m/z* 73 (100%).

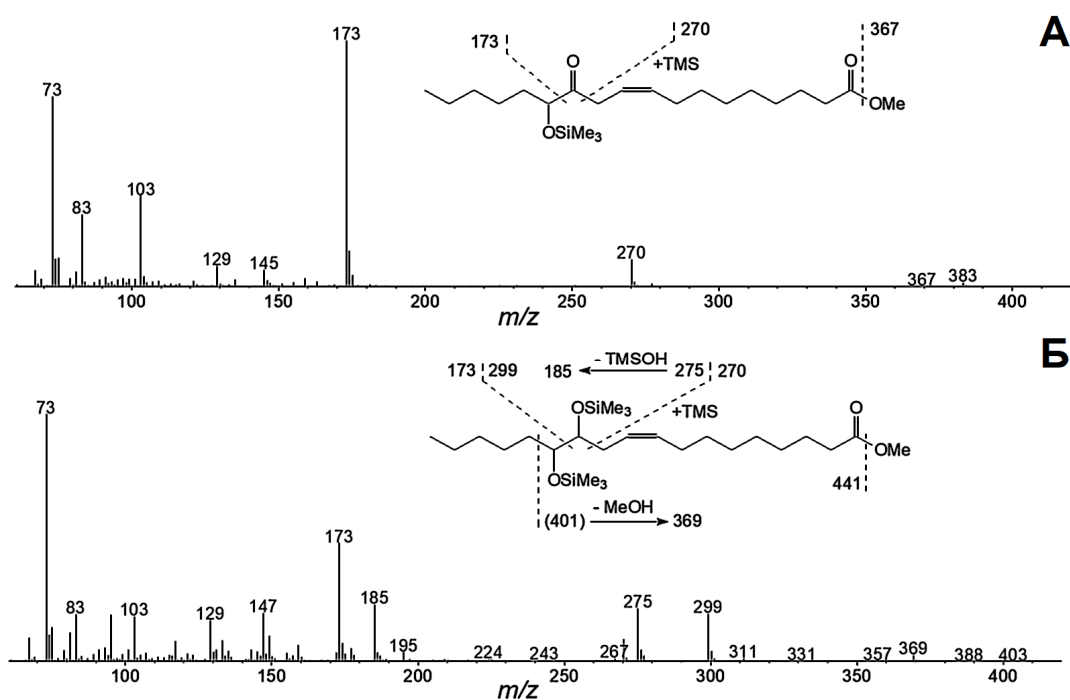


Рис. 66. Масс-спектры и схемы фрагментации соединений **10** и **10a** (Me/TMC) – (9Z)-12-оксо-13-гидрокси-9-октадеценовой и 12,13-дигидрокси-9-октадеценовой кислот соответственно.

Масс-спектры соответствовали таковым диастереомеров (*трео* и *эритро*) 12,13-диола – 12,13-дигидрокси-9-октадеценовой кислоты, что подтвердило идентификацию α -кетола **10**.

По результатам ГХ-МС анализа продуктов превращения 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ при участии ZmAOS1 в реакции образуются только соответствующие α -кетолы (рис. 67, Grechkin *et al.*, 2008; Toporkova *et al.*, 2020a), которые в результате восстановления NaBH₄ превращались в соответствующие диастереомерные пары виц-диолов. 9-ГПОД и 13-ГПОД при участии ZmAOS1 превращались в α -кетолы **8** и **10** соответственно, описание которых дано выше. На хроматограммах выявлены соответствующие виц-диолы **8a-8b** и **10a-10b** (рис. 67A и B). 9-ГПОТ при участии ZmAOS1 превращалась в α -кетол **9** – 9-гидрокси-10-оксо-12,15-октадекадиеновую кислоту (рис. 68), которая на хроматограмме после восстановления NaBH₄ (рис. 67Б) выявлялась в виде диастереомерной пары виц-диолов **9a** и **9b** (Me/TMS). Масс-спектр соединения **9a** (рис. 68) содержал следующие фрагменты: M⁺ при *m/z* 470 (0,7%), [M – Me]⁺ при *m/z* 455 (0,4%), [M – MeO]⁺ при *m/z* 439 (1%), [M – C11/C18]⁺ при *m/z* 361 (4%), [361 – TMSOH]⁺ при *m/z* 271 (27%), [M – C10/C18]⁺ при *m/z* 259 (33%), [M – C1/C9]⁺ при *m/z* 211 (7%), *m/z* 155 (39%), *m/z* 129 (13%), *m/z* 109 (25%), [CH₂ = O⁺ – TMS] при *m/z* 103 (17%) и [TMS]⁺ при *m/z* 73 (100%). Масс-спектр соответствовал таковому 9,10-дигидрокси-12,15-октадекадиеновой кислоты (Me/TMS), подтверждая структуру α -кетола **9**.

В свою очередь, 13-ГПОТ при участии ZmAOS1 превращалась в α -кетол **11** (рис. 68) – 12-оксо-13-гидрокси-9,15-октадекадиеновую кислоту, которой на хроматограмме после восстановления NaBH₄ (рис. 67Г) соответствовала диастереомерная пара виц-диолов **11a** и **11b** (Me/TMS).

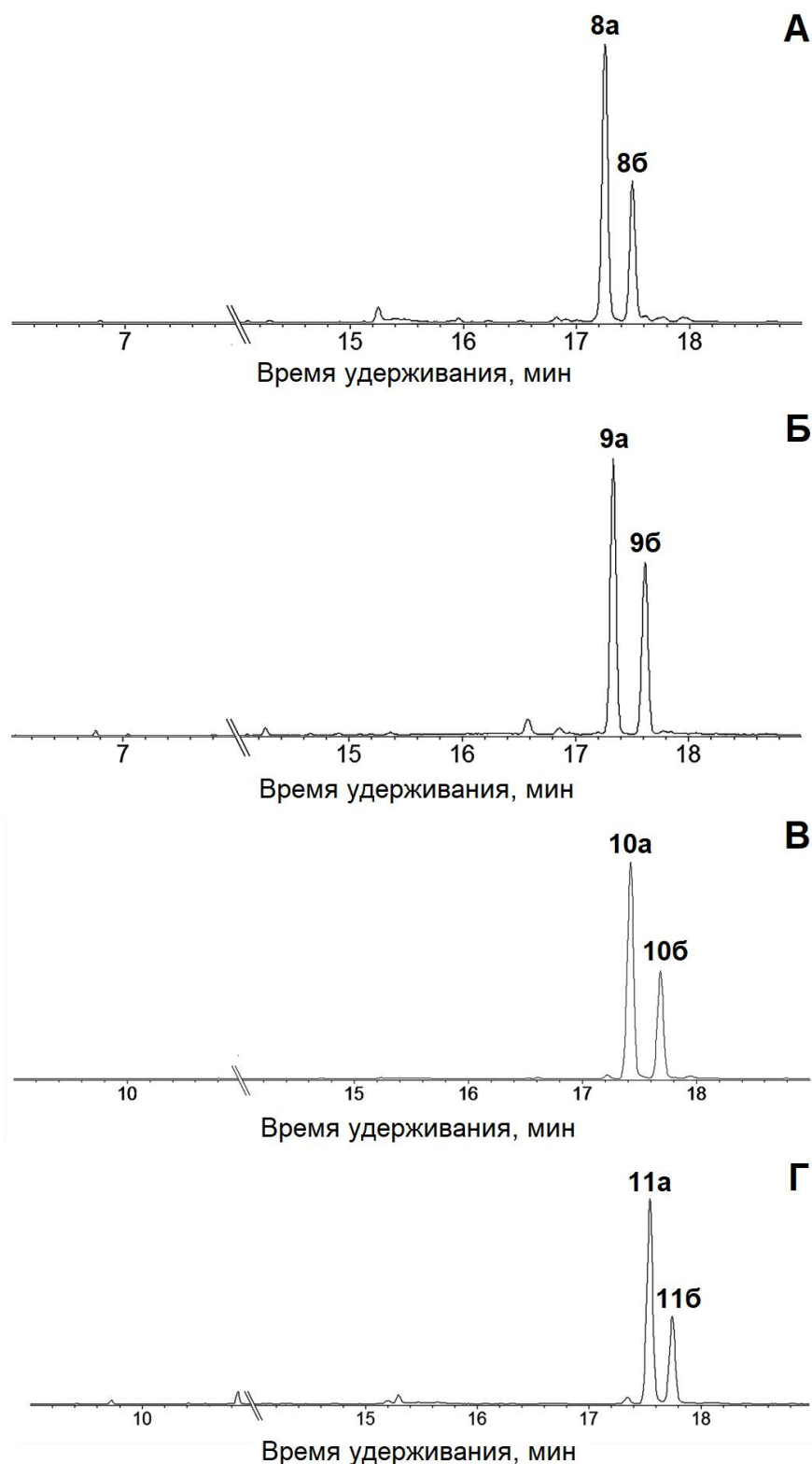


Рис. 67. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А), 9-ГПОТ (Б), 13-ГПОД (В) и 13-ГПОТ (Г) при участии ZmAOS1. **8a-8б**, 9,10-дигидрокси-12-октадеценовая кислота (Me/TMC); **9a-9б**, 9,10-дигидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота (Me/TMC); **10a-10б**, 12,13-дигидрокси-9-октадеценовая кислота (Me/TMC); **11a-11б**, 12,13-дигидрокси-9,15-октадекадиеновая кислота (Me/TMC). Структурные формулы представлены на рисунке 63.

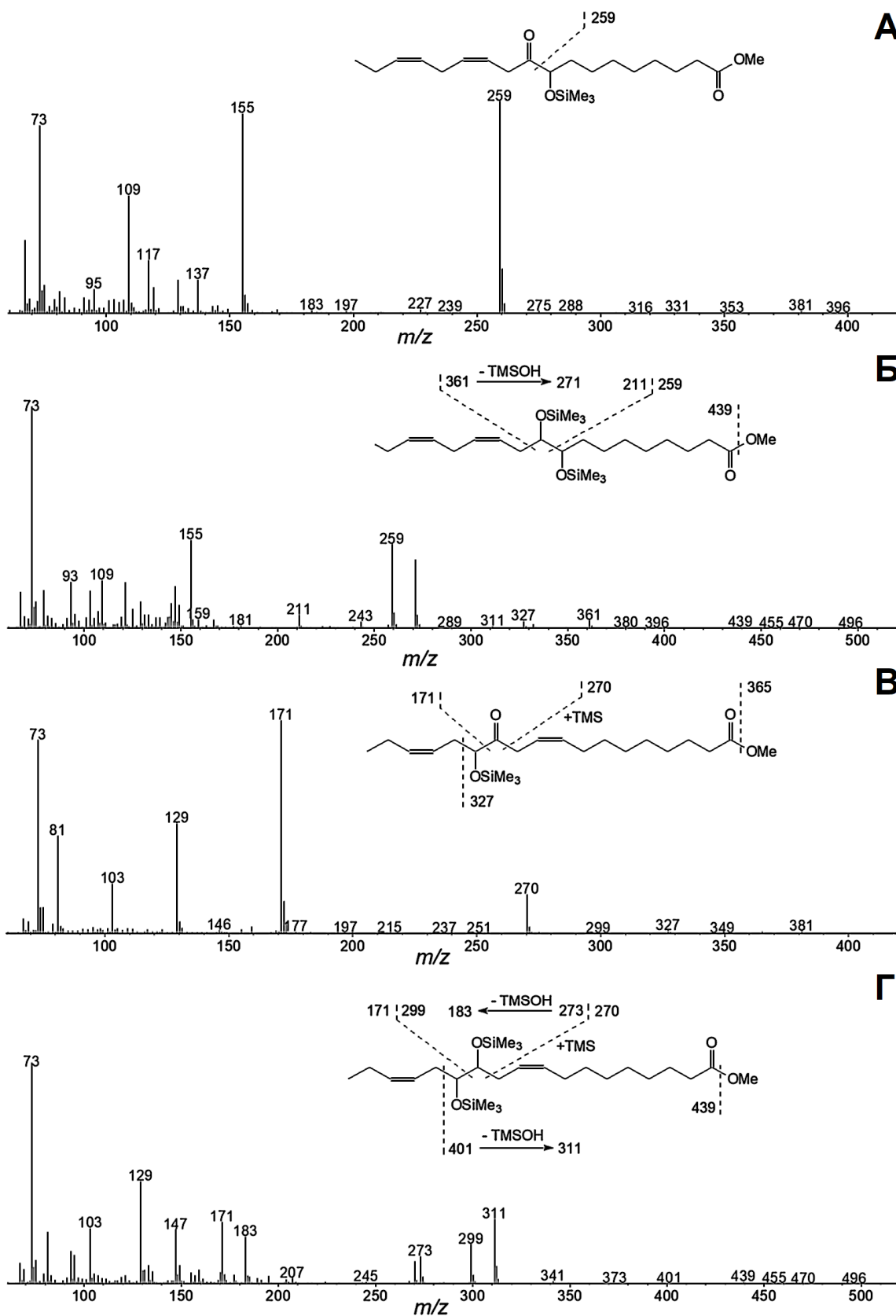


Рис. 68. Масс-спектры и схемы фрагментации соединений **9**, **9a**, **11** и **11a** (Me/TMC) – (12*Z*,15*Z*)-9-гидрокси-10-оксо-12,15-октадекадиеновой, 9,10-дигидрокси-12,15-октадекадиеновой, (9*Z*,15*Z*)-12-оксо-13-гидрокси-9,15-октадекадиеновой и 12,13-дигидрокси-9,15-октадекадиеновой кислот соответственно.

Масс-спектры соединений **11a** (рис. 68) и **11b** были практически идентичными и содержали M^+ при m/z 470 (0,3%), $[M - Me]^+$ при m/z 455 (0,6%), $[M - MeOH]^+$ при m/z 439 (1%), $[M - TMSOH - H]^+$ при m/z 379 (0,3%), $[M - C_{13}/C_{18}]^+$ при m/z 299 (13%), $[M - C_{11}/C_{11}]^+$ при m/z 273 (10%), $[M - C_{12}/C_{18} + TMS]^+$ при m/z 270 (7%), $[275 - TMSOH]^+$ при m/z 183 (18%), $[M - 299]^+$ при m/z 171 (24%), m/z 143 (3%) и $[TMC]^+$ при m/z 73 (100%) и соответствовали таковым изомеров 12,13-дигидрокси-9,15-октадекадиеновой кислоты (Me/TMC), что подтвердило структуру α -кетола **11**.

По результатам ГХ-МС анализа продуктов превращения 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ при участии ферментов PrAOS2 и LuAOS продуктами этих ферментов так же, как у ZmAOS1, являлись соответствующие α -кетолы (Toporkova *et al.*, 2020a). Среди продуктов превращения гидроперекисей при участии алленоксидсинтаз LeAOS3 (CYP74C3), ZmAOS1 (CYP74A19), PrAOS2 (CYP74A8) и LuAOS (CYP74A1) эпокси спирты не обнаружены.

3.6. Получение ферментов подсемейства CYP74B и изучение их каталитических свойств

После проверки наличия эпоксиалкогольсинтазной активности у представителей подсемейства CYP74C, показавшей, что, как минимум, некоторые ранее охарактеризованные или аннотированные как ГПЛ ферменты проявляют двойную ГПЛ/ЭАС активность, в то время как проанализированные АОС подсемейств CYP74A и CYP74C дополнительными ЭАС свойствами не обладают, следующим этапом стала проверка наличия ЭАС свойств у ферментов CYP74 из других подсемейств. 13-Специфичные ГПЛ растений входят в состав одного из крупнейших подсемейств CYP74 – CYP74B (Matsui *et al.*, 1996, 1999, 2000; Noordermeer *et al.*, 2000, 2001a; Howe *et al.*, 2000; Tijet *et al.*, 2000; Kandzia *et al.*, 2003; Ono *et al.*, 2016). Эти ферменты локализуются в пластидах (Froehlich *et al.*, 2001) и контролируют выработку цитостатических и антипатогенных летучих соединений GLV (Hatanaka, 1996; Matsui, 2006).

Результаты по исследованию ферментов CYP74C свидетельствуют, что для полной характеристики каталитических свойств важен анализ продуктов превращений всех гидроперекисей, поскольку ферменты могут вести себя по-разному в отношении различных субстратов. Вследствие этого, был проведен ГХ-МС анализ продуктов превращения всех гидроперекисей при участии трех ферментов подсемейства CYP74B: StHPL (CYP74B3) картофеля, MsHPL (CYP74B4v1) люцерны (*Medicago sativa*) и CsHPL (CYP74B6) огурца. ГХ-МС анализ продуктов этих ферментов ранее проводили только с отдельными субстратами (Matsui *et al.*, 2000; Noordermeer *et al.*, 2000; Vancanneyt *et al.*, 2001).

Клонирование ОРС генов *StHPL* (картофель) и *CsHPL* (огурец) проводили с использованием вектора pET-23a и пар праймеров StHPLcF/StHPLcR и CsHPLcF/CsHPLcR (таблица 3 приложения), как описано выше. У обоих генов отсутствуют лидерные последовательности для транспортировки в хлоропласты. Рекомбинантная плазмида pQE30 (Qiagen, USA), содержащая ОРС гена, кодирующего фермент MsHPL (CYP74B4v1, CAB54847.1) без лидерной последовательности, обеспечивающей транспорт белка в хлоропласты, была любезно предоставлена доктором М.А. Ноордермеер (Университет Северного Техаса, США). Клонированные ОРС генов *StHPL* и *MsHPL* включают по 1440 нуклеотидных остатков (480 аминокислотных остатков), ОРС гена *CsHPL* – 1443 нуклеотидных остатка (481 аминокислотный остаток). Получение рекомбинантных ферментов StHPL (картофель), MsHPL (люцерна) и CsHPL (огурец) с использованием клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS и их очистку проводили, как описано выше. Полные аминокислотные последовательности целевых ферментов представлены на рисунке 3 приложения.

Ген *CsHPL* ранее был описан как псевдоген (Matsui *et al.*, 2000). Это предположение было основано на наличии сдвига рамки считывания в последовательности соответствующего транскрипта. Однако клонирование ОРС гена *CsHPL de novo* с использованием праймеров, перечисленных в таб-

лице 3 приложения, позволило получить функциональный белок. Наблюдаемый ранее сдвиг рамки считывания (Matsui *et al.*, 2000), по-видимому, был вызван ошибкой полимеразы, используемой в ПЦР.

В ходе изучения каталитических свойств ферментов подсемейства CYP74B, в первую очередь, определяли оптимум pH реакционной среды для каталитической активности. Для StHPL и MsHPL оптимальное значение pH составляло 8,0, тогда как для CsHPL это значение составляло 6,0 (рис. 69). Оптимальные значения pH для каталитической активности StHPL, MsHPL и CsHPL косвенно указывают на субклеточную локализацию этих ферментов. Ранее было показано, что 13-специфичные ГПЛ подсемейства CYP74B локализуются во внешней оболочке хлоропластов, причем большая часть белка находится в межмембранном пространстве (Froehlich *et al.*, 2001). pH межмембранного пространства хлоропластов имеет значение 6,0, тогда как pH стромы – значение 8,0. Таким образом, фермент CsHPL, по-видимому, находится в межмембранном пространстве, тогда как StHPL и MsHPL – в строме. Локализация MsHPL подтверждается присутствием хлоропластного транзитного пептида в нативной последовательности (Noordermeer *et al.*, 2001).

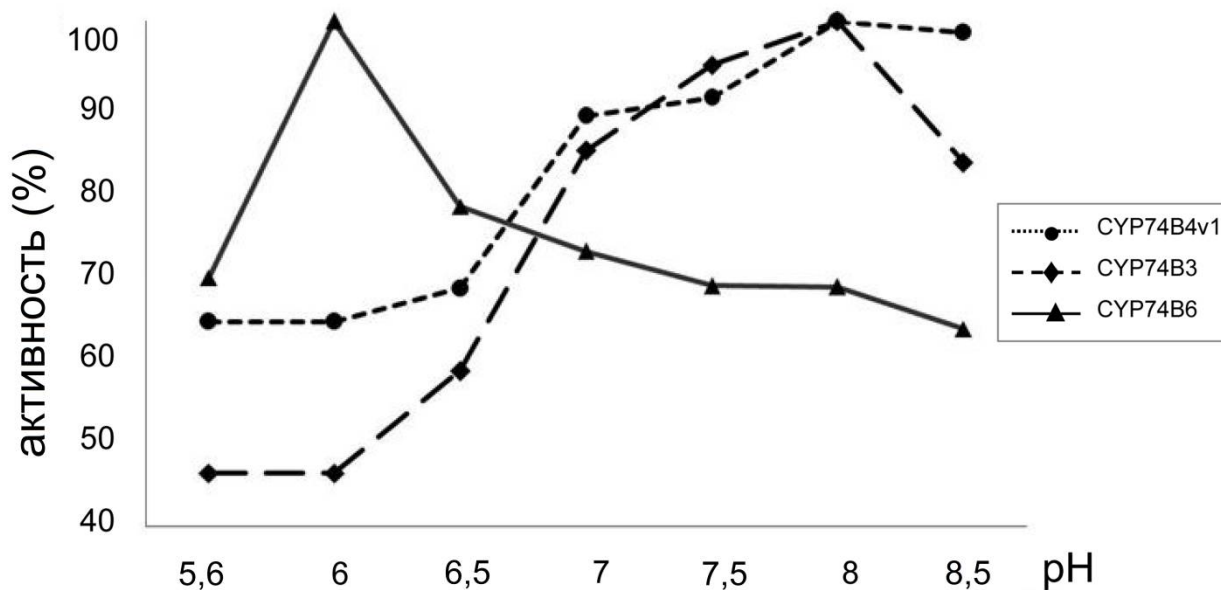


Рис. 69. Зависимость каталитической активности рекомбинантных ферментов StHPL, MsHPL и CsHPL от значения pH реакционной смеси.

Na-фосфатный буфер (100 мМ) с оптимальным для каждого фермента значением рН использовали для исследования каталитической активности StHPL, MsHPL и CsHPL. Эти ферменты эффективно использовали в качестве субстратов 13-ГПОД и 13-ГПОТ. Превращение 9-гидроперекисей при участии этих ферментов протекало значительно менее эффективно. Кроме того, рекомбинантный фермент CsHPL был абсолютно неактивен в отношении 9-ГПОТ. Сродство и каталитическая активность рекомбинантного фермента CsHPL в отношении 13-ГПОТ были намного выше, чем в отношении других субстратов, как видно из значений K_m и k_{cat} (таблица 7). В то же время, сродство StHPL и MsHPL было выше в отношении 13-ГПОД, хотя каталитическая активность этих ферментов была выше в отношении 13-ГПОТ (таблица 7). В целом, судя по значениям отношения k_{cat}/K_m , 13-гидроперекиси α -линоленовой и линолевой кислот являлись предпочтительными субстратами для ферментов подсемейства CYP74B (таблица 7).

Анализ продуктов (в виде Me/TMC после или без восстановления NaBH_4) превращения гидроперекисей при участии рекомбинантных ферментов MsHPL, StHPL и CsHPL проводили методом ГХ-МС, как описано выше. По результатам анализа продуктов инкубации MsHPL с 13-ГПОТ (рис. 70А) основными были два относительно летучих соединения **5a** и **6a** (Me/TMC после восстановления NaBH_4), описанных выше и представляющих собой (9Z)-12-гидрокси-9-додеценую и (10E)-12-гидрокси-10-додеценую кислоты (Me/TMC, раздел 3.3) соответственно. Эти соединения свидетельствовали о присутствии 13-ГПЛ активности. Дополнительным продуктом превращения 13-ГПОТ при участии MsHPL было соединение **2a**, описанное выше как оксиранил карбинол 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота (раздел 3.3) – продукт ЭАС активности.

Таблица 7. Кинетические параметры реакций, катализируемых ферментами StHPL (CYP74B3, *S. tuberosum*), MsHPL (CYP74B4v1, *M. sativa*) и CsHPL (CYP74B6, *C. sativus*) и их субстратная специфичность.

Фермент	Субстрат	K_m , μM	k_{cat} , c^{-1}	k_{cat}/K_m , $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{c}^{-1}$	Специфичность, %
StHPL	13-ГПОТ	195,82	501,47	2,56	76,19
	13-ГПОД	93,63	314,53	3,36	100
	9-ГПОТ	275,94	143,66	0,52	15,48
	9-ГПОД	179,73	116,15	0,65	19,23
MsHPL	13-ГПОТ	138,98	645,58	4,65	86,75
	13-ГПОД	115,34	618,02	5,36	100
	9-ГПОТ	149,00	86,04	0,58	10,77
	9-ГПОД	277,19	255,41	0,92	17,16
CsHPL	13-ГПОТ	52,79	1222,44	23,16	100
	13-ГПОД	276,44	978,02	3,54	15,28
	9-ГПОТ	Следовая активность			
	9-ГПОД	391,97	966,37	2,47	10,65

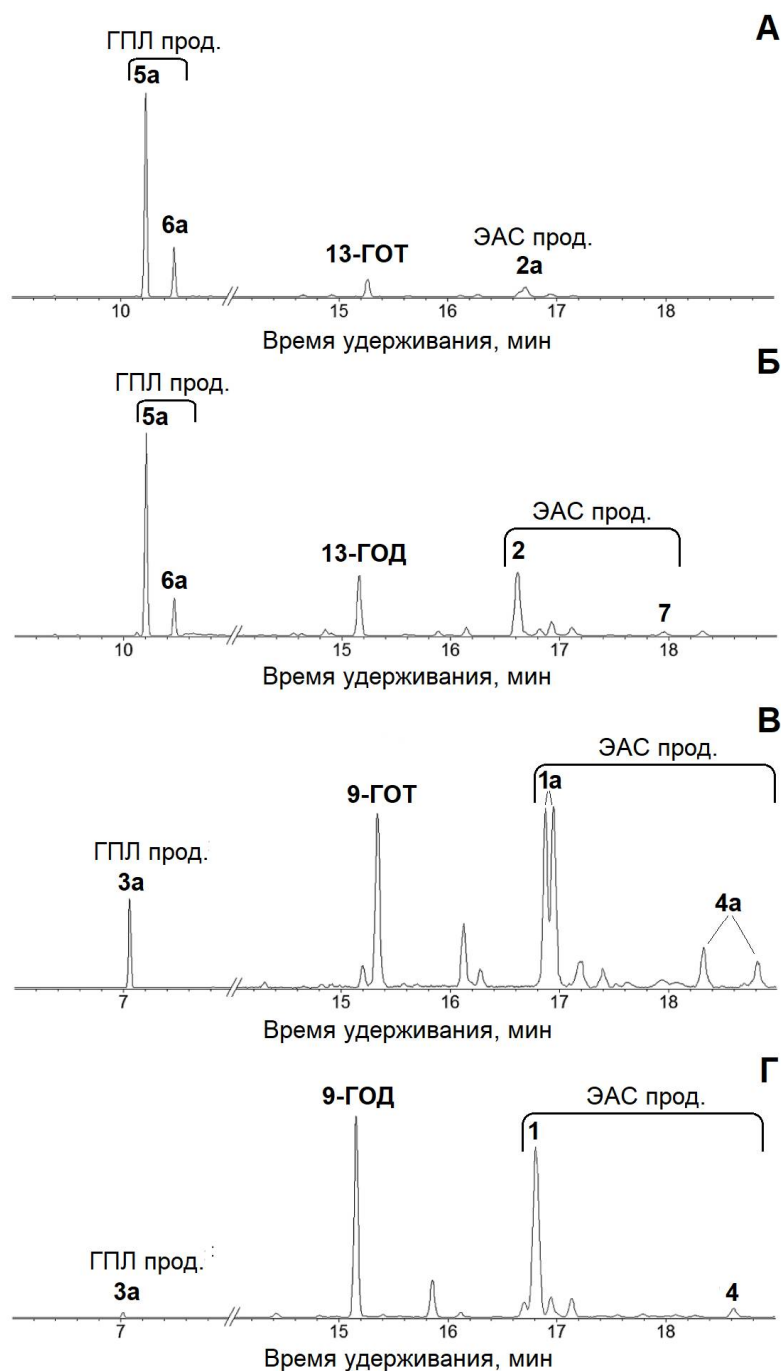


Рис. 70. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS после восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПОТ (А), 13-ГПОД (Б), 9-ГПОТ (В) и 9-ГПОД (Г) при участии MsHPL . **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; **1a**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; **2a**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота; **3a**, 9-гидроксинонановая кислота; **4**, 9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовая кислота; **4a**, 9,10-эпокси-13-гидрокси-11,15-октадекадиеновая кислота; **5a**, 12-гидрокси-9-додеценовая кислота; **6a**, 12-гидрокси-10-додеценовая кислота; **7**, 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота. Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 50.

Превращение 13-ГПОД при участии MsHPL (рис. 70Б) также приводило к образованию преобладающих продуктов **5a** и **6a** (Me/TМС после восстановления NaBH₄) – (9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценной и (10*E*)-12-гидрокси-10-додеценной кислот (Me/TМС). Дополнительным продуктом реакции было соединение **2** и три минорных пика, элюируемых сразу после продукта **2**. Описание соединения **2** дано выше (раздел 3.1); оно имеет структуру оксиранил карбинола 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценной кислоты – продукта ЭАС активности. Небольшие пики, элюируемые непосредственно после продукта **2** (рис. 70Б), имели аналогичные масс-спектры. Следовательно, это стереоизомеры соединения **2**, предположительно имеющие различную стереоконфигурацию у С11 или С12. Дополнительным следовым продуктом превращения 13-ГПОД при участии MsHPL был пик **7**, значительно удаленный от пика **2**. Масс-спектр соединения **7** (Me/TМС), которое является (10*E*)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценной кислотой, также описан выше (раздел 3.3).

Каталитическая активность MsHPL в отношении 9-гидроперекисей была ниже, чем в отношении 13-гидроперекисей. Большой пик 9-ГОТ (рис. 70В) и 9-ГОД (рис. 70Г) указывал на относительно плохое превращение субстрата по сравнению с 13-ГПОТ (рис. 70А). В хроматограммах продуктов (Me/TМС после восстановления NaBH₄) превращения 9-ГПОТ при участии MsHPL выявлены продукты **1a** (2 изомера), **3a** и **4a** (2 изомера) (рис. 70В). Масс-спектры продуктов **1a** и **3a** (Me/TМС) – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновой и 9-гидроксинонановой кислот (Me/TМС) соответственно – описаны выше (раздел 3.3). Минорными продуктами превращения 9-ГПОТ при участии MsHPL являлись два изомера соединения **4a**, масс-спектры которых были почти идентичными. Масс-спектр одного из двух изомеров содержал M⁺ при *m/z* 396 (0,2%), [M⁺ – Me] при *m/z* 381 (0,6%), [M⁺ – MeO] при *m/z* 365 (0,1%), [M⁺ – MeCH₂CH=CHCH₂] при *m/z* 327 (14%), *m/z* 311 (12%), [327 – TMSOH]⁺ при *m/z* 237 (18%), [M⁺ – C10/C18] при *m/z* 185 (43%), [CH₂]O⁺ – TMS] при *m/z* 103 (27%), *m/z* 75 (50%), [TМС]⁺ при *m/z* 73 (100%).

Фрагменты в спектре при m/z 185 и 173 указывали на присутствие оксирана при C9,C10 и вторичной спиртовой группировки (TMS) при C13. Таким образом, спектр, содержащий также $[M - Me]^+$ при m/z 381, позволил идентифицировать соединение **4a** как оксиранил винил карбинол 9,10-эпокси-13-гидрокси-11,15-октадекадиеновую кислоту, представленную в виде двух стереоизомеров.

Инкубация MsHPL с 9-ГПОД приводила к образованию преобладающего продукта **1** (рис. 70Г) – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислоты, описание которого приведено выше (раздел 3.1). Дополнительными минорными продуктами были соединения **3** и **4**, структуры которых выше определены как 9-оксононановая кислота и оксиранил винил карбинол 9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовая кислота (раздел 3.3).

Профили продуктов реакций, катализируемых ферментами StHPL (рис. 71) и CsHPL (рис. 72), в целом, аналогичны профилю продуктов фермента MsHPL. В целом, все ферменты преимущественно использовали 13-гидроперекиси и проявляли 13-ГПЛ активность в отношении этих субстратов. 13-ГПОТ преобразовывалась в 13-ГПЛ продукты с высокой специфичностью при участии всех изученных ферментов (рис. 70А, 71А и 72А). Преобразование 13-ГПОД было менее специфичным и приводило к заметному выходу эпоксписпирта **2** (11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты, рис. 70Б, 71Б и 72Б). В случае StHPL выход эпоксписпирта **2** был особенно высоким (рис. 71Б). В то же время, превращения 9-гидроперекисей – менее предпочтительных субстратов – давали больший выход эпоксписпиртов, чем продуктов ГПЛ реакции (рис. 70В,Г, 71В,Г, 72В,Г).

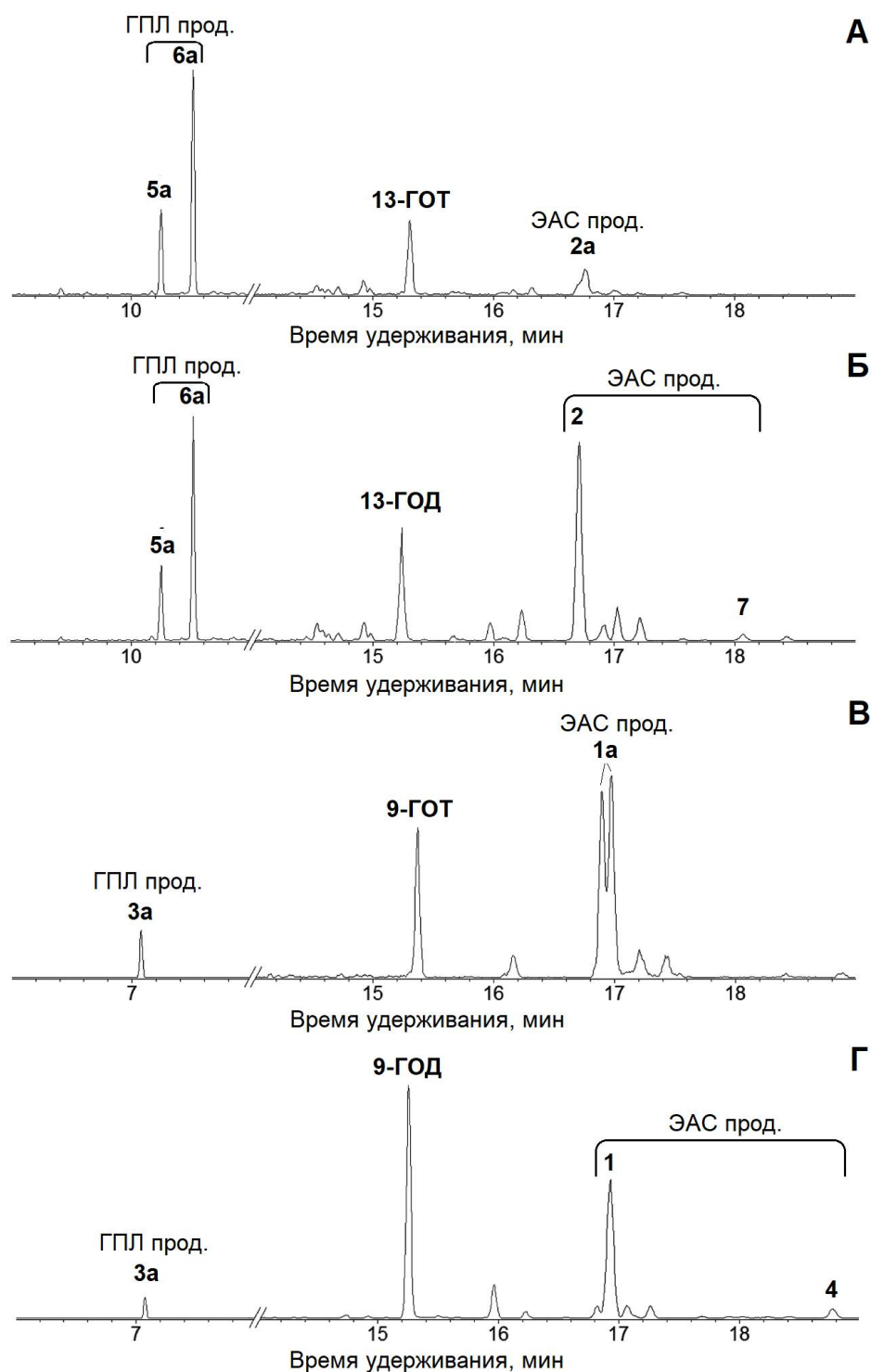


Рис. 71. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS после восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПОТ (А), 13-ГПОД (Б), 9-ГПОТ (В) и 9-ГПОД (Г) при участии StHPL. 1, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; 1а, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота; 2, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; 2а, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота; 3а, 9-гидроксинонановая кислота; 4, 9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовая кислота; 5а, 12-гидрокси-9-додеценовая кислота; 6а, 12-гидрокси-10-додеценовая кислота; 7, 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота. Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 50.

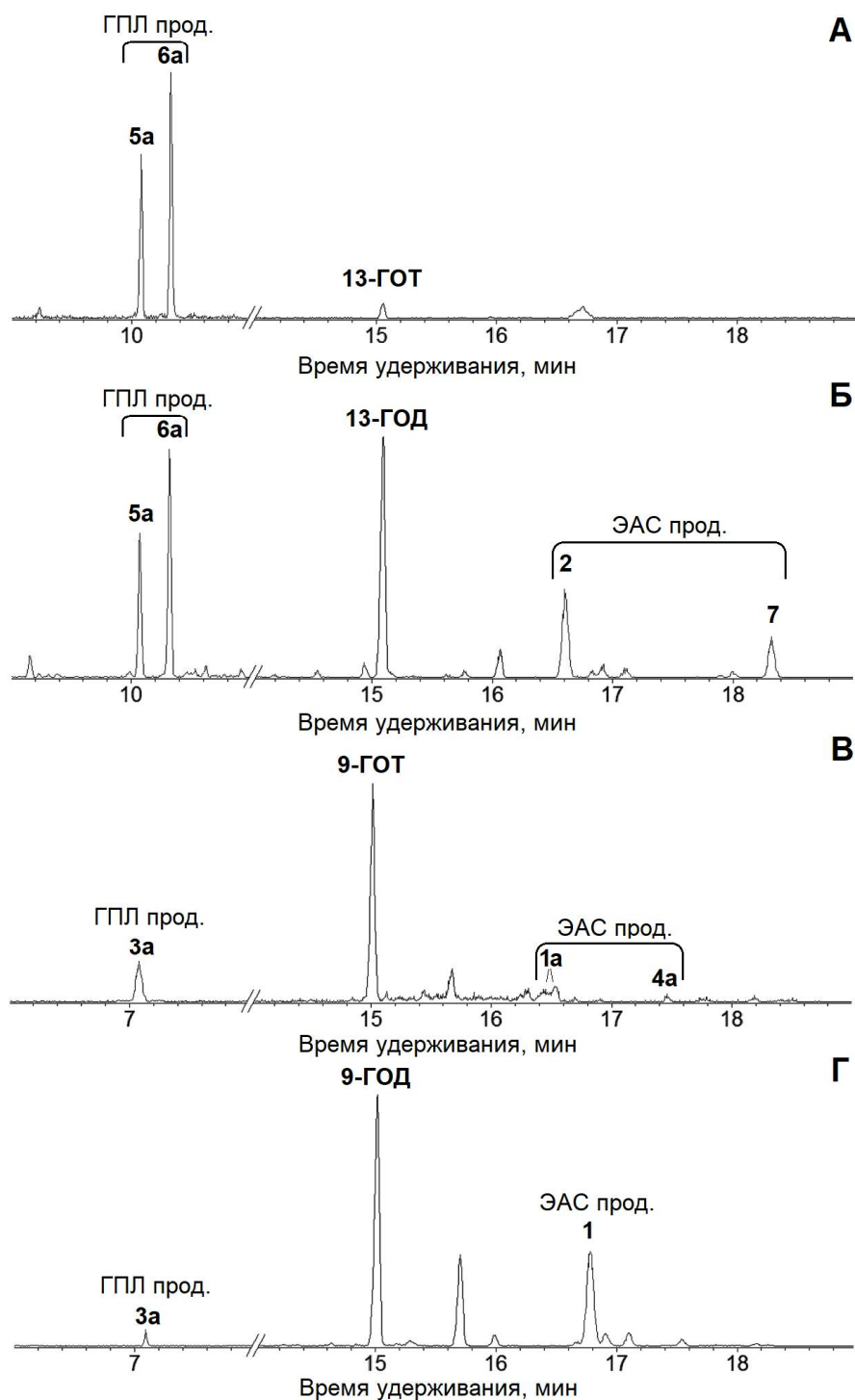


Рис. 72. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS после восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПИОТ (А), 13-ГПИОД (Б), 9-ГПИОТ (В) и 9-ГПИОД (Г) при участии CsHPL. **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценная кислота; **1a**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиенная кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценная кислота; **3a**, 9-гидроксинонановая кислота; **4a**, 9,10-эпокси-13-гидрокси-11,15-октадекадиенная кислота; **5a**, 12-гидрокси-9-додеценная кислота; **6a**, 12-гидрокси-10-додеценная кислота; **7**, 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценная кислота. Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 50.

Полученные результаты (Toporkova *et al.*, 2020б), в целом, соответствовали общей схеме переключения между каталитическими механизмами ферментов CYP74, а также опубликованным ранее данным, что ферменты MsHPL, StHPL и CsHPL проявляют в основном ГПЛ активность (Matsui *et al.*, 2000; Noordermeer *et al.*, 2000; Vancanneyt *et al.*, 2001). В то же время, все ферменты катализировали образование эпокиспиртов в качестве побочных продуктов. Более того, превращение 9-гидроперекисей, как правило, приводило к формированию в основном эпокиспиртов. Другая интересная тенденция наблюдалась в отношении 13-гидроперекисей. Специфичность образования продукта зависела от присутствия ω 3 двойной связи у субстрата. В частности, 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 (самый высокий в случае StHPL); при этом продукты ГПЛ оставались основными. По-видимому, наличие ω 3 двойной связи благоприятствует катализу по типу ГПЛ. Это может быть объяснено тем, что ω 3-двойная связь, вероятно, влияет на превращение промежуточного эпоксиаллильного радикала за счет содействия раскрытию С-С связи в оксиране эпоксиаллильного радикала, что приводит к образованию винилоксикарбинильного радикала (рис. 73). В свою очередь, винилоксикарбинильный радикал рекомбинирует с гидроксильным радикалом с образованием полуацетала, истинного продукта ГПЛ (синоним: полуацетальсинтаза). В отсутствие ω 3 двойной связи раскрытие оксирана происходит с меньшей эффективностью, и рекомбинация с гидроксильным радикалом приводит к образованию эпокиспирта. Эффект анхимерного содействия ω 3 двойной связи был описан ранее в случае циклизации окиси аллена (Grechkin, 1994; González-Pérez *et al.*, 2017).

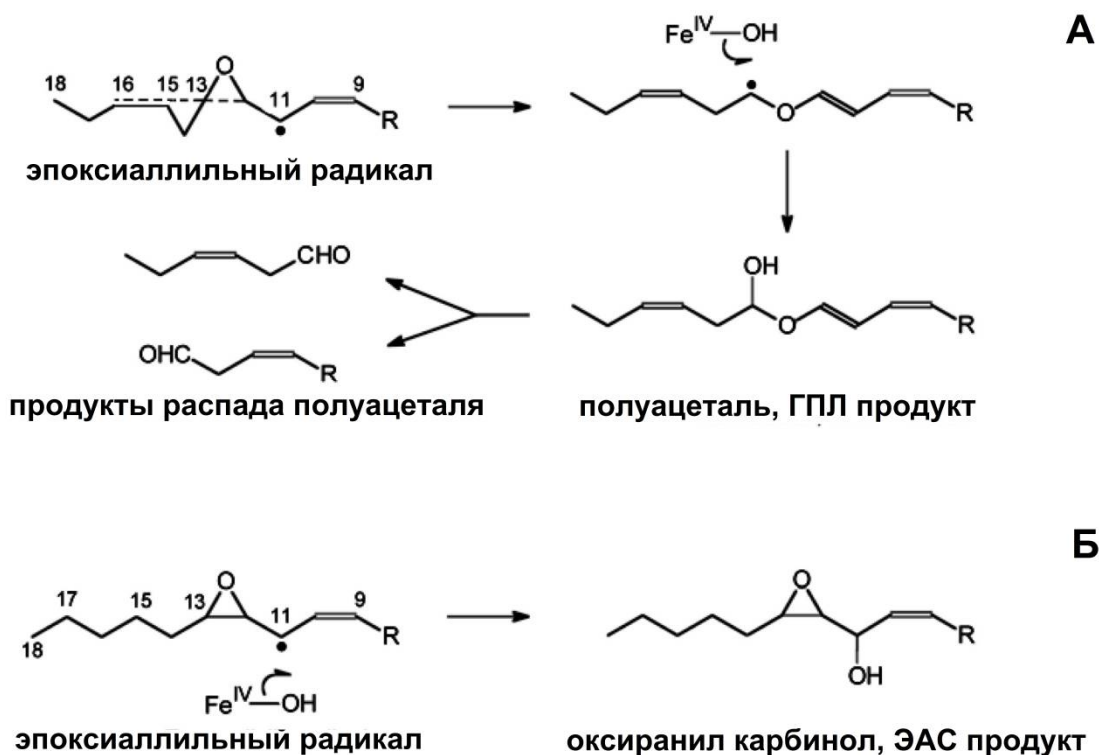


Рис. 73. Особенности превращения эпоксиаллильного радикала – промежуточного продукта – ферментами СУР74В в зависимости от ненасыщенности ω3 связи 13-гидроперекиси. Наличие ω3 двойной связи благоприятствует катализу по GPL типу (А), тогда как отсутствие ω3 двойной связи способствует катализу по ЭАС типу (Б). R = MeOOC(CH₂)₇-.

3.7. Получение фермента СУР74В33 моркови (*Daucus carota*) и изучение его каталитических свойств

Одним из растений, у которых ранее было выявлено большое количество эпокиспиртов и тригидроксикислот – продуктов ЭАС ветви липоксигеназного каскада – стала морковь. Поэтому следующим объектом настоящего исследования стал фермент СУР74В33 моркови, вследствие того, что, как описано выше, фермент подсемейства СУР74В может катализировать образование эпокиспиртов, а также особенностей первичной структуры этого фермента. В домене PPVP внутри ERR-триады в последовательности фермента СУР74В33 последний остаток заменен на остаток аланина. Подобная замена не характерна для белков подсемейства СУР74В, однако, в целом, в семействе СУР74 встречается, например, у белков подсемейства СУР74А, включающего 13-специфичные АОС. В остальных каталитически важных

доменах не было выявлено каких-либо значимых отличий по сравнению с другими ферментами CYP74B. Например, участок перегиба I-спирали имеет последовательность LGFNAF, типичную для 13-ГПЛ. В сайте «F/L toggle» (CPC-1) последовательности DcAOS содержится остаток лейцина, который консервативен для всех изученных ГПЛ, тогда как все известные АОС содержат остаток фенилаланина в этом сайте. В целом, DcAOS проявляет высокую степень идентичности последовательности к ферментам подсемейства CYP74B: 72,55% идентичности при 94% покрытия к белку CYP74B24 чая (*Camellia sinensis*, GenBank: AZP01941.1), 69,41% идентичности при 94% покрытия к белку CYP74B32 женьшеня (*Panax ginseng*, GenBank: AZP01941.1) и 68,28% идентичности при 93% покрытия к ГПЛ манго (*Mangifera indica*, GenBank: AQZ55554.1).

ОПС гена *CYP74B33* (GenBank XM_017393211.1, GI: 108219710), состоящую из 1464 п.н. и кодирующую белок из 488 аминокислотных остатков, клонировали в векторе pET-32 Ek/LIC (Novagen, США) с использованием праймеров CYP74B33cF и CYP74B33cR (таблица 3 приложения), как описано выше. Получение рекомбинантного фермента CYP74B33 с использованием клеток *E. coli* штамма Rosetta-gami(DE3)pLysS В и его очистку проводили, как описано выше.

Фермент CYP74B33 проявлял максимальную активность при pH 7,0 (рис. 74). Субстратная специфичность этого фермента оказалась необычной для представителя подсемейства CYP74B. В отличие от всех изученных к настоящему времени белков CYP74B, являющихся 13-специфичными ГПЛ, фермент CYP74B33 эффективно использовал 9-ГПОД и 9-ГПОТ в качестве субстратов. При этом 13-гидроперекиси жирных кислот превращались при участии этого фермента гораздо менее эффективно (таблица 8).

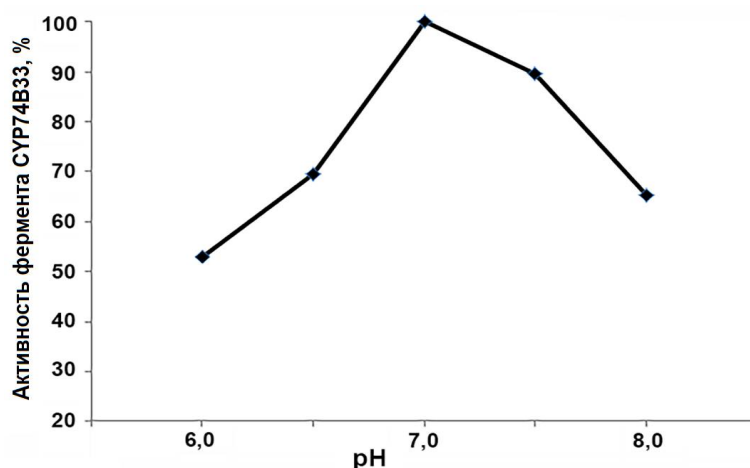


Рис. 74. Зависимость каталитической активности фермента СУР74В33 от pH реакционной среды.

Таблица 8. Субстратная специфичность и кинетические параметры реакций, катализируемых ферментом СУР74В33.

Субстрат	k_{cat} (с ⁻¹)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (μM ⁻¹ ·с ⁻¹)	Субстратная специфичность
9-ГПОТ	162,3	27,1	6,0	100
9-ГПОД	188,7	34,3	5,5	91,7
13-ГПОТ	69,5	111,2	0,6	10,0
13-ГПОД	75,8	89,5	0,8	13,3

Для определения типа каталитической активности рекомбинантный фермент СУР74В33 инкубировали с 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ. Анализ продуктов (в виде Me эфиров или Me/ТМС после или без восстановления NaBH₄) превращения гидроперекисей при участии рекомбинантного фермента СУР74В33 проводили методом ГХ-МС, как описано в разделах 2.18 и 2.20. В результате анализа продуктов превращения 9-ГПОД при участии фермента СУР74В33 в виде Me/ТМС после восстановления NaBH₄ основными выявляемыми продуктами (рис. 75А) были соединения **8a** и **8b**, описанные выше – *трео* и *эритро* изомеры 9,10-дигидрокси-12-октадеценовой кислоты, которые являются продуктами восстановления NaBH₄ α-кетона **8**, 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовой кислоты – продукта спонтанного гидролиза окиси аллена, первичного продукта АОС.

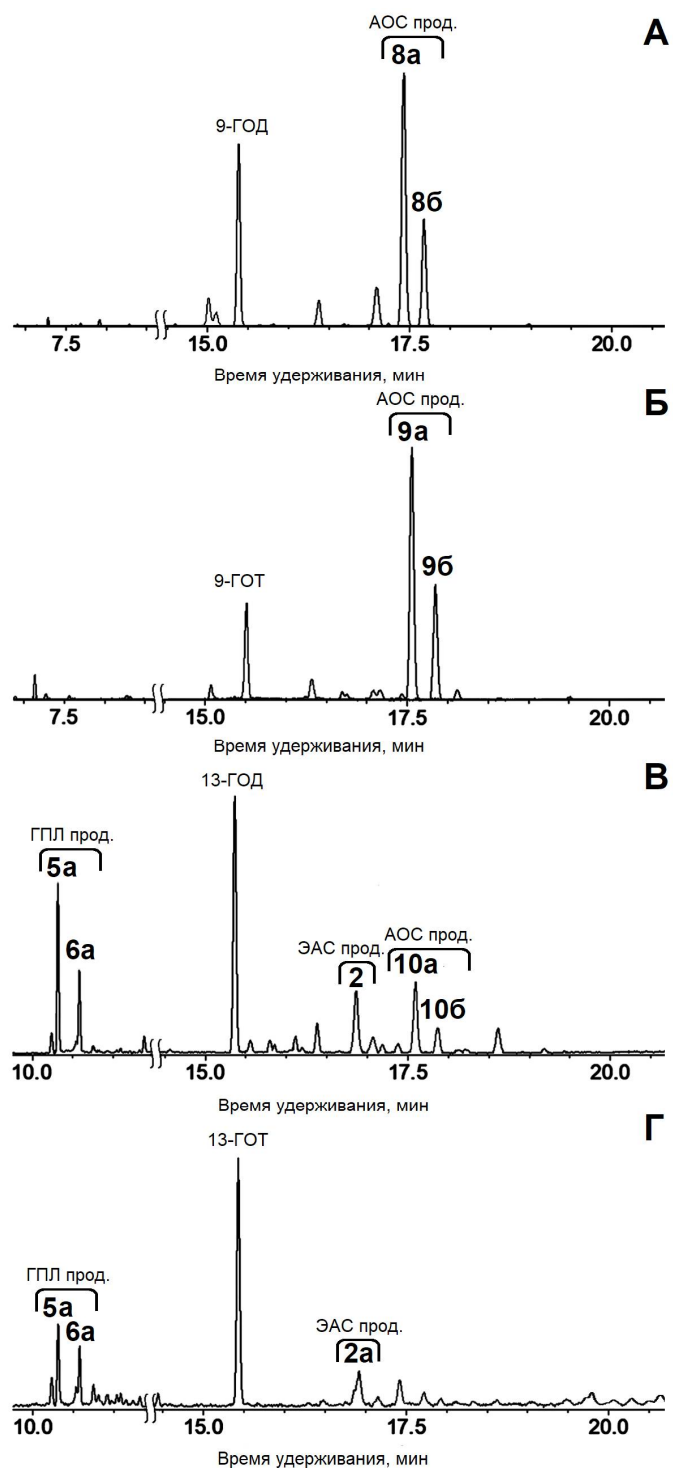


Рис. 75. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А), 9-ГПОТ (Б), 13-ГПОД (В) и 13-ГПОТ (Г) при участии фермента CYP74B33. **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; **2a**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота; **5a**, (9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценовая кислота; **6a**, (10*E*)-12-гидрокси-10-додеценовая кислота; **8a** и **8б**, *трео* и *эритро* изомеры 9,10-дигидрокси-12-октадеценовой кислоты; **9a** и **9б**, *трео* и *эритро* изомеры 9,10-дигидрокси-12,15-октадекадиеновой кислоты; **10a** и **10б**, *трео* и *эритро* изомеры 12,13-дигидрокси-9-октадеценовой кислоты. Структурные формулы продуктов представлены на рисунках 50 и 63.

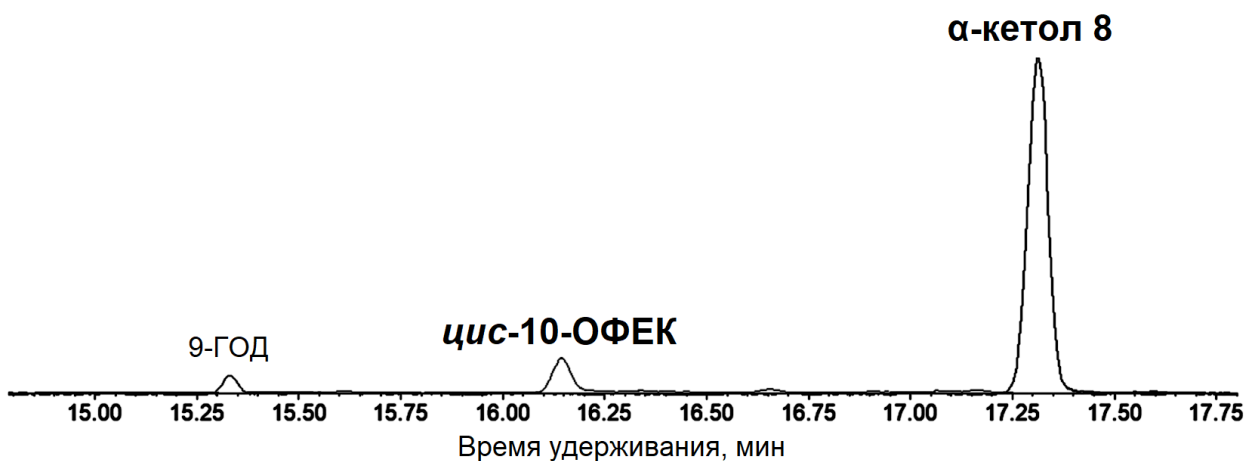


Рис. 76. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC) превращения 9-ГПОД при участии фермента СУР74В33. Структурные формулы продуктов представлены на рисунках 62 и 64.

Когда продукты (Me/TMC) превращения 9-ГПОД анализировали без предварительного восстановления NaBH_4 , был обнаружен единственный основной продукт **8** (рис. 76) – 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовая кислота (Me/TMC), также описанная выше. Кроме того, в реакции образовывался циклопентенон – 10-оксо-11-фитоеновая кислота (примерно 10% от количества α -кетола, как было оценено интегрированием площадей пика хроматограммы общего ионного тока, рис. 76). Масс-спектр и схема фрагментации этого соединения описаны выше. Помимо АОС продуктов, среди продуктов реакции присутствовало в следовых количествах соединение **1** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота (Me/TMC).

ГХ-МС профиль продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОТ при участии фермента СУР74В33 был аналогичным таковому превращения 9-ГПОД (рис. 75Б). Основными выявляемыми продуктами были соединения **9а** и **9б**, описанные выше – *трео* и *эритро* изомеры 9,10-дигидрокси-12,15-октадекадиеновой кислоты, которые являются продуктами восстановления NaBH_4 соответствующего α -кетола **9**, 9-гидрокси-10-оксо-12,15-октадекадиеновой кислоты. Когда продукты (Me/TMC) анализировали с помощью ГХ-МС без восстановления NaBH_4 , на хроматограмме выявляли основной пик α -кетола **9**, описанного выше – 9-

гидрокси-10-оксо-12,15-октадекадиеновой кислоты (Me/TMC). Кроме того, в реакции также образовывался циклопентенон – 10-оксо-11,15-фитодиеновая кислота (10-ОФДК, рис. 77). Выход этого соединения составлял 2-3% от пика α -кетола. Таким образом, в отношении 9-гидроперекисей – предпочтительных субстратов – фермент CYP74B33 проявлял АОС активность.

Способность DcAOS продуцировать значительное количество циклопентенонеров наряду с α -кетолами является необычным свойством. До сих пор подобные свойства были описаны только для АОС подсемейства CYP74C, таких как StAOS3 картофеля (CYP74C10) (Hamberg, 2000; Stumpe *et al.*, 2006) и LeAOS3 томата (CYP74C3) (Itoh *et al.*, 2002; Grechkin *et al.*, 2008; Brash *et al.*, 2013). Наиболее распространенные АОС подсемейства CYP74A не производят сколько-нибудь заметных количеств циклопентенонеров из 13-ГПОД или 9-ГПОД (Vick *et al.*, 1980; Brash *et al.*, 1988; Grechkin, 1994; Grechkin *et al.*, 2002).

Каталитическая активность фермента CYP74B33 в отношении 13-гидроперекисей жирных кислот была значительно ниже, чем в отношении 9-гидроперекисей (рис. 75В и Г), о чем свидетельствовали высокие пики 13-ГОД и 13-ГОТ. Превращение 13-ГПОД было менее специфичным и приводило к образованию широкого спектра продуктов.

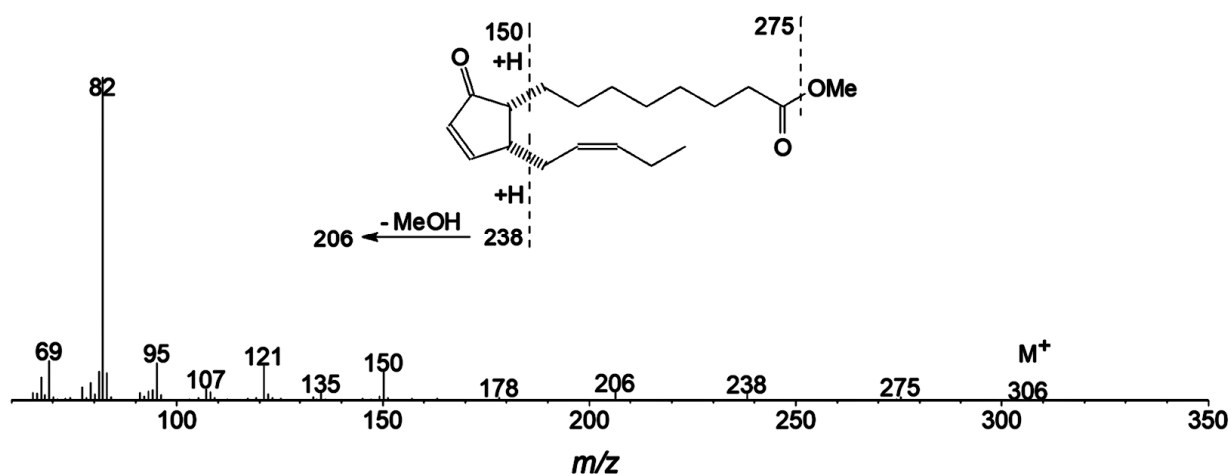


Рис. 77. Масс-спектр и схема фрагментации *cis*-10-оксо-11,15-фитодиеновой кислоты (Me).

В реакции образовывались соединения **2** (11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота, ЭАС продукт), **5a** ((9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценовая кислота, восстановленный NaBH₄ 13-ГПЛ продукт), **6a** ((10*E*)-12-гидрокси-10-додеценовая кислота, восстановленный NaBH₄ 13-ГПЛ продукт), а также соединения **10a** и **10b** – *трео* и *эритро* изомеры 12,13-дигидрокси-9-октадеценовой кислоты (Me/ТМС), которые являются продуктами восстановления NaBH₄ соответствующего α-кетона **10**, 12-оксо-13-гидрокси-9-октадеценовой кислоты (АОС продукта). Все соединения описаны выше. Таким образом, в отношении 13-ГПОД фермент СУР74В33 проявлял тройную ГПЛ/АОС/ЭАС активность. В отношении 13-ГПОТ фермент СУР74В33 проявлял слабые ГПЛ и ЭАС активности, продуцируя соединения **5a** и **6a** ((9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценовая и (10*E*)-12-гидрокси-10-додеценовая кислоты соответственно), а также соединение **2a** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновую кислоту. В целом, фермент СУР74В33 является 9-специфичной АОС с минорными ГПЛ и ЭАС активностями. Белку было присвоено тривиальное имя DcAOS (*D. carota* АОС), тогда как гену – *DcAOS*.

Белки СУР74В относятся к наиболее распространенным ферментам биосинтеза оксипинов в растениях. До настоящей работы в подсемействе СУР74В были описаны только 13-специфичные ГПЛ, ответственные за образование соединений GLV (Grechkin, 2002; Matsui, 2006; Matsui *et al.*, 2016). Полученные результаты свидетельствуют, что фермент СУР74В33 демонстрирует отличное в двух отношениях поведение по сравнению со всеми членами подсемейства СУР74В, изученными ранее. Во-первых, фермент СУР74В33 предпочтительно использует 9-гидроперекиси линолевой и α-линоленовой кислоты, в то время как превращение 13-гидроперекисей, особенно 13-ГПОТ, происходит значительно менее эффективно. Во-вторых, фермент СУР74В33 преимущественно проявляет АОС активность в отношении 9-гидроперекисей жирных кислот, в то время как превращение 13-гидроперекисей приводит к образованию различных продуктов, в том числе эпокси спиртов. Таким образом, по нашим сведениям, фермент СУР74В33 яв-

ляется первой АОС, которая дополнительно продуцирует эпокиспирты (Gorina *et al.*, 2019). При этом отличительной особенностью структуры фермента СУР74В33 является остаток лейцина в сайте «F/L toggle» (СРС-1). У всех описанных ранее АОС в данном сайте находится остаток фенилаланина, тогда как остаток лейцина характерен для последовательностей ГПЛ и ДЭС.

3.8. Получение дивинилэфирсинтаз подсемейства СУР74D и изучение их каталитических свойств

В отличие от АОС и ГПЛ, которые являются наиболее распространенными ферментами СУР74 и гены которых обнаружены в геномах всех цветковых растений, изученных до настоящего времени, ДЭС менее распространены и изучены. ДЭС обнаружены у небольшого числа видов растений из разных таксонов. Эти ферменты выявлены у двудольных, включая виды семейств Solanaceae (Galliard, Phillips, 1972; Galliard *et al.*, 1973; Itoh, Howe, 2001; Stumpe *et al.*, 2001; Fammartino *et al.*, 2007) и Ranunculaceae (Hamberg, 1998, 2002, 2004, 2005), и однодольных, включая чеснок (*A. sativum*, Alliaceae) (Grechkin *et al.*, 1995; Grechkin, Hamberg, 1996; Grechkin *et al.*, 1997; Stumpe *et al.*, 2008) и ландыш (*Convallaria majalis*, Ruscaceae) (Ogorodnikova *et al.*, 2008). 9-Специфичные ДЭС обнаружены у томата (Itoh, Howe, 2001), картофеля (Stumpe *et al.*, 2001), табака (Fammartino *et al.*, 2007) и болгарского перца (Gullner *et al.*, 2010). В луковицах чеснока была обнаружена 9/13-специфичная ДЭС (Stumpe *et al.*, 2008). Кроме того, дивиниловые эфиры – продукты ДЭС реакции – были обнаружены у бурой водоросли *Laminaria sinclairii* (Proteau, Gerwick, 1993) и красной водоросли *Polyneura latissima* (Jiang, Gerwick, 1997). Помимо этого, этерифицированные дивиниловые эфиры содержатся в фосфолипидах клубней картофеля (Fauconnier *et al.*, 2003), а также в галактолипидах (называемых «линолипинами») льна-долгунца и лютика лугового (Chechetkin *et al.*, 2009а, 2013, 2019). ДЭС и дивиниловые эфиры играют важную роль в механизмах защиты растений (Croft *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1999; Göbel *et al.*, 2001; Granér *et al.*, 2003; Prost *et al.*, 2005; Cow-

ley, Walters, 2005; Fammartino *et al.*, 2010; Nelson, 2011; Топоркова и др., 2018; Deboever *et al.*, 2020). Гены ДЭС экспрессируются в ответ на патогенез (Weber *et al.*, 1999; Stumpe *et al.*, 2001; Fammartino *et al.*, 2007), вирусную атаку (Nelson, 2011) или обработку элиситорами (Göbel *et al.*, 2001). Кроме того, дивиниловые эфиры обладают антимикробными свойствами (Grechkin, 2002; Weber *et al.*, 1999; Granér *et al.*, 2003; Prost *et al.*, 2005). Так, обработка первых листьев экзогенными дивиниловыми эфирами вызывает системную устойчивость растений ячменя к патогенному грибу *Blumeria graminis* (Cowley, Walters, 2005).

После обнаружения ЭАС активности у ферментов CYP74B и CYP74C, ранее описанных или аннотированных как ГПЛ (при этом у АОС подсемейств CYP74A и CYP74C ЭАС активность отсутствовала) следующим этапом стала проверка наличия ЭАС активности у ДЭС подсемейства CYP74D: LeDES (CYP74D1) томата (*S. lycopersicum*) и StDES (CYP74D3) картофеля (*S. tuberosum*).

Получение рекомбинантных ферментов NtDES (NP_001312606, GI: 107799697) и LeDES (NP_001234527, GI: 543675) с использованием клеток *E. coli* штаммов Rosetta-gami(DE3)pLysS В и BL21(DE3)pLysS соответственно и их очистку проводили, как описано выше. Рекомбинантные плазмиды – pET-23a, содержащая ОРС гена *LeDES*, и pBSK, содержащая ОРС гена *NtDES* – были любезно предоставлены профессором Г. Хоу (Университет Мичигана, США) и доктором Ф. Кардинале (Университет Турина, Италия) соответственно. Для получения рекомбинантного белка ОРС гена *NtDES* переклонировали в векторе pET-32 Ek/LIC. Описание продуктов (Me/TMC без или после восстановления NaBH_4) превращения гидроперекисей жирных кислот при участии NtDES и LeDES проводили, как описано выше.

Рекомбинантные ферменты NtDES и LeDES эффективно использовали 9-ГПОД и 9-ГПОТ, тогда как 13-ГПОД плохо утилизировалась в качестве субстрата. В то же время, эти ферменты были абсолютно неактивны в отношении 13-ГПОТ. Соотношения ДЭС, ЭАС и ГПЛ продуктов в реакциях, ка-

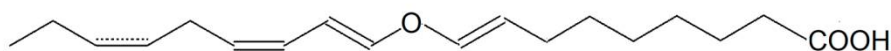
тализируемых NtDES и LeDES, представлены в таблице 9. Структурные формулы продуктов NtDES и LeDES представлены на рисунках 50 и 78. Основным продуктом превращения 9-ГПОД при участии NtDES (рис. 79А) и LeDES (рис. 80А) было соединение **12**, масс-спектр которого содержал M^+ при m/z 308 (20%), $[M - MeO]^+$ при m/z 277 (1%), $[M - C6'/9']^+$ при m/z 251 (5%), $[M - C5'/9']^+$ при m/z 237 (2%), $[M - C1/C7]^+$ при m/z 165 (11%), m/z 123 (27%), m/z 109 (29%), m/z 95 (59%), m/z 81 (97%), m/z 67 (100%). Его масс-спектр был идентичен таковому 9-[(1'E,3'Z)-нонадиенилокси]-(8E)-ноненовой (колнелевой) кислоты (Galliard, Phillips, 1972; Fammartino *et al.*, 2007).

Таблица 9. Количественное соотношение (%) ДЭС, ГПЛ и ЭАС продуктов, образующихся при участии ферментов NtDES и LeDES. Оценку проводили, исходя из площадей пиков дивиниловых эфиров (ДЭС продукты), эпокиспиртов (ЭАС продукты), 9-гидроксинонановой кислоты (восстановленный $NaBH_4$ 9-ГПЛ продукт) и (9Z)-12-гидрокси-9-додеценной и (10E)-12-гидрокси-10-додеценной кислот (восстановленные $NaBH_4$ 13-ГПЛ продукты) в хроматограммах по полному ионному току.

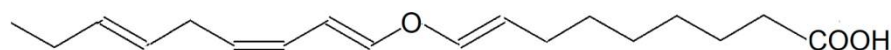
		NtDES	LeDES
9-ГПОД	ДЭС	64,6	55,2
	ГПЛ	8,9	Сл.*
	ЭАС	29,5	44,8
9-ГПОТ	ДЭС	92,5	66,9
	ГПЛ	7,5	9,9
	ЭАС	Сл.*	23,2
13-ГПОД	ДЭС	0	0
	ГПЛ	0	0
	ЭАС	100	100
13-ГПОТ	-	Нет активности	Нет активности

* Следовое количество – менее 1% всех продуктов.

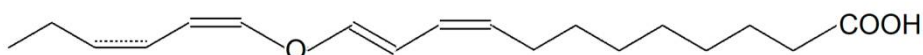
12, ω6
12a, ω3



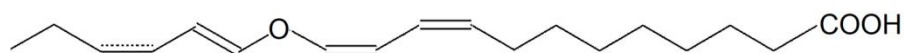
12a*



13, ω6
13a, ω3



14, ω6
14a, ω3



15, ω6
15a, ω3

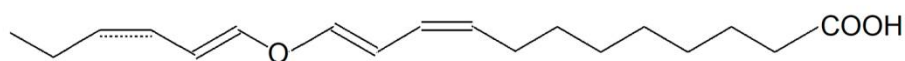


Рис. 78. Структурные формулы дивиниловых эфиров, синтезируемых при участии ДЭС, описанных в настоящей работе. **12**, колнелевая кислота; **12a**, колнеленовая кислота; **12a***, (3'*E*)-колнеленовая кислота; **13**, (ω5*Z*)-этеролева кислота; **13a**, (ω5*Z*)-этероленовая кислота; **14**, (11*Z*)-этеролева кислота; **14a**, (11*Z*)-этероленовая кислота; **15**, этеролева кислота; **15a**, этероленовая кислота. (3'*E*)-Колнеленовая кислота является продуктом термической изомеризации (8*E*,1'*E*,3'*Z*,6'*Z*)-колнеленовой кислоты во время ГХ-МС анализа.

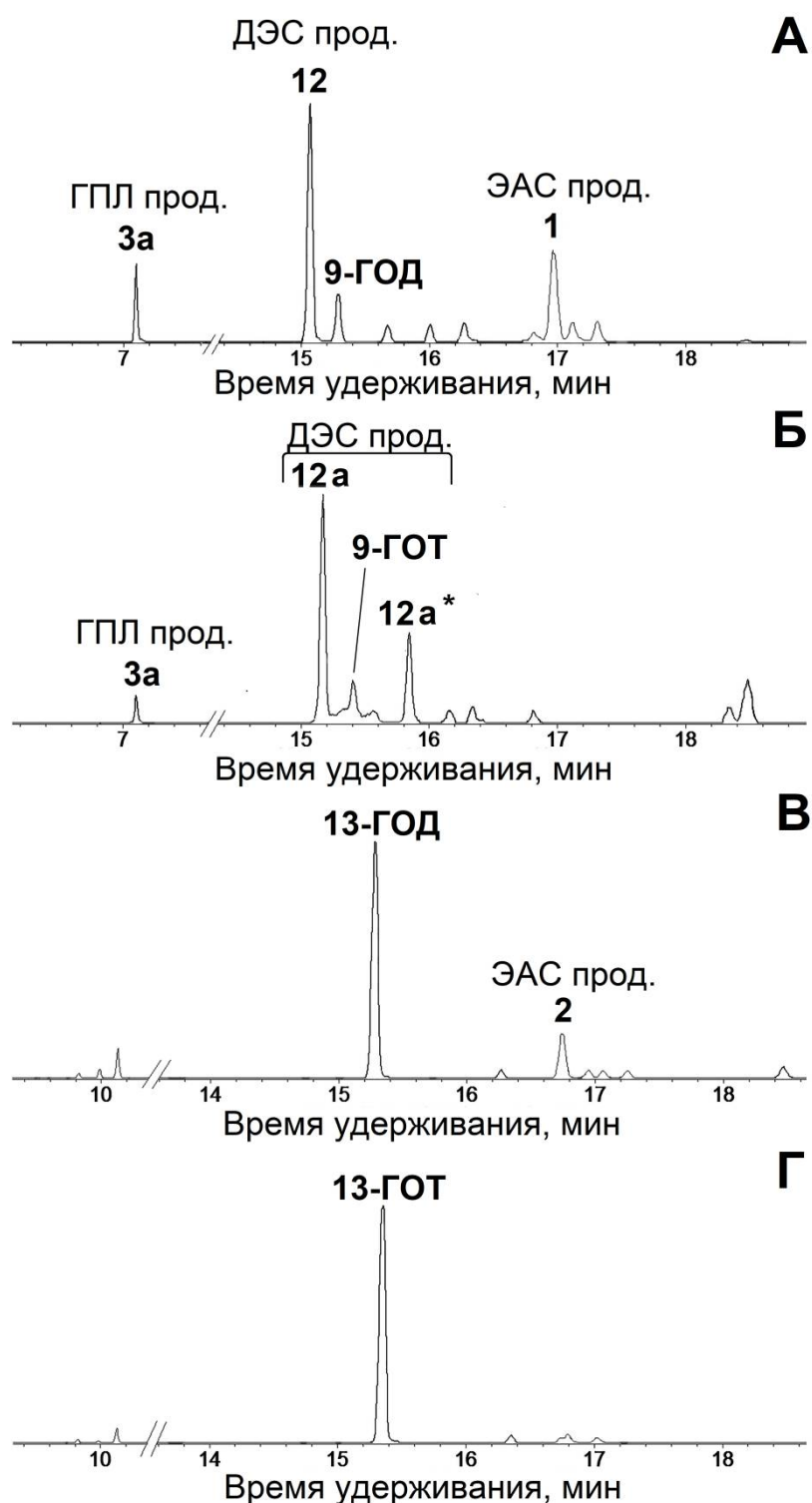


Рис. 79. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А), 9-ГПОТ (Б), 13-ГПОД (В) и 13-ГПОТ (Г) при участии NtDES. **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; **3a**, 9-гидроксинонановая кислота; **12**, колнелевая кислота; **12a**, колнелевая кислота; **12a***, (3'E)-колнеленовая кислота – продукт термальной изомеризации колнеленовой кислоты в ходе ГХ-МС анализа. Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 50 и 78.

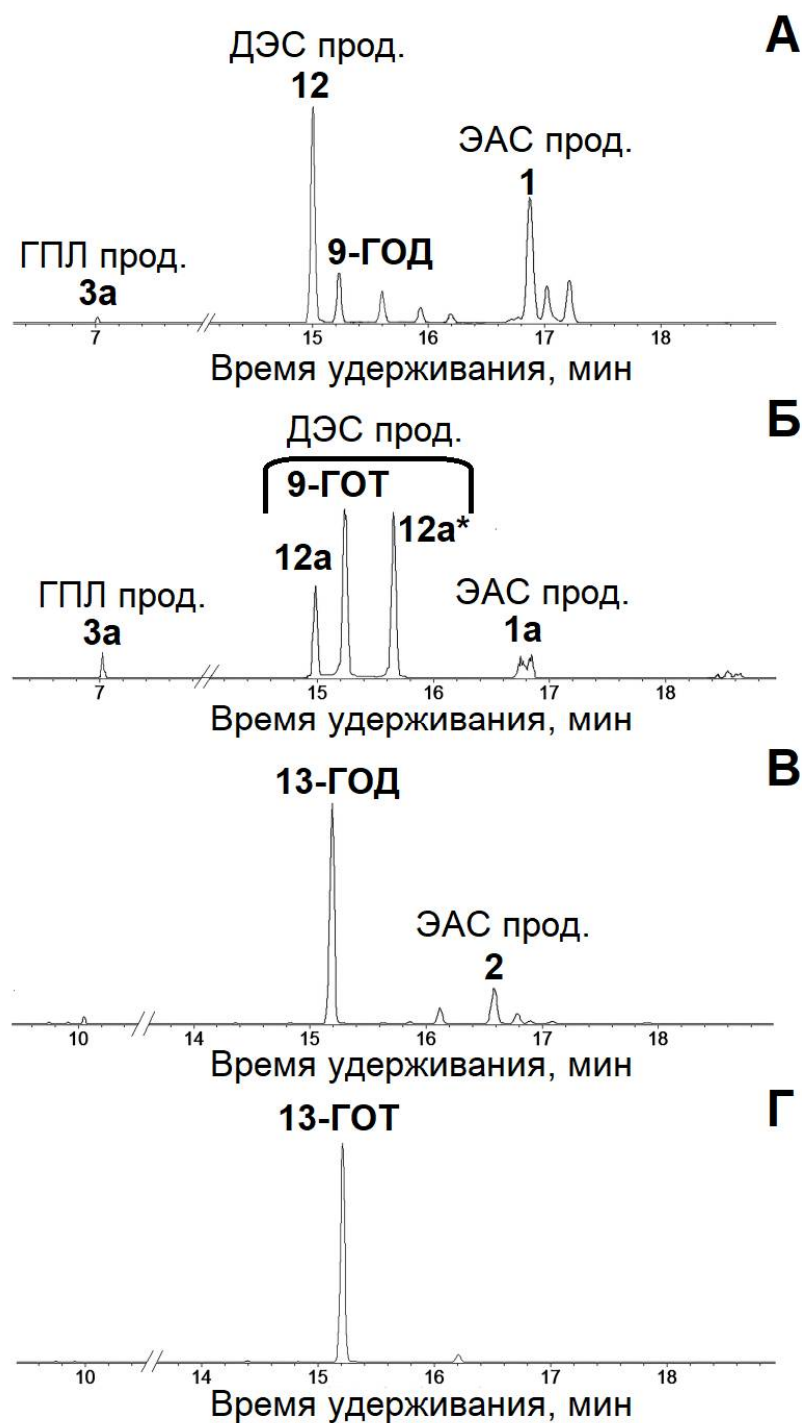


Рис. 80. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А), 9-ГПОТ (Б), 13-ГПОД (В) и 13-ГПОТ (Г) при участии LeDES. **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценон; **1a**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценон; **3a**, 9-гидроксинонановая кислота; **12**, колнелевая кислота (Me); **12a**, колнеленовая кислота; **12a***, (3'E)-колнеленовая кислота – продукт термальной изомеризации колнеленовой кислоты в ходе ГХ-МС анализа. Структурные формулы продуктов представлены на рисунках 50 и 78.

В результате гидрирования над PtO_2 с последующим метилированием продукт **12** превращался в соединение, масс-спектр которого содержал M^+ при m/z 314 (0,3%), $[\text{M} - \text{MeO}]^+$ при m/z 283 (3%), $[\text{M} - \text{Me}(\text{CH}_2)_8]^+$ при m/z 187 (36%), $[\text{M} - \text{Me}(\text{CH}_2)_8\text{O} + \text{H}]^+$ при m/z 172 (25%), $[\text{M} - \text{MeOH}]^+$ при m/z 155 (81%), $[\text{M} - \text{Me}(\text{CH}_2)_8\text{O} - \text{MeOH}]^+$ при m/z 139 (56%), $[\text{M} - \text{H}]^+$ при m/z 138 (80%), m/z 87 (75%), m/z 74 (100%) и соответствовал таковому 10-оксанадекановой кислоты (Me). Таким образом, полученные данные подтвердили идентификацию продукта **12** как колнелевой кислоты.

Вторым по количеству продуктом превращения 9-ГПОД при участии NtDES и LeDES было соединение **1** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценная кислота (ЭАС продукт). Кроме того, выявлен минорный продукт **3a** – 9-гидроксинонановая кислота (восстановленный NaBH_4 9-ГПЛ продукт). Описание соединений **1** и **3a** дано выше.

Профили продуктов (Me/TMC) инкубаций NtDES и LeDES с 9-ГПОТ выглядели аналогично профилям продуктов превращения 9-ГПОД (рис. 79Б, 80Б). Основным продуктом обеих инкубаций было соединение **12a**, масс-спектр которого содержал M^+ при m/z 306 (8%), $[\text{M} - \text{C}_8'/9']^+$ при m/z 277 (1%), m/z 240 (4%), $[\text{M} - \text{C}_1'/\text{C}_9' - \text{O}]^+$ при m/z 169 (8%), $[\text{M} - \text{MeOH}]^+$ при m/z 137 (21%), $[\text{M} - \text{C}_1/\text{C}_9 - \text{O}]^+$ при m/z 121 (37%), m/z 93 (69%), m/z 79 (100%) и соответствовал спектру 9-[1'E,3'Z,6'Z-нонатриенилокси]-(8E)-ноненоевой (колнеленовой) кислоты (Me) (Galliard *et al.*, 1973). Вторым по количеству продуктом превращения 9-ГПОТ при участии LeDES было соединение **1a** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота (ЭАС продукт). При этом в результате превращения 9-ГПОТ при участии NtDES соединение **1a** образовывалось в следовом количестве (рис. 79Б). И, наконец, минорным продуктом в обеих реакциях было так же, как в результате превращения 9-ГПОД, соединение **3a**, 9-гидроксинонановая кислота (восстановленный NaBH_4 9-ГПЛ продукт).

Инкубация обоих ферментов с 13-ГПОД была менее эффективной, о чем свидетельствовал высокий пик 13-ГОД, и приводила к образованию

единственного продукта **2** (рис. 79В, 80В) – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (ЭАС продукт). Таким образом, NtDES и LeDES вели себя в основном как ДЭС с незначительными ЭАС и ГПЛ активностями в отношении предпочтительных субстратов – 9-гидроперекисей и как ЭАС – в отношении 13-ГПОД (таблица 9, Toporkova *et al.*, 2020в). Сходная картина наблюдалась и в случае ферментов CYP74В, описанных выше. Таким образом, по-видимому, многие ферменты CYP74 – АОС, ГПЛ и ДЭС – зачастую проявляют дополнительную эпоксиалкогольсинтазную активность наряду с основной.

3.9. Получение ферментов CYP74В16 льна-долгунца (*Linum usitatissimum*) и CYP74Q1 лютика едкого (*Ranunculus acris*) и изучение их каталитических свойств

После изучения эпоксиалкогольсинтазной активности у 9/13-специфичных и 13-специфичных ГПЛ, 9/13-специфичных и 13-специфичных АОС и 9-специфичных ДЭС необходимо было проверить наличие эпоксиалкогольсинтазной активности у 13-специфичных ДЭС. До настоящей работы были описаны 9-специфичные ДЭС представителей семейства Solanaceae и 9/13-специфичная ДЭС чеснока. Однако известно, что в листьях растений семейства Ranunculaceae и у льна-долгунца синтезируется дивиниловый эфир (9Z,11E)-12-[(1'Z,3'Z)-гексадиенилокси]-9,11-додекадиеновая ((ω5Z)-этероленовая) кислота – производное 13-гидроперекиси α-линоленовой кислоты (Hamberg, 1998, 2002, 2004; Chechetkin *et al.*, 2008, 2009). В отличие от этого, все ранее описанные ДЭС синтезируются в подземных органах (корни, клубни или луковицы), используют 9-гидроперекиси (или обладают 9/13-специфичностью) и продуцируют дивиниловые эфиры, имеющие (E)-двойные связи по обе стороны от эфирного мостика.

Выбор последовательности, предположительно кодирующей дивинилэфирсинтазу льна-долгунца, проводили на основе анализа каталитически важных доменов – сайта «F/L toggle», участка перегиба I-спирали и ERR-

триады. Была выбрана последовательность CYP74B16, у которой в сайте «F/L toggle» находится остаток лейцина, а один из двух остатков глицина, расположенных непосредственно после участка перегиба I-спирали, заменен другим аминокислотным остатком. Эти особенности отличают дивинилэфир-синтазы от других ферментов CYP74. Клонирование полноразмерной ORF гена *CYP74B16* льна-долгунца проводили с использованием вектора pET-32 Ek/LIC и праймеров CYP74B16cF и CYP74B16cR (таблица 3 приложения), как описано выше (Гоголев и др., 2011; Gogolev *et al.*, 2012). Получение рекомбинантного фермента CYP74B16 с использованием клеток *E. coli* штамма Rosetta-gami(DE3)pLysS В и его очистку проводили, как описано выше. Продукты реакций были охарактеризованы с помощью УФ-спектроскопии, ГХ-МС, ВЭЖХ и ЯМР, как описано выше.

Предпочтительными субстратами рекомбинантного фермента CYP74B16 были 13-ГПОД и 13-ГПОТ (рис. 81А и Б, таблица 10). 9-ГПОД и 9-ГПОТ были менее предпочтительными субстратами (рис. 81В и Г). Фермент CYP74B16 катализировал превращение 13-ГПОТ в соединение **13a**, масс-спектр которого (Me) содержал M^+ при m/z 306 (14%), $[M - C_2H_5]^+$ при m/z 277 (2%), $[M - OCH_3]^+$ при m/z 275 (2%), $[M - (CH_2)_6 - COOCH_3]^+$ при m/z 163 (9%), 149 (28%), 131 (38%), 107 (36%), 81 (100%) и 55 (84%), см. рис. 82А. Каталитическое гидрирование над PtO_2 с последующим метилированием превращало соединение **13a** в 13-оксанодекановую кислоту (Me), масс-спектр которой содержал $[M - MeO]^+$ при m/z 283 (3%), $[M - Me(CH_2)_5]^+$ при m/z 229 (33%), $[M - Me(CH_2)_5O + H]^+$ при m/z 214 (23%), $[229 - MeOH]^+$ при m/z 197 (65%), m/z 143 (40%), m/z 97 (52%), m/z 87 (87%), m/z 74 (100%). Все эти данные, наряду с ультрафиолетовым спектром (максимум поглощения при 267 нм в MeOH), позволили идентифицировать соединение **13a** как (9Z,11E)-12-[(1'Z,3'Z)-гексадиенилокси]-9,11-додекадиеновую ((ω5Z)-этероленовую) кислоту.

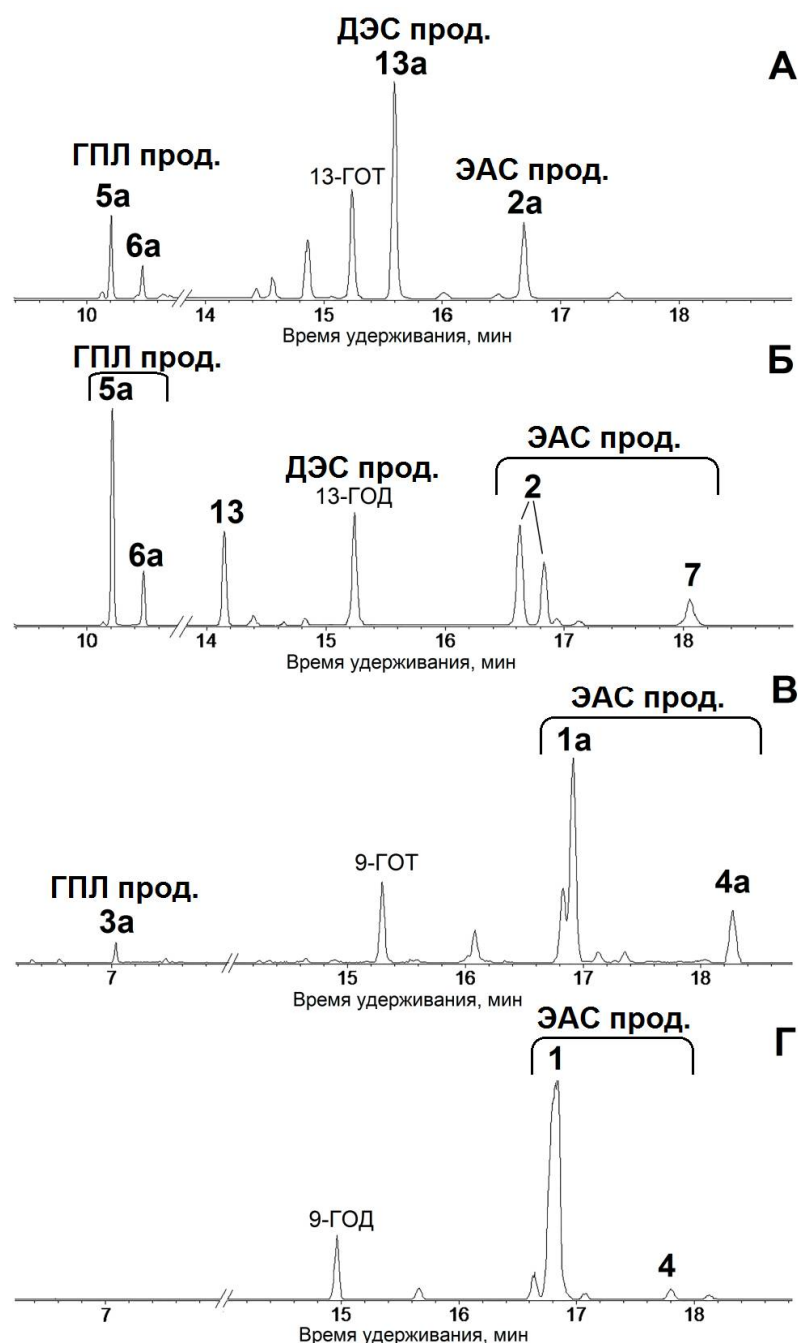


Рис. 81. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS после восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПОТ (А), 13-ГПОД (Б), 9-ГПОТ (В) и 9-ГПОД (Г) при участии фермента СУР74В16. **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; **1а**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; **2а**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота; **3а**, 9-гидроксинонановая кислота; **4**, 9,10-эпокси-13-гидрокси-12-октадеценовая кислота; **4а**, 9,10-эпокси-13-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота; **5а**, (9Z)-12-гидрокси-9-додеценовая кислота; **6а**, (10E)-12-гидрокси-10-додеценовая кислота; **7**, 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота; **13**, (ω 5Z)-этеролевая кислота; **13а**, (ω 5Z)-этероленовая кислота. Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 50 и 78.

Таблица 10. Субстратная специфичность фермента СУР74В16 и кинетические параметры катализируемых им реакций.

Субстрат	k_{cat} (c^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1} c^{-1}$)	Субстратная специфичность, %
13-ГПОТ	623,7	31,2	20	100
13-ГПОД	1222,1	80,3	15,22	76,1
9-ГПОТ	277,4	132,1	2,1	10,5
9-ГПОД	364,5	125,7	2,9	14,5

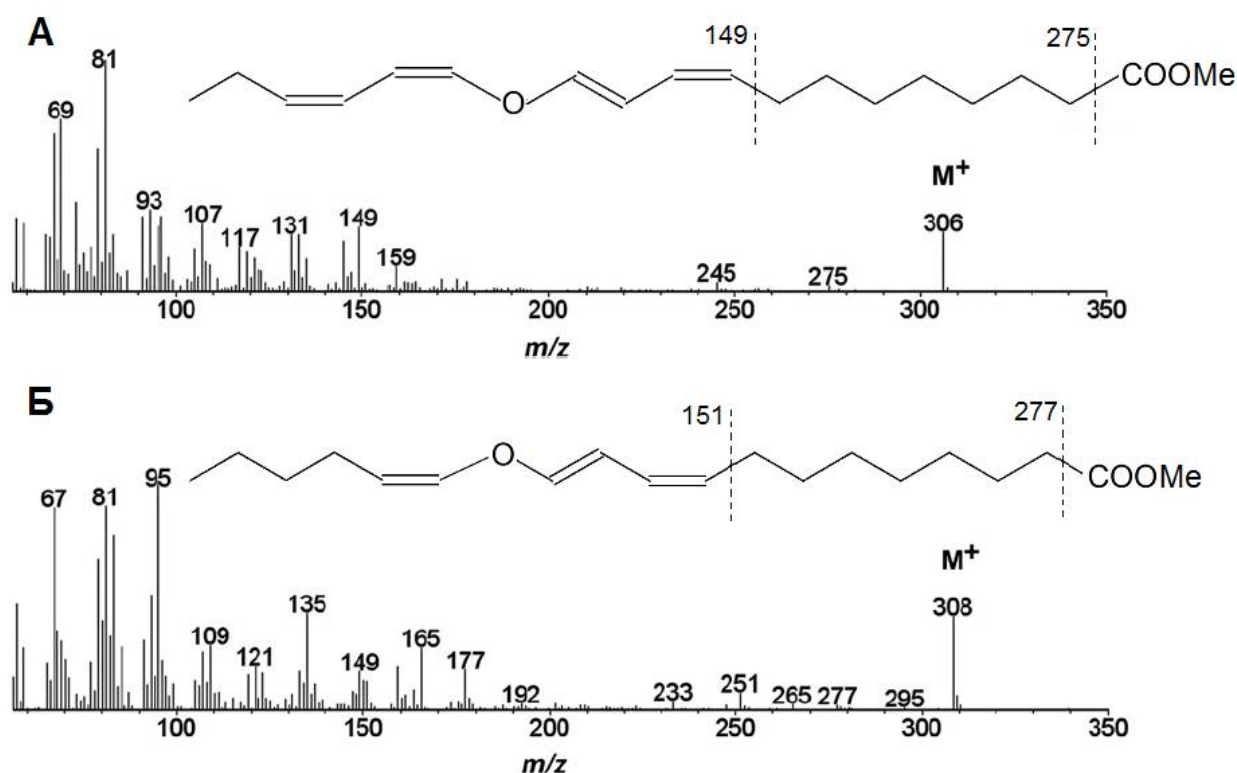


Рис. 82. Масс-спектр продуктов **13a** (А) и **13** (Б) – ($\omega 5Z$)-этероленовой и ($\omega 5Z$)-этеролевой кислот (Me) соответственно.

Первоначально это соединение было обнаружено у бурой водоросли *L. sinclairii* (Proteau, Gerwick, 1993), после чего в листьях растений семейства Ranunculaceae (Hamberg, 1998, 2002, 2004) и льна-долгунца в результате инфицирования клетками *Pectobacterium atrosepticum* (Chechetkin *et al.*, 2008). Дополнительными продуктами превращения (рис. 81А) были соединения **5a**

и **6a** ((9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценная и (10*E*)-12-гидрокси-10-додеценная кислоты соответственно, восстановленные NaBH₄ 13-ГПЛ продукты), а также **2a** (11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота, ЭАС продукт), описание которых дано выше.

Хроматограмма превращения 13-ГПОД при участии фермента СУР74В16 отличалась от таковой превращения 13-ГПОТ (Рис. 81Б). Эта реакция приводила к образованию в основном соединений **5a** и **6a** – продуктов 13-ГПЛ активности. Минорными продуктами были два изомера соединения **2**, а также соединения **7** и **13**. Соединения **2** (11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценная кислота, ЭАС продукт), **5a** и **6a** ((9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценная и (10*E*)-12-гидрокси-10-додеценная кислоты соответственно, восстановленные NaBH₄ 13-ГПЛ продукты) и **7** (9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценная кислота, ЭАС продукт) описаны выше. Изомеры соединения **2**, по-видимому, отличаются стереоконфигурацией при C11 и C12. Масс-спектр соединения **13** (Me, рис. 82Б) содержал M⁺ при *m/z* 308 (21%), [M – MeO]⁺ при *m/z* 277 (2%), [M – Me(CH₂)₃]⁺ при *m/z* 251 (4%), *m/z* 219 (3%), *m/z* 177 (15%) и [M – (CH₂)₆COOMe]⁺ при *m/z* 165 (19%) и соответствовал такому (9*Z*,11*E*,1'*Z*)-12-(1'-гексенилокси)-9,11-додекадиеновой, (ω5*Z*)-этеролеовой, кислоты (Me, Hamberg, 1998).

9-ГПОТ была наименее предпочтительным субстратом для фермента СУР74В16. Превращение 9-ГПОТ (рис. 81В) приводило к образованию соединений **1a** (9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота, ЭАС продукт), **3a** (9-гидроксинонановая кислота, восстановленный NaBH₄ 9-ГПЛ продукт) и **4a** (9,10-эпокси-13-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота, ЭАС продукт), описание которых дано выше. На хроматограмме продуктов превращения 9-ГПОД при участии фермента СУР74В16 (рис. 81Г) выявлены соединения **2** и **4** (9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценная и 9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценная кислоты соответственно, ЭАС продукты), описание которых дано выше. В целом, полученные данные свидетельствуют, что фермент СУР74В16 проявляет в основном ДЭС активность в отно-

шении предпочтительного субстрата – 13-ГПОТ – и ГПЛ активность в отношении 13-ГПОД. В то же время, фермент СУР74В16 проявляет ЭАС активность в отношении 9-гидроперекисей с минорной ГПЛ активностью в отношении 9-ГПОТ (таблица 11, Гоголев и др., 2011; Gogolev *et al.*, 2012; Toporkova *et al.*, 2020в).

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. К сожалению, геном данного растения не расшифрован. В отсутствие данных о нуклеотидной последовательности выявление мРНК неизвестных генов возможно при использовании системы вырожденных праймеров. Для конструирования праймеров проанализировали результат выравнивания аминокислотных последовательностей ферментов СУР74 различных видов растений (таблица 12) и их консервативных доменов с акцентом на каталитически важные домены: В'-спираль, участок перегиба I-спирали, ERR-триаду и гем-связывающий домен. Эти выравнивания позволили определить наиболее консервативные области последовательностей СУР74.

Таблица 11. Количественное соотношение (%) ДЭС, ГПЛ и ЭАС продуктов, образующихся при участии фермента СУР74В16. Оценку проводили, исходя из площадей пиков дивиниловых эфиров (ДЭС продукты), эпокиспиртов (ЭАС продукты), 9-гидроксинонановой кислоты (восстановленный NaBH₄ 9-ГПЛ продукт) и (9Z)-12-гидрокси-9-додеценновой и (10E)-12-гидрокси-10-додеценновой кислот (восстановленные NaBH₄ 13-ГПЛ продукты) в хроматограммах по полному ионному току.

	9-ГПОД			9-ГПОТ			13-ГПОД			13-ГПОТ		
	ДЭС	ГПЛ	ЭАС	ДЭС	ГПЛ	ЭАС	ДЭС	ГПЛ	ЭАС	ДЭС	ГПЛ	ЭАС
СУР74 В16	0	0	100	0	4,8	95,2	19,7	55,9	24,4	58,0	22,7	19,3

Таблица 12. Идентификационные номера нуклеотидных и аминокислотных последовательностей представителей семейства СУР74.

Название фермента	Идентификационный номер в базе данных NCBI	
	нуклеотидная последовательность	аминокислотная последовательность
ДЭС (<i>N. tabacum</i>)	AF070976.1	AAL40900
ДЭС (<i>Capsicum annuum</i>)	DQ832721.1	ABH03632
ДЭС (<i>A. sativum</i>)	AJ867809.1	CAI30435
ДЭС (<i>S. tuberosum</i>)	AJ309541.1	CAC2152
ДЭС (<i>S. lycopersicum</i>)	AF317515.1	AAG4261
АОС (<i>A. thaliana</i>)	AY128755	AAM9115
АОС (<i>L. usitatissimum</i>)	U00428	AAA03353
АОС (<i>Oryza sativa</i>)	AY055775	AAL17675
АОС (<i>S. tuberosum</i>)	DQ174273	ABA54984
АОС (<i>Z. mays</i>)	AY488135	AAR33048
АОС (<i>G. max</i>)	EU366252.1	ACA7994.1
АОС (<i>S. lycopersicum</i>)	AF230371	AAF67141
13-ГПЛ (<i>M. truncatula</i>)	DQ011231	AAV30368
9-ГПЛ (<i>C. melo</i>)	AF081955	AAK54282
ГПЛ (<i>Citrus aurantium</i>)	DQ866816	ABI64149
ГПЛ (<i>Citrus sinensis</i>)	AY242385	AAO72740
ГПЛ (<i>S. lycopersicum</i>)	AF230372	AAF67142
ГПЛ (<i>Psidium guajava</i>)	AF239670	AAK15070
ГПЛ (<i>Z. mays</i>)	AY540745	AAS47027
ГПЛ (<i>Populus trichocarpa</i>)	EF145878	EEE99451

В качестве подходящих участков для конструирования вырожденных праймеров выбрали аминокислотные последовательности двух доменов: В'-спирали и ERR-триады – и сконструировали три пары консенсусных праймеров, соответствующих этим доменам у трех групп ферментов (таблица 13).

Перечисленные три группы ферментов, обозначенные как группы ДЭС, ГПЛ и АОС, определили следующим образом. В первую группу (ДЭС) включили охарактеризованные к настоящему времени дивинилэфирсинтазы растений семейства Solanaceae. Праймеры DF и DR оказались строго комплементарны выбранным участкам генов данной группы. Вторую и третью группы (ГПЛ и АОС соответственно) составили гидропероксидлиазы и алленоксидсинтазы, обладающие наибольшим сходством первичной структуры и субстратной специфичности с дивинилэфирсинтазами. На основе последовательностей генов, кодирующих выбранные ферменты, сконструировали вырожденные праймеры HF/HR (группа ГПЛ) и AF/AR (группа АОС).

Таблица 13. Олигонуклеотидные праймеры для выявления транскриптов генов неизвестных ферментов СУР74.

Группа	Праймер	5' - 3' последовательность	Соответствующая аминокислотная последовательность (домен)
ГПЛ	HF11	gA(A/g)AAg(C/g)ACAAGAg CAC(g/C)gT(g/T)TTC	EKHKSTV (В'-спираль)
	HR21	CA(T/A)Ag(A/C)A(g/A)CTC (C/g/A)CCTTTCTTg	IKKGELL (ERR-триада)
АОС	AF1	CCAACATgCC(T/A)CC(T/g/ C)ggCCC(C/T/A)TTC	ANMPPGP' (В'-спираль)
	AR2	gTCTC(A/C)(C/g)gC(T/C)C(A/g)TT(T/C)gACC	WSNGPE (ERR-триада)
ДЭС	DF1	gTCAAAATCAACATggCA CC	VKINMA (В'-спираль)
	DR2	gTTTCCCTTCCATTAgACC	WSNGRE (ERR-триада)

Сконструированные праймеры, приведенные в таблице 13, использовали для выявления последовательностей, гомологичных генам семейства CYP74, в библиотеках кДНК, полученных в результате реакции обратной транскрипции тотальных мРНК, выделенных из взрослых растений лютика едкого. Схема расположения праймеров приведена на рисунке 83. Кроме основных пар, приведенных в таблице 13, на схеме указаны дополнительные праймеры (таблица 5 приложения).

Для изучения ферментов CYP74 лютика едкого (*R. acris*) тотальную РНК выделяли из листьев. В качестве матрицы для гнездовой ПЦР с вырожденными праймерами (таблица 13) использовали кДНК, полученную в результате реакции обратной транскрипции. Полученные в результате продукты длиной около 1000 п.н. изначально клонировали в векторе pGEM-T (Promega, США), после чего расшифровали их нуклеотидную последовательность с помощью ДНК-анализатора ga3130 (Applied Biosystems, США). Разработанная система вырожденных праймеров позволила выявить центральные области кДНК генов неизвестных ранее ферментов CYP74. После этого на расшифрованной части кДНК конструировали по несколько прямых и обратных тандемно расположенных праймера и использовали их в качестве ген-специфичных праймеров (рис. 84, таблица 6 приложения). Для обеспечения амплификации с ними 5'- и 3'-концевых участков гена в соответствии с методом RACE к 5'- и 3'-концам матрицы присоединили неспецифичные адаптерные последовательности, комплементарным которым является универсальный праймер M1. Первый раунд ПЦР проводили с использованием внешнего ген-специфичного и M1 праймеров. Продукты этих реакций послужили матрицами для второго раунда ПЦР с тандемно расположенным внутренним ген-специфичным и M1 праймерами. Этот подход гнездовой ПЦР (рис. 84) позволил увеличить специфичность амплификации участков ДНК, для которых известна последовательность только одной концевой области. В результате расшифровали 5'- и 3'-концевые фрагменты кДНК транскриптов гена (или нескольких генов) неизвестных ферментов CYP74.

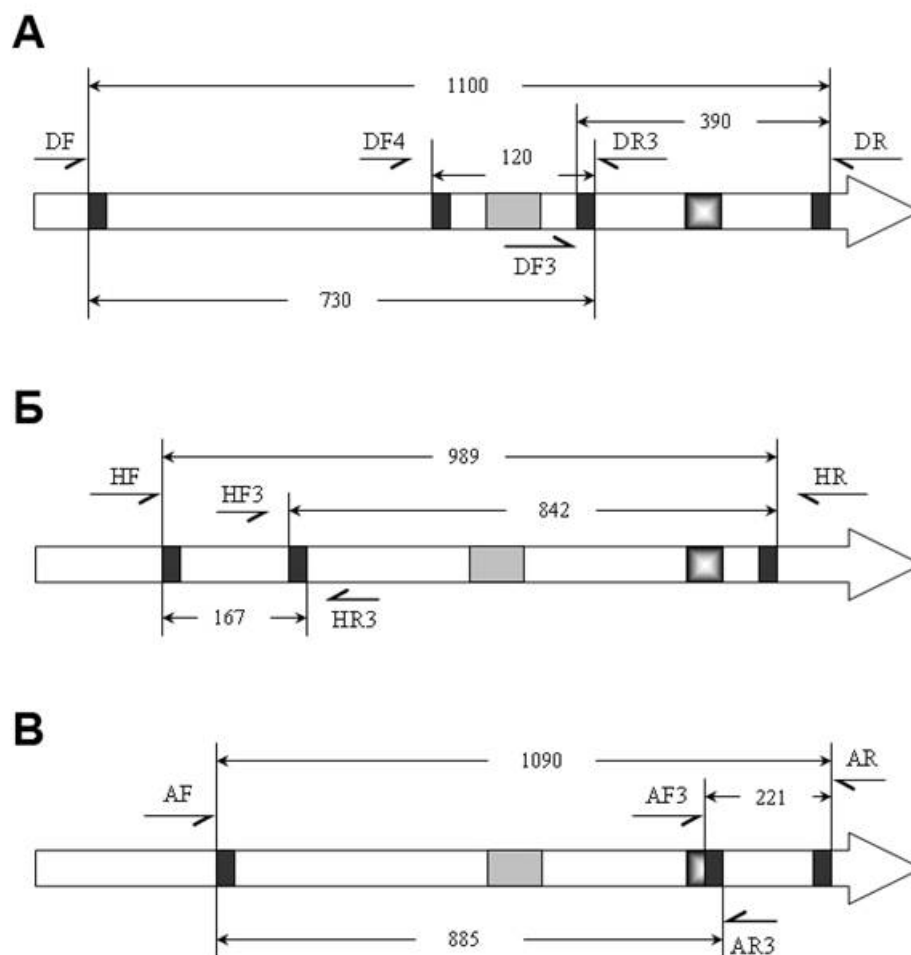


Рис. 83. Схема расположения праймеров на последовательностях транскриптов генов, кодирующих ферменты семейства CYP74: группа ДЭС (А), группа GPL (Б), группа АОС (В).

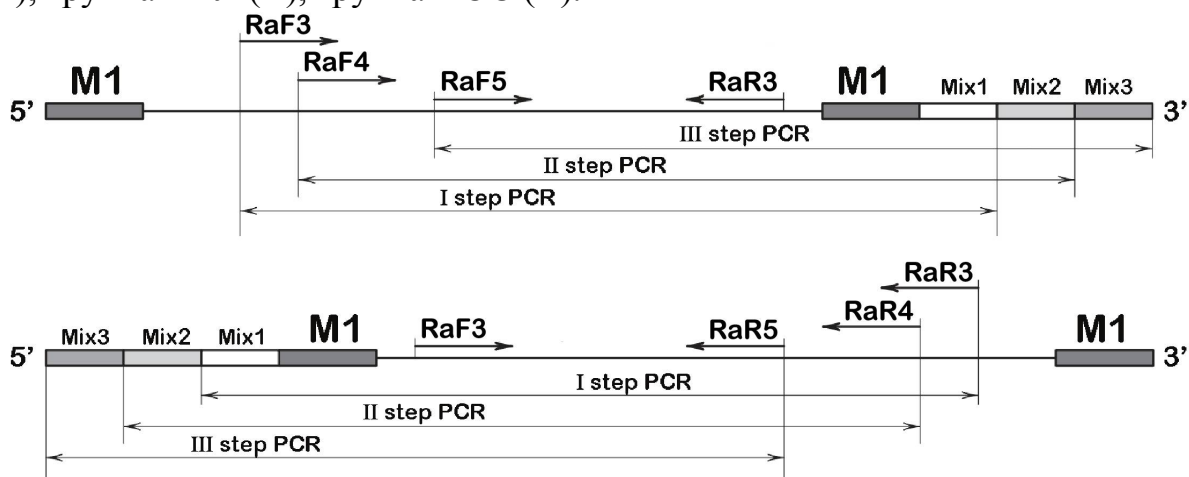


Рис. 84. Схема «гнездовой» ПЦР с использованием ген-специфичных праймеров и универсального праймера M1. Универсальные праймеры (Evrogen, Россия), использованные на этой стадии, обозначены следующим образом: Step-out primer mix1 – Mix 1, Step-out primer mix2 – Mix 2, Step-out primer mix3 – Mix 3; M1 – универсальный праймер для синтеза двуцепочечной кДНК (Evrogen, Россия).

Следующим этапом стало определение нуклеотидных последовательностей нескольких клонов полученной клонотеки. Известно, что цитохромы P450 растений часто представлены множеством изоформ, кодируемых семействами генов. Поскольку клонированные нами 5'- и 3'-фрагменты могли соответствовать генам разных изоформ, для получения полной последовательности ОРС проводили дополнительный раунд амплификации полноразмерных кДНК. Для этого использовали концевые праймеры, комплементарные 5'- и 3'-концевым участкам. Таким образом, выявили и клонировали ОРС полноразмерного гена неизвестного ранее фермента CYP74Q1 лютика. Этот белок не принадлежит ни одному известному подсемейству CYP74, как определено по результатам анализа последовательности с помощью программы BLAST. Таким образом, это первый представитель нового подсемейства CYP74Q (рис. 85) – CYP74Q1.

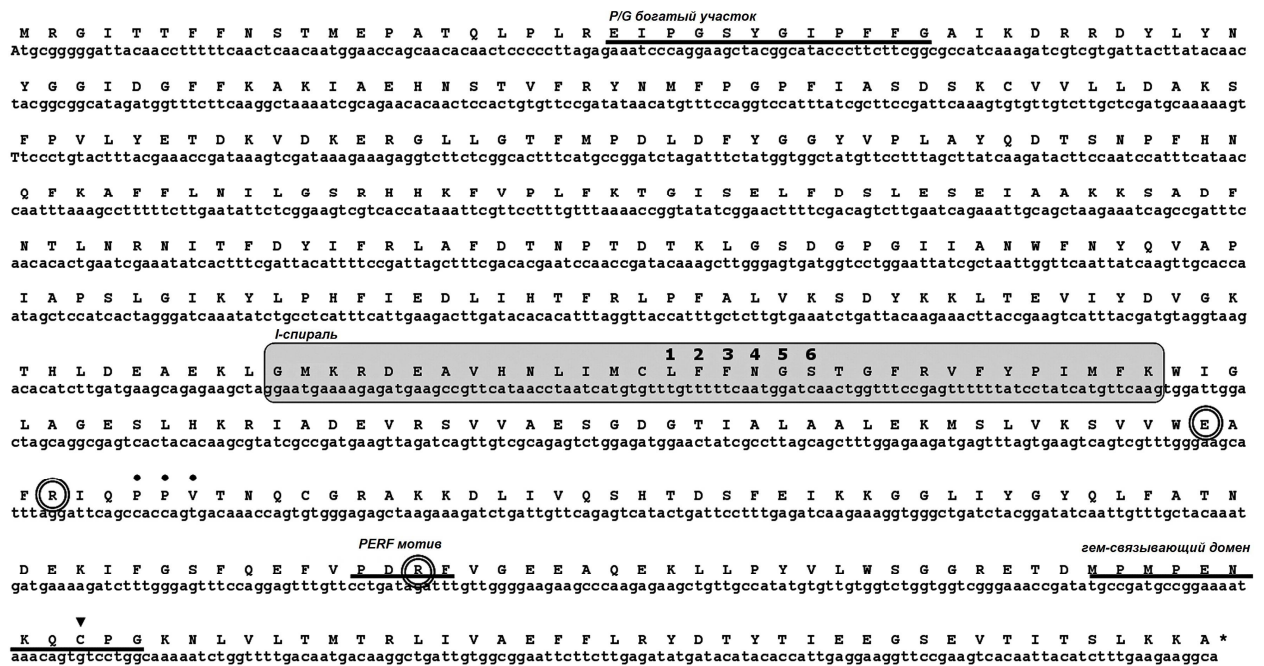


Рис. 85. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности фермента CYP74Q1 лютика едкого. Консервативные домены отмечены следующим образом: I-спираль обведена и закрашена серым цветом, участок перегиба I-спирали пронумерован 1 – 6, ERR-триада обведена двойным кольцом, P/G-богатый участок, PERF-мотив и гем-связывающий домен подчеркнуты жирными линиями, черным треугольником отмечено положение консервативного остатка цистеина – гемового лиганда.

Скрининг библиотеки кДНК выявил две дополнительные изоформы, обладающие некоторыми незначительными вариациями последовательностей. Клонирование ОРС гена *CYP74Q1* для получения рекомбинантного белка проводили с использованием вектора pET-32 Ek/LIC и праймеров CYP74Q1cF и CYP74Q1cR (таблица 3 приложения), как описано выше. Получение рекомбинантного фермента CYP74Q1 с использованием клеток *E. coli* штамма Rosetta-gami(DE3)pLysS В и его очистку проводили, как описано выше. ОРС изоформы 1 состояла из 1449 нуклеотидов и кодировала полипептид длиной 483 аминокислотных остатка (рис. 85). Аминокислотная последовательность фермента CYP74Q1 проявляла 52% идентичности с CmHPL (CYP74C2), 51% – с предполагаемой АОС (CYP74C9) *Petunia integrarifolia*, 49% – с LeDES (CYP74D1) и 49% – с HbAOS (CYP74A9). Таким образом, фермент CYP74Q1 почти одинаково удален от подсемейств CYP74C, CYP74D и CYP74A.

Рекомбинантный фермент CYP74Q1 эффективно использовал в качестве субстратов 13-ГПОТ и 13-ГПОД (рис. 86), но не 9-ГПОД и 9-ГПОТ. Кинетика реакций превращения 13-ГПОТ и 13-ГПОД при участии фермента CYP74Q1 имела гиперболический профиль (рис. 86). Значения K_M (таблица 14) свидетельствовали, что сродство фермента CYP74Q1 к 13-ГПОТ более чем в два раза выше, чем к 13-ГПОД. Значение константы каталитической (k_{cat}) реакции превращения 13-ГПОТ было примерно в два раза выше, чем соответствующее значение реакции превращения 13-ГПОД (таблица 14). Таким образом, исходя из соотношения k_{cat}/K_M (таблица 14), 13-ГПОТ являлась предпочтительным субстратом для фермента CYP74Q1.

Анализ продуктов (в виде Me эфиров или Me/ТМС после или без восстановления NaBH_4) превращения гидроперекисей при участии рекомбинантного фермента CYP74Q1 проводили, как описано выше. Выявлено специфическое превращение 13-ГПОД в продукт **13** (рис. 87А).

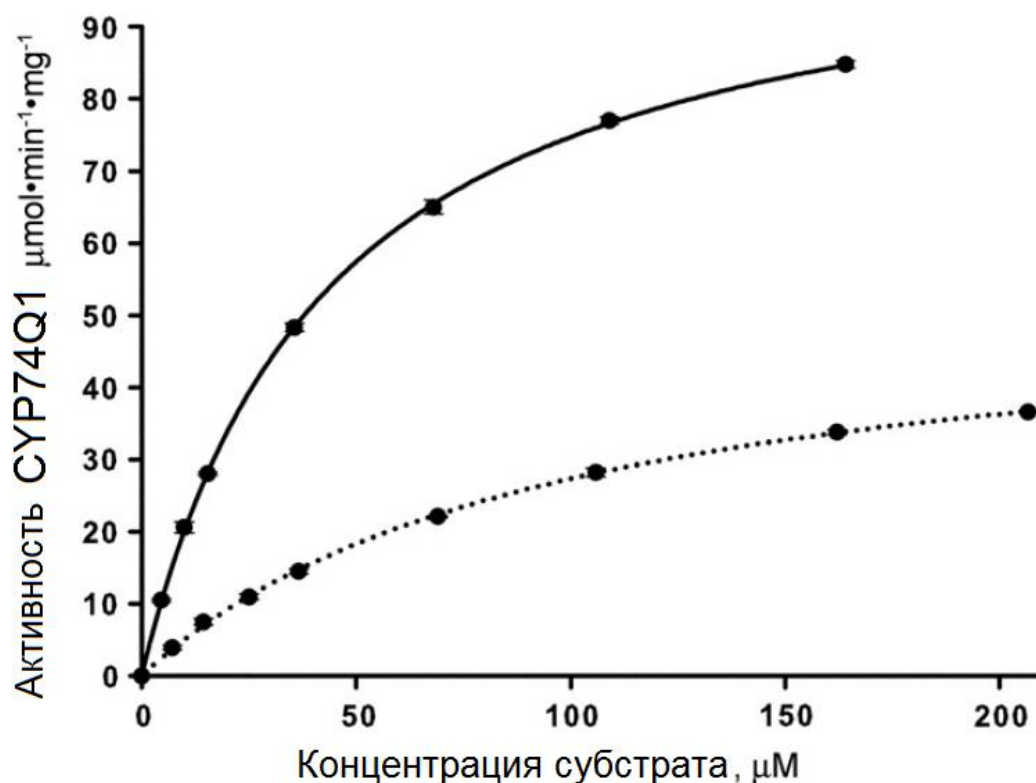


Рис. 86. Кривые субстратного насыщения для рекомбинантного фермента СУР74Q1. Кинетическая кривая превращения 13-ГПОТ показана сплошной линией, 13-ГПОД – пунктирной линией.

Таблица 14. Субстратная специфичность фермента СУР74Q1 и кинетические параметры катализируемых им реакций.

Субстрат	k_{cat} (с^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}\text{с}^{-1}$)	Субстратная специфичность, %
13-ГПОТ	$134,0 \pm 1,4$	$43,1 \pm 1,1$	3,11	100
13-ГПОД	$67,7 \pm 1,1$	$97,6 \pm 3,5$	0,69	22
9-ГПОТ	-	-	-	0
9-ГПОД	-	-	-	0

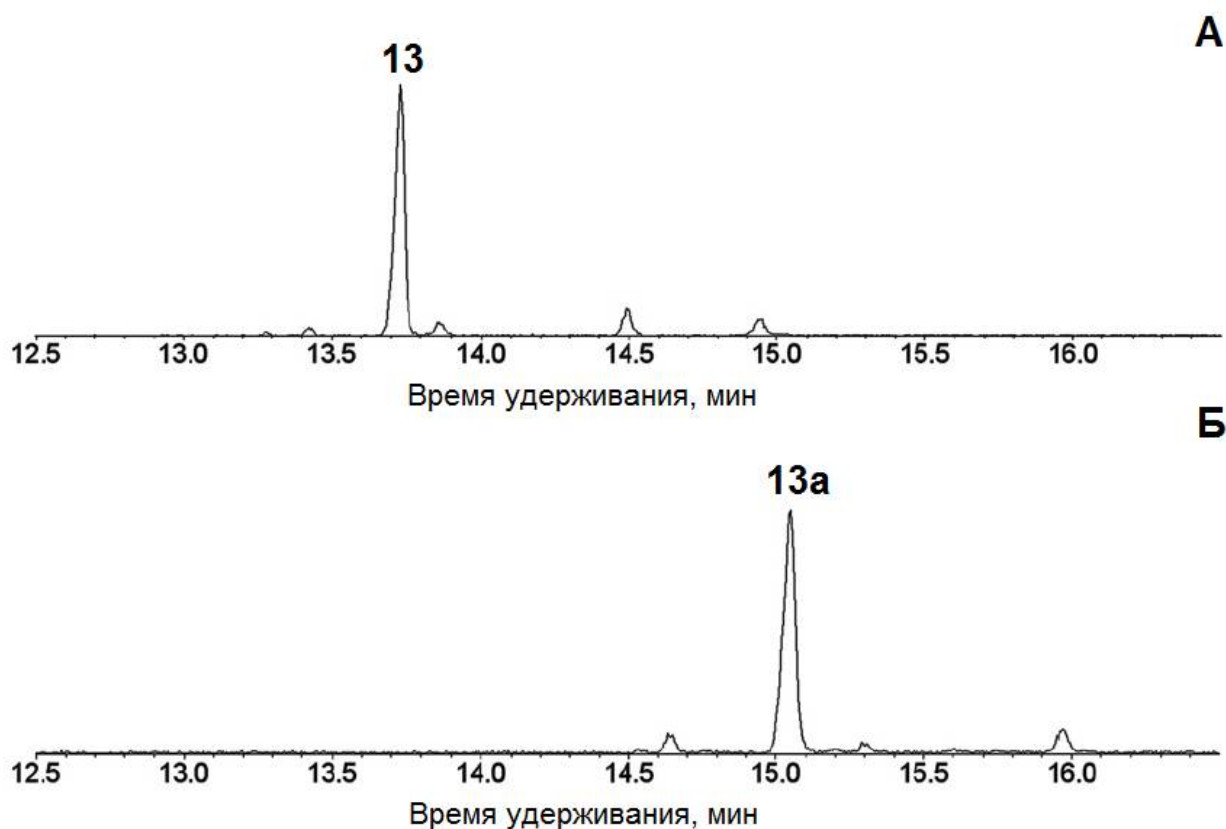


Рис. 87. Хроматограммы продуктов (Me) превращения 13-ГПОД (А) и 13-ГПОТ (Б) при участии фермента СУР74Q1. **13**, (ω 5Z)-этеролева кислота; **13a**, (ω 5Z)-этероленовая кислота.

Чтобы подтвердить структурную идентификацию, включая геометрию двойной связи, продукт **13** (Me) очищали с помощью ВЭЖХ, и записывали его ^1H -ЯМР и 2D-COSY спектры (рис. 88А, таблица 7 приложения). Данные полностью подтвердили идентификацию продукта **13** как (ω 5Z)-этеролевои кислоты. Фермент СУР74Q1 наиболее эффективно и специфично превращал 13-ГПОТ. Преобладающим продуктом (рис. 87Б) было соединение **13a** (Me эфир) – (ω 5Z)-этероленовая кислота, охарактеризованная выше. Следует отметить, что (ω 5Z)-этероленовая и этероленовая кислоты коэлюируют при разделении методом ГХ-МС. Таким образом, чтобы выявить точную геометрию двойной связи, продукт **13a** (Me эфир) выделяли и очищали с помощью ВЭЖХ на обратной и нормальной фазах. После этого записали данные ^1H -ЯМР и 2D-COSY спектров (рис. 88Б, таблица 8 приложения). Эти данные позволили однозначно определить соединение **13a** как (ω 5Z)-этероленовую кислоту.

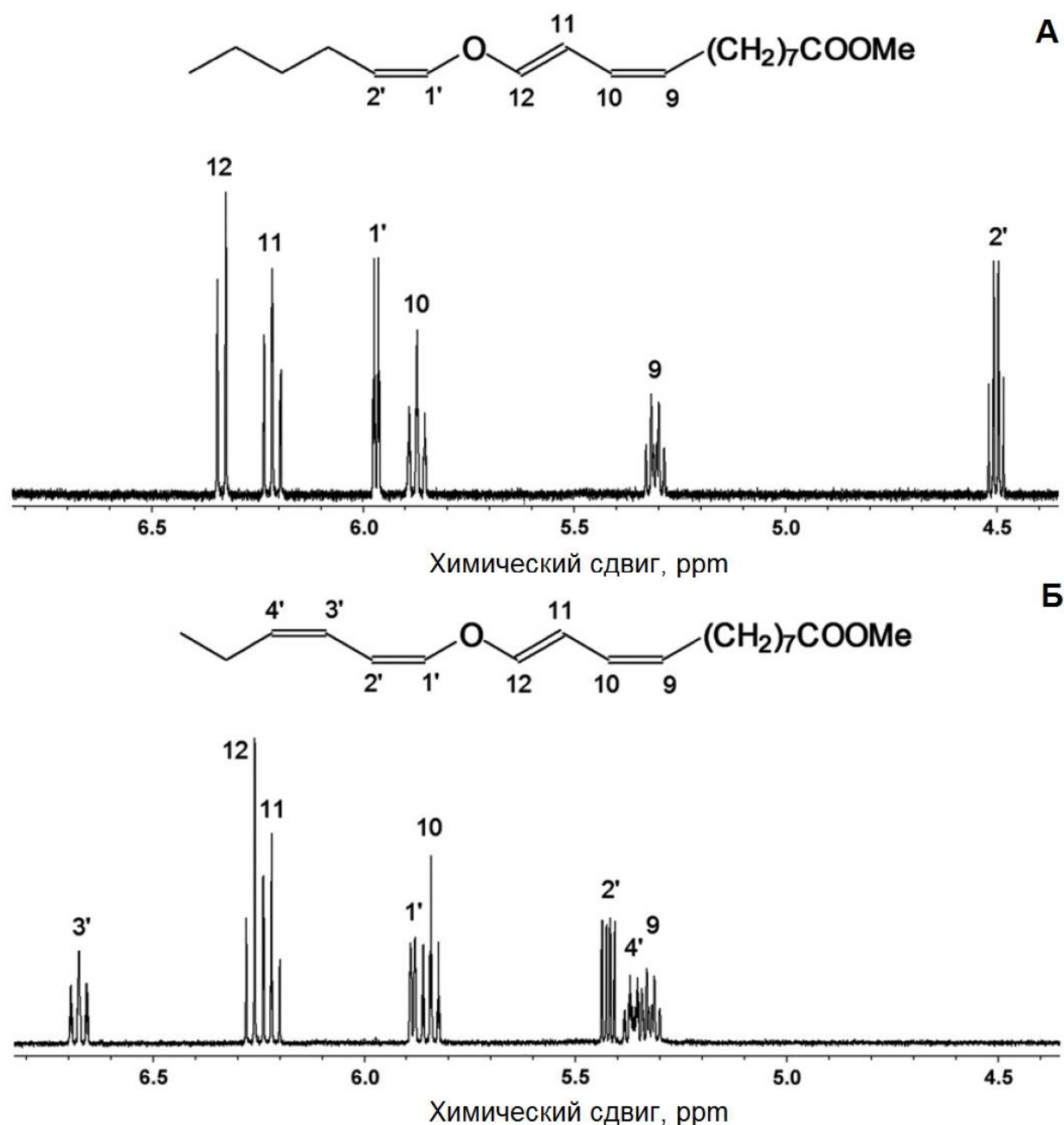


Рис. 88. Олефиновые участки $^1\text{H-NMR}$ спектров (600 МГц, $[\text{D}_6]\text{бензол}$, 296 К) продуктов **13** (А) и **13a** (Б). Номера положения метиновых группировок указаны над пиками. Вставки – структурные формулы продуктов **13** и **13a** с пронумерованными олефиновыми протонами.

Таким образом, новому ферменту было присвоено название RaDES (ДЭС *R. acris*) и кодирующему его гену – *RaDES*. RaDES, в отличие от фермента CYP74B16, является истинной ДЭС (Gorina *et al.*, 2014).

Виды семейства Ranunculaceae филогенетически удалены от других растений, у которых описаны ДЭС. Хотя ДЭС были обнаружены в тканях растений нескольких видов семейства Ranunculaceae (Hamberg, 1998, 2002,

2004), гены ДЭС до настоящей работы не были клонированы, и кодируемые ими белки не были охарактеризованы. RaDES (CYP74Q1) расширяет разнообразие изученных ДЭС. ДЭС растений семейства Solanaceae относятся к подсемейству CYP74D, в то время как ДЭС чеснока (*A. sativum*) является единственным членом подсемейства CYP74H. Фермент CYP74B16 льна-долгунца представляет собой необычный фермент, проявляющий двойную ДЭС/ГПЛ активность (с минорной ЭАС активностью), относящийся к подсемейству CYP74B (Gogolev *et al.*, 2012). Все другие известные члены этого подсемейства являются 13-специфичными ГПЛ. Гены ДЭС подсемейства CYP74D, а также ДЭС чеснока экспрессируются в незеленых органах растений (Grechkin *et al.*, 1995). В отличие от этого, гены ферментов CYP74Q1 и CYP74B16 (Gogolev *et al.*, 2012) экспрессируются в листьях *R. acris* и льна-долгунца соответственно. Оба фермента преимущественно используют 13-гидроперекиси α -линоленовой и линолевой кислот. Их отличительной особенностью является производство (ω 5Z)-этеролевой и (ω 5Z)-этероленовой кислот. В отличие от них, «классические» ДЭС растений семейства Solanaceae (CYP74D) представляют собой 9-специфичные ферменты и продуцируют колнелевую и колнеленовую кислоты. ДЭС чеснока (CYP74H1) использует как 13-, так и 9-гидроперекиси линолевой и α -линоленовой кислот и катализирует образование либо этеролевой и этероленовой, либо колнелевой и колнеленовой кислот соответственно.

Помимо сходства, есть и существенные различия между ферментом CYP74B16 льна-долгунца и RaDES лютика едкого. Эти ферменты филогенетически удалены друг от друга и обладают только 36% идентичности аминокислотных последовательностей. Однако главное различие между этими ферментами относится к образуемым продуктам. В отношении 13-ГПОТ эти ферменты ведут себя сходным образом, продуцируя (ω 5Z)-этероленовую кислоту. Однако RaDES продуцирует это соединение в качестве единственного продукта, тогда как фермент CYP74B16 катализирует образование дополнительно ГПЛ и ЭАС продуктов, хотя и в меньшем количестве. В отношении

13-ГПОД различия еще более существенны: при участии RaDES образуется только (ω 5Z)-этеролевая кислота, тогда как при участии фермента CYP74B16 (ω 5Z)-этеролевая кислота является не основным продуктом. В основном, в результате инкубации фермента CYP74B16 с 13-ГПОД образуются ГПЛ продукты. Минорными продуктами превращения являются эпокиспирты. В отношении 9-гидроперекисей RaDES не проявляет активности, тогда как фермент CYP74B16 катализирует их превращение преимущественно в эпокиспирты. Таким образом, RaDES является истинной ДЭС, в то время как фермент CYP74B16 проявляет ДЭС, ГПЛ и ЭАС свойства в зависимости от используемого субстрата, что ставит ее в один ряд с описанными выше ферментами с двойной и тройной активностями.

3.10. Получение ферментов CYP74M1, CYP74M2 и CYP74M3 плаунка *Selaginella moellendorffii*

Еще одной группой растений, у которых обнаружены дивиниловые эфиры – производные 13-гидроперекисей жирных кислот – являются плаунки рода *Selaginella*: *S. martensii* и *S. moellendorffii* (Ogorodnikova *et al.*, 2015). В целом, например, в геноме *S. moellendorffii* содержится не менее 10 генов семейства CYP74 (Banks *et al.*, 2011). Плаунок *Selaginella moellendorffii* Hieron относится к древнейшим сосудистым растениям, сохранившимся до наших дней. Ферменты CYP74 *S. moellendorffii* относятся к четырем новым подсемействам CYP74J, CYP74K, CYP74L и CYP74M. Подобное разнообразие генов CYP74 является одним из самых больших среди геномов изученных растений. До настоящей работы ни один из этих генов не был клонирован, и соответствующие ферменты не были охарактеризованы. Особенности первичной структуры каталитически важных доменов указывают на то, что, по всей вероятности, ферменты CYP74J, CYP74K и CYP74L являются АОС. В то же время, каталитически важные домены ферментов подсемейства CYP74M не позволяют однозначно предсказать тип их каталитической активности (рис. 89).

	1		75
CYP74M1	(1)	-----MSASGKEKPLKDVPGSYGVFVVGALKDRLDFYWFQGEVEFYKSRMEKNQSTVFRVNFPPGPPGFPE	
CYP74M2	(1)	-----MENEAAKISGSVKAVPGGYGLFFGAMRDRLLEYWFQGDVEFFKRRIEKYKSTVFRVNFAPGPPGYQN	
CYP74M3	(1)	MSKPAAAAAPSDPSKPSKPLKEVPGSYGLEPVLGAVKDRLDFYWFQGDTEFFRIRMEQHKSTVFRVNFYSPGPPGYPD	
	76	↓	150
CYP74M1	(67)	GHGIVLLDQVSYSVLLDNAKVDKRDTLIGSYMPDLAFTGGYRTPYPLDTAEKHTTYKSLMFEILHESAQRFGPE	
CYP74M2	(69)	PRGVALLDHKSFQVMLDNSKVDKSDTFFGTAMPVAVFTGGYRALPYLDTTEKHTLYKRMLELLHVKFSMVTE	
CYP74M3	(76)	SRGIILLDQKSFVLLDNSKVDKSDTLGPGYIPNLAFTGGYRVLPLYLDTSEAKHTAYKDLIFELLVNSSRIIPE	
	151		225
CYP74M1	(142)	LSSAFDRTAQEWAEAKIAKDGSVESLSTAGNMVIOFLYKTIITHQDPM----ATMGDDPHSVYMAWTGVQFAGIAYT	
CYP74M2	(144)	YSKAF AETSATWDLAVAKSGKAEVGDSSGRMVVNFLLKSIITGHQDPA---SIIGSDPHSTFQTWSFVQFAGTVVG	
CYP74M3	(151)	YNKVF AETAGSWEERIAKSGKAEVFASSDSMITKFLLRITIVHKDPAEPGPASLGPKFRDQYQLWTGVNFAGIAHT	
	226		300
CYP74M1	(213)	NLPHITEELLMHSEQLPFFPIKPKYEQIVEFFRSAGSGLLDLAVTKYGLDREELHNLVFSFGINTRLGLLKMF	<div style="text-align: center;">I-спираль</div> <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div>
CYP74M2	(216)	VLPHFVEELTYHSFSLPSMLVKSKYAAALCKFFRNATEALDLAESKYGLDREEAHVQIVFCFVGNARVGLMKKIP	
CYP74M3	(226)	PLPHFLEELLFHTFRLPPLVVKQYKALANFYRTHATEVLDLAEKKYGLDREETVHQLILILGINARLGLHKMIP	
	301	↓ ↓	375
CYP74M1	(288)	PILEFFIARAGAEFQARLKQEIFGRMKKREDAAS-----IQALGDLKLVKATVLEVFRLMPSTFVAFGRARQDLE	
CYP74M2	(291)	VMVYIYIAKMGPEFQARLADEVRSASEQGGGGF----TVKALSGMPLKSTVLEAFRLMPSTFFVYGRAREDIV	
CYP74M3	(301)	ALIYYLGLLGEDFQAKIAAEVRSVAVHNRAQGEEGVNITQALLEMPLLRSTVLETLRLTPSIFYIYGRAREDMV	
	376	↓	450
CYP74M1	(357)	VESHDARYKIKKGELLGTHQYFVMRDPVVFVKDPHSEVPDRFMGSEGAALLEPHIVWSNGRETDSPTPNKQCPGKN	
CYP74M2	(361)	VESHDALYKVGKELLGAHWYVLRDPKVFEDPQRFNPERFMGKQGEALFQLVWSNGRQDQTPGENDKQCPAKD	
CYP74M3	(376)	IESHDAAFQIKKGELLGGHQYFVMRDPVEVFEHPKVFADRFLGERGKAVLPYLVWSNGRETESPSSSNKQCPAKD	
	451		498
CYP74M1	(432)	Q AELIAVQFIAEMFLRYDSWEVTQESSVSATKLDVHLCKLVKRS----	
CYP74M2	(436)	YAVMLTSQFVAEMFLKYDAFEITEDSTIDTTSCLKVAFKSLKSFQAQISS	
CYP74M3	(451)	VAELITMQFVAEMFLRYDSFEITKDSFINTELNVHLKSLKRSV---	

Рис. 89. Сопоставление полных аминокислотных последовательностей ферментов CYP74M1, CYP74M2 и CYP74M3: сайт «F/L toggle» (CPC-1) обозначен черной стрелкой, участок перегиба I-спирали (CPC-4) выделен черной рамкой, ключевые сайты ERR-триады обозначены белыми стрелками, гем-связывающий остаток цистеина – ромбом.

Например, в сайте «F/L toggle», в котором у всех АОС находится остаток фенилаланина, тогда как у ГПЛ и ДЭС – остаток лейцина, у ферментов CYP74M1 и CYP74M3 находится остаток лейцина, тогда как у фермента CYP74M2 – остаток фенилаланина (рис. 89). В участке перегиба I-спирали (CPC-4) у ферментов CYP74M1 и CYP74M3 во втором положении содержится остаток глицина, так же как в последовательностях ДЭС представителей семейства Solanaceae (подсемейство CYP74D), у всех известных ГПЛ, а также у АОС мхов и подсемейства CYP74C. В третьем положении этого участка практически все дивинилэфирсинтазы содержат остаток изолейцина. Почти для всех ГПЛ и АОС консервативным является наличие остатка фенилаланина в данной позиции. Ферменты CYP74M1 и CYP74M3 в этом сайте содер-

жат остаток изолейцина (Ile276 и Ile289). В шестом сайте участка перегиба I-спирали почти у всех представителей семейства CYP74 находится остаток ароматической аминокислоты (тирозина или фенилаланина). У ферментов подсемейства CYP74M *S. moellendorffii* в этом сайте находится остаток аргинина. У всех АОС и ГПЛ непосредственно после этого участка находятся два консервативных остатка глицина. Замена первого остатка глицина является характерной особенностью для всех ДЭС. У ферментов CYP74M1 и CYP74M3 в данном положении находится остаток лейцина, также как у дивинилэфирсинтазы AsDES чеснока. Таким образом, структурные особенности указывают на вероятность принадлежности ферментов CYP74M1 и CYP74M3 к дивинилэфирсинтазам.

У фермента CYP74M2 структура участка перегиба I-спирали отличается. В первом сайте этого домена у фермента CYP74M2, так же как у фермента CYP74M1, находится остаток фенилаланина (Phe277). В третьем положении этого участка находится остаток валина, что является нетипичным для ферментов CYP74. В шестом сайте фермент CYP74M2, так же как и ферменты CYP74M1 и CYP74M3, содержит остаток аргинина. Первый остаток глицина непосредственно после этого участка у фермента CYP74M2 также заменен другим аминокислотным остатком, однако в отличие от ферментов CYP74M1 и CYP74M3, фермент CYP74M2 в данном сайте содержит валин. Таким образом, по последовательности фермента CYP74M2 невозможно предположить тип каталитической активности этого фермента. В целом, полученные данные позволили предположить, что ферменты подсемейства CYP74M *S. moellendorffii* не являются алленоксидсинтазами или гидропероксидазами.

Клонирование ОРС генов *CYP74M1v1* (XP_002979266.1 GI: 302795005), *CYP74M2* (XM_002972757, GI:9637471) и *CYP74M3v1* (XP_002964012.1 GI: 302761180) проводили с использованием векторов pET-40b (*CYP74M1v1*) и pET-32 Ek/LIC (*CYP74M2* и *CYP74M3v1*), а также пар праймеров CYP74M1cF/CYP74M1cR, CYP74M2cF/CYP74M2cR и

CYP74M3cF/CYP74M3cR (таблица 3 приложения) соответственно, как описано выше. Для клонирования использовали полные ОРС, поскольку у всех генов отсутствовали какие-либо лидерные последовательности. Получение рекомбинантных ферментов с использованием клеток *E. coli* штаммов BL21(DE3)pLysS (CYP74M1) и Rosetta-gami(DE3)pLysS В (CYP74M2 и CYP74M3) и их очистку проводили, как описано выше (рис. 90).

Ферменты CYP74M1 и CYP74M3, как и фермент CYP74B16 и RaDES, использовали 13-ГПОТ и 13-ГПОД в качестве субстратов, но были неактивны в отношении 9-ГПОТ и 9-ГПОД (таблица 15). Фермент CYP74M1 проявлял более высокое сродство к 13-ГПОТ, чем к 13-ГПОД, о чем свидетельствовало значение K_M . В то же время, значение константы каталитической активности (k_{cat}) было выше в случае превращения 13-ГПОД, чем 13-ГПОТ.

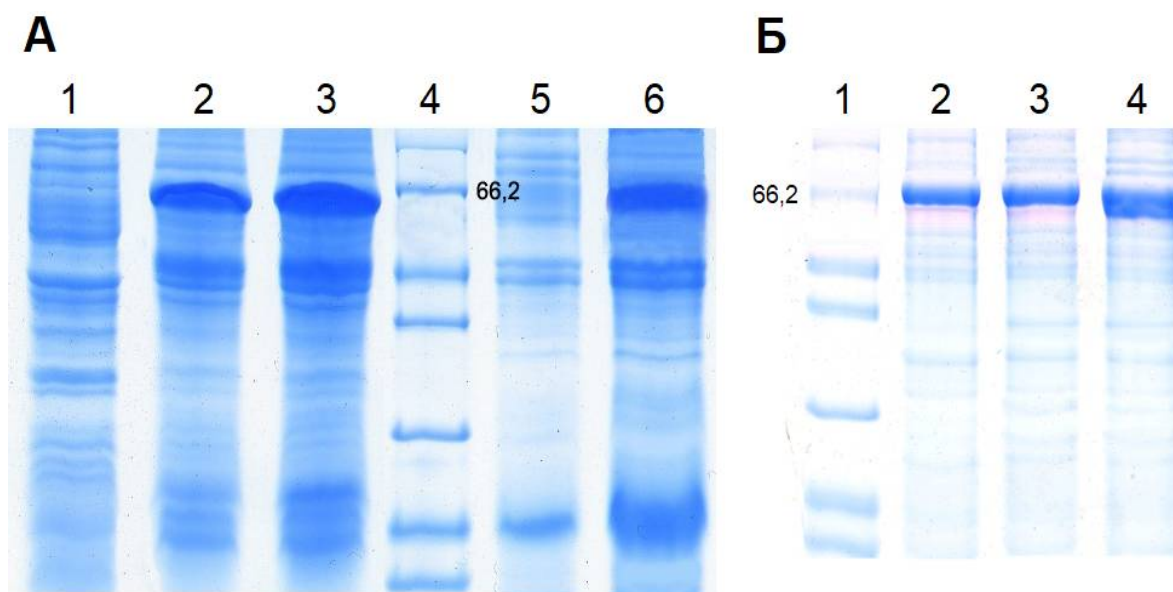


Рис. 90. Результат электрофоретического разделения рекомбинантных ферментов CYP74M1, CYP74M2 и CYP74M3 в клетках после индукции (А) и после металлоаффинной хроматографии (Б). (А), Лизат клеток Rosetta-gami(DE3)pLysS В до добавления ИПТГ (1); лизат клеток Rosetta-gami(DE3)pLysS В, трансформированных плазмидами, содержащими ОРС генов *CYP74M2* (2) и *CYP74M3* (3); маркер белкового веса SDS-PAGE standards Low Range Protein Ladder (Bio-Rad, USA) (4); лизат клеток BL21(DE3)pLysS до добавления ИПТГ (5); лизат клеток BL21(DE3)pLysS, трансформированных плазмидой, содержащей ОРС гена *CYP74M1* (6). (Б), Маркер белкового веса SDS-PAGE standards Low Range Protein Ladder (Bio-Rad, USA) (1); очищенные методом металлоаффинной хроматографии ферменты CYP74M1 (2), CYP74M2 (3) и CYP74M3 (4).

Соотношение k_{cat}/K_M свидетельствовало, что 13-ГПОТ является предпочтительным субстратом для фермента СУР74М1. В отличие от этого, фермент СУР74М3 проявлял примерно одинаковое сродство и каталитическую активность к обеим 13-гидроперекисям, вследствие чего специфичность фермента СУР74М3 в отношении 13-ГПОТ и 13-ГПОД была примерно одинаковой (таблица 15). Субстратные предпочтения рекомбинантного фермента СУР74М2 были аналогичными предпочтениям ферментов СУР74М1 и СУР74М3 (таблица 15). Кроме того, данный фермент был также активен в отношении 9-ГПОД, однако данный субстрат был менее предпочтительным, чем 13-гидроперекиси. Из значений K_M видно, что сродство рекомбинантного белка к 13-ГПОТ намного выше, чем к 13-ГПОД и 9-ГПОД.

Таблица 15. Субстратная специфичность рекомбинантных ферментов СУР74М1, СУР74М2 и СУР74М3 и кинетические параметры катализируемых ими реакций.

Субстрат	Фермент	k_{cat} (с ⁻¹)	K_M (μМ)	k_{cat}/K_M (μМ ⁻¹ ·с ⁻¹)	Специфичность, %
13-ГПОТ	СУР74М1	185,3 ± 4,2	11,4 ± 1,9	16,2	100
	СУР74М2	75,42 ± 7,5	17,33 ± 1,7	4,35	100
	СУР74М3	266,7 ± 7,1	89,3 ± 5,0	2,99	100
13-ГПОД	СУР74М1	261,1 ± 5,3	70,3 ± 7,6	3,71	22,9
	СУР74М2	131,90 ± 13,1	57,78 ± 5,8	2,28	52,48
	СУР74М3	193,5 ± 3,6	72,3 ± 3,2	2,68	89,63
9-ГПОТ	СУР74М1	-	-	0	0
	СУР74М2	-	-	0	0
	СУР74М3	-	-	0	0
9-ГПОД	СУР74М1	-	-	0	0
	СУР74М2	22,91 ± 2,3	164,02 ± 8,2	0,14	3,21
	СУР74М3	-	-	0	0

В то же время, k_{cat} реакции превращения 13-ГПОД при участии фермента СУР74М2 выше, чем k_{cat} реакции превращения 13-ГПОТ. В целом, соотношения k_{cat}/K_M свидетельствовали о том, что 13-ГПОТ является предпочтительным субстратом для фермента СУР74М2. В отношении 9-ГПОТ ферменты подсемейства СУР74М не проявляли активности (таблица 15). Результаты изучения продуктов, образующихся при участии ферментов СУР74М1, СУР74М2 и СУР74М3, описаны ниже.

3.11. Изучение каталитических свойств ферментов СУР74М1 и СУР74М3

Анализ продуктов (в виде Me эфиров или Me/ТМС после или без восстановления NaBH_4) превращения гидроперекисей при участии рекомбинантных ферментов СУР74М1 и СУР74М3 проводили, как описано выше. Инкубация фермента СУР74М1 с 13-ГПОД (рис. 91А) и 13-ГПОТ (рис. 91Б) приводила к образованию преобладающих продуктов **14** (с минорными продуктами **15** и **13**) и **14а** (с минорными продуктами **15а** и **13а**) соответственно. Масс-спектры продуктов превращения 13-ГПОД соответствовали изомерам этеролево́й кислоты, продуктов превращения 13-ГПОТ – изомерам этеролево́вой кислоты. Спектральные данные ЯМР (^1H -ЯМР, 2D-COSY, HSQC и HMBC) продуктов **14**, **14а**, **15** и **15а** представлены в таблицах 9, 10, 11 и 12 приложения соответственно. Спектральные параметры соединения **14** (таблица 9 приложения), в частности значения констант спин-спинового взаимодействия $J_{11,12} = 6,3$ Гц и $J_{1',2'} = 12,2$ Гц, однозначно подтвердили (*Z*) и (*E*) конфигурацию (соответственно) соответствующих двойных связей и общую структуру (9*Z*,11*Z*)-12-[(1'*E*)-гексенилокси]-9,11-додекадиеновой, (11*Z*)-этеролево́й, кислоты (Me) для соединения **14**. Константы спин-спинового взаимодействия у соединения **14а** (таблица 10 приложения) $J_{11,12} = 6,2$ Гц и $J_{1',2'} = 12,0$ Гц были почти такими же, как в спектре соединения **14**, что указывало на *цис*- и *транс*-конфигурации соответствующих двойных связей. Три двойные связи соединений **14** и **14а** имели одинаковую (9*Z*,11*Z*,1'*E*) конфигу-

рацию. Единственным отличием являлась дополнительная двойная связь (3'Z) в соединении **14a** ($J_{3',4'} = 10,8$ Гц), что указывало на структуру (9Z,11Z)-12-[(1'E,3'Z)-гексаденилокси]-9,11-додекадиеновой, (11Z)-этероленовой, кислоты (Me).

Данные ЯМР (таблица 11 приложения) для минорного продукта **15** свидетельствовали о наличии трех двойных связей с конфигурацией (9Z,11E,1'E) и эфирного мостика между C12 и C1', что указывало на структуру (9Z,11E)-12-[(1'E)-гексенилокси]-9,11-додекадиеновой, этеролеовой, кислоты (Me).

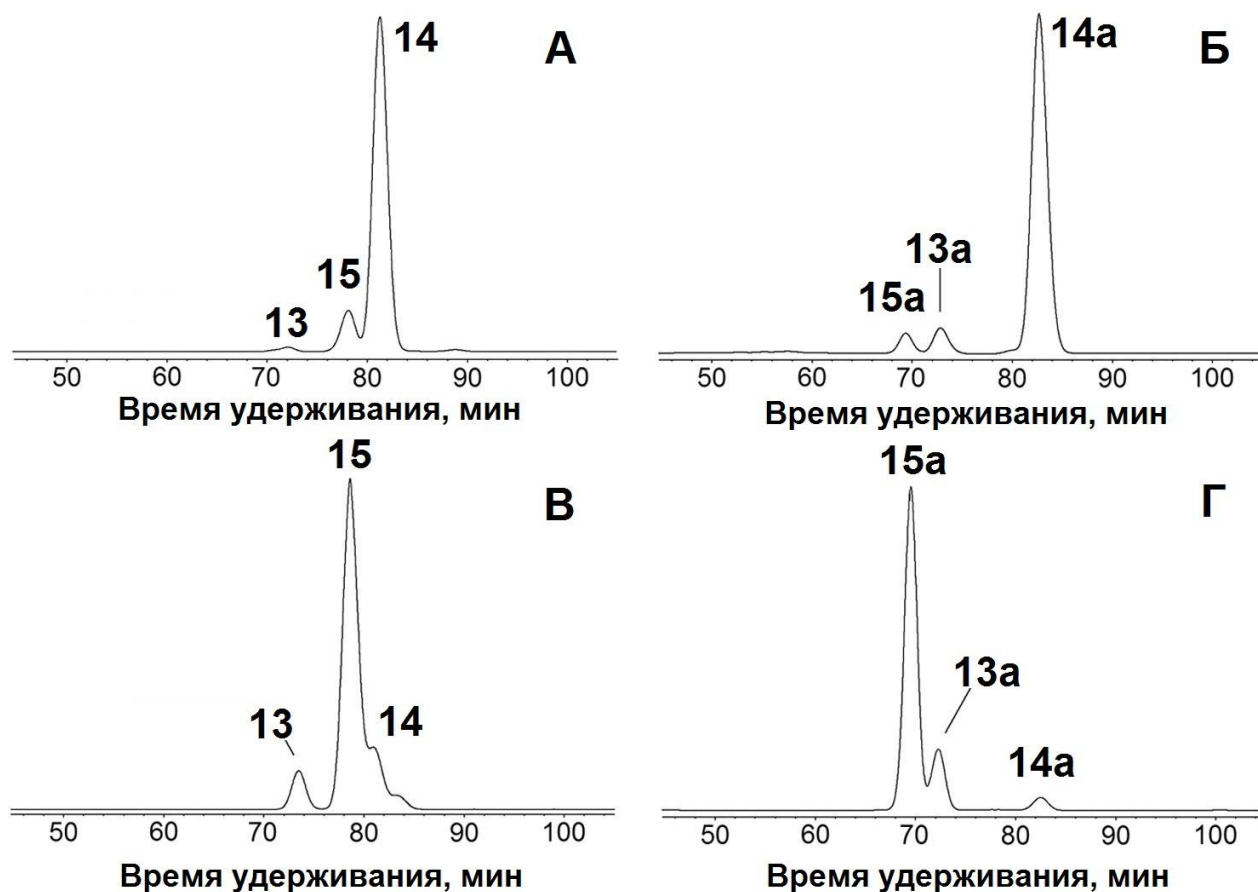


Рис. 91. Результат разделения методом ВЭЖХ на нормальной фазе продуктов (Me) превращения 13-ГПОД (А и В) и 13-ГПОТ (Б и Г) при участии ферментов СУР74М1 (А и Б) и СУР74М3 (В и Г). Представлены хроматограммы при длинах волн 250 нм (А и В) и 267 нм (Б и Г).

Данные ЯМР (таблица 12 приложения) для минорного продукта **15a** выявили наличие четырех двойных связей с конфигурацией (9Z,11E,1'E,3'Z), что указывало на структуру (9Z,11E)-12-[(1'E,3'Z)-гексадиенилокси]-9,11-додекадиеновой, этероленовой, кислоты.

Продукты **13** и **13a** представляли собой (ω 5Z) изомеры этеролевого и этероленовой кислот соответственно. Их спектральные данные описаны выше. Превращение 13-ГПОД (рис. 91В) и 13-ГПОТ (рис. 91Г) при участии фермента CYP74M3 приводило к образованию тех же продуктов, но в других пропорциях. Преобладающими продуктами превращения 13-ГПОД и 13-ГПОТ были соединения **15** и **15a** соответственно; продукты **13**, **13a**, **14** и **14a** были минорными. Соответственно, ферменты CYP74M1 и CYP74M3 являются 13-специфичными дивинилэфирсинтазами. Среди продуктов катализируемых ими реакций не было обнаружено ни АОС, ни ГПЛ, ни ЭАС продуктов. Им присвоены тривиальные названия SmDES1 (CYP74M1) и SmDES2 (CYP74M3).

SmDES1 и SmDES2 являются первыми изученными ферментами CYP74 плаунков и первыми ДЭС, обнаруженными у нецветковых растений. Эти новые ДЭС, наряду с ферментами CYP74B16 и RaDES, относятся к 13-специфичным ферментам. Еще одной общей чертой всех этих ферментов является экспрессия кодирующих их генов в фотосинтезирующих органах (в случае плаунка – в микрофиллах и стеблях). В то же время, SmDES1 и SmDES2 имеют отличительные особенности. В то время как фермент CYP74B16 и RaDES продуцируют (ω 5Z)-этероленовую и (ω 5Z)-этеролевою кислоты, эти изомеры образуются при участии SmDES1 и SmDES2 только в минорных количествах. SmDES2 производит в основном этероленовую и этеролевою кислоты. SmDES1 является первой охарактеризованной ДЭС, специфически продуцирующей (11Z)-изомеры этероленовой и этеролевого кислот. Кроме того, SmDES1 и SmDES2, также как и RaDES, являются истинными ДЭС, продуктами которых являются только дивиниловые эфиры. В отличие от этого, NtDES и LeDES продуцируют эпокиспирты (ЭАС продук-

ты) и/или оксокислоты (ГПЛ продукты) в качестве побочных минорных продуктов, а фермент CYP74B16 проявляет двойную ДЭС/ГПЛ активность с дополнительной ЭАС активностью в зависимости от утилизируемого субстрата (Toporkova *et al.*, 2020в).

Как и АОС, ДЭС являются гидропероксид-дегидратазами (рис. 92). Эпоксиаллильный радикал (рис. 92) является основным промежуточным звеном превращений гидроперекисей жирных кислот, контролируемых ферментами CYP74 (Grechkin, 2002; Lee *et al.*, 2008; Brash, 2009). В случае АОС эпоксиаллильный радикал превращается в нестабильную окись аллена (Lee *et al.*, 2008; Brash, 2009). В ходе ДЭС реакции эпоксиаллильный радикал подвергается расщеплению связи С–С в оксиране и превращается в (*Z*) или (*E*) изоформы винилоксикарбинильного радикала. Винилоксикарбинильные радикалы превращаются в дивиниловые эфиры в результате потери водорода (рис. 92).

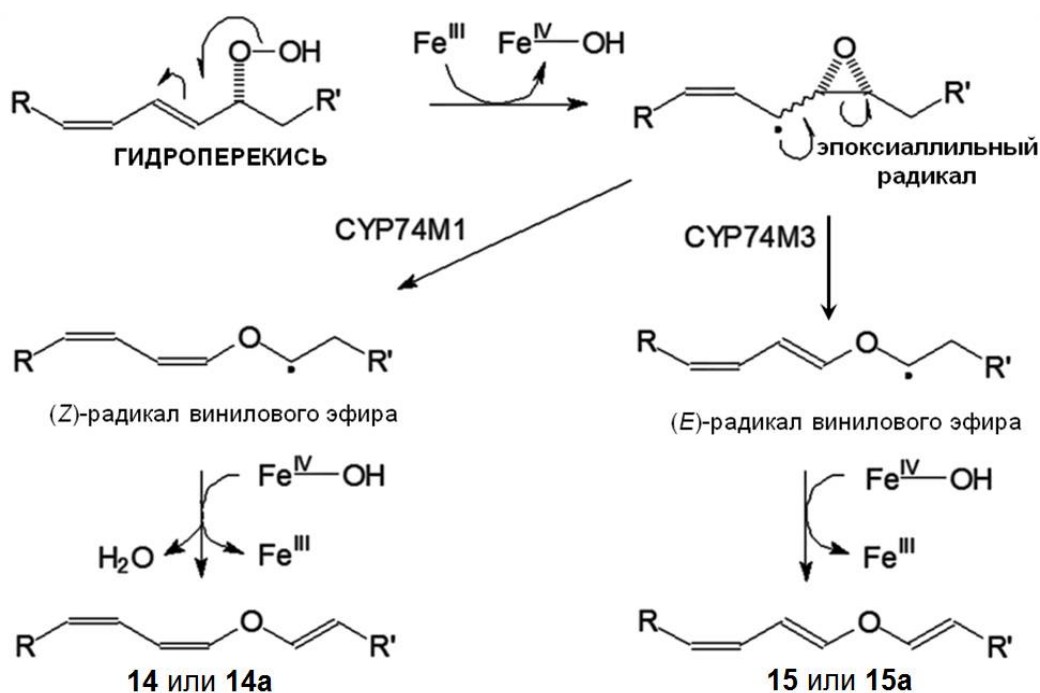


Рис. 92. Схема превращения 13-ГПОД и 13-ГПОТ в основные продукты при участии SmDES1 (CYP74M1) и SmDES2 (CYP74M3). R = HOOC(CH₂)₇-. R' = *n*-бутил (в случае 13-ГПОД); R' = (*Z*)-бутенил (в случае 13-ГПОТ). **14**, (11*Z*)-этеролевая кислота; **14a**, (11*Z*)-этероленовая кислота; **15**, этеролевая кислота; **15a**, этероленовая кислота. Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 78.

Ферменты CYP74M3 и CYP74M1 проявляют 43–45% и 40–43% идентичности с представителями CYP74 многих видов высших растений. Они относительно одинаково удалены от разных подсемейств CYP74 цветковых растений. При этом их структура больше похожа на структуру многих АОС и ГПЛ, чем ДЭС цветковых растений. Например, фермент CYP74M3 на 45% идентичен предполагаемой ГПЛ *Picea sitchensis*, на 44% – PaAOS (CYP74A) *P. argentatum*, на 39% – RaDES (CYP74Q1) *R. acris*, на 38% – StDES (CYP74D) картофеля и AsDES (CYP74H1) чеснока.

Последовательности ферментов CYP74M1 и CYP74M3 в сайте «F/L toggle» содержат остаток лейцина, который характерен для ДЭС и ГПЛ. Это единственные представители CYP74 *S. moellendorffii*, у которых в данном сайте содержится остаток лейцина, что позволяет предположить отсутствие ГПЛ у данного вида растений. Если это подтвердится, *S. moellendorffii* станет первым наземным растением, у которого не обнаружено ГПЛ.

Гены ДЭС удивительно разнообразны. Подсемейство CYP74M расширяет список подсемейств CYP74 (CYP74B, CYP74D, CYP74H и CYP74Q), в которых обнаружены ДЭС. Первая ДЭС была обнаружена во время экспериментов *in vitro* с клубнями картофеля (Galliard, Phillips, 1972). Позже были клонированы и идентифицированы члены подсемейства CYP74D (Itoh, Howe, 2001; Stumpe *et al.*, 2001; Fammartino *et al.*, 2007). ДЭС или ДЭС активность также обнаружены в корнях ландыша (Ogorodnikova *et al.*, 2008), луковицах чеснока (Grechkin *et al.*, 1995) и некоторых других видов семейства Asparagales (Ogorodnikova *et al.*, 2013), листьях льна-долгунца (Chechetkin *et al.*, 2008) и видов семейства Ranunculaceae (Hamberg, 1998, 2002, 2004). Кроме того, дивиниловые эфиры обнаружены у бурых (Proteau, Gerwick, 1993) и красных (Jiang, Gerwick, 1997) водорослей. По-видимому, различные линии ДЭС развивались независимо в результате дупликации генов и последующих мутаций. При этом в процессе эволюции сформировались как ДЭС с дополнительными ферментативными активностями, так и «истинные» ДЭС, катализирующие образование только дивиниловых эфиров.

3.12. Изучение каталитических свойств фермента СУР74М2

Анализ продуктов (Ме/ТМС после или без восстановления NaBH_4) превращения гидроперекисей при участии рекомбинантного фермента СУР74М2 проводили, как описано выше. Для этого фермента предпочтительным субстратом являлась 13-ГПОД (таблица 15). Основными продуктами превращения 13-ГПОД были стереоизомеры соединения **2** – (9*Z*)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (ЭАС продукт), синтезируемые в соотношении 57% : 29% : 14% (рис. 93А). Структурные формулы синтезируемых при участии фермента СУР74М2 стереоизомеров соединения **2** представлены на рисунке 94. Кроме того, в реакции образовывался продукт **7** – (10*E*)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота (ЭАС продукт, рис. 93А). Масс-спектральные данные этих соединений представлены выше. Для определения детальной структуры стереоизомеров соединения **2** использовали метод ЯМР. Данные ЯМР для основного стереоизомера (таблица 13 приложения) подтвердили структуру оксиранил карбинола, исходя из метиновых сигналов от вторичной спиртовой группировки (4,25 ppm, ddd, H11, 1H). Этот химический сдвиг согласовывался с *трео* конфигурацией. Химические сдвиги H9-H13 (таблица 13 приложения) также подтвердили *трео*-конфигурацию оксиранил карбинола. В *эритро*-эпимерах протон H11 относительно отдален и сдвинут вверх до 4,5 – 4,7 ppm (Toporkova *et al.*, 2017a; Thomas *et al.*, 2013). Например, этот протон в спектре минорного стереоизомера (11-эпимер основного стереоизомера) имел химический сдвиг 4,52 (таблица 13 приложения). Значение констант спин-спинового взаимодействия $J_{12,13} = 2,2$ Гц свидетельствовало о *транс* распределении протонов оксирана. В целом, данные позволили установить конфигурацию (11*R*,12*S*,13*S*) для основного стереоизомера соединения **2** с сохранением исходной *S*-конфигурации у C13. Таким образом, этот стереоизомер был идентифицирован как (9*Z*,11*R*,12*S*,13*S*)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота (рис. 94).

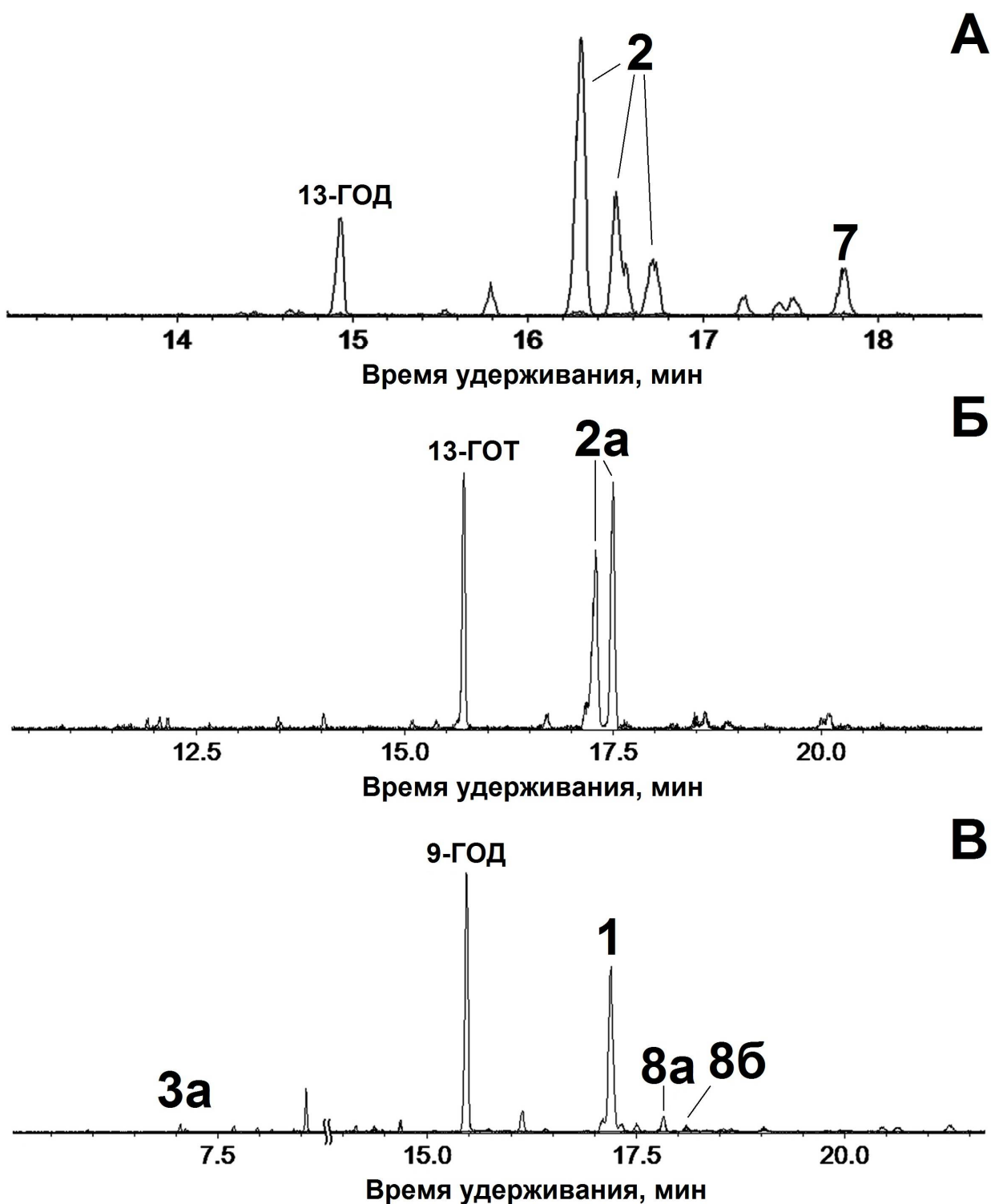


Рис. 93. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS после восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПОД (А), 13-ГПОТ (Б) и 9-ГПОД (В) при участии фермента CYP74M2. 1, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; 2, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; 2а, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота; 3а, 9-гидроксинонановая кислота; 7, 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота; 8а и 8б, 9,10-дигидрокси-12-октадеценовая кислота (*эритро* и *трео* изомеры). Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 50.

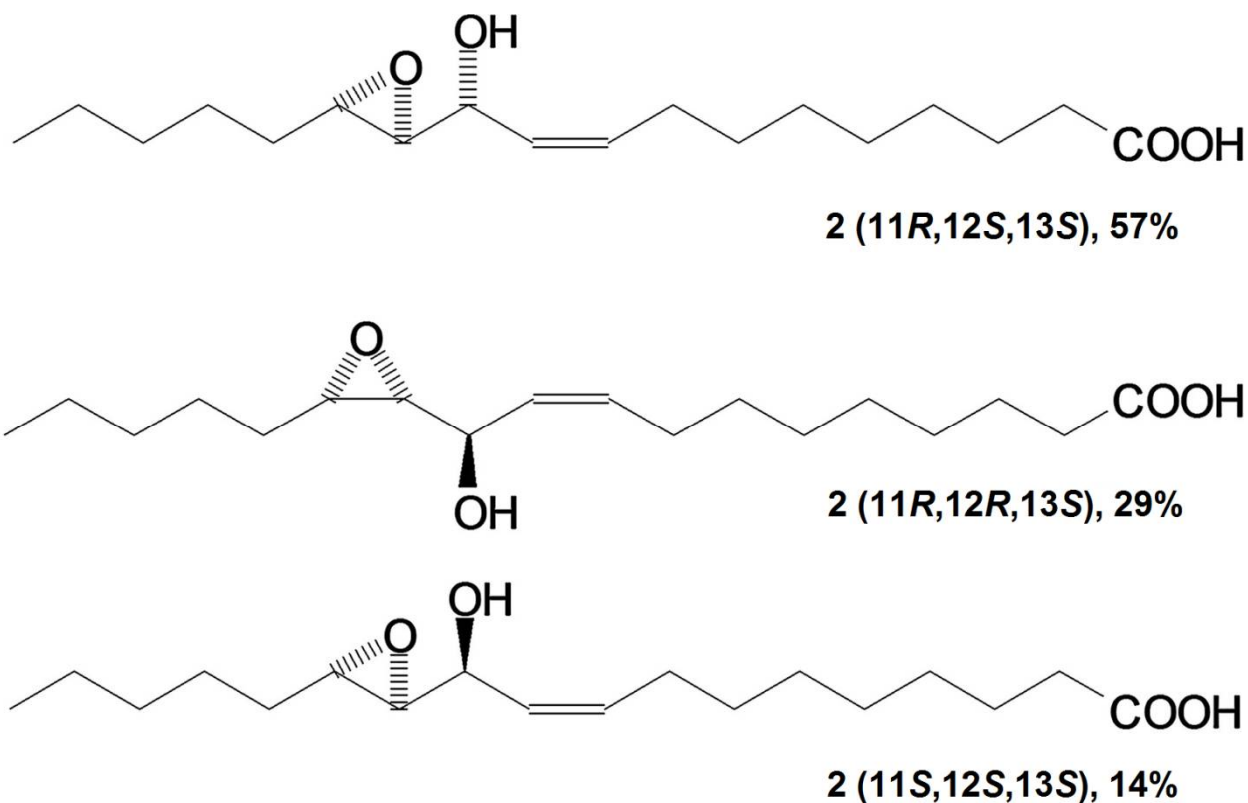


Рис. 94. Структурные формулы изомеров соединения **2** (11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты), синтезируемых при участии фермента CYP74M2: (9Z,11R,12S,13S)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая, (9Z,11R,12R,13S)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая и (9Z,11S,12S,13S)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислоты.

Ранее этот изомер был описан у растений риса, больных пирикуляриозом (Kato *et al.*, 1986), у зеленой водоросли *Acrosiphonia coalita* (Bernart *et al.*, 1993) и в столонах картофеля (Grechkin *et al.*, 1995).

У эпоксидных протонов второго по содержанию стереоизомера была идентифицирована *цис*-конфигурация; это видно из значения констант спин-спинового взаимодействия $J_{12,13} = 4,0$ Гц (таблица 13 приложения). Спектральные параметры этого стереоизомера отличались от таковых ранее описанных *трео* оксиранил карбинолов, содержащих *цис*-оксиран, которые образовывались при участии ЭАС ланцетника (BfEAS, CYP440A1) (Lee *et al.*, 2008). Сигнал H11 сдвинут вверх на 0,1 ppm по сравнению с *трео*-изомерами (Jin *et al.*, 2012). Кроме того, протоны H9 и H10, также как и протон H13 оксирана, слегка сдвинуты вверх, в то время как протон H12 сдвинут вниз. Эти

различия свидетельствовали о том, что этот стереоизомер представляет собой продукт с *эритро-цис* конфигурацией. Насколько нам известно, существует только один пример оксиранил карбинола с *эритро-цис* конфигурацией – это эпокиспирт (8*R*,9*S*,10*S*,11*Z*,14*Z*)-8,9-эпокси-10-гидрокси-11,14-эйкозадиеновая кислота (Jin *et al.*, 2012). Данные ¹H-ЯМР для этого соединения (химические сдвиги H8, H9, H10 и соответствующие значения констант спин-спинового взаимодействия), в целом, соответствуют нашим данным (Jin *et al.*, 2012). Аналогичный *эритро-цис* эпокиспирт образовывался также в результате превращения (15*S*)-ГПЭТЕ при участии микросомального фермента CYP2B1 крысы (Chang *et al.*, 1996). Таким образом, полученные данные позволили идентифицировать второй по содержанию стереоизомер как *эритро-цис* оксиранил карбинол – (9*Z*,11*R*,12*R*,13*S*)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовую кислоту (рис. 94).

ЯМР данные для минорного стереоизомера также представлены в таблице 13 приложения. Этот стереоизомер содержит *транс*-оксиран ($J_{12,13} = 2,2$ Гц) и одну *цис*-двойную связь ($J_{9,10} = 11,0$ Гц). Химический сдвиг H11 составляет 4,52 ppm; это означает, что H11 демаскируется из-за пространственной близости к кислороду эпоксидной группировки. В целом, полученные данные позволили идентифицировать третий изомер как *эритро-транс* оксиранил карбинол – (9*Z*,11*S*,12*S*,13*S*)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовую кислоту – 11-эпимер основного изомера (рис. 94). Этот изомер образовывался также в результате превращения 13-ГПОД при участии некоторых ферментов CYP74C с двойной ГПЛ/ЭАС активностью, описанных выше.

Помимо стереоизомеров соединения **2**, было обнаружено еще несколько полярных продуктов – стереоизомеров (10*E*)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовой кислоты (**7**), имеющих *транс*- или *цис*-дизамещенный оксиран ($J_{12,13} = 2,1$ или 4,2 Гц соответственно) и (*S*) или (*R*)-конфигурации у C9 соответственно.

Превращение 13-ГПОТ при участии рекомбинантного фермента CYP74M2 приводило к образованию двух стереоизомеров продукта **2a** (рис. 93Б) – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновой кислоты (ЭАС продукт). Утилизация 9-ГПОД была менее эффективной (рис. 93В). Тем не менее, образовывался продукт **1** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота (ЭАС продукт). В отличие от 13-гидроперекисей, превращение 9-ГПОД было менее специфичным. Как видно из хроматограммы (рис. 93В), минорными продуктами реакции были *эритро* и *трео* изомеры 9,10-дигидрокси-12-октадеценовой кислоты (**8a** и **8b**), которые являются продуктами восстановления NaBH_4 α -кетона **8** (АОС продукт), и 9-гидроксинонановая кислота **3a** (восстановленный NaBH_4 9-ГПЛ продукт). Описание масс-спектров всех перечисленных соединений представлено выше. Таким образом, вследствие того, что в отношении предпочтительных субстратов – 13-гидроперекисей – фермент CYP74M2 проявляет исключительно эпоксиалкогольсинтазную активность, этот фермент идентифицирован как истинная эпоксиалкогольсинтаза (Toporkova *et al.*, 2018б). Данному ферменту присвоено тривиальное название SmEAS (CYP74M2). Фермент SmEAS (CYP74M2) – первая истинная ЭАС, входящая согласно критериям номенклатуры в состав семейства CYP74 и первая ЭАС, обнаруженная у растений.

Присутствие ферментов CYP74 в древнейших наземных растениях, Bryophytes и Lycophytes, представляет интерес в связи с вопросом об эволюционном происхождении соответствующих генов у цветковых растений. Однако происхождение генов CYP74 у этих древнейших наземных растений до конца не выяснено. Все секвенированные геномы наземных растений, включая *P. patens*, *M. polymorpha* и *S. moellendorffii*, содержат гены CYP74. Кроме того, в 2015 году описана алленоксидсинтаза KfAOS зеленой водоросли *Klebsormidium flaccidum* (Koeduka *et al.*, 2015). До момента обнаружения этой АОС появление генов CYP74 у наземных растений объяснялось результатом горизонтального переноса от животных (Metazoa) посредством протеобакте-

рий (Nelson, 2013). KfAOS на 37% идентична алленоксидсинтазе мха *P. patens* и ферменту CYP74M3 (SmDES2) *S. moellendorffii*. Согласно принятому критерию идентичности 40%, KfAOS не входит в состав семейства CYP74, но однозначно входит в состав клана CYP74. Сходство KfAOS с ферментами CYP74 наземных растений составляет 35–37%. Ферменты CYP74 *K. flaccidum*, *P. patens*, *M. polymorpha* и *S. moellendorffii*, очевидно, являются филогенетически родственными. Обнаружение ферментов CYP74 в зеленых водорослях, печеночниках, мхах и плаунах свидетельствует о раннем появлении липоксигеназного пути у зеленых растений, а наличие, как минимум, у одного из них эпоксиалкогольсинтазы – о раннем появлении эпоксиалкогольсинтаз в эволюции.

3.13. Получение фермента CYP74A88 лютика японского (*Ranunculus japonicus*) и изучение его каталитических свойств

Еще одним растением, у которого были выявлены эпокиспирты, был лютик японский (*R. japonicus*). Из-за отсутствия геномных данных этого растения для выявления генов ферментов CYP74 использовали систему вырожденных праймеров, разработанных ранее для клонирования гена фермента RaDES (Gorina *et al.*, 2014). При использовании одной пары вырожденных праймеров AF1 и AR2 (таблица 13) происходило образование продуктов реакции ~1000 п.н., что соответствовало расчетной протяженности центральных областей генов CYP74 при их амплификации с используемыми праймерами. В качестве матрицы для этой реакции использовали двуцепочечную кДНК, полученную в результате реакции обратной транскрипции тотальной РНК, выделенной из листьев лютика японского, собранного в Хасанском районе Приморского края РФ. Сопоставление полученных последовательностей с базой данных NCBI показало, что один из фрагментов, полученных при использовании комбинации этих праймеров, имеет высокую степень сходства с последовательностями генов ферментов подсемейства CYP74A многих видов растений, которое включает 13-специфичные алленоксидсин-

тазы. Последовательности присвоили идентификационный номер СУР74А88 (Д. Нельсон, личное сообщение).

Для определения 5'- и 3'-концевых участков гена методом RACE использовали по два прямых и обратных ген-специфичных праймера Rj3F1, Rj3F2, Rj5R1, Rj5R2 (таблица 16), tandemно расположенных на расшифрованной части кДНК. Поскольку клонированные нами 5'- и 3'-фрагменты могли соответствовать генам разных изоформ, для получения полной последовательности ОРС проводили дополнительный раунд амплификации полноразмерных кДНК, соответствующих транскриптам генов подсемейства СУР74А лютика японского. Для этого использовали праймеры СУР74А88сF и СУР74А88сR (таблица 16), комплементарные 5'- и 3'-концевым участкам. Полученные ампликоны также клонировали с использованием вектора рGem-T, после чего определили их последовательности. Кроме того, праймеры СУР74А88сF и СУР74А88сR содержали последовательности сайтов рестрикции NdeI и XhoI, позволяющие амплифицированную ОРС клонировать в векторе рЕТ-23а.

Таблица 16. Ген-специфичные праймеры, использованные амплификации и клонирования 5'- и 3'-концевых участков мРНК гена *СУР74А88*, а также полноразмерной ОРС этого гена.

Название	5'-3' последовательность	T _m , °C
Rj3F1	GCGTGGTTGGGTTCTGATGG	57,4
Rj3F2	GTTTGGCGTGGTTGGGTTCTG	58,8
Rj5R1	CCTGTTTCAATGCCTACGGTGG	58,1
Rj5R2	CCCTCCAGCTCTAATCAAATCCAG	57,2
RjcF	CATATGGCTACTTCAACATCTCTAGTC	52
RjcR	CTCGAGCCCGTTTAAGAGACGTCAAAG	63,2

Трансляция полученной нуклеотидной последовательности выявила наличие консервативных мотивов, характерных для ферментов семейства CYP74, а именно – участка перегиба I-спирали, ERR-триады, PPV-мотива и консервативного остатка цистеина. Получение рекомбинантного белка CYP74A88 с использованием клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS и его очистку проводили, как описано выше (рис. 95).

Анализ продуктов (в виде Me эфиров или Me/TMC после или без восстановления NaBH_4) превращения гидроперекисей при участии рекомбинантного фермента CYP74A88 проводили, как описано выше. Оптимальным значением pH для каталитической активности рекомбинантного фермента CYP74A88 являлось значение 7,0 (рис. 96). Дальнейшие эксперименты проводили при этом значении pH. Максимальное сродство и скорость реакции фермент CYP74A88 проявлял в отношении 13-ГПОД (таблица 17).

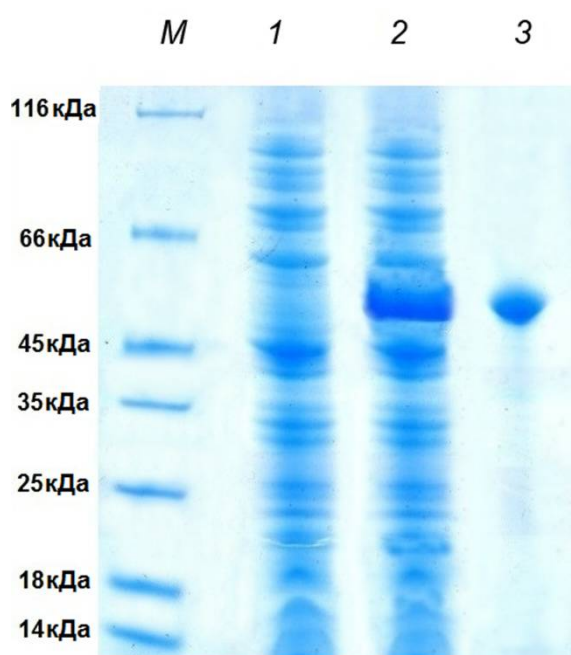


Рис. 95. Электрофореграмма получения и очистки фермента CYP74A88: **М** – маркер молекулярного веса SDS-PAGE Standarts Low Range («Bio-Rad», США); **1**, лизат клеток BL21(DE3)pLysS до добавления ИПТГ; **2**, лизат клеток BL21(DE3)pLysS, содержащих рекомбинантный фермент CYP74A88, через 14 час после добавления ИПТГ; **3**, очищенный препарат рекомбинантного фермента CYP74A88.

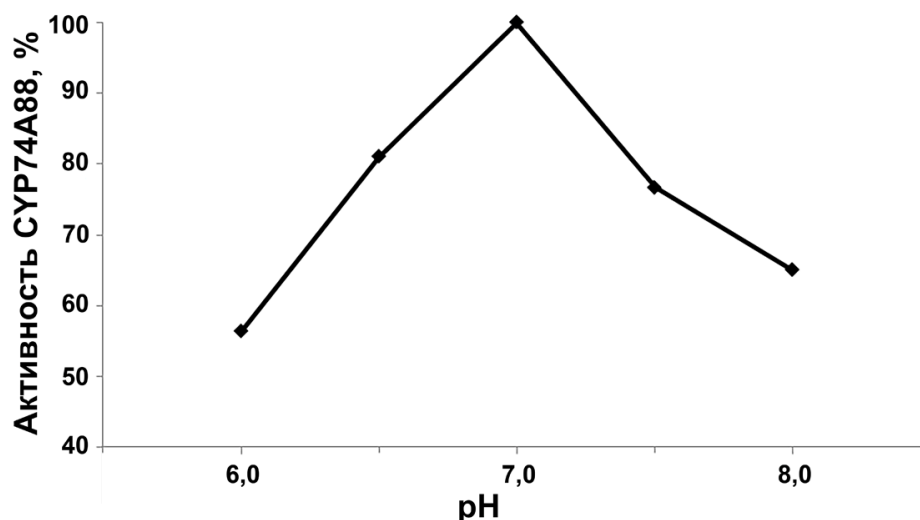


Рис. 96. Зависимость каталитической активности рекомбинантного фермента СУР74А88 от значения pH реакционной смеси.

Таблица 17. Субстратная специфичность рекомбинантного фермента СУР74А88 и кинетические параметры катализируемых им реакций.

Параметр	Субстрат			
	K_m , мкМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_m , мкМ ⁻¹ с ⁻¹	Специфичность, %
13-ГПОД	59,8 ± 5,8	161,2 ± 14,1	2,7	100
13-ГПОТ	199,2 ± 21,5	17,4 ± 3,4	0,1	3,4
9-ГПОД	139,2 ± 15,3	93,0 ± 10,0	0,7	24,9
9-ГПОТ	н.в.*	н.в.*	0	0

* Не выявлено.

Как видно из соотношения значений k_{cat}/K_m , гидроперекиси линолевой кислоты являются более предпочтительными субстратами для рекомбинантного фермента СУР74А88, чем гидроперекиси α -линоленовой кислоты. Фермент СУР74А88 не проявлял активности в отношении 9-ГПОТ и практически не проявлял активности в отношении 13-ГПОТ (таблица 17).

Инкубация рекомбинантного фермента СУР74А88 с 9-ГПОД приводила к образованию основного продукта **1** (рис. 97А) – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислоты (Ме/ТМС). Дополнительным продуктом

превращения 9-ГПОД являлось соединение **3** – 9-оксононановая кислота (Me). Инкубация фермента СУР74А88 с 13-ГПОД приводила к образованию основного продукта **2** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (Me/ТМС), а также трех дополнительных продуктов, имеющих незначительно большее время удерживания, чем соединение **2** (рис. 97Б). Минорные пики, элюируемые после продукта **2**, имели идентичные профили масс-спектров, таким образом, являясь стереоизомерами соединения **2**, различаясь преимущественно стереоконфигурацией при С11 или С12. Дополнительным продуктом инкубации фермента СУР74А88 с 13-ГПОД с большим временем элюции являлось соединение **7** (рис. 97Б) – (10*E*)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота (Me/ТМС). Каталитическая активность фермента СУР74А88 в отношении 13-гидроперекиси α -линоленовой кислоты была гораздо ниже, чем в отношении гидроперекисей линолевой кислоты.

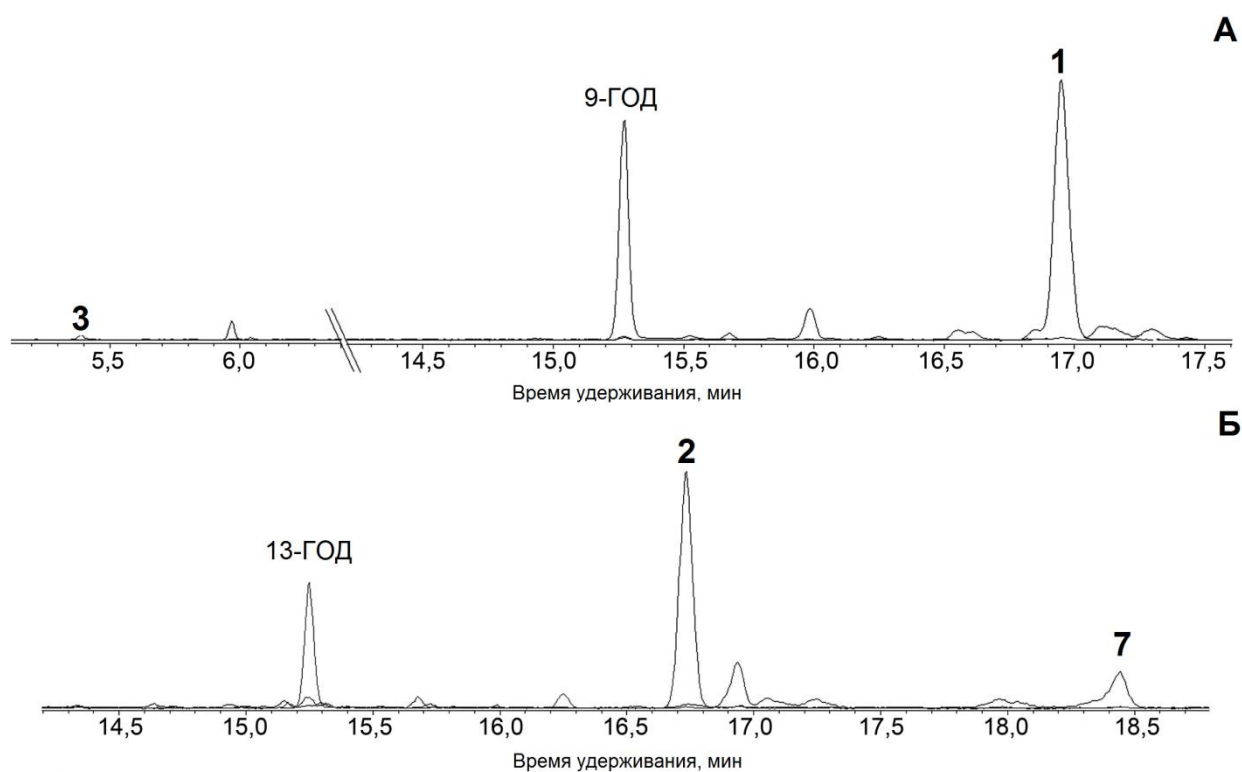


Рис. 97. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/ТМС) превращения 9-ГПОД (А) и 13-ГПОД (Б) при участии фермента СУР74А88. **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; **3**, 9-оксононановая кислота. Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 50.

Инкубация фермента CYP74A88 с 13-ГПОТ приводила к образованию соединения **2a** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновой кислоты (Me/TMC). Описание масс-спектров полученных соединений приведено выше.

Данные ГХ-МС анализа свидетельствуют, что специфичными продуктами каталитического действия фермента CYP74A88 являются оксиранил карбинолы (эпоксиспирты). Таким образом, фермент CYP74A88, как и эпоксиалкогольсинтаза SmEAS (CYP74M2) *S. moellendorffii*, является истинной специфичной эпоксиалкогольсинтазой (ЕС 5.3.99.-). В соответствии с принятой номенклатурой ферменту присвоено тривиальное название RjEAS (эпоксиалкогольсинтаза *R. japonicus*), так же, как и соответствующему гену – *RjEAS*. При этом если SmEAS является 13-специфичной ЭАС, для которой 13-ГПОТ является предпочтительным субстратом, то RjEAS катализирует превращение гидроперекисей линолевой кислоты, и предпочтительным субстратом для нее является 13-ГПОД (Топоркова и др., 2019).

Последовательность RjEAS обладает высокой степенью сходства с ферментами подсемейства CYP74A. Все охарактеризованные до сих пор ферменты этого подсемейства являются 13-специфичными алленоксидсинтазами. Каталитически важные домены RjEAS (сайт «F/L toggle», участок перегиба I-спирали, ERR-триада) практически полностью совпадают с таковыми АОС подсемейства CYP74A, за исключением остатка аланина в пятом положении участка перегиба I-спирали. Остаток аланина характерен для этого сайта в последовательностях ГПЛ подсемейства CYP74B и ферментов с двойной ГПЛ/ЭАС активностью подсемейства CYP74C. RjEAS является первой эпоксиалкогольсинтазой, которая по критериям номенклатуры относится к подсемейству CYP74A. Таким образом, практически все подсемейства внутри семейства CYP74 включают несколько типов ферментов: подсемейство CYP74B включает 13-специфичные ГПЛ и фермент с двойной ДЭС/ГПЛ активностью, а также 9-специфичную АОС; подсемейство CYP74C – 9/13-специфичные АОС, ГПЛ и ферменты, проявляющие двойную активность

ГПЛ/ЭАС; подсемейство СУР74М – 13-специфичные ДЭС и ЭАС; подсемейство СУР74А – 13-специфичные АОС и 9/13-специфичные ЭАС.

3.14. Получение фермента СУР5164В1 бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* и изучение его каталитических свойств

Согласно критериям номенклатуры (40% идентичности последовательности) в состав семейства СУР74 входят только растительные ферменты. Для того чтобы объединить представителей семейства СУР74 и нерастительные СУР74-подобные ферменты, было введено понятие клана СУР74 (Nelson, 2013). Поскольку среди выявленных за пределами царства растений представителей клана СУР74 была описана одна эпоксиалкогольсинтаза – VfEAS (СУР440А1) ланцетника, нами была предпринята попытка выявить и охарактеризовать каталитические свойства дополнительных нерастительных эпоксиалкогольсинтаз. Первый объект для выявления эпоксиалкогольсинтаз был выбран среди обширной группы бурых водорослей. К настоящему времени в талломах некоторых представителей бурых водорослей выявлено множество различных оксипиринов, некоторые из которых имеют структуру, сходную с таковыми наземных растений (например, Proteau, Gerwick, 1993). Эти данные позволили предположить, что ферменты биосинтеза оксипиринов у бурых водорослей могут быть родственными таковым наземных растений. Однако до сих пор у бурых водорослей не обнаружено ни одного представителя СУР74 или родственных ферментов. В значительной мере задачу по поиску этих ферментов у бурых водорослей затрудняло отсутствие геномных данных. Однако в 2010 году была опубликована работа по расшифровке генома первого представителя этой группы организмов – бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* (Cock *et al.*, 2010).

Поиск ферментов, гомологичных алленоксидсинтазе ZmAOS1 (СУР74А19, GenBank: ACG28578.1) кукурузы обыкновенной (*Z. mays*), с помощью программы BLAST (NCBI) выявил три последовательности в геноме *E. siliculosus*, одна из которых, депонированная в базе данных NCBI

(CBN75517.1, 1113 п.н.), соответствовала С-концевой области предполагаемого белка, которому был присвоен номер CYP5164B1 (Д. Нельсон, личное сообщение). Данный белок обладал 33% идентичности с последовательностью ZmAOS1 при покрытии 29%. Открытая рамка считывания (1434 п.н.), кодирующая белок CYP5164B1 размером 477 аминокислотных остатка, депонирована в базе данных мРНК Ectsi_mRNA_LATEST ORCAE под идентификационным номером Esi_0111_0095. Экспрессируемые концевые последовательности (EST – expressed sequence tag), соответствующие гену *CYP5164B1*, были выявлены в ходе транскрипционного анализа в различных стрессовых условиях (Dittami *et al.*, 2009). Они депонированы в базе данных NCBI под идентификационными номерами FP272245, FP278707 и FP286043.

Сопоставление последовательности CYP5164B1 с цитохромами P450 свидетельствует о родстве этого белка и ферментов клана CYP74. Последовательность CYP5164B1 обладает наибольшим сходством (22% при покрытии 87%) с представителями клана CYP74 метиловых бактерий: гидропероксидлиазой MnHPL *Methylobacterium nodulans* (GenBank: ACH43051) и ферментом MspCYP74 *Methylobacterium* sp. (GenBank: WP_018263767).

В последовательности фермента CYP5164B1 выявлен 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 этой вставке соответствует последовательность SEPGRVGGM (в положении 409-417).

Вторая особенность, отличающая фермент CYP5164B1 от монооксигеназ, относится к участку перегиба I-спирали (CPC-4). В четвертом положении этого участка у фермента CYP5164B1 содержится остаток глутамина (Q272), синонимичный остатку аспарагина, характерного для ферментов CYP74 растений. Во втором положении этого домена у фермента CYP5164B1 находится остаток глицина, характерный для большинства ферментов CYP74, кроме алленоксидсинтаз подсемейства CYP74A, а также фермента CYP74B16 льна-долгунца, AsDES чеснока и RaDES лютика. В третьем положении у фермента

CYP5164B1, также как практически у всех ферментов CYP74, за исключением некоторых ДЭС, находится остаток фенилаланина. В пятом положении у фермента CYP5164B1 находится остаток серина, консервативный для АОС. В шестом положении практически у всех ферментов CYP74 находится остаток ароматической аминокислоты: у фермента CYP5164B1, также как у RaDES, в данном положении находится остаток серина. Непосредственно после этого участка практически у всех ферментов CYP74 находятся два остатка глицина: у ДЭС первый остаток глицина заменен остатком другой аминокислоты. У фермента CYP5164B1 заменены оба остатка глицина: первый заменен на остаток серина (синонимичная замена выявлена у RaDES, у которой в данном положении находится треонин); второй остаток глицина заменен на синонимичный, но больший по размеру остаток аланина.

Последовательность ERR-триады – домена, консервативного для всех цитохромов P450, включая представителей CYP74, у фермента CYP5164B1 является характерной для ферментов CYP74. В то же время, в PPV-домене выявлено нехарактерное для большинства ферментов CYP74 смещение второго остатка пролина в третье положение. Таким образом, по результатам анализа первичной структуры фермента CYP5164B1 невозможно однозначно предсказать тип катализируемой им реакции.

Последовательность ОРС гена *CYP5164B1*, опубликованную в базе данных ORCAE, адаптировали для получения рекомбинантного фермента в клетках *Escherichia coli*. Последовательность синтезировали в ЗАО Евроген (Москва) и клонировали в векторе pET-23a (Novagen, США). Получение рекомбинантного фермента с использованием клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS и его очистку проводили, как описано выше (рис. 98).

На первом этапе изучения каталитических свойств было показано, что фермент CYP5164B1 проявляет максимальную каталитическую активность в Na-фосфатном буфере, pH 7,0.

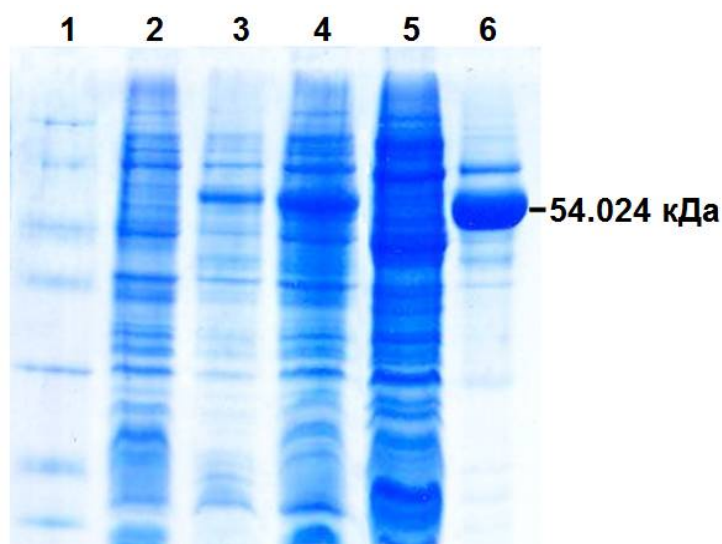


Рис. 98. Электрофореграмма выделения и очистки целевого фермента CYP5164B1 из лизатов бактерий: **1**, маркер молекулярного веса SDS-PAGE Standarts Low Range (Bio-Rad, США); **2**, тотальный белок клеток штамма BL21(DE3)pLysS до индукции с помощью ИПТГ; **3**, тотальный белок клеток штамма BL21(DE3)pLysS через 14 часов после добавления ИПТГ; **4**, лизат клеток штамма BL21(DE3)pLysS, содержащих рекомбинантный фермент CYP5164B1; **5**, фракция несвязавшихся с металлоаффинным сорбентом белков; **6**, очищенный концентрированный препарат рекомбинантного фермента CYP5164B1.

В качестве модельных субстратов для изучения каталитических свойств фермента CYP5164B1 как CYP74-подобного фермента использовали 9- и 13-гидроперекиси линолевой и α -линоленовой кислот, а также 15-гидроперекись эйкозапентаеновой кислоты. Фермент не проявлял активности в отношении 13-ГПОТ, 9-ГПОТ и 15-ГПЭПЕ, однако эффективно утилизировал 9- и 13-гидроперекиси линолевой кислоты. Значение константы каталитической (k_{cat}) реакций превращения 9-ГПОД и 13-ГПОД составляло 149 с^{-1} и $18,1 \text{ с}^{-1}$ соответственно.

Анализ продуктов (в виде Me эфиров или Me/TMC после или без восстановления NaBH_4) превращения гидроперекисей при участии рекомбинантного фермента CYP5164B1 проводили, как описано выше. Инкубация фермента CYP5164B1 с 9-ГПОД приводила к образованию основного продукта **1** (рис. 99А) – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислоты (Me/TMC). Масс-спектр этого соединения описан выше.

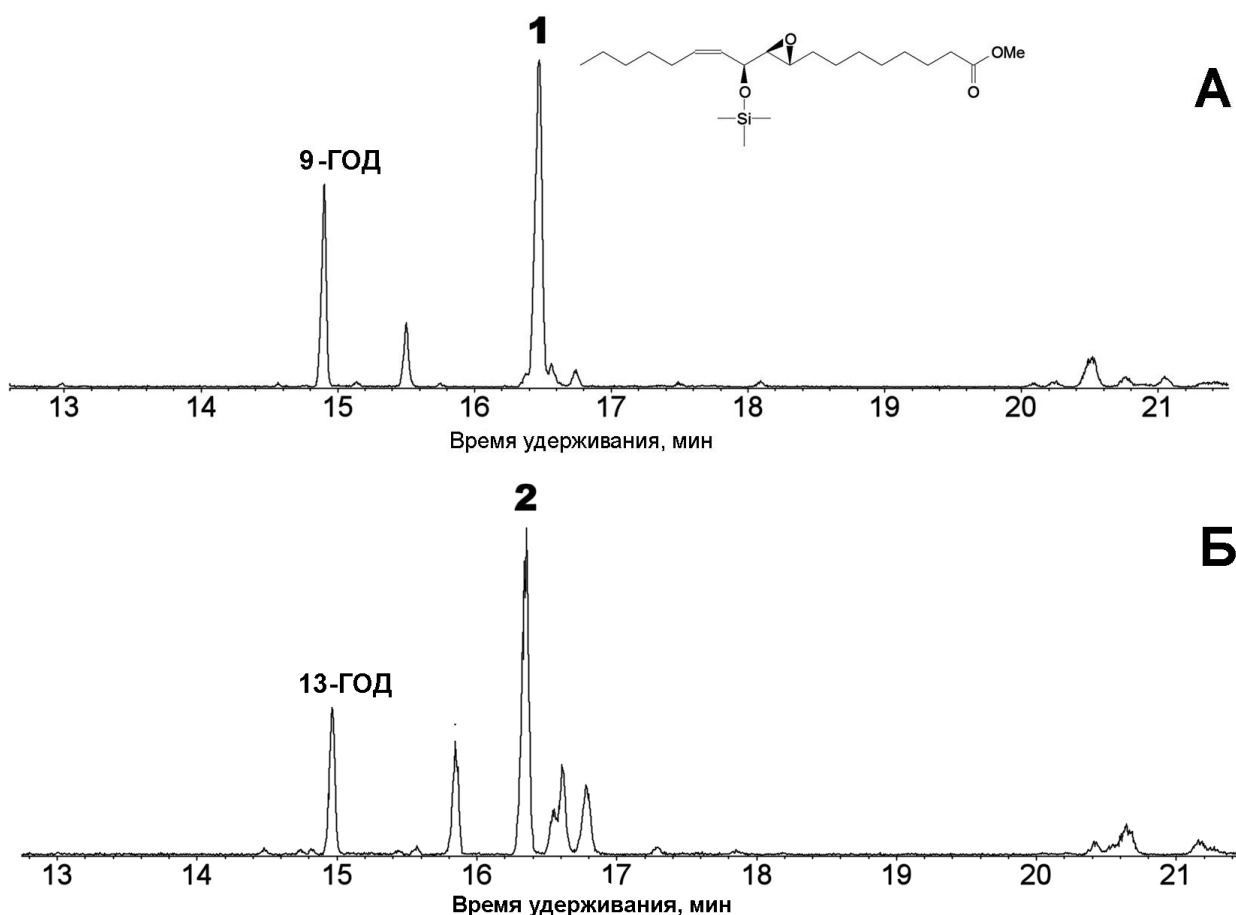


Рис. 99. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А) и 13-ГПОД (Б) при участии фермента СУР5164В1. **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; (А, вставка), структура основного продукта превращения 9-ГПОД при участии фермента СУР5164В1. Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 50.

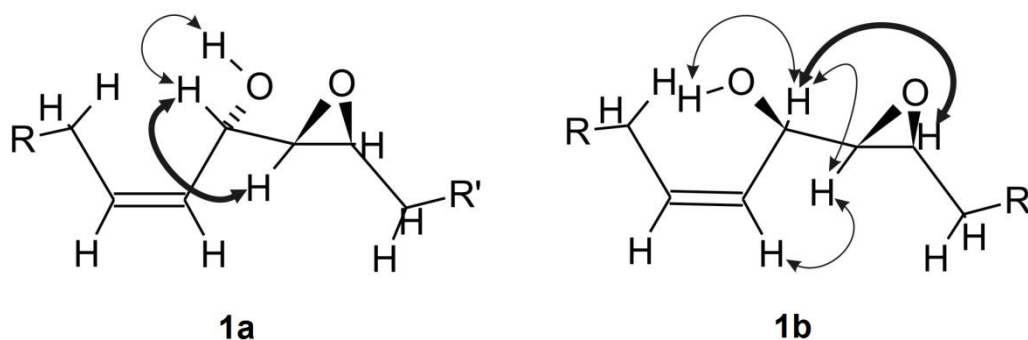


Рис. 100. Корреляция ядерного эффекта Оверхаузера в NOESY спектрах основного (слева) и минорного (справа) эпимеров.

Для подробного изучения структуры соединения **1** (Me), синтезируемого при участии фермента СУР5164В1, фермент инкубировали с $[1-^{14}\text{C}]9$ -

ГПОД, и основной продукт очищали методом радио-ВЭЖХ на нормальной фазе, который выявил, что соединение **1** состоит из двух эпимеров в соотношении 4:1. Оба эпимера собирали по отдельности и анализировали методом ЯМР. Данные ЯМР-анализа двух эпимеров представлены в таблицах 14 и 15 приложения соответственно.

Оба продукта имели одну *цис*-двойную связь ($J_{12,13} = 11,0$ Гц) и *транс*-эпоксидное кольцо ($J_{9,10} = 2,3$ и $2,2$ Гц соответственно). Химический сдвиг H11 в двух спектрах различался: 4,52 ppm в основном эпимере и 4,25 ppm – в минорном. Эта разница свидетельствовала о том, что H11 в основном эпимере демаскируется из-за пространственной близости к кислороду эпоксидной группировки. Основные эффекты Оверхаузера, выявляемые в спектрах NOESY, проиллюстрированы на рисунке 100. Спектр NOESY основного эпимера содержал 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 минорного эпимера 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 указывали на то, что основной и минорный эпимеры соединения **1**, образующегося при участии фермента CYP5164B1 *E. siliculosus*, имеют *эритро* (9*S*,10*S*,11*S*) и *трео* (9*S*,10*S*,11*R*) конфигурацию (рис. 99А, вставка) соответственно.

Инкубация фермента CYP5164B1 с 13-ГПОД приводила к образованию основного продукта **2** – (9*Z*)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (Me/TMC), а также трех дополнительных продуктов, имеющих незначительно большее время удерживания, чем соединение **2** (рис. 99Б). Минорные пики, элюируемые после продукта **2**, имели масс-спектры, идентичные таковому соединению **2**. Таким образом, они являются его стереоизомерами, различающимися преимущественно стереоконфигурацией при C11 или C12.

Полученные данные свидетельствуют, что фермент CYP5164B1 *E. siliculosus* является эпоксиалкогольсинтазой (Торогkова *et al.*, 2017а). В соответствии с принятой номенклатурой ферментов семейства CYP74, ферменту

присвоено тривиальное название EsEAS (эпоксиалкогольсинтаза *E. siliculosus*), также как и соответствующему гену – *EsEAS*. Таким образом, EsEAS стала первым охарактеризованным ферментом клана CYP74 бурых водорослей.

Чтобы расшифровать механизм каталитического действия EsEAS, проводили эксперименты с использованием меченого ^{18}O . Изначально EsEAS инкубировали с $[\text{}^{18}\text{O}_2\text{-гидроперокси}]9\text{-ГПОД}$. Масс-спектр меченого продукта **1** (Me/TMC), представленный на рисунке 101, содержал M^+ при m/z 402 (соответствующий 398 в спектре немеченого продукта) и $[\text{M} - \text{Me}]^+$ при m/z 387 (соответствующий 383 в спектре немеченого продукта). Рассчитали общее содержание ^{18}O в соединении **1**.

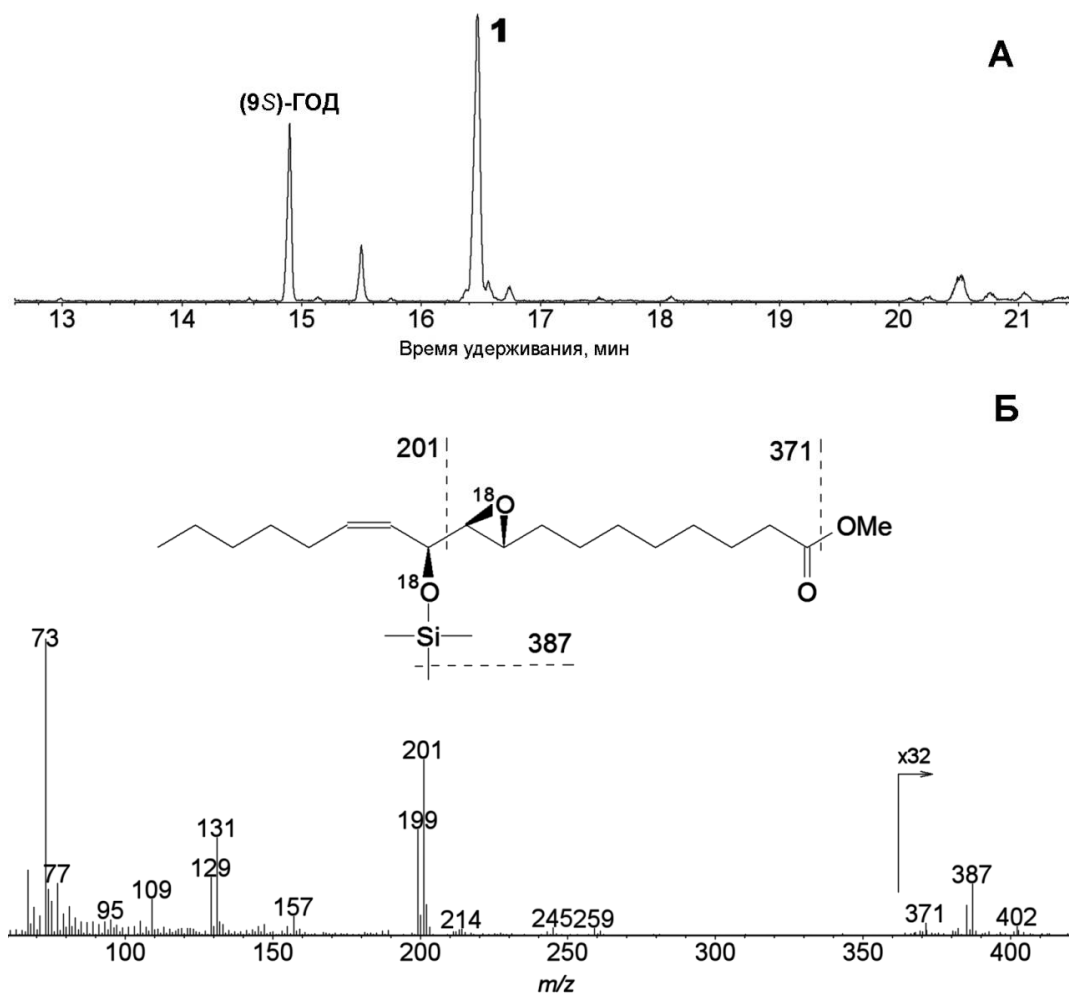


Рис. 101. Результат ГХ-МС анализа продукта инкубации (Me/TMC после восстановления NaBH_4) фермента EsEAS с $[\text{}^{18}\text{O}_2\text{-гидроперокси}]9\text{-ГПОД}$. (А) хроматограмма по полному ионному току продукта инкубации (Me/TMC). (Б) Масс-спектр и схема фрагментации продукта **1** (Me/TMC), полученного в результате инкубации EsEAS с $[\text{}^{18}\text{O}_2\text{-гидроперокси}]9\text{-ГПОД}$.

Полученные данные свидетельствовали о том, что $73,27 \pm 0,46$ % соединения **1**, синтезируемого в результате инкубации EsEAS с [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД, содержит два атома ^{18}O . Оставшаяся часть содержала ^{18}O только в эпоксидной группе. При этом показано, что исходная [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД содержала $84,95 \pm 0,52$ % ^{18}O . Анализ проводили следующим образом. [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД последовательно восстанавливали боргидридом натрия, метилировали диазометаном и триметилсилилировали. Полученную [^{18}O]9-ГОД анализировали методом ГХ-МС (SIM). Содержание ^{18}O оценивали, исходя из относительного содержания пар ионов 384,3 и 382,3, $[\text{M}]^+$; 313,2 и 311,2 $[\text{M} - \text{C}_5\text{H}_{11}]^+$; 227,2 и 225,2 $[\text{M} - (\text{CH}_2)_8\text{COOMe}]^+$. В результате анализа методом ГХ-МС при мониторинге по селективному току выявлено включение 2, 1 и 0 атомов ^{18}O на основании содержания $[\text{M} - \text{Me}]^+$ при m/z 387,3, 385,3 и 383,3 соответственно (таблица 18А). Относительное содержание разных вариантов соединения **1**, содержащих 1 или 0 атомов ^{18}O в гидроксильной группе, оценивали по интегральной интенсивности пика соединения **1** на хроматограммах при мониторинге по селективному ионному току при m/z 201,2 и 199,2 соответственно (таблица 18Б). Расчеты проводили по результатам измерения площади пиков соединения **1** в соответствующих ионных хроматограммах. Полученные данные корректировали в соответствии с относительным содержанием рассматриваемых m/z ионов в спектре немеченого продукта.

В результате каталитического действия EsEAS наблюдали следующую картину. Практически весь эпоксидный и ок. 70 % гидроксильного кислорода эпокиспирта происходил из [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД. Таким образом, EsEAS преимущественно синтезирует эпокиспирты посредством изомеризации гидроперекиси. В результате инкубации EsEAS с немеченой гидроперекисью в атмосфере или воде, содержащих меченый ^{18}O , оставшаяся часть гидроксильного кислорода происходила из атмосферы и следовая часть – из воды (рис. 102).

Таблица 18А. Встраивание ^{18}O из [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД в соединение **1**, оцененное по интегральной интенсивности пика соединения **1** на хроматограммах при мониторинге по селективному ионному току (соответствующему ионам m/z 387,3, 385,3 и 383,3).

Ион, m/z	Относительное содержание разных вариантов соединения 1 , содержащих 2, 1 или 0 атомов ^{18}O , %
387,3	54,60±0,40
385,3	37,34±0,13
383,3	8,06±0,53

Таблица 18Б. Встраивание ^{18}O в гидроксильную группу (C11) соединения **1** после инкубации EsEAS с [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД, немеченой 9-ГПОД в атмосфере $^{18}\text{O}_2$, или немеченой 9-ГПОД в [$^{18}\text{O}_2$]воде.

Источник ^{18}O	Содержание изотопа ^{18}O в гидроксильной группе C11, соединение 1 , %
[$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД	62,10 ± 0,40
$^{18}\text{O}_2$ атмосфера	24,23 ± 0,66
[$^{18}\text{O}_2$]вода	7,45 ± 0,39

Механизмы каталитического действия EsEAS, SmEAS и RjEAS, а также описанных выше ферментов, проявляющих ЭАС активность, являются сходными (рис. 103). Все указанные ферменты продуцируют эпокиспирты – преимущественно (9*S*,10*S*,11*S*)-эпимеры с *транс*-эпоксидом.

У разных видов бурых водорослей обнаружены C18 и C20 ПНЖК (Jamieson, Reid, 1972; Khotimchenko *et al.*, 2002). Основными кислотами у *E. siliculosus* являются линолевая, α -линоленовая, арахидоновая и эйкозапентаеновая (Dittami *et al.*, 2011). В геноме *E. siliculosus* присутствует, по крайней мере, три разных гена липоксигеназы. Однако специфичность действия этих липоксигеназ не изучена.

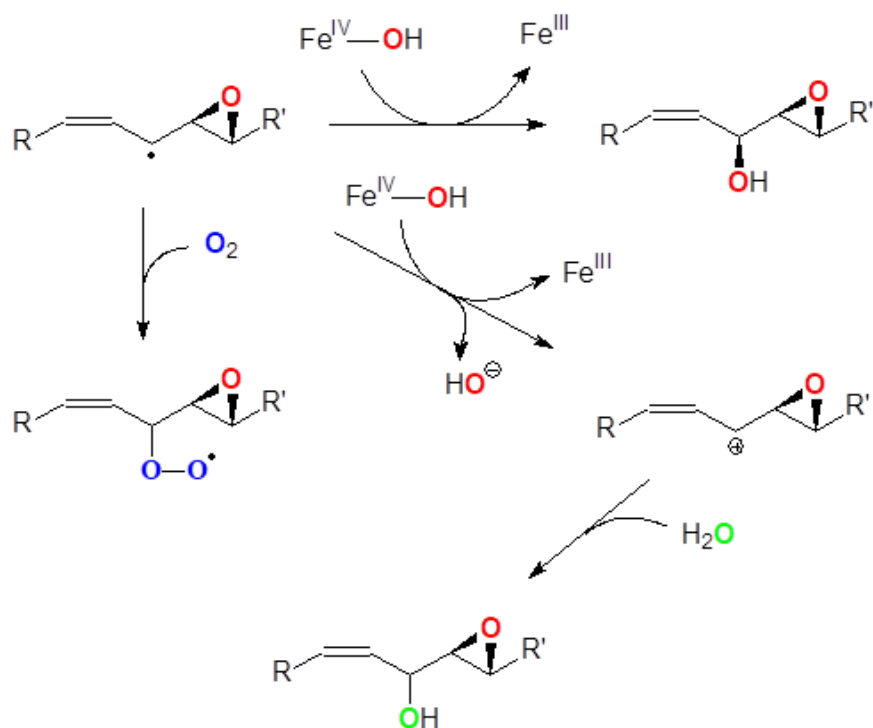


Рис. 102. Схема превращения эпоксиаллильного радикала при участии ЭАС. Эпоксиаллильный радикал образуется на начальной стадии в результате гомолиза O-O связи в молекуле гидроперекиси жирной кислоты и перегруппировки образующегося оксирадикала. Верхняя часть схемы показывает основное превращение, а именно – перегруппировку гидроперекиси в эпокиспирт (кислород гидроперекиси отмечен красным цветом). На левой части схемы представлено включение атмосферного кислорода (отмечен синим цветом) в гидро(перо)кси группу. На нижней части схемы показано встраивание кислорода из воды (кислород воды отмечен зеленым цветом). Происходит окисление эпоксиаллильного радикала в эпоксиаллильный карбокатион с последующим нуклеофильным замещением последнего гидроксильной группой из воды.

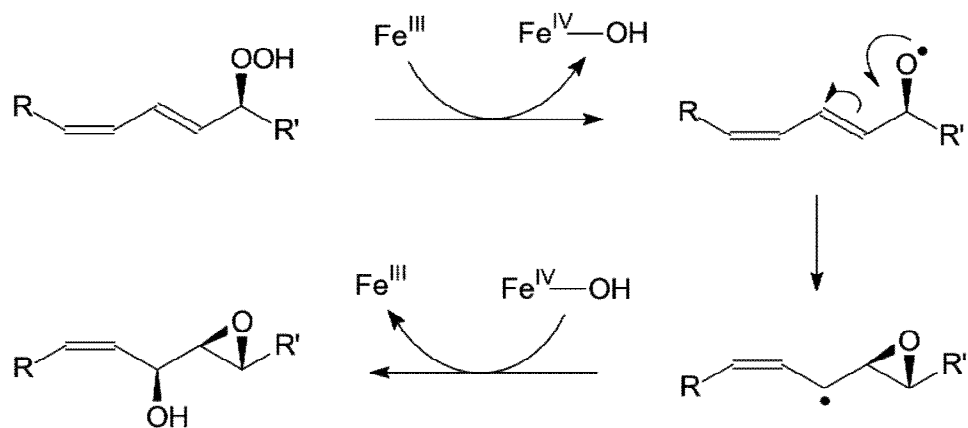


Рис. 103. Механизм реакции, катализируемой EsEAS, SmEAS и RjEAS, а также описанных выше ферментов, проявляющих ЭАС активность.

В то же время, метаболомный анализ *E. siliculosus* выявил 9- и 13-гидроперекиси линолевой и α -линоленовой кислот (Ritter *et al.*, 2014). В настоящей работе были использованы эти гидроперекиси, а также 15-ГПЭПЕ. Наши данные свидетельствуют, что 9-ГПОД является предпочтительным субстратом EsEAS. Таким образом, вполне вероятно, что у *E. siliculosus* может функционировать путь, опосредованный 9-липноксигеназой и EsEAS.

Различные C18 и C20 эпокиспирты были обнаружены у красных (Bernart, Gerwick, 1994; Gerwick, 1996; Jiang, Gerwick, 1997), зеленых (Bernart *et al.*, 1993) и диатомовых (Lamari *et al.*, 2013) водорослей. Нами выявлен ряд эпокиспиртов у бурых водорослей, например, значительное количество 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (соединение **2**) у *Sargassum pallidum*. До настоящей работы у бурых водорослей было выявлено большое разнообразие других оксипинов, включая дивиниловые эфиры (Proteau, Gerwick, 1993), а также различные производные 1,2-эпоксициклопентана и циклопропана (Proteau *et al.*, 1994; Kousaka *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2012).

3.15. Получение ферментов CYP443D1 и CYP443C1 роющей литоральной актинии *Nematostella vectensis* и изучение их каталитических свойств

Описание новых членов клана CYP74 ранее неизученных филогенетических ветвей представляет большой интерес. Одним из модельных животных организмов является роющая литоральная актиния (*Nematostella vectensis*, Cnidaria). Поиск предполагаемых генов клана CYP74 в геноме *N. vectensis* выполняли с использованием инструмента TBLASTN и BLASTP на портале генома JGI *Nematostella* (Putnam *et al.*, 2007), EnsemblMetazoa *N. vectensis* и баз данных NCBI с использованием последовательности CYP74B16 в качестве референсной. В геноме *N. vectensis* выявлено 82 гена цитохромов P450 (Goldstone, 2008). В результате поиска в базе данных NCBI обнаружены белки CYP443D1 (487 аминокислотных остатков; GenBank:

XP_001636360.1) и CYP443C1 (485 аминокислотных остатков; GenBank:QJ154761.1), обладающие соответственно 25% и 28,5% идентичности с ферментом CYP74B16 (92% и 74% покрытия соответственно).

Последовательность транскрипта гена *CYP443D1* (номер EDO44297) доступна в базе данных EnsemblMetazoa (Helm *et al.*, 2013; Tulin *et al.*, 2013). Ген *CYP443D1* состоит из одиннадцати экзонов, ОРС этого гена содержит 1461 нуклеотид. Самой высокой идентичностью (27% при покрытии 85%) среди растительных ферментов CYP74 белок CYP443D1 обладает к представителям подсемейства CYP74M *S. moellendorffii*. Выравнивание последовательности CYP443D1 с другими представителями CYP74 позволило выявить особенности первичной структуры, типичные для ферментов CYP74, такие как участок перегиба I-спирали (CPC-4), ERR-триада, PPV-домен, вставка из девяти аминокислотных остатков в области гем-связывающего домена и гемовый лиганд – цистеин.

Каталитически значимый участок перегиба I-спирали имеет последовательность L-N-F-N-A-S. Этот участок содержит консервативный остаток аспарагина (N246 в последовательности CYP443D1). Шестую позицию в этом участке занимает остаток серина. Большинство ферментов CYP74 содержат остаток ароматической аминокислоты в этом положении. Следующий сайт после этого участка в последовательности CYP443D1 содержит остаток пролина. Все АОС и ГПЛ содержат остаток глицина в этом положении, тогда как в последовательностях ДЭС этот остаток заменен большим по размеру остатком.

Тотальную РНК выделяли из взрослых особей *N. vectensis*, любезно предоставленных нам доктором И. Козевичем (МГУ). Клонирование ОРС гена *CYP443D1* проводили с использованием вектора рЕТ-23а и праймеров CYP443D1cF и CYP443D1cR (таблица 3 приложения), как описано выше. Получение рекомбинантного фермента с использованием клеток *E. coli* штамма BL21 CodonPlus RIL (Novagen, США) и его очистку также проводили, как описано выше.

Рекомбинантный фермент СУР443D1 эффективно использовал в качестве субстратов 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД, 13-ГПОТ, а также γ -9-ГПОТ. Превращение 15-ГПЭПЕ при участии фермента СУР443D1 протекало значительно менее эффективно. Значения константы каталитической (k_{cat}) реакций превращения 13-ГПОТ, 13-ГПОД и 9-ГПОД при участии фермента СУР443D1 составляли 177,8, 142,2 и 218,3 s^{-1} соответственно.

Анализ продуктов (в виде Me эфиров или Me/ТМС после или без восстановления $NaBH_4$) превращения гидроперекисей при участии рекомбинантного фермента СУР443D1 проводили, как описано выше. Было показано специфическое преобразование 9-гидроперекисей. 9-ГПОД преобразовывался в основной продукт **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовую кислоту (Me/ТМС) (рис. 104А), 9-ГПОТ – в основной продукт **1а** (рис. 104Б), 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновую кислоту (Me/ТМС). γ -9-ГПОТ специфически преобразовывался в продукт **1б** (рис. 104В), масс-спектр которого (Me/ТМС) содержал $[M - Me]^+$ при m/z 381 (0,2%), $[M - MeOH]^+$ при m/z 365 (0,15%), $[M - C1/C9]^+$ при m/z 212 (6%), $[M - C1/C10]^+$ при m/z 199 (100%), m/z 155 (22%), m/z 129 (66%), m/z 109 (15%) и $[ТМС]^+$ при m/z 73 (100%) (рис. 105А). Каталитическое гидрирование соединения **1б** с последующим метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию описанной выше 9,10-эпокси-11-гидрокси-октадекановой кислоты (Me/ТМС). Полученные данные позволили идентифицировать продукт **1б** как оксиранил карбинол 9,10-эпокси-11-гидрокси-6,12-октадекадиеновую кислоту (ЭАС продукт).

Для структурной характеристики продукта **1** (Me эфир), образуемого при участии фермента СУР443D1, его получали и очищали методом радио-ВЭЖХ на нормальной фазе, после чего записали ЯМР-спектры (таблица 16 приложения). Двойная связь имела «Z» конфигурацию, о чем свидетельствовало значение $J_{12,13} = 11$ Гц; эпоксид имел *cis*-конфигурацию, о чем свидетельствовало значение $J_{9,10} = 4,3$ Гц.

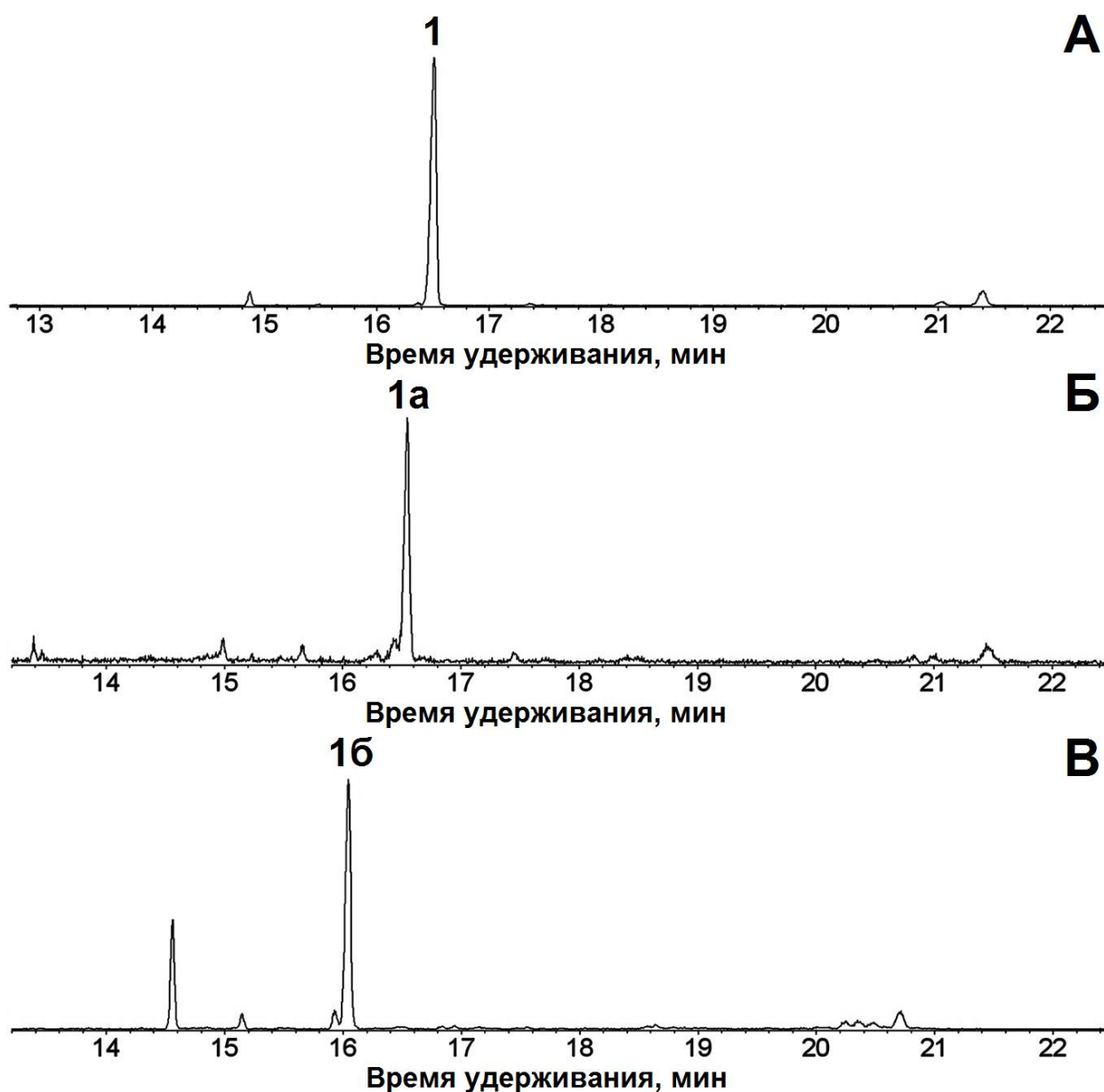


Рис. 104. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TМС после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А), 9-ГПОТ (Б) и γ -9-ГПОТ (В) при участии фермента СУР443D1. **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; **1a**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота; **16**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-6,12-октадекадиеновая кислота. Структурные формулы продуктов представлены на рисунках 50, 104 и 105.

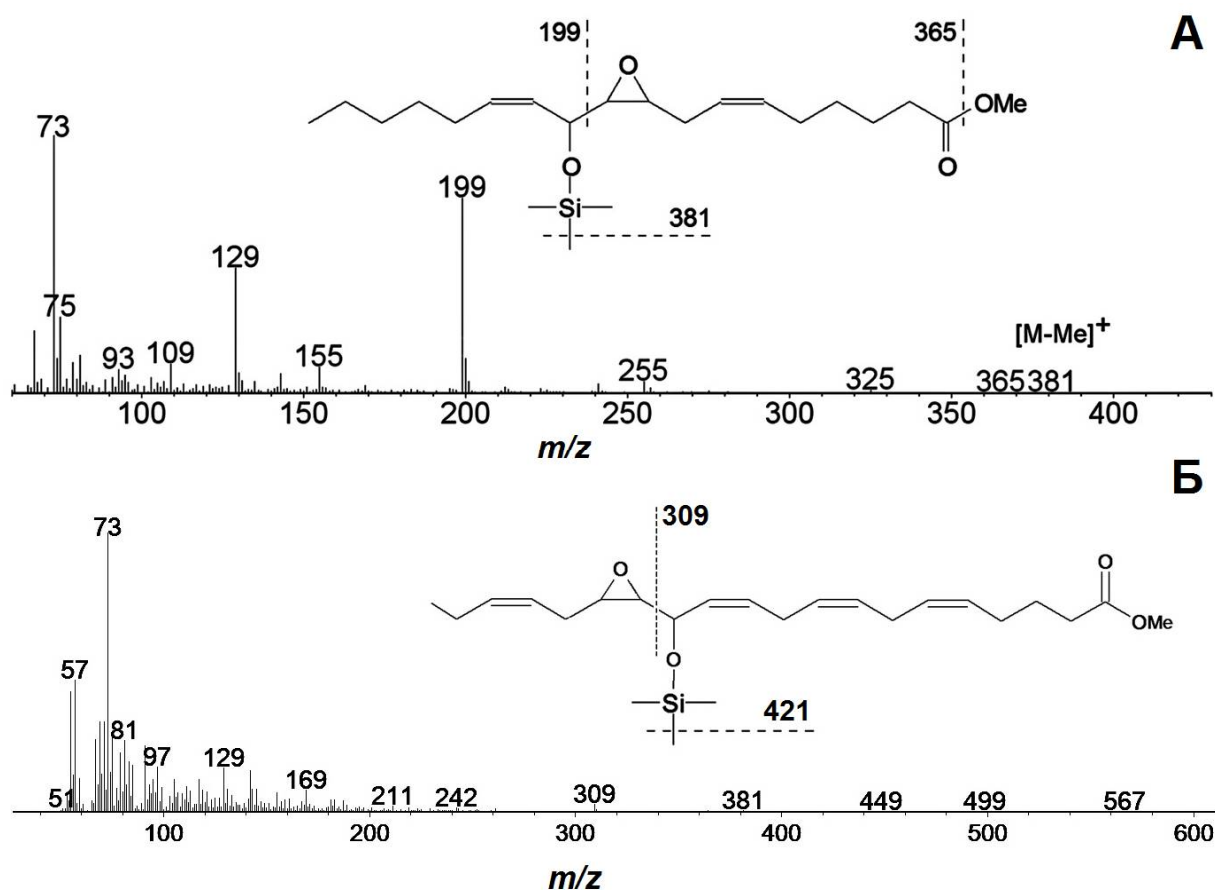


Рис. 105. Масс-спектры соединений **16** (А) и **16** (Б) – 9,10-эпокси-11-гидрокси-6,12-октадекадиеновой и 13-гидрокси-14,15-эпокси-5,8,12,17-эйкозатетраеновой кислот (Me/ТМС) соответственно.

Спин-спиновое взаимодействие между H10 и H11 ($J_{10,11} = 7,7$ Гц) не позволило точно определить конфигурацию *эритро/трео* из-за небольших различий между соответствующими константами связи в ЯМР спектрах *эритро* и *трео* *цис*-эпоксиспиртов (Jin *et al.*, 2012). Однако спектр 2D-NOESY содержал интенсивный перекрестный пик между H10 и H11, а также менее заметный перекрестный пик между H9 и H11; и ядерные эффекты Оверхаузера указывали на пространственную близость между этими протонами (особенно H10 и H11) в соответствии с *трео* конфигурацией. Кроме того, данные 2D-NOESY спектра, демонстрирующие ярко выраженный перекрестный пик между H11 и H8a,b являлись дополнительным доказательством наличия *цис*-эпоксидной группы. В целом, данные подтвердили наличие конфигурации *трео* оксиранил карбинола, *цис*-эпоксида и *цис*-двойной связи в продукте **1**, образованном при участии фермента СУР443D1 (рис. 106).

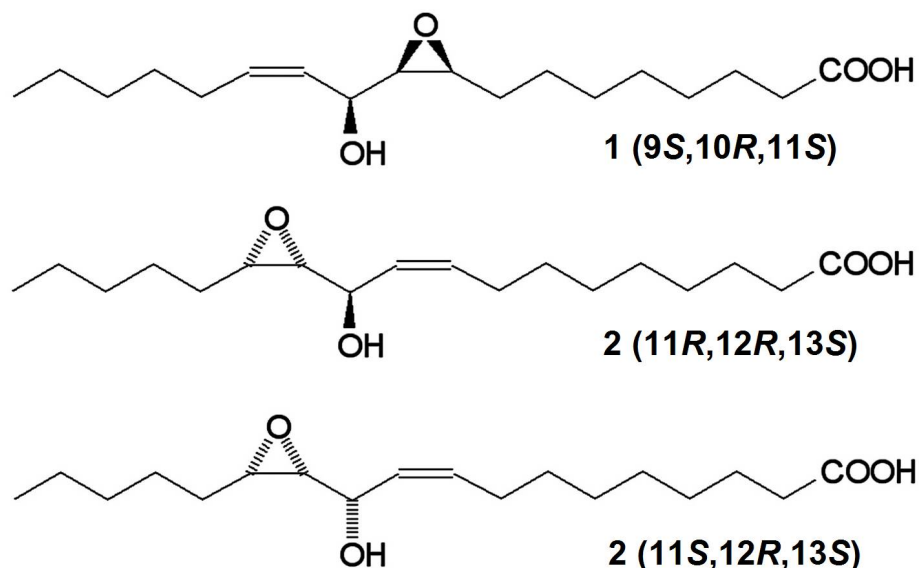


Рис. 106. Детальные структуры некоторых продуктов каталитического действия фермента СУР443D1, определенные методом ЯМР. **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота.

Независимо стереохимию соединения **1** изучали в экспериментах по химическим превращениям. Каталитическое гидрирование в условиях, благоприятствующих гидрогенолизу эпоксидной группировки, приводило к образованию 10,11-дигидроксиоктадекановой кислоты (Me эфир). В результате анализа методом ГХ-МС этого соединения в виде бис-ТМС производного выявили основной пик (время удерживания 12,40 мин), имеющий масс-спектр, содержащий ионы M^+ при m/z 443 (5%), $[M - \text{ОНС} - (\text{CH}_2)_6 - \text{СН}_3]^+$ при m/z 346 (13%), $[\text{ТМСО}^+ = \text{СН} - (\text{CH}_2)_8 - \text{СООНС}_3]$ при m/z 273 (59%), $[\text{ТМСО}^+ = \text{СН} - (\text{CH}_2)_6 - \text{СН}_3]$ при m/z 201 (56%) и $[\text{ТМС}]^+$ при m/z 73 (100%). Время удерживания этого соединения было таким же, как у соответствующего производного аутентичного образца *трео*-10,11-дигидроксиоктадекановой кислоты, но меньше, чем у соответствующего *эритро*-изомера.

В другом эксперименте эпоксидную группу метилового эфира дигидропроизводного удаляли с помощью обработки трифенилфосфинселенидом, и МС-производное полученной в результате метил-11-гидрокси-9-октадеценовой кислоты подвергали окислительному озонолиту. В результате анализа методом ГХ-МС МС/Me-производного хирального фрагмента, а

именно – 2-гидроксинонановой кислоты, с использованием МС/Ме-производных 2(*S*)- и 2(*R,S*)-изомеров гидроксинонановой кислоты в качестве стандартов, показали, что она имела "*S*" конфигурацию. В результате этих экспериментов идентифицировали структуру соединения **1**, образуемого при участии фермента СУР443D1, как (9*S*,10*R*,11*S*,12*Z*)-9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовую кислоту (рис. 106).

Превращение 13-ГПОД при участии фермента СУР443D1 протекало также эффективно, однако специфичность превращения была ниже по сравнению с превращениями 9-гидроперекисей; в результате происходило образование *трео* и *эритро*, то есть 11(*S*) и 11(*R*) эпимеров (имеющих одинаковые масс-спектры) соединения **2** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (рис. 106, 107А). Структура *трео* оксиранил карбинола (Me эфир), очищенного методом радио-ВЭЖХ на нормальной фазе, подтверждена данными ¹H-ЯМР: 5,48 м.д. (ддт, H10; $J_{9,10} = 11,0$ Гц; $J_{10,11} = 8,3$ Гц; $J_{8,10} = 1,3$ Гц); 5,46 м.д. (м, H9); 4,27 м.д. (ддд, H11, $J_{11,12} = 7,7$ Гц, $J_{11,OH} = 3,2$ Гц); 2,90 м.д. (дд H12; $J_{12,13} = 4,3$ Гц); 2,75 м.д. (ддд, H13, $J_{13,14a} = 7,2$ Гц; $J_{13,14b} = 4,9$ Гц); 1,66 (д, OH при C11).

Кроме того, в результате инкубации фермента СУР443D1 с 13-ГПОД образовывались три изомера более полярного соединения **7** – 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовой кислоты. Один из трех пиков продукта **7** (наиболее удаленный от 13-ГОД) состоял из двух почти равных по количеству изомеров, как было определено в результате разделения этого пика методом радио-ВЭЖХ на нормальной фазе. Оба они имели одинаковые масс-спектры (как описано выше) и ЯМР-спектры. Данные ЯМР для обоих изомеров свидетельствовали о наличии *цис*-эпоксида ($J_{12,13} = 4,2$ Гц), *транс*-двойной связи ($J_{10,11} = 15,5$ Гц) и вторичной спиртовой группировки при C9 (dt при 3,88 м.д.) и позволили идентифицировать изомеры как (9*S*) и (9*R*) эпимеры (10*E*,12*R*,13*S*)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовой кислоты.

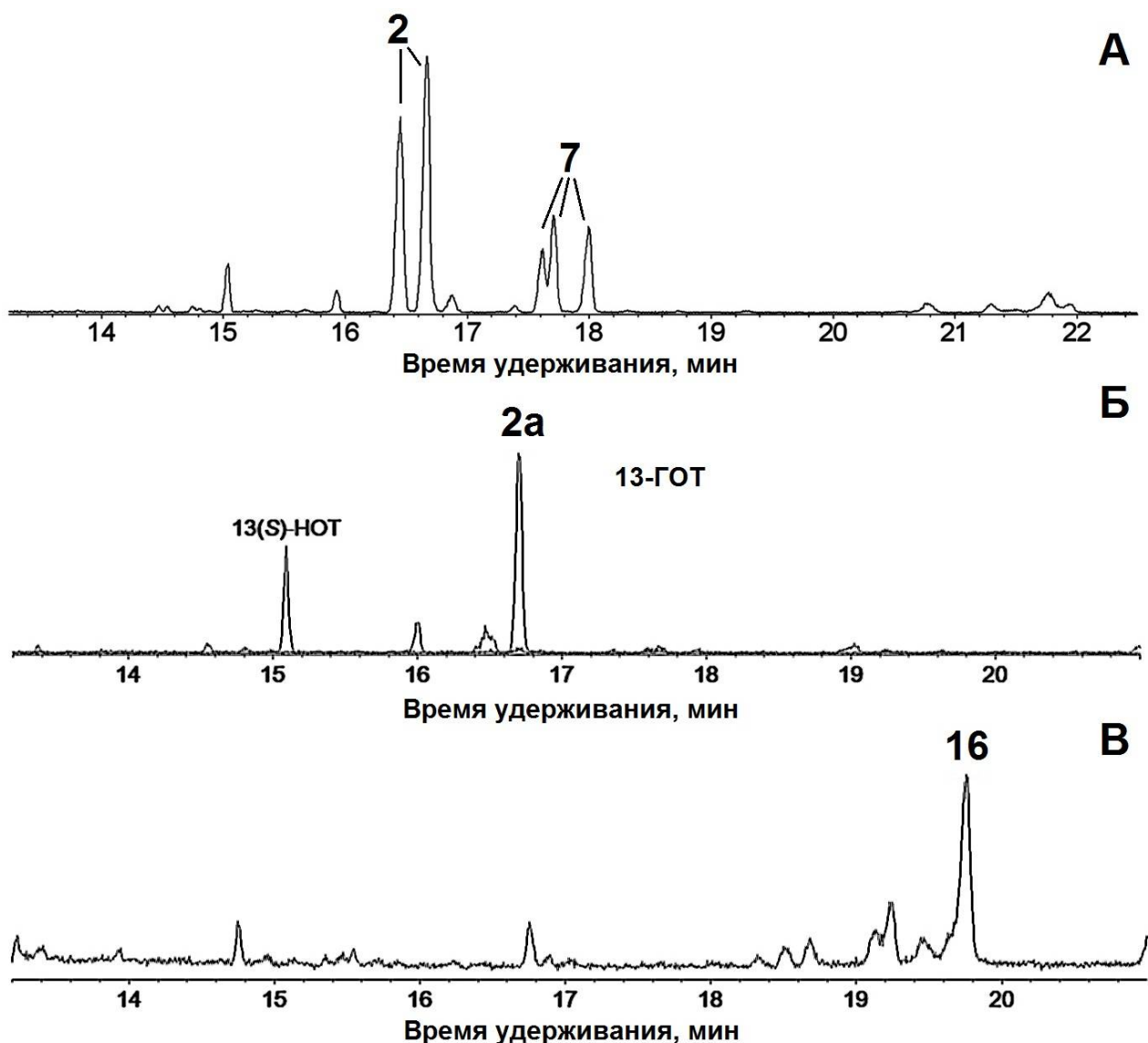


Рис. 107. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS после восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПОД (А), 13-ГПОТ (Б) и 15-ГПЭПЕ (В) при участии фермента CYP443D1. **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; **2a**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота; **7**, 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота; **16**, 13-гидрокси-14,15-эпокси-5,8,11,17-эйкозатетраеновая кислота. Структурные формулы продуктов представлены на рисунках 50, 105 и 106.

Превращение 13-ГПОТ при участии фермента CYP443D1 приводило к образованию единственного продукта **2a** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновую кислоту (Me/TMS) (рис. 107Б). Инкубация 15-ГПЭПЕ при участии фермента CYP443D1 приводила к слабому выходу продукта **16** (рис. 107В), масс-спектр которого (рис. 105) содержал $[\text{M} - \text{Me}]^+$ при m/z 405

(0,1%), [M – пентенил]⁺ при *m/z* 351 (0,4%), [M – C14/C20]⁺ при *m/z* 309 (5%), *m/z* 169 (9%), *m/z* 129 (15%), *m/z* 91 (21%) и [TМС]⁺ при *m/z* 73 (100%). Среди всех фрагментов масс-спектра особенно заметен фрагмент при *m/z* 309, являющийся результатом расщепления между оксираном и вторичной спиртовой группировкой, что позволило идентифицировать соединение **16** как оксиранил карбинол 13-гидрокси-14,15-эпокси-5,8,11,17-эйкозатетраеновую кислоту (Me/TМС, ЭАС продукт).

Для изучения механизма реакции, катализируемой ферментом СУР443D1, проводили эксперименты с использованием меченного ¹⁸O. Фермент СУР443D1 инкубировали с [¹⁸O₂-гидроперокси]9-ГПОД (изотопное содержание ¹⁸O 87,39, по оценкам SIM ГХ-МС продукта восстановления NaBH₄, Me/TМС) (рис. 108А). Масс-спектр ¹⁸O-меченого продукта **1** (Me/TМС) изображен на рис. 108Б. Масс-спектр меченого соединения **1** содержал M⁺ при *m/z* 402 (соответствует *m/z* 398 в спектре немеченого продукта **1**) и [M – Me]⁺ при *m/z* 387 (соответствующий *m/z* 383 в спектр немеченого продукта **1**). В результате анализа SIM ГХ-МС соединения **1**, содержащего 2, 1 или 0 атом ¹⁸O, выявили [M – Me]⁺ при *m/z* 387,3, 385,3 и 383,3 соответственно. Определение числа атомов проводили путем интегрирования площадей пиков соединения **1** в соответствующих ионных хроматограммах. Результаты, представленные таблице 19, свидетельствуют о полном включении обоих атомов ¹⁸O из субстрата [¹⁸O₂-гидроперокси]9-ГПОД в соединение **1**. Суммарное количество меченного ¹⁸O в [¹⁸O-гидроперокси]9-ГПОД и соединении **1** было практически равным, 85,14% и 85,54% соответственно.

Эксперименты с использованием меченного ¹⁸O необходимы для понимания молекулярных механизмов превращения гидроперекисей жирных кислот. Помимо ЭАС, еще один фермент – ГПЛ (синоним гемиацетальсинтаза, Grechkin, Hamberg, 2004; Grechkin *et al.*, 2006; Mukhtarova *et al.*, 2018) дает возможность проследить за судьбой обоих атомов ¹⁸O в меченой гидроперекиси. Оба фермента – ЭАС и ГПЛ – действуют как изомеразы.

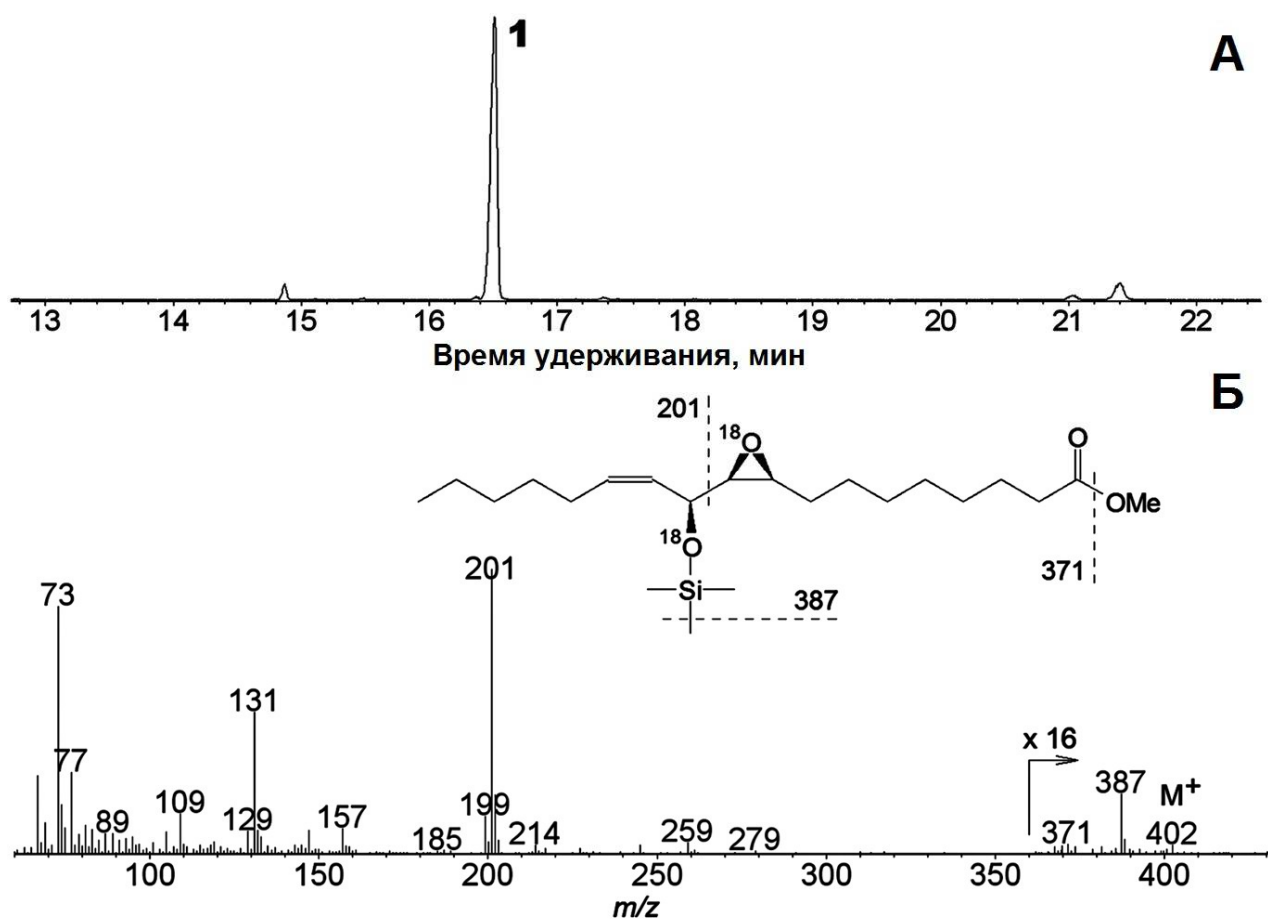


Рис. 108. Хроматограмма (А), а также масс-спектр и схема фрагментации (Б) продукта инкубации фермента СУР443D1 с [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД.

Таблица 19. Оценка методом ГХ-МС (SIM) включения атомов ^{18}O из [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД в соединение **1** в присутствии фермента СУР443D1.

А. Процентное соотношение типов соединения **1**, содержащих 2, 1 или 0 атомов ^{18}O по интегрированию площадей соответствующих пиков на хроматограммах (SIM).

Ион [М-Ме] $^+$, m/z	Относительное содержание типов соединения 1 , содержащих 2, 1 или 0 атомов ^{18}O
387,3	74,76 ± 0,96
385,3	20,09 ± 0,86
383,3	5,15 ± 0,11

Б. Тотальное содержание изотопа ^{18}O в соединении **1** и исходной [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД.

Содержание ^{18}O в соединении 1 (100% соответствует включению двух атомов ^{18}O)	Контроль, содержание ^{18}O [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД
$85,14 \pm 0,29$	$85,54 \pm 1,41\%^{**}$

** [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД восстанавливали NaBH_4 , метилировали и триметилсилилировали. Полученную [^{18}O]9-ГОД подвергали ГХ-МС анализу (SIM). Содержание ^{18}O определяли из относительного содержания пар ионов 384,3 и 382,3, $[\text{M}]^+$; 313,2 и 311,2 $[\text{M} - \text{C}_5\text{H}_{11}]^+$; 227,2 и 225,2 $[\text{M} - (\text{CH}_2)_8\text{COOMe}]^+$.

Так же как ЭАС, ГПЛ включают в продукт – полуацеталь – оба атома ^{18}O из $^{18}\text{O}_2$ -гидроперекисей (Grechkin, Hamberg, 2004; Grechkin *et al.*, 2006; Mukhtarova *et al.*, 2018). Таким образом, механизмы реакции всех ферментов CYP74, по-видимому, проходят стадии (1) гомолиз О-О связи гидроперекиси и (2) перегруппировка оксирадикала в эпоксиаллильный радикал. Дальнейшие преобразования зависят от типа фермента (отрыв гидроксильного радикала в случае ЭАС и ГПЛ и отрыв протона в случае АОС и ДЭС).

Описанные результаты свидетельствуют, что фермент CYP443D1 *N. vectensis*, NvEAS, представляет собой специфичную эпоксиалкогольсинтазу (Toporkova *et al.*, 2017б). Основными продуктами NvEAS являются оксиранил карбинолы, такие как соединение **1**. Ферменту CYP443D1 было присвоено тривиальное название NvEAS (*N. vectensis* ЭАС), тогда как соответствующему гену – NvEAS. В отношении специфичности продукта, фермент NvEAS сходен с ранее описанной ЭАС представителя животных, а именно – VfEAS ланцетника *B. floridae*. С другой стороны, NvEAS обладает предпочтением к 9-ГПОД, тогда как предпочтительным субстратом для VfEAS является 13-ГПОД (Lee *et al.*, 2008). Эпоксиспирты, ранее обнаруженные в качестве побочных продуктов активности АОС (Song *et al.*, 1993), а также описанные в данной работе как продукты каталитического действия SmEAS, RjEAS и EsEAS, а также ферментов с дополнительной ЭАС активностью, имеют

транс-оксиран, в отличие от продуктов NvEAS и VfEAS (Lee *et al.*, 2008), имеющих *цис*-оксиран.

Второй выявленный ген фермента клана CYP74 *N. vectensis* клонировали с использованием праймеров CYP443C1cF/CYP443C1cR. Для получения рекомбинантного фермента CYP443C1 использовали клетки Rosetta-gami(DE3)pLysS В. Фермент CYP443C1 проявлял каталитическую активность в Na-фосфатном буфере в диапазоне pH 6,0–8,0; максимальную активность наблюдали при pH 7,0. Наиболее предпочтительным субстратом для CYP443C1 оказался 9-ГПОТ. Инкубация фермента CYP443C1 с 9-ГПОТ приводила к образованию основного продукта **3a** (Me/TMC) (рис. 109A) – 9-гидроксинонановой кислоты – продукта восстановления NaBH_4 9-оксононановой кислоты, свидетельствующей о присутствии 9-ГПЛ активности. Дополнительным продуктом реакции являлось соединение **1a** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота (Me/TMC, ЭАС продукт).

В результате инкубации CYP443C1 с 13-ГПОД происходило образование двух изомеров продукта **2** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (Me/TMC, ЭАС продукт). Среди продуктов этой реакции были также обнаружены тригидроксикислоты – продукты спонтанного гидролиза эпокиспиртов. Продуктов ГПЛ активности обнаружено не было. В то же время, 9-ГПОД, 13-ГПОТ и 15-ГПЭПЕ при участии фермента CYP443C1 превращались с меньшей эффективностью. Результатом превращения 9-ГПОД было образование 9-оксононановой кислоты (**3**), а также 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовой кислоты (α -кетол **8**) и 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислоты (эпокиспирт **1**) (Me/TMC), т.е. происходило образование продуктов ГПЛ, АОС и ЭАС активностей в соотношении 1,4 : 16,6 : 82,0 соответственно. При этом превращение 13-ГПОТ и 15-ГПЭПЕ приводило к образованию эпокиспиртов – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновой (**2a**) и 13-гидрокси-14,15-эпокси-5,8,11,17-эйкозатетраеновой (**16**) кислот соответственно.

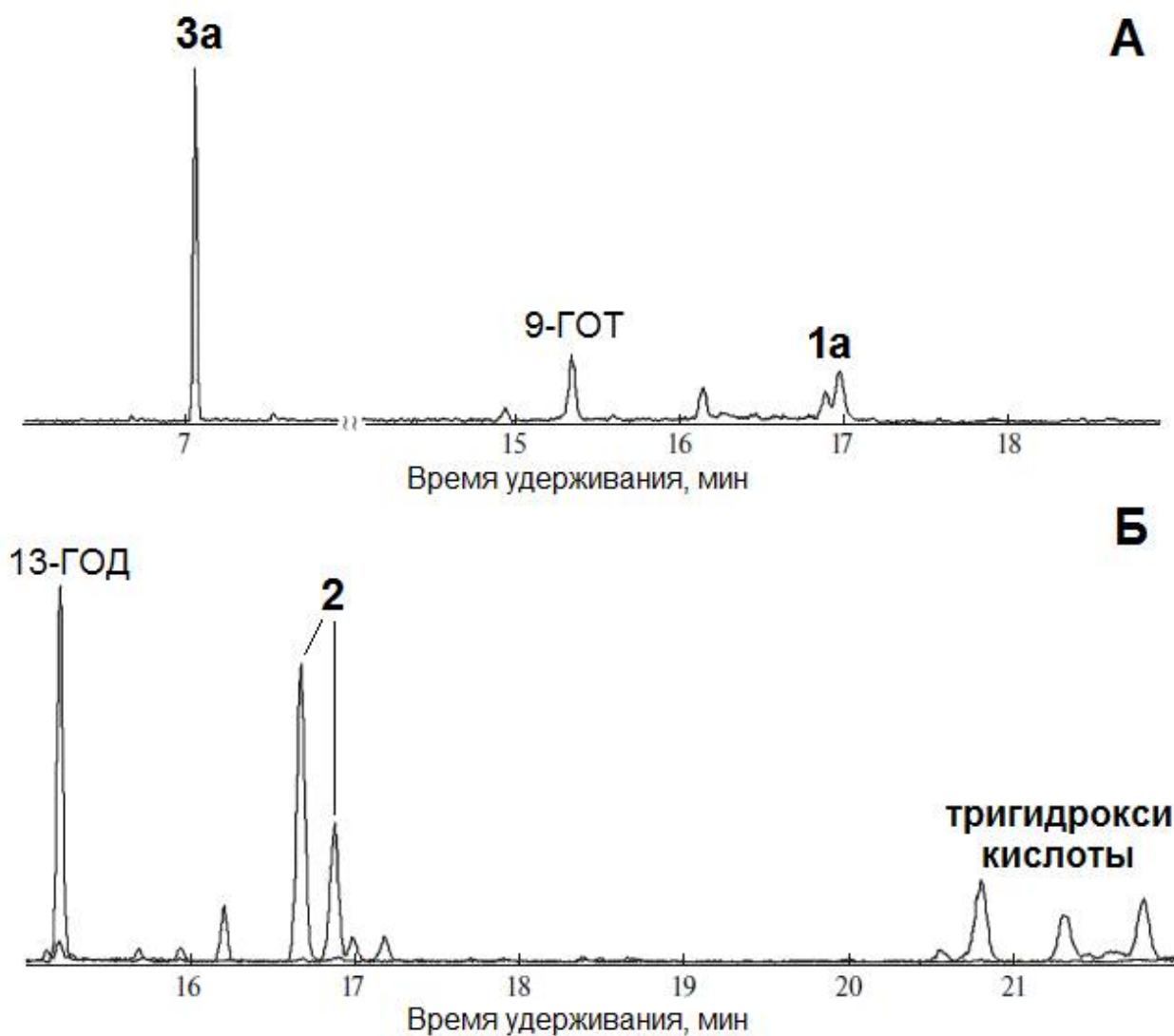


Рис. 109. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TМС после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОТ (А) и 13-ГПОД (Б) при участии фермента СУР443С1. **1а**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадецеиновая кислота; **3а**, 9-гидроксинонановая кислота. Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 50.

Таким образом, в отношении 9-ГПОТ – предпочтительного субстрата – фермент СУР443С1 проявлял основную ГПЛ и минорную ЭАС активности; в отношении остальных субстратов – в основном ЭАС активность. В целом, результаты свидетельствуют, что фермент СУР443С1 проявляет двойную активность ГПЛ/ЭАС. Ферменту СУР443С1 было присвоено тривиальное название *NvHPL/EAS* (*N. vectensis* ГПЛ/ЭАС) и гену *CYP443C1* — название *NvHPL/EAS* (Горина и др., 2019).

NvEAS является вторым ферментом клана CYP74, обнаруженным у представителей Cnidaria после ранее описанной алленоксидсинтазы ApAOS каменистого коралла *A. palmata* (Lee *et al.*, 2008). В то время как клан CYP74 Cnidaria представлен пока только двумя ферментами, у некоторых мягких кораллов, а также у цианобактерий, обнаружены белки совершенно другого типа, катализирующие аналогичные превращения гидроперекисей жирных кислот – сходные с каталазами гемопротейны, например, AOC мягких кораллов *Plexaura homomalla* (Koljak *et al.*, 1997), *Gersemia fruticosa* (Varvas *et al.*, 1999), *Capnella imbricata* (Löhela *et al.*, 2014), *Acaryochloris marina* (Gao *et al.*, 2009), а также ГПЛ каталазного типа мягкого коралла *C. imbricata* (Teder *et al.*, 2015; Mashhadi *et al.*, 2016). Все эти ферменты существуют в виде химерных белков, имеющих каталазоподобный и липоксигеназный домены. Обнаружение новых ферментов клана CYP74 усложняет картину путей биосинтеза оксипинов у представителей Cnidaria.

3.16. Получение фермента CYP440A18 ланцетника азиатского *Branchiostoma belcheri* и изучение его каталитических свойств

Ланцетники, урохордовые и позвоночные принадлежат к типу Chordata (Cameron *et al.*, 2000; Graham, 2004; Delsuc *et al.*, 2006; You *et al.*, 2019). Несмотря на отделение головохордовых от позвоночных более 520 миллионов лет назад, их морфология максимально сохранила характеристики предка позвоночных *Haikouella lanceolata* (Putnam *et al.*, 2008; Bi *et al.*, 2020). Ланцетники считаются промежуточным звеном между позвоночными и беспозвоночными. Эти организмы широко используются в качестве модельного объекта для изучения эволюции беспозвоночных и происхождения позвоночных (Bi *et al.*, 2020).

Поиск предполагаемых генов клана CYP74 в геноме *B. belcheri* выполняли с помощью программы BLAST в базе данных NCBI с использованием последовательности эпоксиалкогольсинтазы VfEAS (CYP440A1; ACD88492.1) ланцетника *B. floridae* в качестве референсной. Поиск выявил

белковую последовательность длиной 458 аминокислотных остатков (GeneBank XP019641998.1), на 71% идентичную VfEAS (при 76% покрытии). Среди зеленых растений целевой белок обладает наибольшим сходством с алленоксидсинтазами PrAOS2 (CYP74A8) *P. patens* (XP024372097.1) и LeAOS1 (CYP74A1) *S. lycopersicum* (CAB88032.1): 26,95% и 26,86% идентичности при 83% и 75% покрытии соответственно. Этой новой последовательности был присвоен номер CYP440A18. В первичной структуре фермента CYP440A18 выявлены типичные для CYP74 особенности первичной структуры: участок перегиба I-спирали (включая необходимый для каталитического действия CYP74 остаток N223), ERR-триада, PPV-домен, вставка из девяти аминокислот в гем-связывающем домене и цистеиниловый лиганд гема.

ОПС гена фермента CYP440A18 синтезировала компания Evrogen (Россия), после чего ее клонировали в векторе pET-23a. Получение рекомбинантного фермента с использованием клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS (Novagen, США) и его очистку проводили, как описано выше.

Рекомбинантный фермент CYP440A18 эффективно утилизировал 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД, 13-ГПОТ, 15-ГПЭТЕ и 15-ГПЭПЕ в качестве субстратов. Оптимальное значение pH для рекомбинантного фермента CYP440A18 было 7,0 (рис. 110).

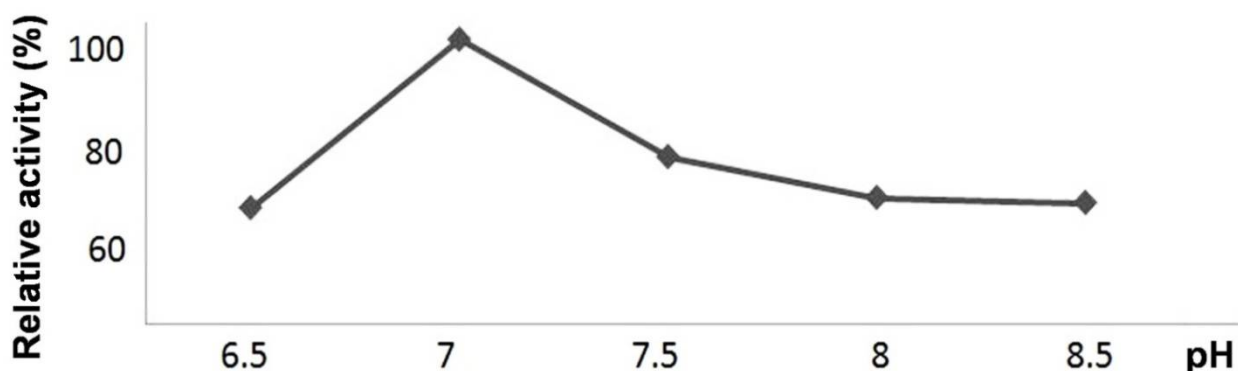


Рис. 110. Зависимость каталитической активности рекомбинантного фермента CYP440A18 в отношении 13-ГПОТ от значения pH.

Среди С18 гидроперекисей фермент СУР440А18 проявлял максимальную каталитическую активность и сродство к 13-ГПОТ (в 3-5 раз выше, чем к другим С18 гидроперекисям, таблица 20). В целом, фермент СУР440А18 обладал более высокой специфичностью к гидроперекисям ω3 жирных кислот (α-линоленовой и эйкозапентаеновой кислот), а не ω6 жирных кислот (линолевой и эйкозатетраеновой кислот).

Анализ продуктов (в виде Me эфиров или Me/ТМС после или без восстановления NaBH₄) превращения гидроперекисей при участии рекомбинантного фермента СУР440А18 проводили, как описано выше. Основными продуктами превращения гидроперекисей С18 жирных кислот были оксиранил карбинолы (рис. 111), которые образуются в результате превращения тех же субстратов при участии фермента NvEAS (описаны выше), а именно – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая (1), 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая (1a), 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая (2) и 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая (2a) кислоты (ЭАС продукты). Кроме того, были выявлены дополнительные минорные продукты превращения 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ – соответствующие α-кетолы (рис. 111): 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовая (8), 9-гидрокси-10-оксо-12,15-октадекадиеновая (9), 12-оксо-13-гидрокси-9-октадеценовая (10) и 12-оксо-13-гидрокси-9,15-октадекадиеновая (11) кислоты соответственно. Их характеристика также дана выше.

Таблица 20. Кинетические параметры реакций, катализируемых рекомбинантным ферментом СУР440А18 в отношении С18 гидроперекисей.

Субстрат	K_M , мкМ	k_{cat} , сек ⁻¹	k_{cat}/K_M , сек ⁻¹ мкМ ⁻¹	Специфичность, %
13-ГПОТ	17,6	431,8	24,5	100
13-ГПОД	18,6	174,2	9,4	38,4
9-ГПОТ	31,8	247,9	7,8	31,8
9-ГПОД	37,0	164,0	4,4	18,0

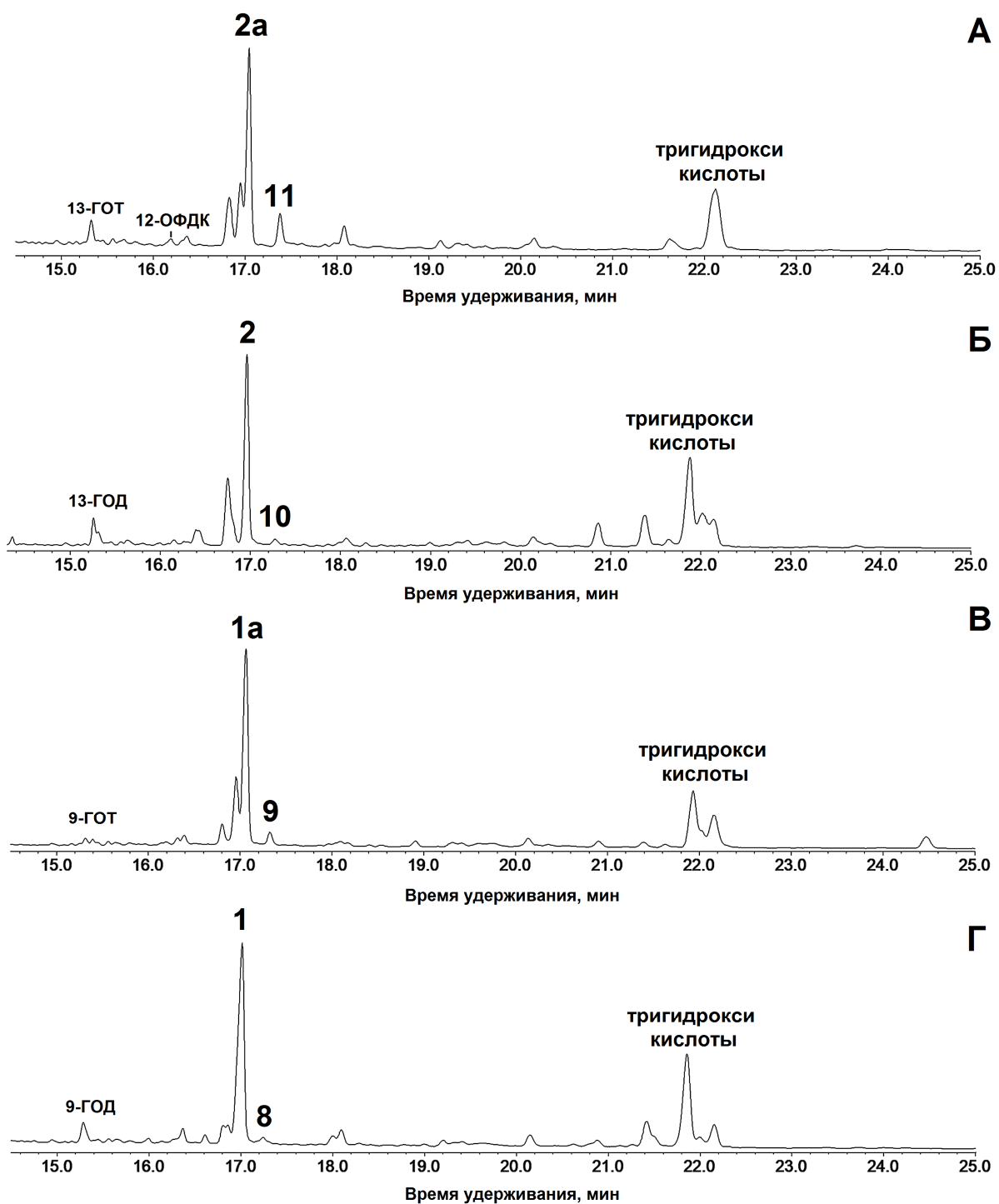


Рис. 111. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS без восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПОТ (А), 13-ГПОД (Б), 9-ГПОТ (В) и 9-ГПОД (Г) при участии фермента СУР440А18. **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; **1a**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота; **8**, 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовая кислота; **9**, 9-гидрокси-10-оксо-12,15-октадекадиеновая кислота; **10**, 12-оксо-13-гидрокси-9-октадеценовая кислота; **11**, 12-оксо-13-гидрокси-9,15-октадекадиеновая кислота. Структурные формулы продуктов представлены на рисунках 50 и 63.

Помимо гидроперекисей С18 жирных кислот, в качестве субстратов фермента СУР440А18 использовали 15-гидроперекиси эйкозопентаеновой (15-ГПЭПЕ) и эйкозатетраеновой (15-ГПЭТЕ) кислот. Структурные формулы образуемых соединений представлены на рисунке 112.

Инкубация 15-ГПЭПЕ с ферментом СУР440А18 (рис. 113А) приводила к образованию основного продукта **16**, масс-спектр которого (Ме/ТМС, рис. 113Б) содержал следующие фрагменты: M^+ при m/z 420 (0,6%), $[M - Me]^+$ при m/z 405 (0,6%), $[M - C16/C20]^+$ при m/z 309 (2%), $[M - C1/C15]^+$ при m/z 142 (29%) и $[TMS]^+$ при m/z 73 (100%). Каталитическое гидрирование продукта **16** над PtO_2 с последующими метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию насыщенного производного, масс-спектр которого соответствовал таковому 13-гидрокси-14,15-эпокси-эйкозановой кислоты (Ме/ТМС).

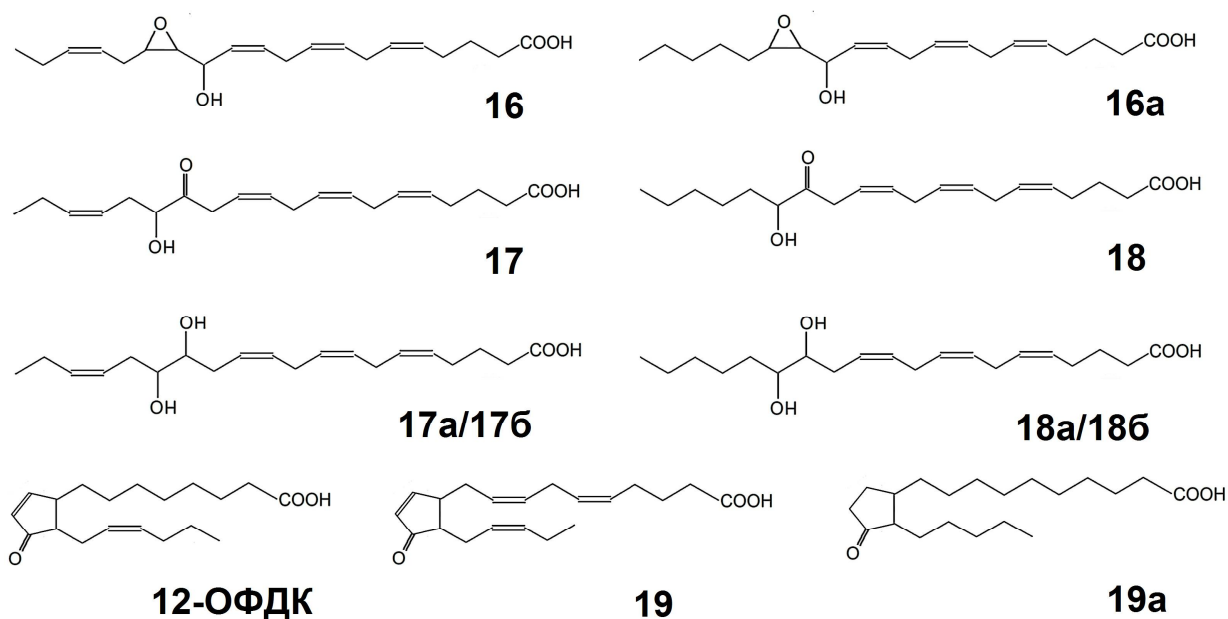


Рис. 112. Продукты превращения гидроперекисей С20 жирных кислот при участии фермента СУР440А18. **16**, 13-гидрокси-14,15-эпокси-5,8,11,17-эйкозатетраеновая кислота; **16a**, 13-гидрокси-14,15-эпокси-5,8,11-эйкозатриеновая кислота; **17**, 14-оксо-15-гидрокси-5,8,11,17-эйкозатетраеновая кислота (α -кетол); **17a/176**, *трео/эритро* 14,15-диола (14,15-дигидрокси-5,8,11,17-эйкозатетраеновая кислота); **18**, 14-оксо-15-гидрокси-5,8,11-эйкозатриеновая кислота (α -кетол); **18a/186**, *трео/эритро* 14,15-диола (14,15-дигидрокси-5,8,11-эйкозатриеновая кислота); **12-ОФДК**, *цис*-12-оксо-10,15-фитодиеновая кислота; **19**, *дигомо-цис*-12-оксо-3,6,10,15-фитотетраеновая кислота; **19a**, *дигомо*-12-оксофитоновая кислота.

В целом, масс-спектральные данные позволили идентифицировать соединение **16** как оксиранил карбинол 13-гидрокси-14,15-эпокси-5,8,11,17-эйкозатетраеновую кислоту (Me/TMS, ЭАС продукт). Минорным продуктом данного превращения являлся α -кетол **17** (рис. 113А, В) – 14-оксо-15-гидрокси-5,8,11,17-эйкозатетраеновая кислота (Me/TMS), которая в результате восстановления с помощью NaBH_4 превращалась в пару диастереомеров (*трео* и *эритро*) 14,15-диола **17а** и **17б** с одинаковыми масс-спектрами (рис. 113Г): M^+ при m/z 494 (1%), $[\text{M} - \text{Me}]^+$ при m/z 479 (1%), $[\text{M} - \text{MeOH}]^+$ при m/z 463 (1%), $[\text{M} - \text{C}_{16}/20]^+$ при m/z 425 (1,5%), $[425 - \text{TMSOH}]^+$ при m/z 335 (4%), $[\text{M} - \text{C}_{14}/\text{C}_{20}]^+$ при m/z 273 (6%), $[273 - \text{TMSOH}]^+$ при m/z 183 (18%), $[\text{M} - \text{C}_{15}/\text{C}_{20}]^+$ при m/z 171 (18%) и $[\text{TMS}]^+$ при m/z 73 (94%).

Основным продуктом превращения 15-ГПЭТЕ при участии фермента СУР440А18 (рис. 114А) было соединение **16а**, масс-спектр которого (Me/TMS, рис. 114Б) содержал M^+ при m/z 422 (0,1%), $[\text{M} - \text{Me}]^+$ при m/z 407 (0,2%), $[\text{M} - \text{C}_{14}/\text{C}_{20}]^+$ при m/z 309 (7%), $[309 - \text{TMSOH}]^+$ при m/z 219 (5%), $[219 - \text{MeOH}]^+$ при m/z 187 (15%), $[\text{M} - \text{C}_1/\text{C}_{15}]^+$ при m/z 144 (6%) и $[\text{TMS}]^+$ при m/z 73 (100%). Масс-спектр соответствовал таковому 13-гидрокси-14,15-эпокси-8,11,17-эйкозатриеновой кислоты (Me/TMS). Каталитическое гидрирование соединения **16а** над PtO_2 с последующими метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию насыщенного аналога 13-гидрокси-14,15-эпокси-эйкозановой кислоты (Me/TMS), описанной выше, что подтвердило идентификацию соединения **16а**. Минорным продуктом этой реакции был α -кетол **18** (рис. 114 А,В) – 14-оксо-15-гидрокси-5,8,11-эйкозатриеновая кислота (Me/TMS), которая в результате восстановления с помощью NaBH_4 превращалась в пару диастереомеров (*трео* и *эритро*) 14,15-диола (14,15-дигидрокси-5,8,11-эйкозатриеновой кислоты, Me/TMS) **18а** и **18б** с одинаковыми масс-спектрами (рис. 114Г).

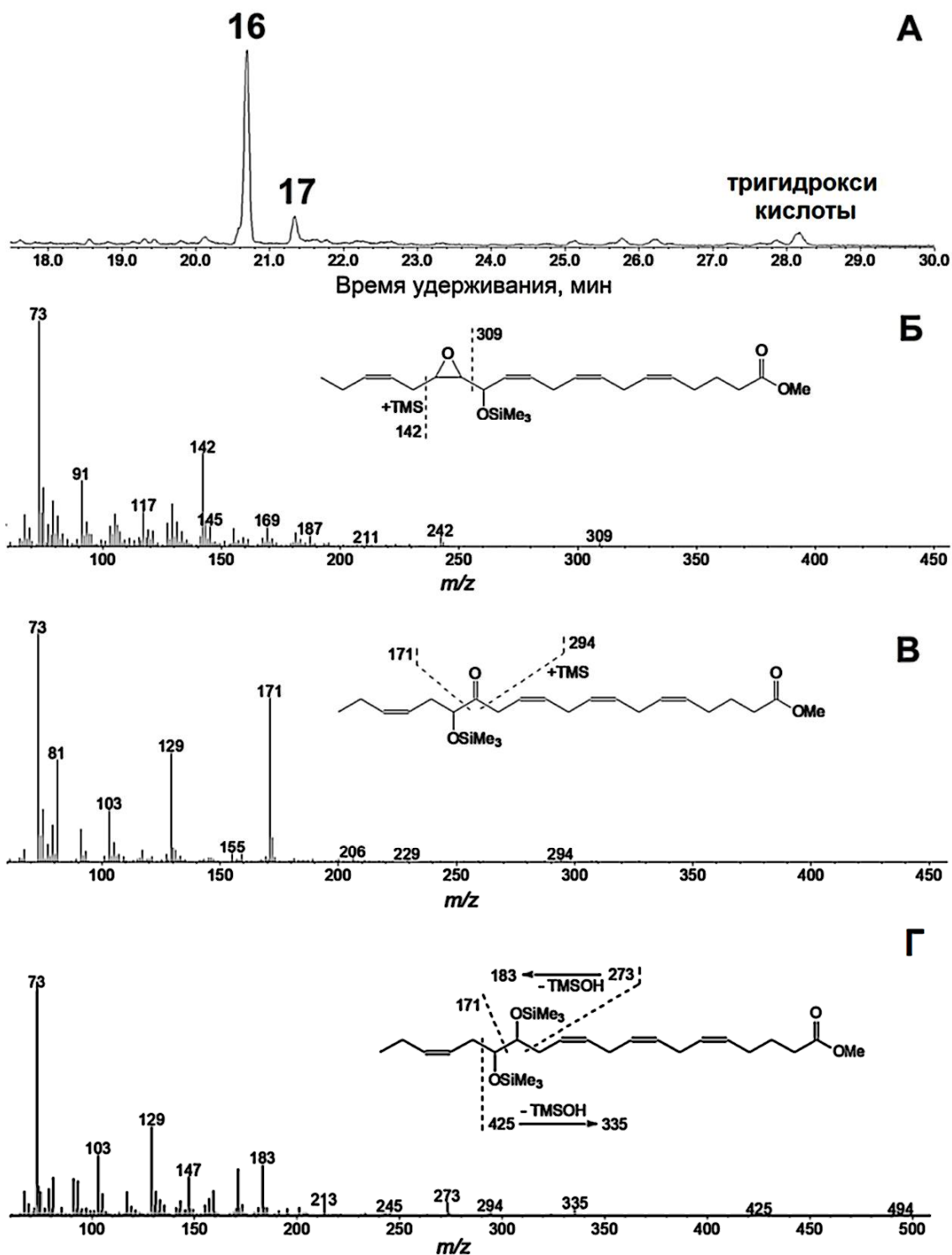


Рис. 113. Результат ГХ-МС анализа продуктов инкубации (Me/TMS без восстановления NaBH_4) фермента СУР440А18 с 15-ГПЭПЕ. А, Хроматограмма (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS без восстановления NaBH_4) превращения 15-ГПЭПЕ при участии фермента СУР440А18: **16**, 13-гидрокси-14,15-эпокси-5,8,11,17-эйкозатетраеновая кислота; **17**, 14-оксо-15-гидрокси-5,8,11,17-эйкозатетраеновая кислота (α -кетол); **19**, дигомо-*цис*-12-оксо-3,6,10,15-фитотетраеновая кислота; **19а**, дигомо-12-оксофитоновая кислота. Масс-спектры и схемы фрагментации соединений **16** (Б), **17** (В) и **17а** (Г). Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 112.

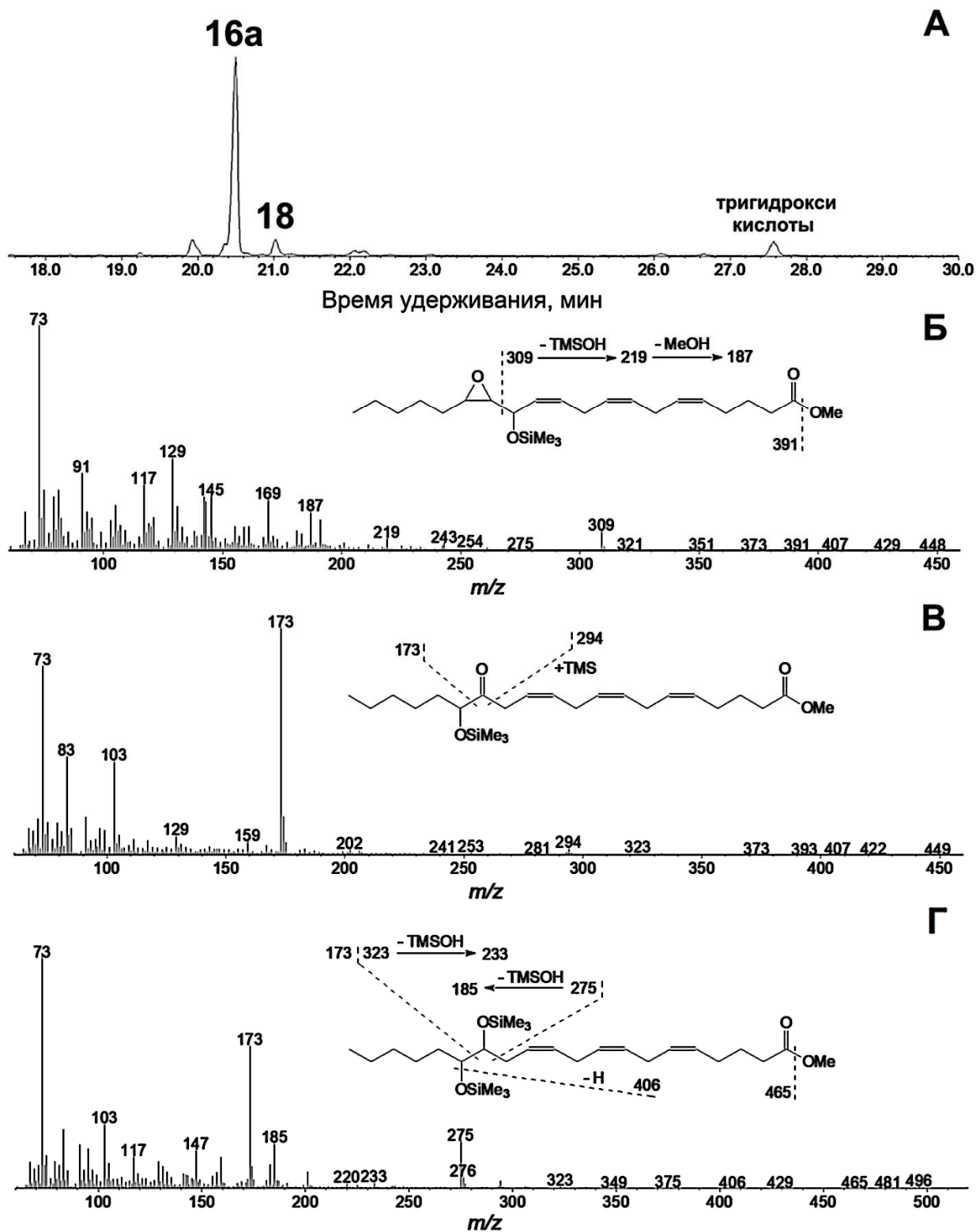


Рис. 114. Результат ГХ-МС анализа продуктов инкубации (Me/TMS без восстановления NaBH_4) фермента CYP440A18 с 15-ГПЭТЕ. А, Хроматограмма (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS без восстановления NaBH_4) превращения 15-ГПЭТЕ при участии фермента CYP440A18: **16a**, 13-гидрокси-14,15-эпокси-5,8,11-эйкозатриеновая кислота; **18**, 14-оксо-15-гидрокси-5,8,11-эйкозатриеновая кислота (α -кетол). Масс-спектры и схемы фрагментации соединений **16a** (Б), **18** (В) и **18a** (Г). Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 112.

Масс-спектр соединения **18a** (Me/TMS, рис. 114Г) содержал M^+ при m/z 496 (0,4%), $[M - Me]^+$ при m/z 481 (0,3%), $[M - MeO]^+$ при m/z 465 (0,4%), $[M - TMSOH]^+$ при m/z 406 (0,5%), $[M - C_{15}/C_{20}]^+$ при m/z 323 (1,4%), $[M - C_{14}/C_{20}]^+$ при m/z 275 (20%), $[323 - TMSOH]^+$ при m/z 233 (3%), $[275 - TMSOH]^+$ при m/z 185 (20%), $[M - C_1/C_{14}]^+$ при m/z 173 (61%) и $[TMS]^+$ при m/z 73 (100%).

Помимо α -кетолов, алленоксидсинтазная активность фермента CYP440A18 в отношении 13-ГПОТ и 15-ГПЭПЕ приводила также к образованию *цис*-циклопентенонов. В случае превращения 13-ГПОТ образовывалось соединение **19**, масс-спектр которого (Me, рис. 115) содержал следующие фрагменты: M^+ при m/z 306 (7%), $[M - MeO]^+$ при m/z 275 (12%), $[M - Et - MeOH]^+$ при m/z 245 (13%), $[M - C_{14}/C_{18} + H]^+$ при m/z 238 (35%), $[238 - MeOH]^+$ при m/z 206 (11%), $[M - C_1/C_6]^+$ при m/z 177 (18%), $[M - C_1/C_7]^+$ при m/z 163 (36%), $[M - C_1/C_8]^+$ при m/z 149 (31%), m/z 135 (26%), m/z 121 (39%), m/z 107 (74%), m/z 96 (99%) и m/z 95 (100%). Масс-спектр соответствовал таковому циклопентенона *цис*-12-оксо-10,15-фитодиеновой кислоты (12-ОФДК), которая является продуктом циклизации окиси аллена – первичного продукта АОС активности (Hamberg, 1998).

В случае превращения 15-ГПЭПЕ образовывался циклопентенон **20**, масс-спектр которого (Me, рис. 115) содержал M^+ при m/z 330 (0,2%), $[M - Et]^+$ при m/z 301 (2%), $[M - MeO]^+$ при m/z 299 (1%), $[301 - MeO]^+$ при m/z 270 (2%), $[301 - MeOH]^+$ при m/z 269 (2%), $[M - C_{16}/C_{20} + H]^+$ при m/z 262 (2%), $[262 - MeOH]^+$ при m/z 230 (4%), m/z 203 (7%), $[M - C_{11}/C_{20}]^+$ при m/z 181 (15%), $[M - C_1/C_{10} + H]^+$ при m/z 150 (45%), $[M - C_1/C_{10}]^+$ при m/z 149 (30%), m/z 121 (51%), m/z 107 (48%), m/z 91 (53%) и m/z 82 (100%).

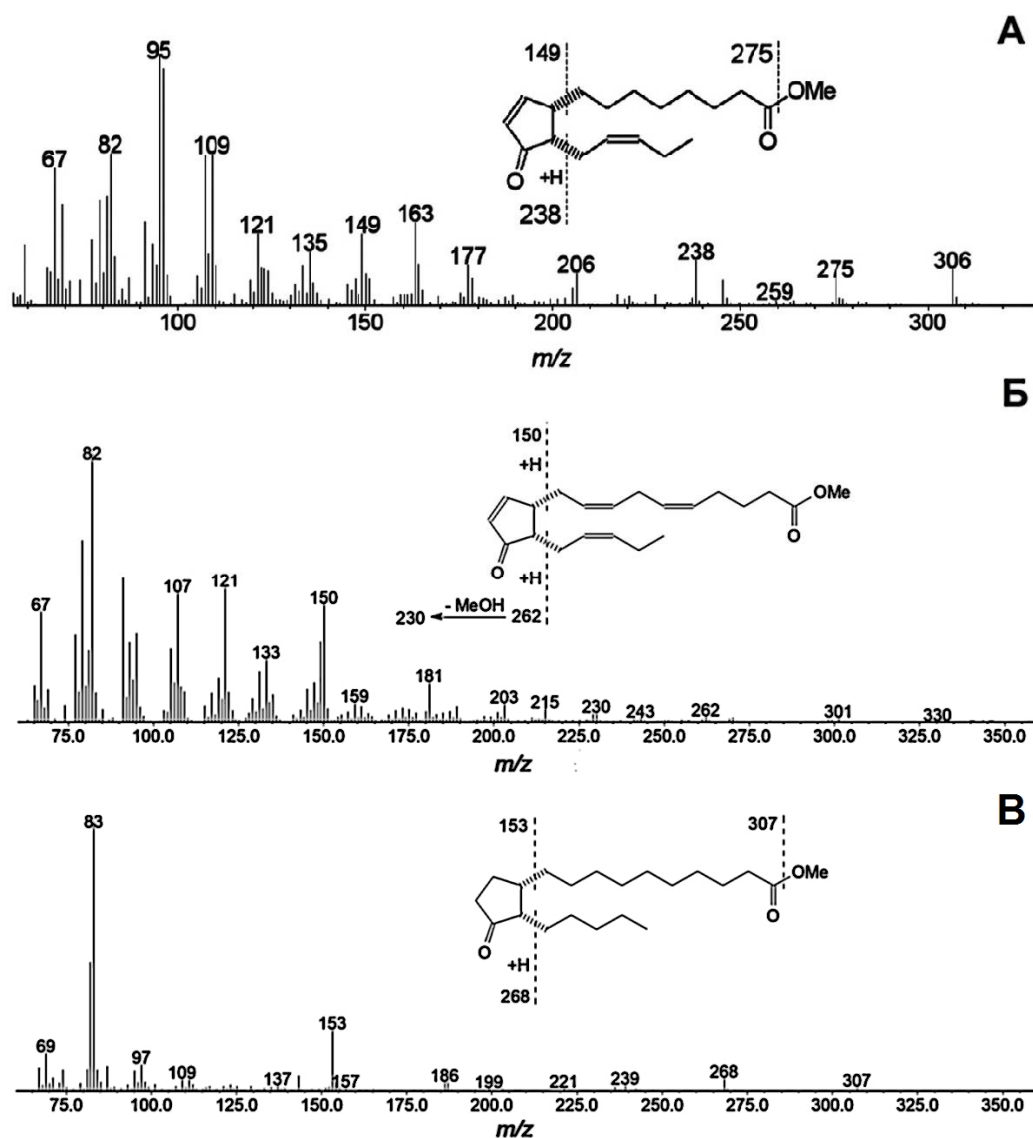


Рис. 115. Масс-спектры и схемы фрагментации соединений **19** (А), **20** (Б) и **20а** (В). Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 112.

До настоящей работы спектральные данные для соединения **20** не были опубликованы, за исключением частичных МС данных, опубликованных в работе (Ziegler *et al.*, 1999). Для подтверждения идентификации мы гидрировали соединение **20** над PtO₂. Масс-спектр гидрированного продукта **20а** (Ме, рис. 115) содержал следующие фрагменты: М⁺ при m/z 338 (0,04%), [М – MeO]⁺ при m/z 307 (2%), [М – C₁₆/C₂₀ + H]⁺ при m/z 268 (6%), [268 – MeOH]⁺ при m/z 236 (2%), m/z 187 (3%), m/z 187 (4%), [М – C₁/C₁₀]⁺ при m/z 153 (25%), m/z 143 (4%) и m/z 83 (100%), что подтвердило идентификацию гидрированного продукта **20а** как насыщенного циклопентанона дигомо-12-

оксофитоновой кислоты и исходного продукта **20** как дигомо-*цис*-12-оксо-3,6,10,15-фитотетраеновой кислоты.

Соотношения различных продуктов каталитического действия фермента СУР440А18 представлены в таблице 21. Количественную оценку продуктов проводили интегрированием площадей пиков в хроматограммах по полному ионному току.

Описанные результаты указывают на двойную активность эпоксиалкогольсинтазы иалленоксидсинтазы (ЭАС/АОС) рекомбинантного фермента СУР440А18 *B. belcheri*. Таким образом, ферменту было дано название BbEAS/AOS. Основными продуктами каталитического действия BbEAS/AOS были оксиранил карбинолы, такие же как у ферментов VfEAS (СУР440А1) ланцетника *B. floridae*, а также NvEAS (СУР443D1) и NvHPL/EAS (СУР443С1) *N. vectensis*. Однако в отличие от этих ферментов, BbEAS/AOS также проявляет алленоксидсинтазную активность, продуцируя α -кетолы. В частности, гидроперекиси ω 3 жирных кислот (13-ГПОТ и 15-ГПЭПЕ) давали более высокий выход АОС продуктов, чем остальные гидроперекиси. Кроме того, превращения 13-ГПОТ и 15-ГПЭПЕ приводили к образованию не только α -кетолов в качестве АОС продуктов, но и соответствующих циклопентенонов, *цис*-12-оксо-10,15-фитодиеновой и дигомо-*цис*-12-оксо-3,6,10,15-фитотетраеновой кислот.

Таблица 21. Соотношения различных продуктов каталитического действия фермента СУР440А18.

Субстрат	α -кетол, %	циклопентенон, %	оксиранил карбинол, %
15-НРЕРЕ (ω 3)	17,1	следовое количество	82,9
15-НРЕТЕ (ω 6)	6,3	не выявлено	93,7
13-ГПОТ (ω 3)	17,4	3,7	78,9
13-ГПОД (ω 6)	2,3	не выявлено	97,7
9-ГПОТ (ω 3)	5,2	не выявлено	94,8
9-ГПОД (ω 6)	3,4	не выявлено	96,6

Циклизация окисей аллена (первичных продуктов АОС) до циклопентенонов зависит от двойной связи в β,γ -положении по отношению к оксирану (Grechkin, 1994; González-Pérez *et al.*, 2017). Другими словами, эта двойная связь β,γ ($\omega 3$ двойная связь в окисях аллена, образованных из 13-ГПОТ и 15-ГПЭПЕ) демонстрирует эффект участия соседней группы (анхимерное содействие), повышая скорость циклизации (Grechkin, 1994; González-Pérez *et al.*, 2017). Недавнее моделирование методом DFT (density functional theory, теория функционала плотности) показало, что раскрытие оксирана при этом анхимерном содействии является лимитирующей стадией всего превращения окиси аллена в циклопентенон (González-Pérez *et al.*, 2017). Аналогичным образом, более высокий выход АОС продуктов в результате инкубации VbEAS/AOS с 13-ГПОТ и 15-ГПЭПЕ (по сравнению с 13-ГПОД и 15-ГПЭТЕ) предполагает влияние $\omega 3$ двойной связи на превращение эпоксиаллильной группы в радикальный интермедиат. Наличие $\omega 3$ двойной связи, вероятно, способствует отщеплению водорода в оксиране с образованием окиси аллена. Точно так же фермент CYP74B16 дегидратирует 13-ГПОТ преимущественно до дивинилового эфира ($\omega 5Z$)-этероленовой кислоты, тогда как 13-ГПОД в значительной степени изомеризуется до полуацеталя (ГПЛ продукт). Эти наблюдения показывают, что $\omega 3$ двойная связь влияет на специфичность образования продукта ферментами клана CYP74.

VbEAS/AOS – второй член клана CYP74, обнаруженный у Chordata, после VfEAS (CYP440A1) ланцетника *B. floridae* (Lee *et al.*, 2008). В то же время это первый фермент Chordata, проявляющий АОС активность. В целом, это второй фермент клана CYP74 у Metazoa, обладающий АОС активностью, после ранее описанной алленоксидсинтазы ApAOS каменистого коралла *A. palmata* (Lee *et al.*, 2008).

3.17. Филогенетические исследования ферментов CYP74

Согласно имеющимся данным литературы, подсемейства CYP74 включают следующие типы ферментов: подсемейство CYP74A и CYP74B – 13-

специфичные АОС и ГПЛ соответственно, подсемейство CYP74C – 9- и 9/13-специфичные АОС и ГПЛ, подсемейство CYP74D – 9-специфичные ДЭС. Кроме того, до настоящей работы были охарактеризованы отдельные представители других подсемейств, такие как дивинилэфирсинтаза AsDES (CYP74H1) чеснока, алленоксидсинтаза SmAOS2 (CYP74K3) плаунка *S. moellendorffii*, гидропероксидлиазы PpHPL (CYP74G1) мха *P. patens*, ZmHPL (CYP74F2) кукурузы, HvHPL (CYP74F3) ячменя, OsHPL1 (CYP74E1) и OsHPL2 (CYP74E2) риса (Kuroda *et al.*, 2005; Stumpe *et al.*, 2006, 2008; Pratiwi *et al.*, 2017). Результаты настоящей работы расширяют список охарактеризованных биохимически ферментов CYP74 и усложняют действующую классификацию. 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. Кроме того, показано, что ферменты подсемейства CYP74C, ранее охарактеризованные как 9/13-специфичные ГПЛ, являются ферментами с двойной ГПЛ/ЭАС активностью. Помимо этого, выявлены и охарактеризованы представители новых подсемейств CYP74: CYP74M и CYP74Q, а также ферменты, входящие в состав клана, но не семейства CYP74: эпоксиалкогольсинтазы EsEAS (CYP5164B1) бурой водоросли *E. siliculosus* и NvEAS (CYP443D1) роющей литоральной актинии *N. vectensis*, а также фермент с двойной ГПЛ/ЭАС активностью NvHPL/EAS (CYP443C1) *N. vectensis* и фермент с двойной ЭАС/АОС активностью VbEAS/AOS (CYP440A18) *B. belcheri*. На рисунке 116 изображено филогенетическое древо, позволяющее оценить распределение ЭАС и ферментов, проявляющих ЭАС активность, в семействе и клане CYP74.

GI:7677376; LeAOS3, CYP74C3, GI:25991603; LeHPL, CYP74B3, GI:7677378; LeDES, CYP74D1, GI:11991245; Lj, *L. japonicus*; LjHPL, CYP74B15, SI:BAJ78217.1; Lu, *L. usitatissimum*; LuAOS, CYP74A1, GI:1352186; CYP74B16, GI:379048766; Mp, *M. polymorpha*; MpAOS1, SI:LC032457.1, MpAOS2, SI:LC032458.1; Ms, *M. sativa*; MsHPL, CYP74B4V1; SI: AJ249245.1; Mt, *M. truncatula*; MtHPL3, CYP74B4, GI:63081244; MtHPL1/EAS, CYP74C13_MT, GI:33504430; Nt, *N. tabacum*; NtDES, CYP74D3; GI: 107799697; NtHPL, CYP74C43; Os, *O. sativa*; OsAOS, CYP74A4, GI:115455571; OsHPL1, CYP74E2, GI:115445057; OsHPL2, CYP74E1, GI:125538638; Pa, *P. argentatum*; PaAOS, CYP74A1, GI:218511958; Pd, *P. dulcis*; PdHPL, CYP74C5, GI:33300600; Pg, *P. guajava*; PgHPL, CYP74B5, GI:13183137; Pp, *P. patens*; PpAOS1, CYP74A1, GI:22217985; PpAOS2, CYP74A8, GI:168014176; PpHPL, CYP74G1, GI:76057841; Ra, *R. acris*; RaDES, CYP74Q1, GI:768564485; Rj, *R. japonicus*; RjEAS, CYP74A88, SI:MK061531; Sm, *S. moellendorffii*; SmDES1, CYP74M1, GI:9660714; SmEAS, CYP74M2, GI: 9637471 SmDES2, CYP74M3, GI:9654395; St, *S. tuberosum*; StAOS2, CYP74A6, GI:86769479; StAOS3, CYP74C10, GI:56605358; StHPL/EAS, CYP74C4, GI:102588560; StDES, CYP74D2, GI:12667099; StHPL, CYP74B3, GI:102577863; Vv, *V. vinifera*; VvHPL, CYP74B13, FJ861082; Zm, *Z. mays*; ZmAOS, CYP74A19, GI: 223947589; ZmHPL, CYP74F2, GI:162462890.

Члены клана CYP74: Es, *E. siliculosus* (бурые водоросли); EsEAS, CYP5164B1, GI:1109557544; Mn, *M. nodulans* (протеобактерии); MnHPL, SI:WP_015932840.1; Msp, *Methylobacterium* sp. 4–46; MspCYP74, SI:WP_012335549.1. Ap, *A. palmata* (животные); ApAOS, GI:187948710; Bb, *B. belcheri* (животные); BbEAS/AOS, CYP440A18; Bf, *B. floridae* (животные); BfEAS, CYP440A1, GI:189312561; Nv, *N. vectensis* (животные); CYP443D1, GI:5516222; NvHPL/EAS CYP443C1. Красным цветом отмечены охарактеризованные в данной работе ферменты; полужирным шрифтом – ферменты, проявляющие эпоксиалкогольсинтазную активность.

Поскольку последовательности ЭАС и ферментов, проявляющих ЭАС активность, равномерно распределены по древу и сильно различаются, очевидно, что все они либо являются древней группой ферментов, либо имеют независимое друг от друга происхождение и, по-видимому, являются примером конвергентной эволюции.

Результаты настоящей работы свидетельствуют, что многие ферменты семейства CYP74 продуцируют эпокиспирты наряду с другими продуктами. При этом относительный выход эпокиспиртов зависит от субстрата. Так, в настоящей работе показано, что у ферментов подсемейства CYP74C ЭАС активность выше при использовании 9-гидроперекисей жирных кислот, в то время как в отношении 13-гидроперекисей выше ГПЛ активность. Один из изученных ферментов, фермент CYP74C31, обладал дополнительной АОС активностью в отношении 9-ГПОД. Родственный фермент CYP74C1_CS также продуцировал некоторое количество α -кетола (АОС продукт) при инкубации с 9-ГПОД и 13-ГПОД. При этом оба фермента филогенетически удалены от истинных АОС подсемейства CYP74C, таких как LeAOS3 (CYP74C3) томата (рис. 116).

Обнаружение ферментов с двойной ГПЛ/ЭАС активностью объяснило образование эпокиспиртов в тканях огурца, которые мы наблюдали ранее. После обнаружения первых подобных ферментов мы не были уверены, что продукция эпокиспиртов не является уникальным свойством ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31. Чтобы исключить сомнения, мы расширили список исследуемых представителей подсемейства CYP74C до семи ферментов, ранее описанных или аннотированных как ГПЛ. Все изученные ферменты CYP74C продуцируют эпокиспирты в значительном количестве. Таким образом, ЭАС активность является неотъемлемым свойством этих ферментов. В целом, ЭАС активность (минорная либо сопоставимая с основной) выявлена у всех изученных ГПЛ и у некоторых АОС и ДЭС. Кроме того, выявлены две истинные ЭАС внутри семейства CYP74 (*SmEAS* (CYP74M2) *S. moellendorffii* и *RjEAS* (CYP74A88) лютика японского), а также две истинные

ЭАС, входящие в состав клана, но не семейства CYP74 (EsEAS (CYP5164B1) *E. siliculosus* и NvEAS (CYP443D1) *N. vectensis*). 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, *эритро/транс* (*9S,10S,11S*)-эпимер эпокиспирта с *транс*-эпоксидом, тогда как ферменты животных, включая охарактеризованную ранее VfEAS (CYP440A1) ланцетника, – (*S,R,S*)-стереоизомеры с *цис*-эпоксидом и *трео*-конфигурацией между эпоксидом и спиртовой группировкой. Обнаружение CYP74-подобных ЭАС у бурых водорослей и животных поднимает новые вопросы о происхождении генов клана CYP74. Заполнение существующих пробелов в геномных данных необходимо для лучшего понимания взаимосвязи между ферментами CYP74 представителей разных таксонов.

Описаны два различных пути биосинтеза эпокиспиртов из гидроперекисей жирных кислот. Один из них происходит за счет эпоксидирования двойной связи атомом кислорода из гидроперекиси жирной кислоты. Такие превращения катализируются пероксигеназами (Blée, Schuber, 1990; Hamberg, Hamberg, 1996; Blée *et al.*, 2012) и другими, менее изученными растительными ферментами, такими как один из ферментов свеклы (Hamberg, Olsson, 2011). Второй путь включает гомолитическое расщепление гидроперекисной связи O–O, атаку алкоксирадикала на α -ненасыщенную связь и образование эпоксиаллильного радикала, который затем подвергается рекомбинации с гидроксильным радикалом, что приводит к образованию оксиранил карбинола. Эта перегруппировка происходит неферментативно в присутствии кислот (Gardner *et al.*, 1984а,б), металлов с переходной валентностью (Gardner *et al.*, 1974; Gardner, 1975; Gardner, Crawford, 1981; Gardner, Kleiman, 1981; Dix, Marnett, 1983, 1985), гемовых белков (Gardner, 1989) и при нагревании (Hamberg, Gotthammar, 1973). Кроме того, ранее были описаны липоксигеназы (Yu *et al.*, 2003) и некоторые АОС (Song *et al.*, 1993; Hughes *et al.*,

2008), в том числе неклассические АОС грибов (Hoffmann, Oliw, 2013; Hoffmann *et al.*, 2013), продуцирующие эпокиспирты в качестве минорных побочных продуктов. Помимо этого, наблюдалось образование эпокиспиртов из гидроперекисей в присутствии монооксигеназ (Chang *et al.*, 1996), однако с низким выходом и небольшой скоростью. Эту же реакцию катализируют выявленные и изученные в ходе выполнения данной работы ферменты семейства и клана СУР74. От описанных выше путей образования эпокиспиртов их отличает высокая скорость превращения субстрата, типичная для всех ферментов СУР74.

Результаты экспериментов с использованием меченого ^{18}O свидетельствуют, что ЭАС представляют собой изомеразы. Механизм эпоксиалкогольсинтазной реакции включает следующие стадии: (1) гомолиз гидроперекисной группировки; (2) перегруппировка образовавшегося оксирадикала в эпоксиаллильный радикал; (3) рекомбинация эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, приводящая к образованию эпокиспирта. Эксперименты с использованием ^{18}O необходимы для понимания молекулярных механизмов превращения гидроперекисей жирных кислот. Еще одним типом ферментов СУР74, помимо ЭАС, катализирующим изомеризацию гидроперекисей жирных кислот, является ГПЛ – фермент, широко распространенный у высших растений (Grechkin, 1998). Показано, что в полуацеталь, короткоживущий первичный продукт ГПЛ, включаются оба атома ^{18}O из $^{18}\text{O}_2$ -гидроперекиси (Grechkin, Hamberg, 2004; Grechkin *et al.*, 2006; Mukhtarova *et al.*, 2018). Еще два фермента СУР74, а именно – АОС и ДЭС, являются дегидразами (Grechkin, 1998; Brash, 2009). В отличие от ЭАС и ГПЛ, судьбу кислорода в АОС и ДЭС реакциях проследить невозможно.

Таким образом, в ходе настоящей работы были выявлены представители нового, практически неизученного типа ферментов – эпоксиалкогольсинтаз, единственный представитель которого – эпоксиалкогольсинтаза VfEAS (СУР440A1) ланцетника *B. floridae* – был описан в 2008 году (Lee *et al.*, 2008). Несмотря на обнаружение эпокиспиртов – продуктов эпоксиалко-

гольсинтазной активности – у растений разных видов, до сих пор не было описано ни одного растительного фермента, проявляющего эпоксиалкогольсинтазную активность. Кроме того, было обнаружено, что некоторые ферменты CYP74, описанные ранее как алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы и дивинилэфирсинтазы, проявляют также эпоксиалкогольсинтазную активность. Эпоксиалкогольсинтазы и ферменты, проявляющие эпоксиалкогольсинтазную активность наряду с другими активностями, были выявлены у растений, животных и бурых водорослей. Однако продукты, образующиеся при участии ферментов представителей разных таксонов, отличаются по стереохимии. Кроме того, присутствие эпоксиалкогольсинтаз во всех трех таксонах свидетельствует о появлении этих ферментов до разделения животных, растений и бурых водорослей. Возможно, в других таксонах выявить их только предстоит.

Помимо ЭАС, а также ферментов с ЭАС активностью, в настоящей работе выявлены и описаны 13-специфичные ДЭС и фермент с двойной ДЭС/ГПЛ активностью льна-долгунца. В отличие от АОС и ГПЛ, гены которых обнаружены у всех описанных к настоящему времени цветковых растений, ДЭС, как и ЭАС, имеют значительно меньшее распространение и встречаются у филогенетически отдаленных видов. До настоящей работы были охарактеризованы четыре 9-специфичных ДЭС подсемейства CYP74D растений семейства Solanaceae (LeDES (CYP74D1) томата (Itoh, Howe, 2001), StDES (CYP74D2) картофеля (Stumpe *et al.*, 2001), NtDES (CYP74D3) табака (Fammartino *et al.*, 2007) и CaDES (CYP74D4) перца (Gullner *et al.*, 2010)), а также 9/13-специфичная AsDES (CYP74H1) чеснока (*A. sativum*, Stumpe *et al.*, 2008). Было показано, что все указанные ферменты продуцируют только дивиниловые эфиры: ДЭС растений семейства Solanaceae – колнелевую и колнеленовую кислоты, AsDES – этеролевою и этероленовую либо колнелевую и колнеленовую кислоты. В настоящей работе представлены данные, что как минимум две ДЭС подсемейства CYP74D катализируют образование также минорного количества ГПЛ и ЭАС продуктов при превращении предпочти-

тельных субстратов – 9-гидроперекисей линолевой и α -линоленовой кислот. В отношении менее предпочтительного субстрата – 13-ГПОД – эти ферменты проявляли ЭАС активность.

Описанный в настоящей работе фермент CYP74B16 льна-долгунца вел себя преимущественно как 13-специфичная ДЭС в отношении предпочтительного субстрата (13-ГПОТ) с дополнительными минорными ГПЛ и ЭАС активностями. Однако в результате превращения 13-ГПОД при участии фермента CYP74B16 дивиниловых эфиров образовывалось менее 20% от общего количества продуктов. Основными продуктами этой реакции были (9Z)-12-оксо-9-додеценовая и (10E)-12-оксо-10-додеценовая кислоты – ГПЛ продукты. В то же время, (ω 5Z)-этероленовая кислота является преобладающим эндогенным дивиниловым эфиром в листьях льна (Chechetkin *et al.*, 2008). Поэтому, по-видимому, превращение 13-ГПОТ в (ω 5Z)-этероленовую кислоту является основной нативной функцией фермента CYP74B16. В отношении 9-гидроперекисей фермент CYP74B16 проявляет гораздо меньшую активность, продуцируя в основном эпокиспирты. Фермент CYP74B16 является первым ферментом, проявляющим ДЭС активность, в подсемействе CYP74B. Практически все остальные известные члены этого подсемейства являются 13-специфичными ГПЛ, за исключением 9-специфичной алленоксидсинтазы DcAOS (CYP74B33) моркови, которая также описана в настоящей работе.

Помимо фермента CYP74B16, в настоящей работе описаны специфичные 13-ДЭС – RaDES (CYP74Q1) лютика едкого, а также SmDES1 (CYP74M1) и SmDES2 (CYP74M3) плаунка *S. moellendorffii*. Виды семейства Ranunculaceae, а также плаунок *S. moellendorffii* филогенетически удалены от других растений, у которых описаны ДЭС. Хотя ДЭС были обнаружены в тканях некоторых видов семейства Ranunculaceae достаточно давно (Hamberg, 1998, 2002, 2004), ни гены, ни ферменты до сих пор не были выделены либо описаны. В плаунках так же ранее было описано образование дивиниловых эфиров без выявления и характеристики соответствующих ферментов (Ogorodnikova *et al.*, 2015б).

Выявление 13-специфичных ДЭС расширяет наши представления о ДЭС в целом. Гены 9-специфичных ДЭС подсемейства CYP74D, так же как ген *AsDES* чеснока, экспрессируются в незеленых органах растений (Grechkin *et al.*, 1995). Напротив, гены 13-специфичных ДЭС экспрессируются в побегах. Кроме того, ферменты отличаются субстратной специфичностью. Несмотря на сходство свойств, ферменты CYP74B16, RaDES (CYP74Q1), SmDES1 (CYP74M1) и SmDES2 (CYP74M3) филогенетически удалены друг от друга (рис. 116). Их последовательности обладают небольшой идентичностью. RaDES на 52% идентична с SmHPL (CYP74C2), на 51% – с предполагаемой АОС (CYP74C9) *P. integrifolia* subsp. *inflata*, на 49% – с LeDES (CYP74D1) и на 49% – с HbAOS (CYP74A9). Таким образом, RaDES почти одинаково удалена от подсемейств CYP74C, CYP74D и CYP74A. Кроме того, 13-специфичные ДЭС различаются образуемыми продуктами. RaDES (CYP74Q1) и фермент CYP74B16 продуцируют (ω 5Z)-этероленовую и (ω 5Z)-этеролевою кислоты. В то же время, SmDES1 и SmDES2 продуцируют эти изомеры в минорных количествах. SmDES2 продуцирует в основном этероленовую и этеролевою кислоты, тогда как SmDES1 – это первая изученная рекомбинантная ДЭС, специфически образующая (11Z)-изомеры этероленовой и этеролеовой кислот. Еще один вид, у которого обнаружена (ω 5Z)-этероленовая кислота и другие подобные дивиниловые эфиры – это бурая водоросль *L. sinclairii* (Proteau, Gerwick, 1993). Однако ДЭС *L. sinclairii* не были выявлены и охарактеризованы.

Эволюция растений создала большое разнообразие различных типов ДЭС. Впервые ДЭС была обнаружена в экспериментах *in vitro* с клубнями картофеля (Galliard, Phillips, 1972). Известные ДЭС входят в подсемейства CYP74B (CYP74B16), CYP74D (ДЭС растений семейства Solanaceae), CYP74H (*AsDES*, CYP74H1), CYP74M (SmDES1, CYP74M1 и SmDES2, CYP74M3) и CYP74Q (RaDES, CYP74Q1). ДЭС были также обнаружены в корнях ландыша (Ogorodnikova *et al.*, 2008), некоторых видах семейств Asparagales (Ogorodnikova *et al.*, 2013) и Ranunculaceae (Hamberg, 1998, 2002,

2004). Кроме того, дивиниловые эфиры обнаружены у бурых (Proteau, Gerwick, 1993) и красных (Jiang, Gerwick, 1997) водорослей. При этом каждый отдельный тип ДЭС, по-видимому, произошел в результате дубликации генов и независимой эволюции. Например, фермент CYP74B16, хотя и принадлежит к подсемейству CYP74B, имеет только ок. 70% идентичности с LuHPL (Lus10030029, CYP74B). Эти два гена льна, очевидно, произошли в результате дубликации и дивергенции. Качественные изменения катализа CYP74 могут происходить в результате точечных мутаций, реконструировать которые можно с помощью сайт-направленного мутагенеза.

3.18. Анализ взаимосвязи структуры и каталитических свойств ферментов CYP74 с помощью сайт-направленного мутагенеза

Выравнивание аминокислотных последовательностей охарактеризованных биохимически ферментов семейства CYP74 позволило предположить корреляцию между аминокислотными остатками в отдельных сайтах (в основном субстрат-распознающих сайтах, CPC (Gotog, 1992)) и типом катализируемой реакции. Для поиска первичных детерминант, определяющих тип катализа CYP74, в первую очередь эпоксиалкогольсинтазной активности, был выбран метод сайт-направленного мутагенеза. Результаты экспериментов по сайт-направленному мутагенезу описаны в последующих главах.

В результате выравнивания последовательностей ферментов с двойной активностью ГПЛ и ЭАС (рис. 117) были выбраны сайты, консервативные для целевых ферментов, в первую очередь, ферментов CYP74C13_MT, CYP74C1_CS и CYP74C31. Первая детерминанта катализа CYP74 – сайт «F/L toggle» – локализуется в CPC-1 (Gotoh, 1992) вблизи N-конца. Все АОС и две описанные ЭАС растений (RjEAS и SmEAS) содержат в этом сайте остаток фенилаланина, в то время как все известные ГПЛ и ДЭС – остаток лейцина. Ферменты CYP74C13_MT, CYP74C1_CS и CYP74C31 содержат в данном сайте остаток лейцина. Были созданы и проанализированы мутантные формы CYP74C13_MT L97F, CYP74C1_CS L93F и CYP74C31 L98F.

	*		123456▼
CsAOS (145)	KVEKKDLFTGTYMPVT	(317)	RLGISREEACHNLLFTTCFNSFGGMKIFFPNMIKWIGRAG
GmAOS (131)	KVEKKDVFTGTFMPST	(303)	RLGITRDEACHNLLFATCFNSFGGMKIFFPNVLKWIGRAG
HbAOS (137)	KVEKKDLFTGTFMPST	(309)	KMGISREEACHNLLFATCFNTFGGLKIFFPNILKWIGRAG
HnAOS (111)	KVEKKDLFTGTFMPST	(283)	KLGISRDEACHNLLFATCFNSFGGMKIFFPNMMKSIKAG
LjAOS (140)	KVDKTDVFTGTFMPST	(312)	RLGVSREEACHNLLFATCFNSLGGMKLFFPNVLKWIGRGG
AtAOS (130)	KVEKKDLFTGTYMPST	(302)	KLGISREEACHNLLFATCFNTWGGMKLFFPNMVKRIGRAG
LeAOS2 (124)	KVEKKDLFTGTFVVPST	(296)	KLGISKDEACHNLLFATCFNSFGGMKIFFPNMLKSIKAG
CYP74C13_MT (90)	KVEKRDVLDGTFMPST	(296)	KLGISKDEACHNLLFATCFNSFGGMKIFFPNMLKSIKAG
CYP74C13_Gm (86)	KVDKRDVLDGTFMPST	(262)	RVGIKRDEACHNLFVFLAGFNAYGGGLVNFPIILIKWLAG
CYP74C4_ST (102)	KVEKKNVLDGTFMPST	(278)	KSGIKRDEACHNLFVFLAGFNAYGGMKLFFPSLMKWVASGG
CYP74C1_CS (86)	KVEKRNILDGTYMPSL	(261)	KQGIDREKACHNLFVFLAGFNAYGGMKVLEPPTILKWVGTGG
CYP74C2 (89)	KVEKRNILDGTYMPSL	(264)	KQGIDREKACHNLFVFLAGFNAYGGMKVLEPPTLLKWVGTAG
CYP74C31 (91)	KVEKRNVDGTYMPSL	(265)	KQGINREKACHNLFVFLAGFNAYAGMKVLLPILLNWSGAS
LeHPL (97)	IVEKANVLVGDMPFSV	(271)	EFQLTEQEAIENLWEIFILGFNAFGGFSIFLPTLLGNLGDEK
CjHPL (120)	IVEKKNILVGDMPFSV	(294)	EFGLTKEEAIENLWEIFILGFNAFGGFSIFVPEKLINAIASDT
NtHPL (115)	IVEKANVLVGDMPFSV	(289)	EFGLTEQEAIENLWEIFILGFNAFGGFSIFLPTLLGNLGDEK
AtHPL (111)	LVDKRDVLDGDFRPSL	(286)	EFRLRDEAIQNLLFVFLAGFNAYGGFSVLEPSLIGRITGDN
PgHPL (112)	IVEKSNVLVGDMPFSV	(286)	EFGLTHQEAIENLWEIFILGFNAFGGFSIFLPTLLSNILSDT
CYP74B16 (95)	IADKKDTLLGDFMPST	(270)	EYGLTEEEAIENLWFLVLAFNSEEGFTLEIPKLLTRLLSDS

Рис. 117. 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 этого участка отмечен символом ▼, сайт «F/L toggle» (CPC-1) отмечен звездочкой. Для выравнивания использованы следующие последовательности CYP74: At, *A. thaliana*; AtAOS, AED94842.1; AtHPL, AAC69871; Cj, *Citrus jambhiri*; CjHPL, BAC55161.1; Cs, *C. sativus*; CsAOS, NP_001274390; CsHPL/EAS, CYP74C1_CS, NP_001274399; CsHPL/EAS/AOS, CYP74C31, XP_004137005; Cm, *C. melo*; CmHPL/EAS, CYP74C2, NP_001284390.1; Gm, *G. max*; GmAOS, NP_001236445; GmHPL/EAS, CYP74C13_GM, KRH29541.1; Hb, *Hevea brasiliensis*; HbAOS, AAY27751; Hn, *Hyoscyamus niger*, HnAOS, ABS50433; Le, *S. lycopersicum*; LeAOS2, NP_001274707; LeHPL, CAB43022.1; Lj, *Lotus japonicus*; LjAOS, BAJ78216; Mt, *M. truncatula*; MtHPL/EAS, CYP74C13_MT, CAC86897; Nt, *N. tabacum*; NtHPL, AAZ39884; Pg, *P. guajava*; PgHPL, AF239670.1; St, *S. tuberosum*; StHPL/EAS, CYP74C4_ST, XP_006365486.1.

Для анализа значения участка перегиба I-спирали в катализе CYP74 было решено изменить последовательность этого участка фермента CYP74C13_MT LGFNAF на последовательность TCFNSF, характерную для 13-специфичных AOC подсемейства CYP74A. В свою очередь, у ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 огурца последовательности этого участка (рис. 117) имеют идентичные последовательности. Однако после этого участка фермент CYP74C1_CS содержит остаток глицина, как все AOC и ГПЛ, тогда как фермент CYP74C31 – остаток аланина. Поскольку этот сайт представляет собой наиболее существенную разницу между этими двумя ферментами, были созданы и проанализированы мутантные формы CYP74C1_CS G283A и

CYP74C31 A287G. Таким образом, получили и проанализировали следующие мутантные формы:

1) CYP74C13_MT: мутантную форму, имеющую мотив TCFNSF (типичный для 13-АОС); мутантную форму L97F с заменой в сайте «F/L toggle» и двойную мутантную форму CYP74C13_MT L97F/TCFNSF.

2) CYP74C1_CS L93F, CYP74C1_CS G283A и CYP74C1_CS L93F/G283A

3) CYP74C31 L98F, CYP74C31 A287G и CYP74C31 L98F/A287G.

Для получения мутантных форм использовали праймеры, перечисленные в таблице 17 приложения.

3.19. Анализ каталитических свойств мутантных форм ферментов CYP74C13_MT, CYP74C1_CS и CYP74C31

Все описанные мутантные формы сохранили высокую каталитическую активность, которая в некоторых случаях превышала активность соответствующего фермента дикого типа (таблица 23). Замена участка перегиба I-спирали на TCFNSF в последовательности фермента CYP74C13_MT практически не меняла специфичность катализа по сравнению с ферментом дикого типа (рис. 118А, таблица 24). В отличие от этого, мутантная форма CYP74C13_MT L97F проявляла хорошую АОС активность в отношении 9-ГПОД (рис. 118Б, таблица 23). 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. 118В).

В результате инкубации 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ со всеми тремя мутантными формами CYP74C13_MT АОС продукты не образовывались. Все мутантные формы обладали главным образом ГПЛ активностью в отношении 9-ГПОТ, в то время как 13-гидроперекиси полностью или в основном превращались в ЭАС продукты (таблица 24).

Мутантные формы СУР74С1_СS L93F/G283А и СУР74С31 L98F/A287G проявляли более высокую каталитическую активность (k_{cat}) в отношении всех гидроперекисей, чем ферменты дикого типа (таблица 23). Все мутантные формы ферментов СУР74С1_СS и СУР74С31 обладали в основном АОС активностью (как видно из образования α -кетола) в отношении 9-ГПОД и 9-ГПОТ (таблица 24). При этом мутантные формы СУР74С1_СS G283А и СУР74С31 A287G вели себя как высокоспецифичные ГПЛ в отношении 9-ГПОТ. В отличие от этого, почти все мутантные формы обладали преобладающей ГПЛ активностью в отношении 13-ГПОТ.

Таблица 23. Значения константы каталитической (k_{cat} , с⁻¹) реакций, катализируемых ферментами дикого типа и их мутантными формами.

Фермент	9-ГПОД	9-ГПОТ	13-ГПОД	13-ГПОТ
СУР74С1_СS дикого типа	676,4	375,4	596, 4	530,9
СУР74С1_СS L93F/G283А	732, 4	619,8	712,7	829,1
СУР74С13_МТ дикого типа	773,3	867,7	913,3	768,9
СУР74С13_МТ L97F/ТСFNSF	571,4	550,0	471,4	187,1
СУР74С31 ди- кого типа	455,3	337,6	752,4	377,2
СУР74С31 L98F/A287G	949,6	356,1	1587,5	997,0

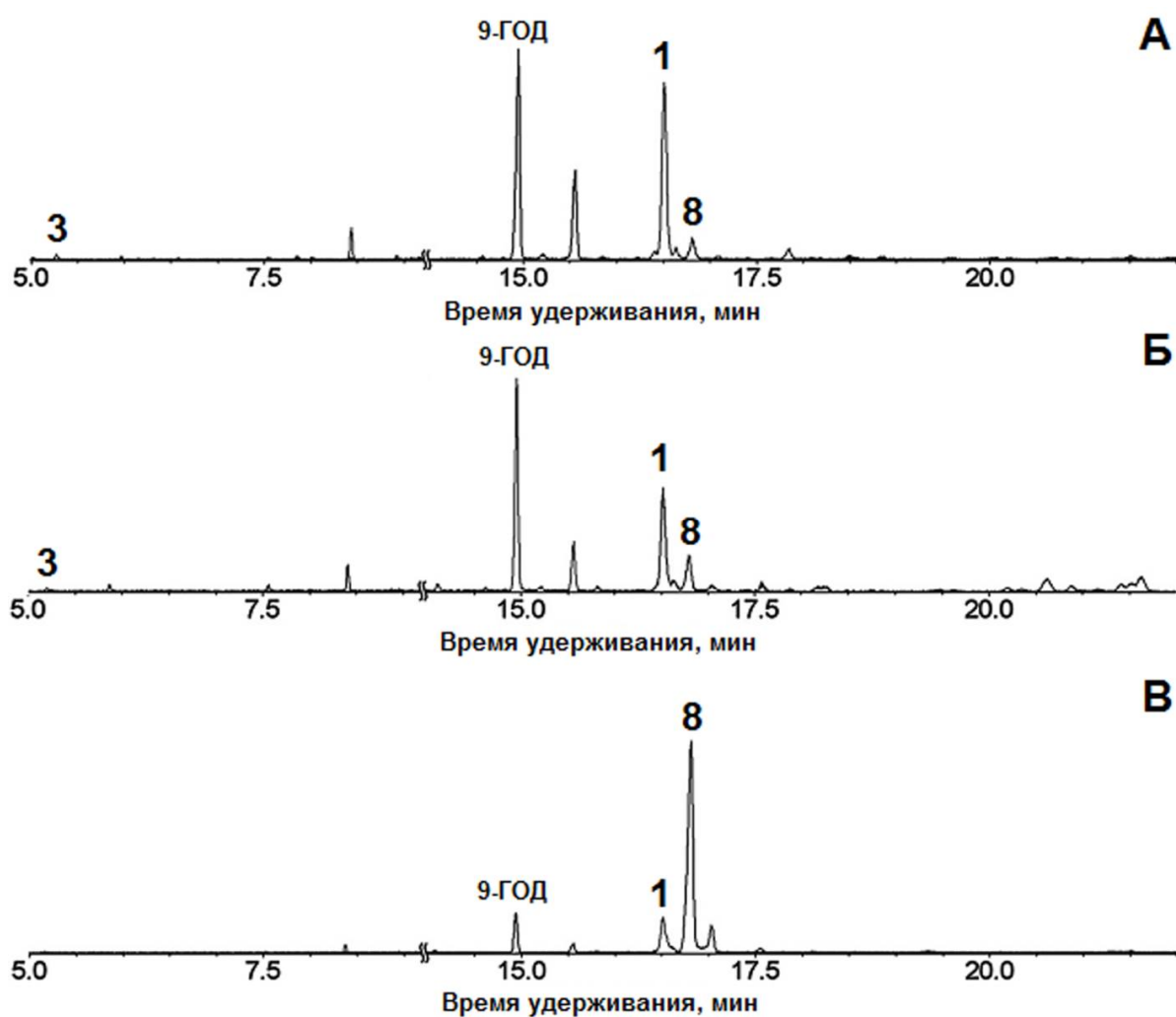


Рис. 118. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC) превращения 9-ГПОД при участии мутантных форм CYP74C13_MТ TCFNSF (А), L97F (Б) и L97F/TCFNSF (В). 1, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; 3, 9-оксононановая кислота; 8, α -кетол, 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовая кислота. Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 50.

Исключениями были CYP74C1_CS L93F и CYP74C1_CS G283A/L93F. Первая мутантная форма катализировала превращение 13-ГПОТ в α -кетол, а вторая – 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 проявляли в основном ГПЛ активность, тогда как оба мутанта по сайту «F/L toggle», а также CYP74C1_CS G283A L93F – преимущественно АОС активность (таблица 24, Torokova *et al.*, 2018a).

Таблица 24. Количественная оценка ЭАС, ГПЛ и АОС продуктов каталитического действия мутантных форм ферментов СУР74С1_CS, СУР74С31 и СУР74С13_МТ. Измерены площади пиков эпокиспиртов (ЭАС продукты), 9-гидроксинонановой кислоты (восстановленный NaBH₄ 9-ГПЛ продукт), (9Z)-12-гидрокси-9-додеценон и (10E)-12-гидрокси-10-додеценон кислоты (восстановленные NaBH₄ 13-ГПЛ продукты), 9,10- и 12,13-диола (восстановленные NaBH₄ АОС продукты) в хроматограммах по полному ионному току. Представлены процентные соотношения продуктов.

Фермент	9-ГПОД			9-ГПОТ			13-ГПОД			13-ГПОТ		
	ЭАС	ГПЛ	АОС	ЭАС	ГПЛ	АОС	ЭАС	ГПЛ	АОС	ЭАС	ГПЛ	АОС
СУР74С1_CS (G283A)	15	15	<u>70</u>	0	<u>100</u>	0	26	<u>57</u>	17	0	<u>100</u>	0
СУР74С1_CS (L93F)	19	3	<u>78</u>	2	17	<u>81</u>	10	14	<u>76</u>	1	13	<u>86</u>
СУР74С1_CS (G283A/L93F)	0	0	<u>100</u>	0	10	<u>90</u>	5	10	<u>85</u>	1	<u>52</u>	47
СУР74С31 (A287G)	34	24	<u>42</u>	0	<u>100</u>	0	4	<u>96</u>	0	0	<u>100</u>	0
СУР74С31 (L98F)	6	6	<u>88</u>	0	6	<u>94</u>	12	41	<u>47</u>	0	<u>100</u>	0
СУР74С31 (A287G/L98F)	5	0	<u>95</u>	0	3	<u>97</u>	0	<u>90</u>	10	0	<u>86</u>	14
СУР74С13_МТ (TCFNSF)	<u>87</u>	6	7	13	<u>87</u>	0	<u>100</u>	0	0	<u>100</u>	0	0
СУР74С13_МТ (L97F)	<u>58</u>	14	28	0	<u>100</u>	0	<u>100</u>	0	0	<u>77</u>	23	0
СУР74С13_МТ (L97F/TCFNSF)	13	0	<u>87</u>	0	<u>100</u>	0	<u>100</u>	0	0	<u>100</u>	0	0

Продукты АОС активности, выявляемые методом ГХ-МС в результате инкубации различных мутантных форм с 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ, представляли собой α -кетолы **8**, **9**, **10** и **11** (Me/TMC) соответственно, описание которых дано выше. Инкубация с 13-ГПОТ также приводила к образованию некоторого количества 12-ОФДК наряду с α -кетолом **11**. Масс-спектр 12-ОФДК (Me) описан выше.

3.20. Изучение влияния сайта «F/L toggle» на каталитические свойства алленоксидсинтаз подсемейств CYP74A и CYP74C

После получения информации о результатах замены остатка лейцина на остаток фенилаланина в сайте «F/L toggle» на каталитические свойства ферментов с двойной ГПЛ/ЭАС активностью для получения дополнительных данных необходимо было провести обратную замену. Вследствие этого, изучали влияние замены остатка фенилаланина на остаток лейцина в этом сайте у алленоксидсинтаз LeAOS3 (CYP74C3), ZmAOS1 (CYP74A19), PpAOS2 (CYP74A8) и LuAOS (CYP74A1). Методом сайт-направленного мутагенеза с использованием праймеров LeAOS3FLf/LeAOS3FLr, ZmAOS1FLf/ZmAOS1FLr, PpAOS2FLf/PpAOS2FLr и LuAOSFLf/LuAOSFLr (таблица 17 приложения) получили мутантные формы LeAOS3 F108L, ZmAOS1 F95L, LuAOS F155L и PpAOS2 F93L. Полученные мутантные формы инкубировали с теми же субстратами, что и ферменты дикого типа (описано выше). Продукты (Me/TMC после восстановления NaBH_4) реакций анализировали, как описано выше.

В результате инкубации мутантной формы LeAOS3 F108L с 9-ГПОД наряду с α -кетолом и 10-ОФЕК – продуктами каталитического действия фермента дикого типа (рис. 119А) образовывалось соединение **1** (рис. 119Б) – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота. Инкубация мутантной формы LeAOS3 F108L с 13-ГПОД приводила к появлению двух основных изомеров соединения **2** – 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты, а также минорных продуктов: 12,13-диолов **10a** и **10б** (восстановленные NaBH_4 АОС продукты) и трех изомеров соединения **7** – (10E)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовой кислоты. Таким образом, мутантная форма LeAOS3 F108L обладала двойной активностью АОС/ЭАС, и ЭАС активность была основной при инкубации мутантной формы с 13-ГПОД. В то же время ГПЛ активность LeAOS3 F108L оставалась такой же, как у фермента дикого типа. Мутантная форма обладала следовой 9-ГПЛ активностью (подобно LeAOS3 дикого типа), и у нее отсутствовала 13-ГПЛ активность.

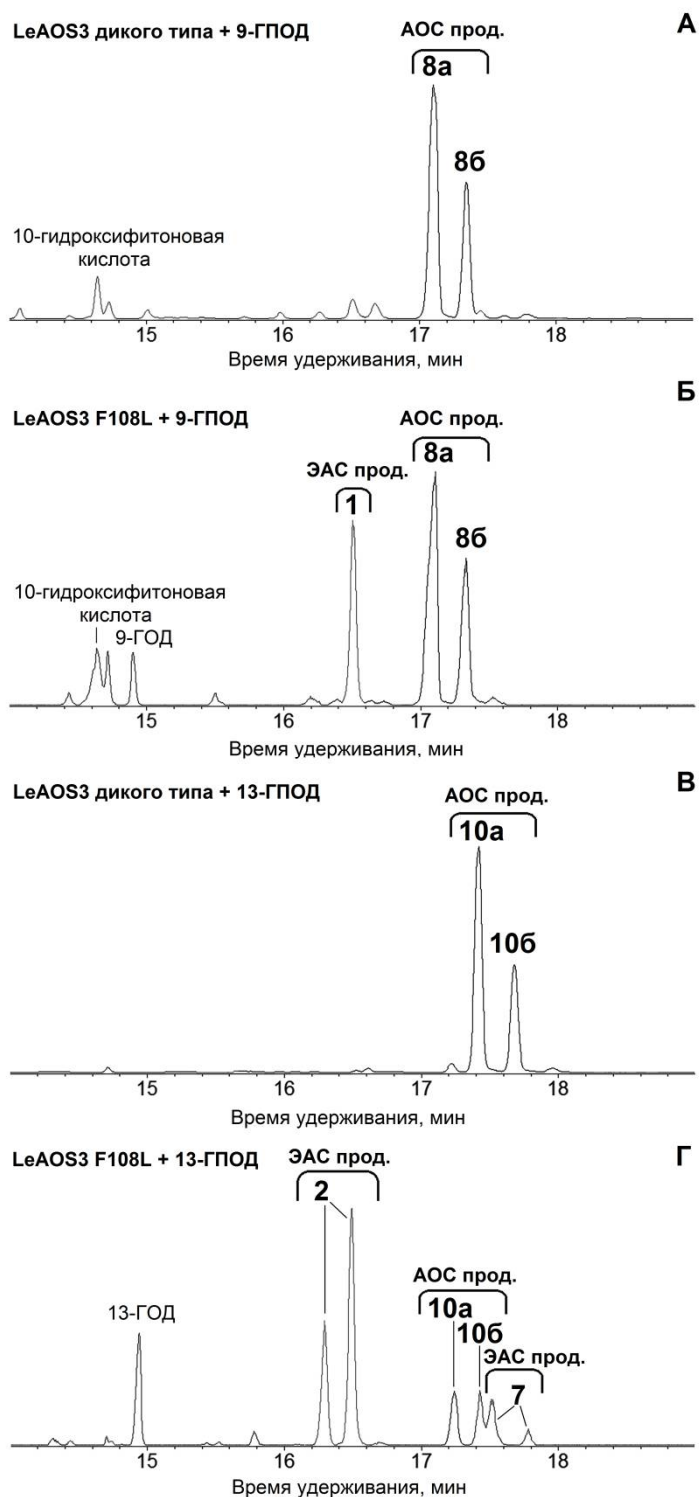


Рис. 119. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД (А и Б) и 13-ГПОД (В и Г) при участии LeAOS3 дикого типа (А и В) и мутантной формы LeAOS F108L (Б и Г). 1, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; 2, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; 7, 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота; 8а и 8б, *трео* и *эритро* изомеры 9,10-дигидрокси-12-октадеценовой кислоты; 6а и 6б, *трео* и *эритро* изомеры 12,13-дигидрокси-9-октадеценовой кислоты. Структурные формулы продуктов представлены на рисунках 50 и 63.

В результате инкубации 9-ГПОТ (рис. 120Б) и 9-ГПОД (рис. 121Б) с мутантной формой PrAOS2 F93L α -кетол не образовывался. Вместо этого 9-ГПОТ превращался в преобладающий продукт **4a** – 9,10-эпокси-13-гидрокси-11,15-октадекадиеновую кислоту и минорный продукт **1a** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновую кислоту, в то время как превращение 9-ГПОД приводило к образованию продуктов **1** и **4** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой и 9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовой кислот соответственно. Таким образом, основной активностью мутантной формы PrAOS2 F93L в отношении 9-гидроперекисей являлась ЭАС активность. Кроме того, в результате инкубации 9-гидроперекисей с мутантной формой PrAOS2 F93L с 9-ГПОТ (рис. 120Б) и 9-ГПОД (рис. 121Б) образовывалось минорное количество 9-оксононановой кислоты, выявляемой на хроматограммах продуктов реакций после восстановления с помощью NaBH_4 в виде пика **3a** – 9-гидроксинонановой кислоты (Me/TMC).

В случае ZmAOS1 замена F95L не полностью нарушила АОС активность. Мутантная форма продуцировала значительное количество α -кетолов (регистрируемых в виде продуктов восстановления NaBH_4 – виц-диолов) в результате инкубации с 9-ГПОТ (рис. 120В) и 9-ГПОД (рис. 121В). В то же время, мутантная форма ZmAOS1 F95L также продуцировала оксиранил карбинолы **1a** (рис. 120В) и **1** (рис. 121В) – продукты ЭАС активности, а также соединение **3a** – 9-гидроксинонановую кислоту, восстановленный NaBH_4 продукт ГПЛ активности.

Мутантные формы PrAOS2 F93L и ZmAOS1 F95L также инкубировали с 13-ГПОД (рис. 122) и 13-ГПОТ (рис. 123). Основными продуктами превращения 13-гидроперекисей при участии этих двух мутантных форм были соединения **5a** и **6a** – (9Z)-12-гидрокси-9-додеценовая и (10E)-12-гидрокси-10-додеценовая кислоты соответственно (восстановленные NaBH_4 13-ГПЛ продукты) (рис. 122, 123).

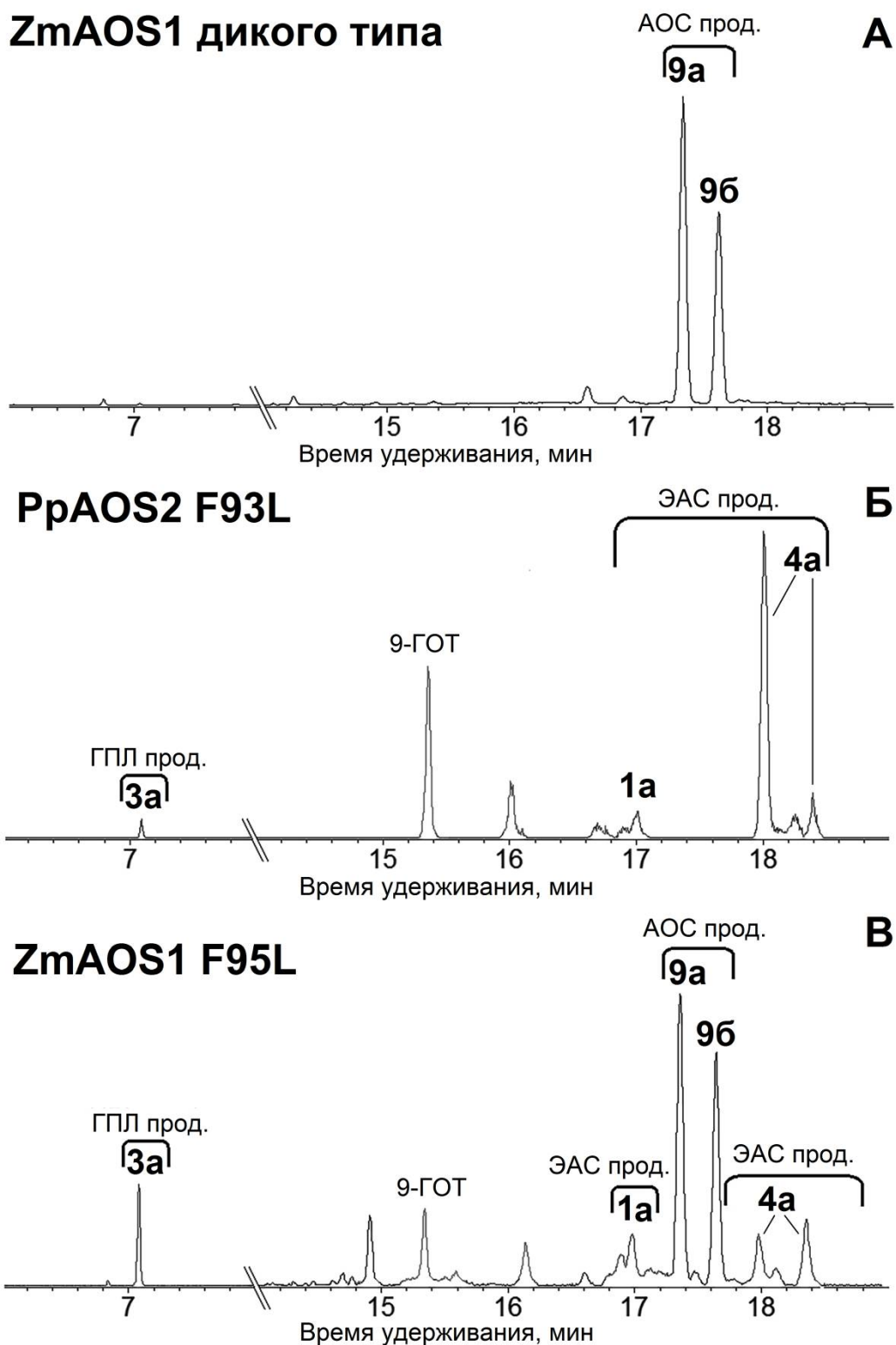


Рис. 120. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMS) после восстановления NaBH_4 превращения 9-ГПОТ при участии ZmAOS1 дикого типа (А), PrAOS2 F93L (Б) и ZmAOS1 F95L (В). **1a**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота; **3a**, 9-гидроксинонановая кислота; **4a**, *трео* и *эритро* изомеры 9,10-эпокси-13-гидрокси-11,15-октадекадиеновой кислоты; **9a** и **9b**, *трео* и *эритро* изомеры 9,10-дигидрокси-12,15-октадекадиеновой кислоты. Структурные формулы продуктов представлены на рисунках 50 и 63.

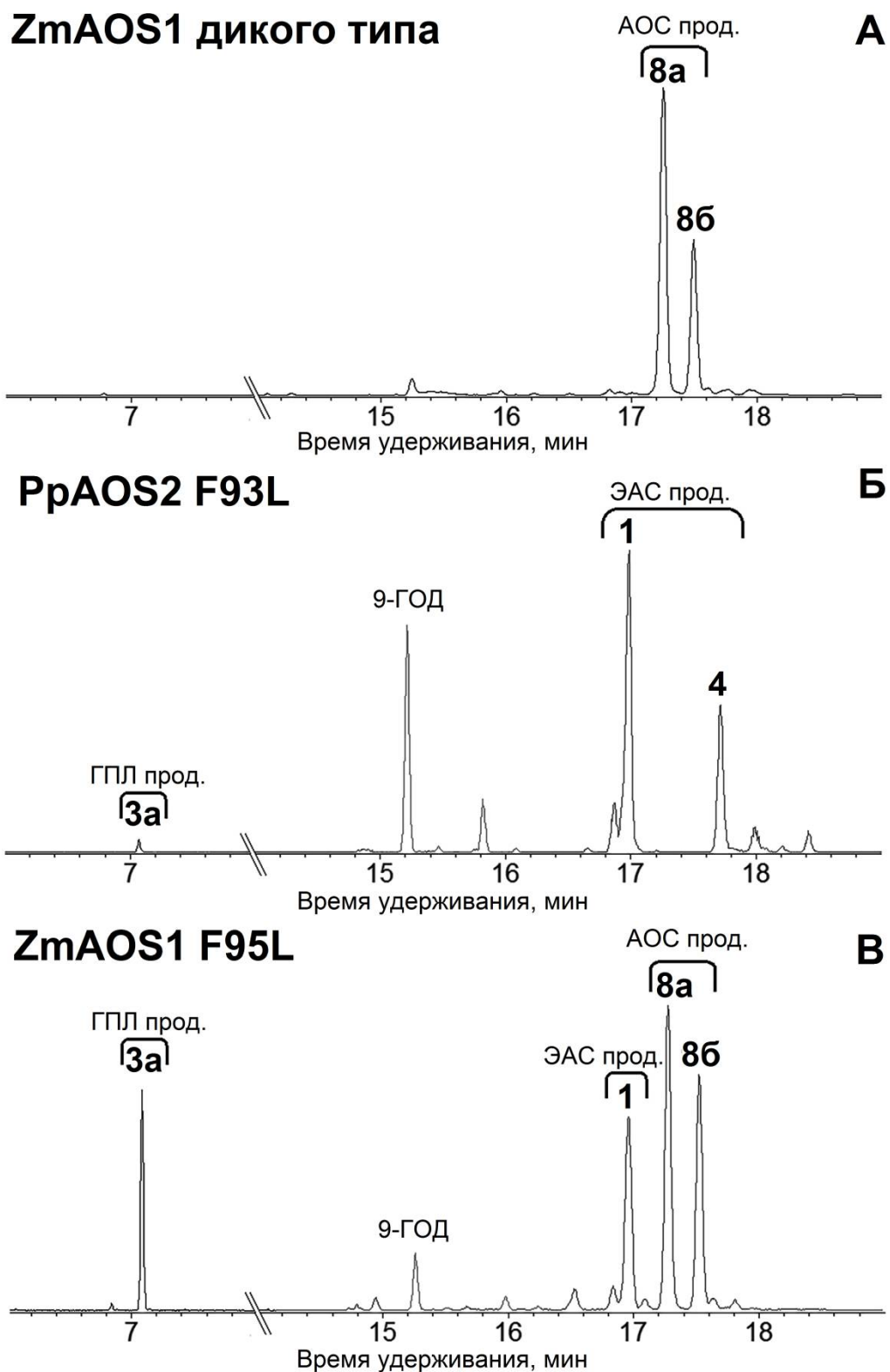


Рис. 121. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH_4) превращения 9-ГПОД при участии ZmAOS1 дикого типа (**А**), PrAOS2 F93L (**Б**) и ZmAOS1 F95L (**В**). **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценная кислота; **3a**, 9-гидроксинонановая кислота; **4**, 9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценная кислота; **8a** и **8b**, *трео* и *эритро* изомеры 9,10-дигидрокси-12-октадеценной кислоты. Структурные формулы продуктов представлены на рисунках 50 и 63.

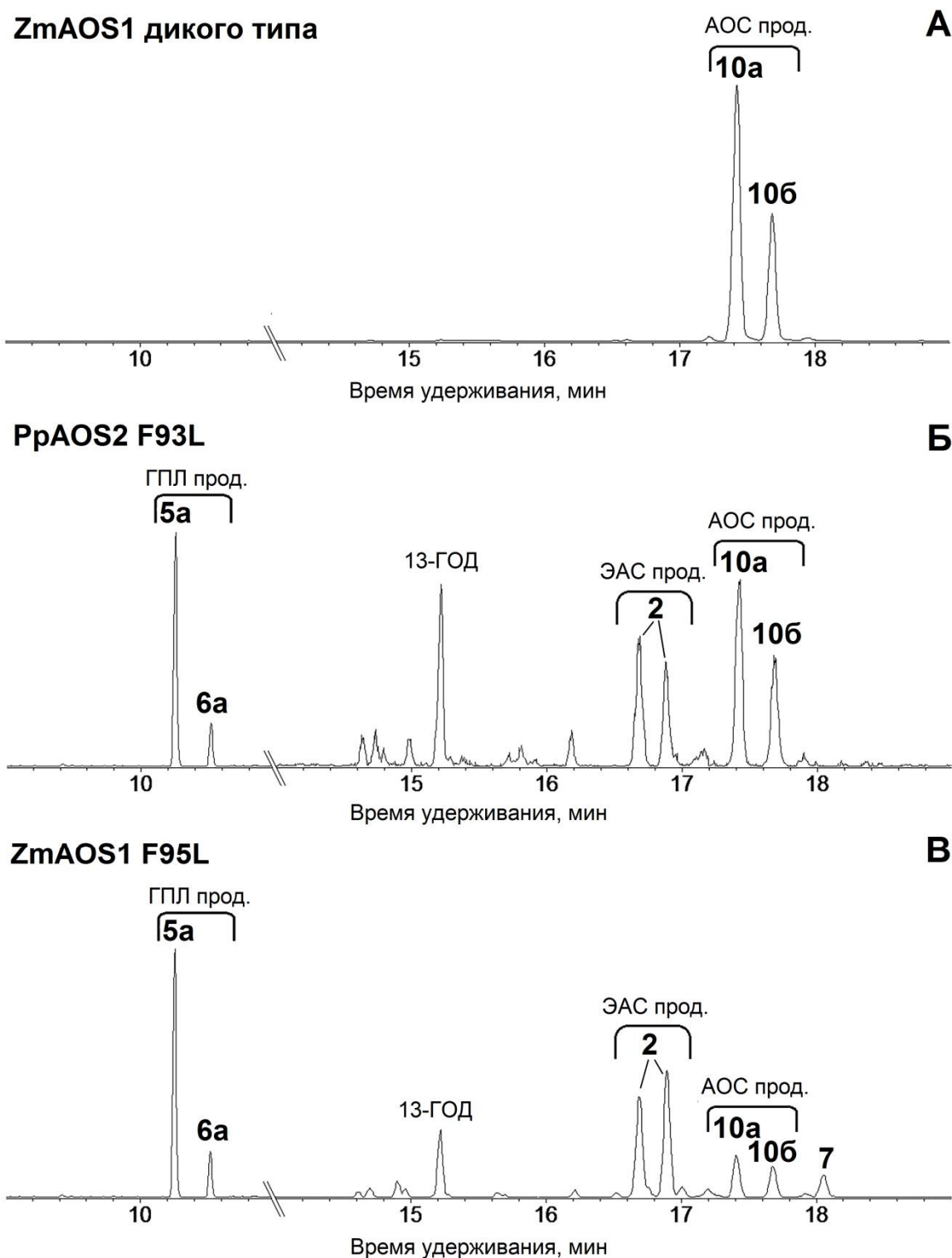


Рис. 122. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПОД при участии ZmAOS1 дикого типа (А), PrAOS2 F93L (Б) и ZmAOS1 F95L (В). **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценная кислота; **5a**, (9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценная кислота; **6a**, (10*E*)-12-гидрокси-10-додеценная кислота; **7**, 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценная кислота; **10a** и **10b**, *трео* и *эритро* изомеры 12,13-дигидрокси-9-октадеценной кислоты. Структурные формулы продуктов представлены на рисунках 50 и 63.

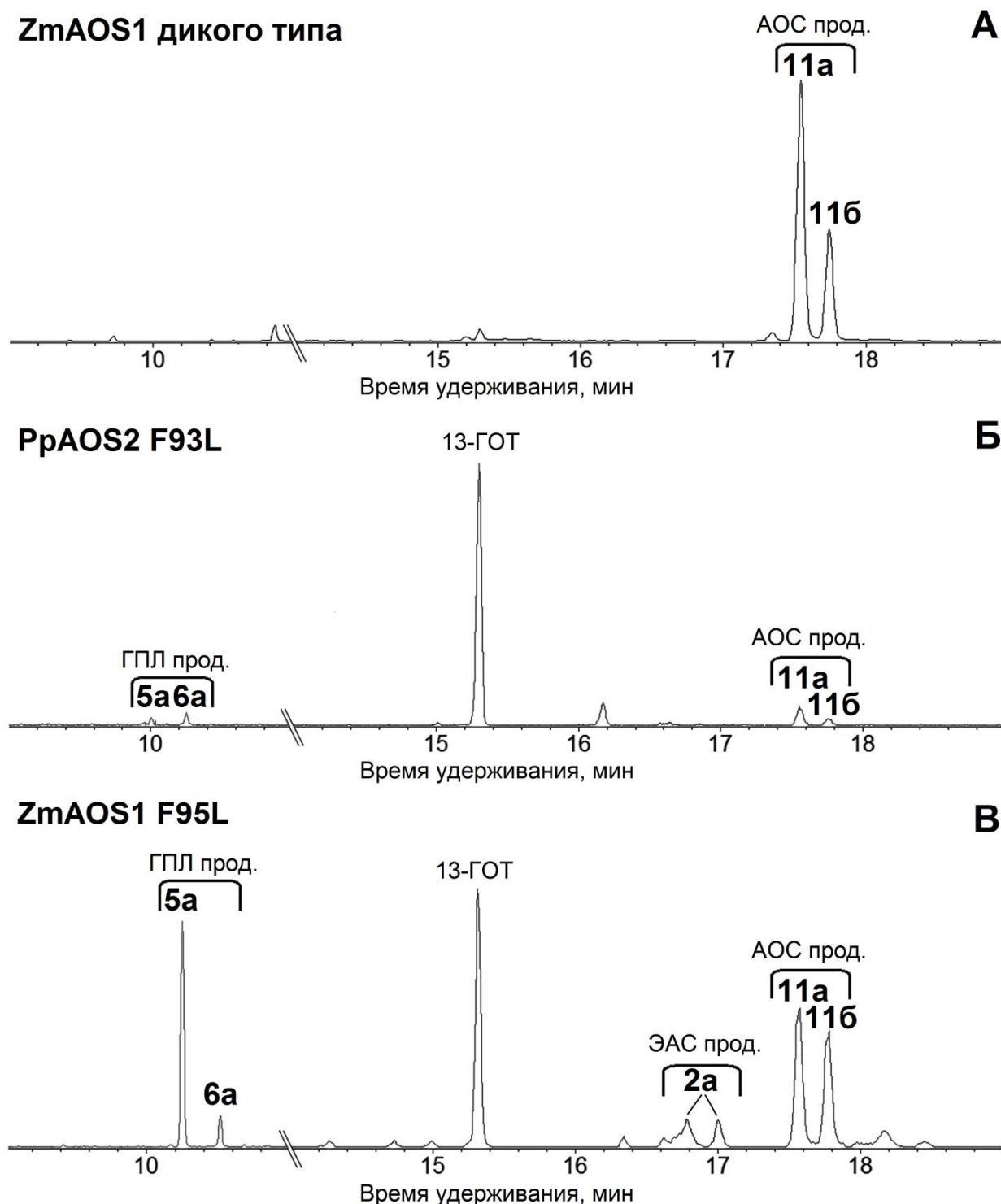


Рис. 123. Хроматограммы (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПОТ при участии ZmAOS1 дикого типа (А), PrAOS2 F93L (Б) и ZmAOS1 F95L (В). **2a**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота; **5a**, (9Z)-12-гидрокси-9-додеценивая кислота; **6a**, (10E)-12-гидрокси-10-додеценивая кислота; **11a** и **116**, *трео* и *эритро* изомеры 12,13-дигидрокси-9,15-октадекадиеновой кислоты. Структурные формулы продуктов представлены на рисунках 50 и 63.

Кроме этого, превращение 13-ГПОД мутантной формой PrAOS2 F93L приводило к образованию α -кетола **10**, выявляемого в виде виц-диолов **10a** и **10б**, и изомеров 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (соединение **2**, ЭАС продукт) (рис. 122Б). В то же время, превращение 13-ГПОТ мутантной формой PrAOS2 F93L не приводило к образованию оксиранил карбинолов либо оксиранил винил карбинолов (рис. 123Б). При этом большой пик 13-ГОТ указывает на относительно слабое превращение субстрата по сравнению с 9-гидроперекисями или 13-ГПОД.

Дополнительными продуктами превращения 13-ГПОТ при участии ZmAOS1 F95L (рис. 123В) были α -кетол **11**, выявляемый в виде пары виц-диолов **11a** и **11б**, и стереоизомеры 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновой кислоты (соединение **2a**, ЭАС продукт), предположительно имеющие различную стереоконфигурацию при C11 или C12. В то же время, превращение 13-ГПОД при участии ZmAOS1 F95L приводило к образованию помимо ГПЛ продуктов α -кетола **10**, выявляемого в виде пары виц-диолов **10a** и **10б**, изомеров 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (соединение **2**, ЭАС продукт, рис. 122В), а также минорного продукта **7** – 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовой кислоты (ЭАС продукт).

В отличие от описанных выше мутантных форм, замена F155L в последовательности LuAOS не приводила к каким-либо качественным изменениям каталитической активности по сравнению с ферментом дикого типа. Превращение 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ мутантной формой LuAOS F155L приводило к специфичному образованию соответствующих α -кетолов. Превращение 13-ГПОТ, наряду с α -кетолом приводила к образованию циклопентенона – 12-оксо-10,15-фитодиеновой кислоты, которая также является АОС продуктом. Продукты ГПЛ, ДЭС и ЭАС обнаружены не были.

Сайт «F/L toggle» (CPC-1) был выявлен как первичная детерминанта катализа в результате рентгеноструктурного 3D-структурного анализа аллелноксидсинтазы AtAOS (CYP74A1) *A. thaliana*. Важность этого сайта была подтверждена преобразованием АОС активности в ГПЛ в результате замены

остатка фенилаланина на остаток лейцина (Lee *et al.*, 2008). Тем не менее, попытки авторов работы выполнить обратное преобразование ГПЛ в АОС заменой остатка лейцина на остаток фенилаланина в этом сайте потерпели неудачу (личное сообщение). Результаты настоящей работы подтверждают важность сайта «F/L toggle» (CPC-1) как детерминанты типа катализа CYP74. В то же время, замена остатка фенилаланина на остаток лейцина в этом сайте у различных АОС не обязательно приводит к появлению ГПЛ активности. Изменения могут быть разными. У одного из исследованных ферментов, LuAOS (CYP74A1), замена в этом сайте не привела ни к каким изменениям механизма катализа. При этом у мутантных форм трех других АОС – ZmAOS1, LeAOS3 и PrAOS2 – произошли значительные изменения катализа. Замена F108L у LeAOS3 привела к частичному превращению АОС в ЭАС. В свою очередь, мутантная форма ZmAOS1 F95L приобрела частичную ГПЛ активность. Наконец, мутантная форма PrAOS2 F93L в основном действовала как ЭАС в отношении 9-гидроперекисей и как ГПЛ в отношении 13-ГПОД. Более того, превращения 9-ГПОД и 9-ГПОТ при участии мутантной формы PrAOS2 F93L приводили к образованию оксиранил винил карбинолов в качестве основных продуктов, тогда как обычно ЭАС продуцируют в основном оксиранил карбинолы. Результаты настоящей работы показывают, что одна и та же мутация не обязательно приводит к одинаковым превращениям в случае разных белков, катализирующих один и тот же тип реакции (Горина и др., 2019; Toporkova *et al.*, 2020a).

3.21. Изменение каталитической активности алленоксидсинтазы LeAOS3 томата в результате сайт-направленного мутагенеза в участке перегиба I-спирали (CPC-4) и ERR-триаде

Помимо сайта «F/L toggle» в последовательностях ферментов CYP74 существуют дополнительные каталитически важные домены, а именно – участок перегиба I-спирали и ERR-триада (рис. 124).

A

HPL [<i>Medicago truncatula</i>]	KMGIKREEACHNLVFTLGFNAFGLTLNQFPILIKWVG
HPL [<i>Nicotiana attenuata</i>]	RGKSEFGLTEQEAIHNLLFILGFNAFGGFSIFLPTLL---GN
HPL [<i>Nicotiana tabacum</i>]	RGKSEFGLTEQEAIHNLLFILGFNAFGGFSIFLPTLL---GN
HPL [<i>Solanum tuberosum</i>]	RAQTEFQLTEQEAIHNLLFILGFNAFGGFTIFLPTLL---GN
HPL [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	RAQTEFQLTEQEAIHNLLFILGFNAFGGFSIFLPTLL---GN
HPL [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	QTEFQLTEQEAIHNLWFILGFNAFGGFSIFLPTLL---GN
HPL [<i>Capsicum annuum</i>]	RAQTDQFLTEQEAIHNLLFILGFNAFGGFTIFLPTLL---GN
HPL [<i>Citrus sinensis</i>]	QRGQDEFGLTKEEAIHNLLFILGFNAFGGFSIFLPTLL---GN
HPL [<i>Citrus jambhiri</i>]	QRGQDEFGLTKEEAIHNLLFILGFNAFGGFSVFKLINAIAS
HPL [<i>Hordeum vulgare</i>]	TNHGMSEKDAINNIFLGMSEKDAINNIFLLGFNAFGGFSVFLPFLILQIGK
HPL [<i>Murraya paniculata</i>]	HNLLFILGFNAFGGFSIFLPRIDLAIAS
HPL [<i>Citrus aurantium</i>]	HNLLFILGFNAFGGFSIFLPKLINAIAS
HPL [<i>Oryza sativa</i>]	AEKEHGISKEEAINNIFVLGFNAFGGFSVFLPFLVMEVVGK
HPL [<i>Zea mays</i>]	AEAQHGIKGDINNIFVLGFNAFGGFSVFLPFLVAKVG
HPL [<i>Cucumis sativus</i>]	GIDREKACHNLVFLAGFNAYGGMVLFPFILKWWG
AOS [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	YNAFYNSMKDILDEAEKLGVRDEACHNFVFLAGFNAYGGLVVFPPLIKWIG
AOS [<i>Solanum tuberosum</i>]	AEAELGISKEEACHNLLFATCFNSFGGMKIFFPNMLKSIA
AOS [<i>Nicotiana attenuata</i>]	FGISRDEACHNLLFATCFNSFGGMKIFFPNMLKWIAR
AOS [<i>Hevea brasiliensis</i>]	LDEAEKMGISREEACHNLLFATCFNSFGGLKIFFPNMLKWIAR
AOS [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	KIGISREEACHNLLFATCFNSFGGMKIFFPNMLKWIAR
AOS [<i>Cucumis melo</i>]	EEADRLGISREEACHNLLFTTCFNSFGGMKIFFPNMLKWIAR
AOS [<i>Hevea brasiliensis</i>]	KMGISREEACHNLLFATCFNSFGGLKIFFPNMLKWIAR
AOS [<i>Medicago truncatula</i>]	FALEEAERLDVSKEEACHNLLFATCFNSFGGMKIFFPNMLKWIAR
AOS [<i>Pisum sativum</i>]	GVSKEEAVHNLI FATCFNSFGGMKILFPSMLAYIGE
AOS [<i>Prunus persica</i>]	SGHVLDEAERLGVSRDEACHNLLFATCFNSFGGMKILFPNMLKWIAR
AOS [<i>Citrus sinensis</i>]	DEAEKLGVSREEACHNLV FATCFNSFGGMKILFPNMLKWIAR
AOS [<i>Citrus jambhiri</i>]	KLGVSRREEACHNLV FATCFNSFGGMKILFPNMLKWIAR
AOS [<i>Humulus lupulus</i>]	QMGISREEACHNLI FATCFNSFGGMKILFPNMLKSIGR
AOS [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	KLGISKDEACHNLLFATCFNSFGGMKIFFPNMLKSIAK
AOS [<i>Triticum aestivum</i>]	MAESLGLNRDEACHNLLFATVENS YGGLEVMPLPGLGRIA
DES [<i>Allium sativum</i>]	EYFSTGGSWILDNAEEIGLSREEAIHHLI FTWAIYALGIRTCMLRFLKWIVA
DES [<i>Allium cepa</i>]	YEFSTGGSWILDNAEEVGLPREEAIHHLI FTWVIYALGMRTCLMRLFKWIVA
DES [<i>Nicotiana tabacum</i>]	DAFSKNAGSMLDEAEKLGIKREEAVHNLI FLVGINMEAGLNAPPHLIRFVGE
DES [<i>Capsicum annuum</i>]	DAFSKSAVSMLEAEKLGIKREEAVHNML FLVGINMEAGLNAPPHLIRFVGE
DES [<i>Solanum tuberosum</i>]	IKSDYNKLVDAFSKSAVSI LDEAEKLGIKREEAVQNIL FLVGINMEAGLNAPPHLIRFVGE
DES [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	DAFSKSAVSMLEAEKLGIKREEAVQNIL FLVGINMEAGLNAPPHLIRFVGE

B

AOS [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	VVYETLRMDPPVPFQIVKAR
AOS [<i>Solanum tuberosum</i>]	VVYETLRMDPPVPFQIVKAR
AOS [<i>Pisum sativum</i>]	VVYETLRIDPPVPFQIVAKAK
AOS [<i>Zea mays</i>]	VVWESLRLDPPVKFQNGHAK
AOS [<i>Solanum tuberosum</i>]	VVYEALRVDPPVASQNGRAK
AOS [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	VVYEALRVDPPVASQNGRAK
AOS [<i>Oryza sativa</i>]	VVWEALRLDPPVRFQNGRAK
HPL [<i>Medicago sativa</i>]	VVYETLRMDPPVPFQIVKAR
HPL [<i>Capsicum annuum</i>]	FVYETLRRLSPPVPSQIVARAR
HPL [<i>Cucumis melo</i>]	VVYEALRIEPPVPFQNGKAK
HPL [<i>Cucumis sativus</i>]	VVYEALRIEPPVPFQNGKAK
DES [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	VVYETLRRLDPPVPFQNGKAK
DES [<i>Solanum tuberosum</i>]	VVYETLRRLDPPVPFQNGKAK
DES [<i>Nicotiana tabacum</i>]	IVYETLRRLDPPVPFQNGKAK
DES [<i>Capsicum annuum</i>]	VVYETLRRLDPPVPFQNGKAK

Рис. 124. Сопоставление первичных последовательностей I-спирали (A) и ERR-триады (B) некоторых представителей семейства CYP74. Цветовыми обозначениями отмечены сайты, подвергнутые мутациям.

Для того чтобы проверить, приводят ли замены в этих доменах к появлению у LeAOS3 эпоксиалкогольсинтазной активности, мы получили мутантные формы LeAOS3 S297A, K302S, F295I, D359R и T366Y и проверили особен-

ности их каталитического действия в сравнении с ферментом дикого типа. Для этого использовали праймеры, перечисленные в таблице 17 приложения. Сайты, в которых проводили замены, отмечены на рисунке 124 цветными выделениями.

Мутантные формы LeAOS3 инкубировали с 9-ГПОД, и продукты реакции (Me/ТМС) анализировали с помощью ГХ-МС, как описано выше. Было показано, что все полученные нами мутантные формы LeAOS3 сохранили способность утилизировать 9-ГПОД в качестве субстрата. Однако, наряду с продуктами, характерными для реакции, катализируемой LeAOS3 дикого типа, в значительном количестве образовывался продукт, характерный для ГПЛ, а именно – 9-оксононановая кислота (**3**).

Активность мутантной формы F295I составляла 13% от активности LeAOS3 дикого типа (рис. 125А). При этом основной алленоксидсинтазный продукт, α -кетол **8**, не выявлялся (рис. 125Б). Вместо этого, мутантная форма F295I продуцировала только соединение **3** – 9-оксононановую кислоту, ГПЛ продукт (рис. 125Б). Таким образом, мутация F295I превратила алленоксидсинтазу (дегидразу) в высокоспецифичную гидропероксидлиазу (изомеразу). Активность мутантных форм LeAOS3 S297A и K302S составляла 52 и 36%, соответственно, от активности фермента дикого типа. Эти мутации также привели к изменению типа катализа. Полученные мутантные формы LeAOS3 также проявляли активность ГПЛ, продуцируя 9-оксононановую кислоту в качестве основного продукта (рис. 125В и Г). Эти мутанты проявляли некоторую остаточную активность АОС, но она была сильно снижена по сравнению с LeAOS3 дикого типа (рис. 125В и Г).

Мутантная форма T366Y проявляла 72% активности в сравнении с LeAOS3 дикого типа. Этот фермент проявлял двойственную активность ГПЛ и АОС, продуцируя соизмеримое количество 9-оксононановой кислоты **3** и α -кетола **8** в качестве продуктов реакции (рис. 125Д). С другой стороны, замена остатка аспарагиновой кислоты на остаток аргинина в ERR-триаде не привела к изменению типа каталитической активности (данные не показаны).

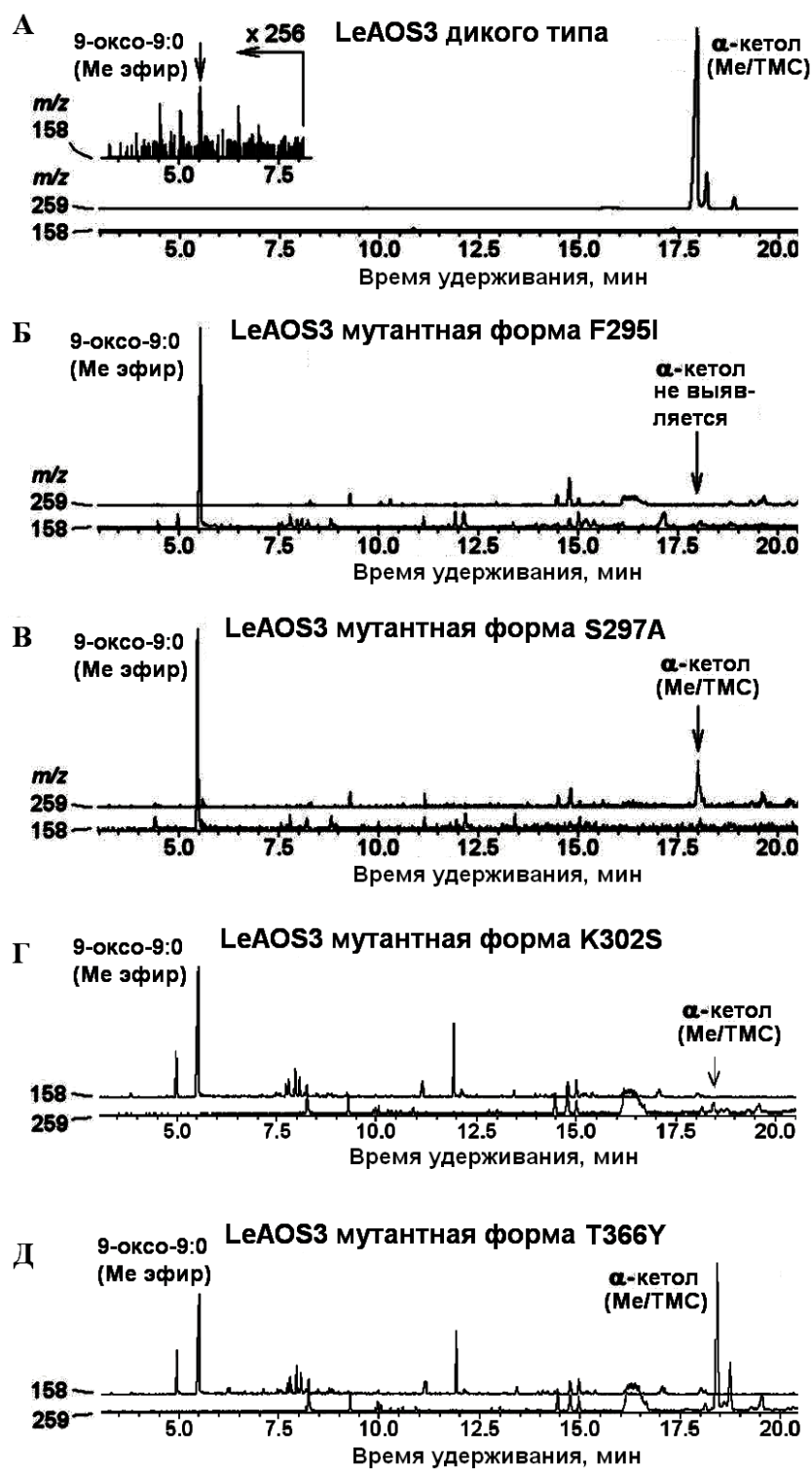


Рис. 125. Хроматограммы продуктов (Me/TMS) превращения 9-ГПОД при участии LeAOS3 дикого типа (А) и ее мутантных форм: F295I (Б), S297A (В), K302S (Г), T366Y (Д). 3, 9-оксононановая кислота; 8, 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценная кислота. Вставка (слева сверху): 256-кратный масштабированный фрагмент хроматограммы (m/z 158, 9-оксононановая кислота) продуктов LeAOS3 дикого типа. Структурные формулы продуктов реакций представлены на рисунке 50.

Таким образом, четыре единичные мутации F295I, K302S, T366Y и S297A LeAOS3 (CYP74C3) превратили АОС дикого типа частично или полностью в ГПЛ (Toporkova *et al.*, 2008; Топоркова и др., 2010). При этом ЭАС активности у этих мутантов обнаружено не было, в отличие от мутантной формы LeAOS3 F108L.

3.22. Изменения каталитической активности фермента CYP74B16 и NtDES в результате сайт-направленного мутагенеза

Дивинилэфирсинтазы содержат в своих последовательностях ряд сайтов, кардинально отличающих их от АОС и ГПЛ. Фермент CYP74B16 является единственным, к настоящему времени описанным ферментом CYP74B, проявляющим ДЭС активность. Практически все остальные описанные CYP74B ферменты являются 13-специфичными ГПЛ. Наиболее значимым отличием в последовательности фермента CYP74B16, в сравнении с 13-ГПЛ, является сайт, следующий после участка перегиба I-спирали, в котором все АОС и ГПЛ содержат остаток глицина, тогда как ДЭС – другой, больший по размеру остаток (например, Ala-286 у NtDES или Leu-279 у AsDES, рис. 126А). Фермент CYP74B16 содержит в этом сайте остаток глутаминовой кислоты (Glu-292, рис. 126А). Для проверки этого сайта в качестве первичной детерминанты катализа CYP74, провели замену в этом сайте и получили мутантную форму фермента CYP74B16 E292G.

По результатам множественного выравнивания последовательностей CYP74 с дополнительным анализом компьютерных моделей ферментов CYP74 выявили дополнительную гипотетическую первичную детерминанту катализа CYP74 внутри ERR-триады (рис. 126Б), расположенную на компьютерной модели в каталитическом центре. Все АОС подсемейств CYP74А и CYP74С, так же как ферменты с двойной ГПЛ/ЭАС активностью подсемейства CYP74С содержат остаток фенилаланина (иногда тирозина) в этом сайте.

NtDES (266) LGIKREEAVHNILFLVGINMFAGLNAFFPHLIRFVGEAG
 StDES (265) LGIKREEAVQNILFLVGINMFAGLNAFSPHLFRFVGEAG
 LeDES (265) LGIKREEAVQNILFLVGINMFAGLNAFFPHLFRFVGEAG
 CaDES (265) LGIKREEAVHNMLFLVGINMFAGLNAFFPHLIRFVGEAG
 AsDES (259) IGLSREEAIHHLIFTWAINAYLIGIRTCLMRLFKWIVASG
 CYP74B16 (271) **YGLTEEEAIIHNLFLVLAFNSEFGFTLFI PKLLTRLLSDS**
 AtHPL (287) FRLTRDEAIQNLLFV LGFNAYGGFSVFLPSLIGRITGDN
 CaHPL (273) FQLTEQEAIHNLFLV LGFNAYGGFTIFLPTLLGNLGD
 NaHPL (289) FGLTEQEAIHNLFLV LGFNAYGGFSIFLPTLLGNLGD
 NtHPL (290) FGLTEQEAIHNLFLV LGFNAYGGFSIFLPTLLGNLGD
 GmAOS (305) LGITRDEACHNLLFATCFNSFGGMKLFPPNVLKWIGRAG
 LuAOS (322) SGISRDEACHNILFAVCFNSWGGFKILFPPSLMKWIGRAG
 NaAOS (307) FGISRDEACHNLLFATCFNSFGGMKIFFPNMLKWIARAG
 PaAOS (259) LGVPKDEAVHNILFAVCFNTFGGFKILFPNTLKWIGLAG
 LeAOS3 (279) LGVKRDEACHNFVFLAGFNAYGGGLKVFFPSLIKWIGTSG
 MtHPL (272) AGLKRSEALHNIIFTAGFNAYGGGLKNQFPILFKWLSSG
 CmHPL (266) QGIDREKACHNLVFLAGFNAYGGMKVLFPTLLKVVGTAG
 PdHPL (270) FGLSREEACHNLLFVAGFNAYGGMKLLFPALIKWVASGG

▼ ▼ ◇◇◇ ● ▼
NtDES (342) ETLRLRPPVPLQY GKAKKDFMVQSHDASYMIKKGQFLVGYQPMASRDPKIFDKPDDFIPDRF
 StDES (341) ETLRLRPPVPLQY GKAKKDFMVQSHDASYKINKGQFVVGYPMASRDPKIFANPDEFV PDRF
 LeDES (341) ETLRLRPPVPLQY GKAKKDFMVQSHDASYKINKGQFVVGYPMASRDPKIFANPDEFV PDRF
 CaDES (341) ETLRLRPPVPLQY GKAKKDFMVQSHDASYKINKGQFLVGYNPMASRDPKIFANPDEFV PDRF
 AsDES (335) **ESFRFDPVQVQYGTAKS DLI IESHGKYQVKKGEMLCGFQPMATRDPKVFDRAD EFPDRF**
 CYP74B16 (344) **ETLRLEPPVPTQFARARKDF TLSSEASYKVKKGELLCGYQPLV MRDSTIFDDPESFKPDRF**
 AtHPL (363) ETLRFNPPVPLQFARARKDFQISSHDVAFVKKGELLCGYQPLV MRDANVFDEPEEFK PDRY
 CaHPL (351) ESLRLSPPVPSQYARARKDFMLSSHDSVYEIKKGELLCGYQPLV MKDPKVFDEPEKFM LERF
 NaHPL (367) ETLRLSPPVPSQYARARKDFKLSHDSVYEIKKGELLCGYQPLV MRDPKVFDDPEK FVLERF
 NtHPL (368) ETLRLSPPVPTQYARARKDFKLSHDSVYEIKKGELLCGYQPLV MRDPKVF DNPEK FVLERF
 GmAOS (381) EAFRIDPPVALQFGRAKRDLI IESHDAFQVKEGEMLFQYQPFATKDP RIFERAE EFGVDRF
 LuAOS (399) ETLRIEPPVALQY GKAKKDFILE SHEAAYQVKEGEMLFQYQPFATKDP KIFDRPEE FVADRF
 NaAOS (383) EALRIDPPVASQYGRAKRDLMIESHG VFEVKKGEMLFQYQPFATRDPKIFDRP DEFV PDRF
 PaAOS (336) ESLRIEPPVPQY GKA SNTIESH DATFEVKKGEMLFQYQPFATKDPK VFD RPEEYV PDRF
 LeAOS3 (354) ETLRMDPPVFPQTVKARKNI IITNHES SFLIKKDELIFGYQPLATKDSKV FKNAAEFNPDRF
 MtHPL (347) EAMRIEPAVPYQYAKAREDLIVKSHDA AFEIKKGEMIFQYQPFATKDP RVFDDPEV FVAKRF
 CmHPL (341) EALRIEPPVFPQY GKAKEDIVI QSHDSSFKIKKGETIFQYQPFATKDPKIFK DSEK FVGD RF
 PdHPL (346) EALRIEPPVFPYQY GKAKEDIVI QSHDATFEIKKGEMIFGNQNFV GKDPKVFENPEE FVAHRF

Рис. 126. Множественное выравнивание частичных последовательностей CYP74: I-спирали (А) и ERR-триады (Б). Участок перегиба I-спирали (CPC-4) пронумерован 1–6, ERR-триада и PPV-домен отмечены символами ▼ и ◇ соответственно. Сайты, в которых проводили замены, выделены серым цветом. Следующие последовательности использовали для выравнивания: As, *A. sativum*; AsDES, CAI30435; AtHPL; Ca, *Capsicum annuum*; CaDES, ABH03632; CaHPL, AAK27266; CmHPL/EAS; GmHPL/EAS; Le, *S. lycopersicum*; LeDES, AAG42261; LeAOS3, NP_001234833; Lu, *L. usitatissimum*; CYP74B16, ADP03054; LuAOS, AAA03353; MtHPL/EAS; Na, *Nicotiana attenuata*; NaAOS, CAC82911; NaHPL, CAC91565; Nt, *N. tabacum*; NtDES, AAL40900; NtHPL; Pa, *P. argentatum*; PaAOS, Q40778; Pd, *Prunus dulcis*; PdHPL, CAE18065; St, *S. tuberosum*; StDES, CAC28152.

Все ДЭС растений семейства Solanaceae содержат остаток валина в этом сайте (например, Val-379 у NtDES), в том время как все ферменты CYP74B (в том числе фермент CYP74B16), а также AsDES (CYP74H1) – остаток цистеина. Расположение этого сайта около каталитического центра и несинонимичные аминокислотные остатки в этом сайте у ферментов с разным типом катализа позволили предположить его роль как детерминанты катализа. Для проверки этого предположения получили мутантную форму NtDES V379F. Для получения обеих мутантных форм использовали праймеры, перечисленные в таблице 17 приложения.

Инкубация фермента CYP74B16 дикого типа с 13-ГПОТ (предпочтительным субстратом) приводила к образованию соединения **13a** – (ω 5Z)-этероленовой кислоты (рис. 127A). Мутантная форма CYP74B16 E292G сохраняет способность превращать 13-ГПОТ на 82% в сравнении с ферментом дикого типа. Однако по результатам анализа продуктов каталитического действия CYP74B16 E292G произошло кардинальное изменение катализа. Основного продукта – (ω 5Z)-этероленовой кислоты – выявлено не было (рис. 127Б). Вместо этого, образовывалось основное соединение **11** – α -кетол, (9Z,15Z)-12-оксо-13-гидрокси-9,12-октадекадиеновая кислота (АОС продукт). Наряду с α -кетолом, выявлены *транс*- и *цис*-изомеры 12-ОФДК (АОС продукт, рис. 127Б) (Ермилова и др., 2013; Torokova *et al.*, 2013). Оба соединения описаны выше.

NtDES дикого типа превращает 9-ГПОД, в основном, в дивиниловый эфир **12** – колнелевую кислоту (рис. 127В). Мутантная форма NtDES V379F сохранила 25% активности в сравнении с ферментом дикого типа. В отличие от NtDES дикого типа, мутантная форма продуцировала следовое количество дивинилового эфира (рис. 127Г). Основным продуктом превращения 9-ГПОД при участии мутантной формы было соединение **8** – α -кетол, 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).

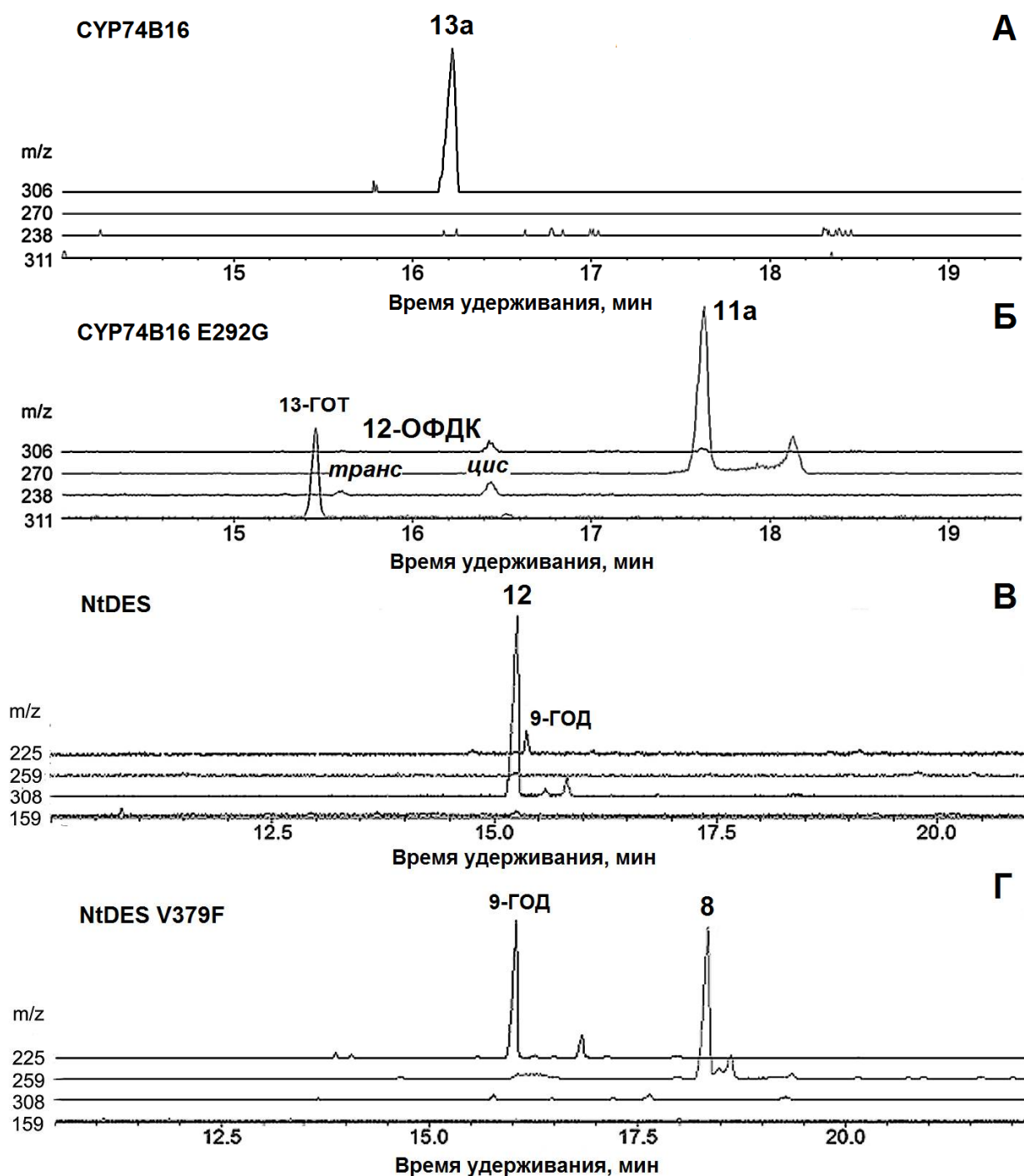


Рис. 127. Хроматограммы продуктов (Me/TMC) превращения 13-ГПОТ при участии фермента CYP74B16 дикого типа (А) и его мутантной формы CYP74B16 E292G (Б), а также 9-ГПОД при участии NtDES дикого типа (В) и его мутантной формы NtDES V379F (Г). **8**, 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовая кислота; **11a**, 12-оксо-13-гидрокси-9,15-октадекадиеновая кислота; **12**, колнелевая кислота; **13a**, этероленовая кислота. Структурные формулы продуктов представлены на рисунках 62, 64 и 78.

Все продукты описаны выше. Таким образом, мутантная форма NtDES V397F проявляла преимущественно АОС активность с минорными ДЭС и ГПЛ активностями (Ермилова и др., 2013; Toporkova *et al.*, 2013).

После превращения фермента СУР74В16 в алленоксидсинтазу в результате сайт-направленного мутагенеза в сайте непосредственно после участка перегиба I-спирали (СРС-4) получили дополнительных мутантов по сайтам внутри этого участка. Во втором положении этого участка у фермента СУР74В16 содержится остаток аланина, в отличие от 13-специфичных ГПЛ того же подсемейства, у которых в этом сайте содержится остаток глицина. В шестом положении этого участка у большинства ферментов СУР74, включая фермент СУР74В16, содержится остаток ароматической аминокислоты, как правило, фенилаланина. Данные, полученные ранее (Hughes *et al.*, 2008), и результаты компьютерного моделирования с использованием программы EzyPred позволили предположить, что этот остаток (Phe-291 у фермента СУР74В16) может контактировать с субстратом. Мы заменили остаток фенилаланина на остаток валина, чтобы изменить размер и гидрофобность субстрат-связывающего кармана и изменить контакт с субстратом и его расположение относительно гемового железа, как это было сделано в работе (Hughes *et al.*, 2008). Так, мы получили мутантные формы СУР74В16 А287G и F291V, используя праймеры в таблице 17 приложения.

Обе замены (А287G и F291V) привели к сходным результатам (рис. 128 и 129). Оба мутанта сохранили высокую каталитическую активность в сравнении с ферментом дикого типа (таблица 25), но привели к потере ДЭС активности и увеличению ГПЛ и ЭАС активности. ДЭС активность сохранилась только в случае превращения 13-ГПОТ при участии мутантной формы СУР74В16 А287G (рис. 129А). В целом, каталитическая активность этого мутанта в отношении 13-ГПОТ (таблица 26) описывается следующим соотношением: ГПЛ > ДЭС > ЭАС (44 : 35,5 : 20,5, %/%).

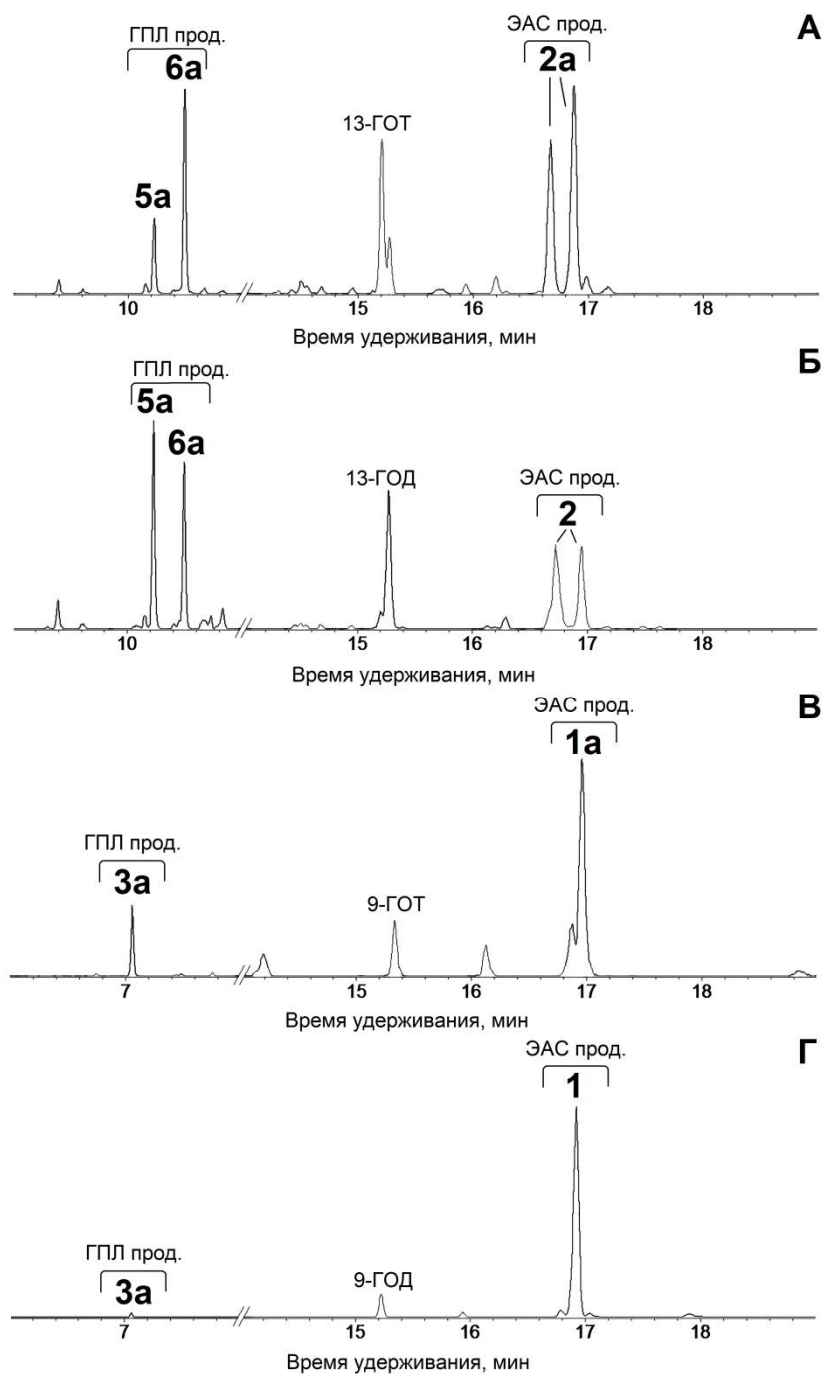


Рис. 128. Хроматограммы продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПОТ (А), 13-ГПОД (Б), 9-ГПОТ (В) и 9-ГПОД (Г) при участии мутантной формы СУР74В16 F291V. **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; **1a**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; **2a**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота; **3a**, 9-гидроксинонановая кислота; **5a**, (9Z)-12-гидрокси-9-додеценовая кислота; **6a**, (10E)-12-гидрокси-10-додеценовая кислота. Структурные формулы продуктов представлены на рисунке 50.

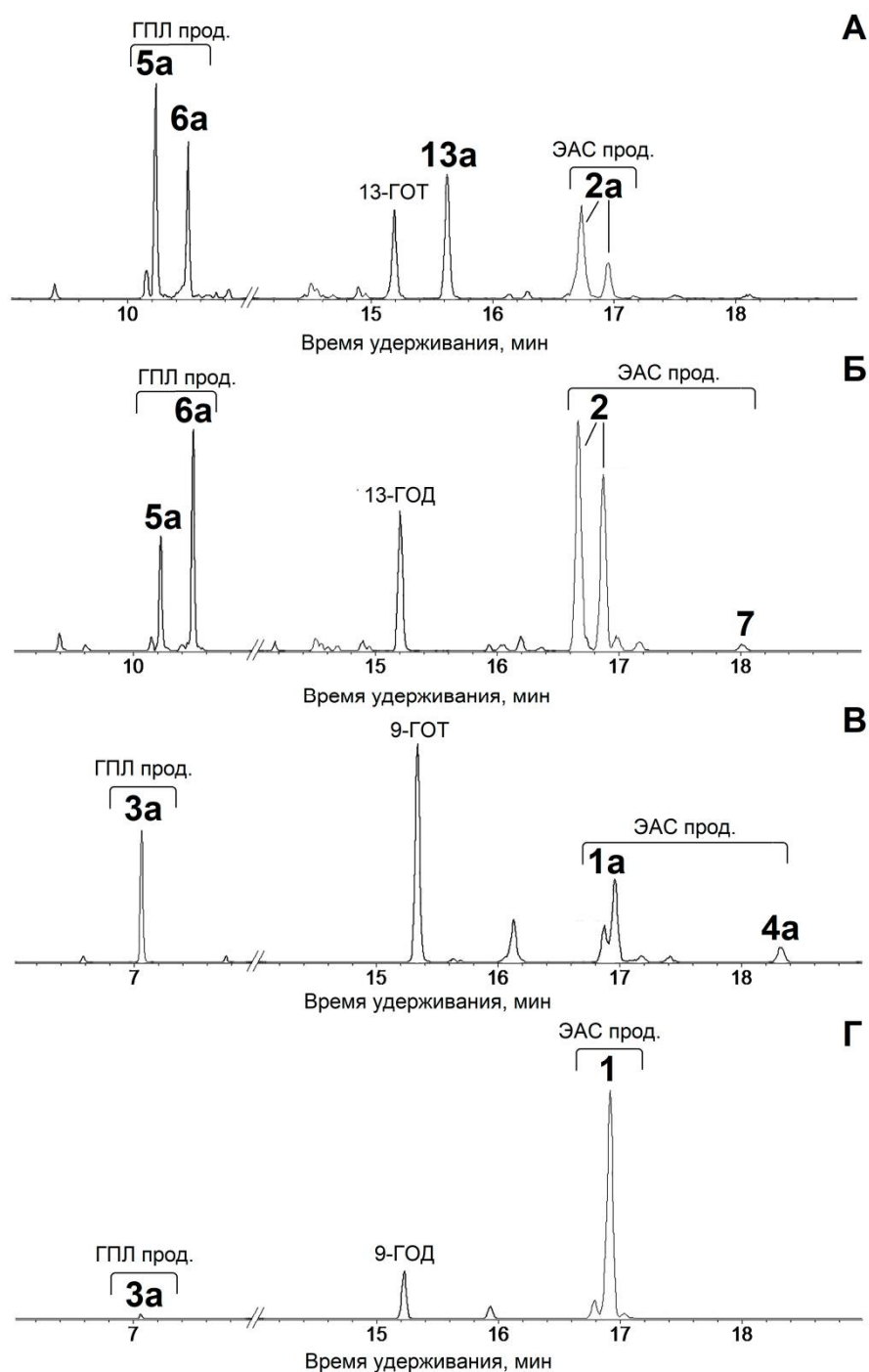


Рис. 129. Хроматограммы продуктов (Me/TMC после восстановления NaBH_4) превращения 13-ГПОТ (А), 13-ГПОД (Б), 9-ГПОТ (В) и 9-ГПОД (Г) при участии мутантной формы СУР74В16 А287G. **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; **1a**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота; **2**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота; **2a**, 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновая кислота; **3a**, 9-гидроксинонановая кислота; **4a**, 9,10-эпокси-13-гидрокси-12,15-октадекадиеновая кислота; **5a**, (9*Z*)-12-гидрокси-9-додеценовая кислота; **6a**, (10*E*)-12-гидрокси-10-додеценовая кислота; **7**, 9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота; **13a**, этероленовая кислота. Структурные формулы продуктов представлены на рисунках 50 и 78.

Таблица 25. Кинетические параметры реакций, катализируемых ферментом СУР74В16 дикого типа и его мутантными формами СУР74В16 F291V и A287G.

	Субстрат	K_m , μМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_m , с ⁻¹ μМ ⁻¹	Специфичность, %
Фермент СУР74В16 дикого типа	13-ГПОТ	31,2	623,7	20	100
	13-ГПОД	80,3	1222,1	15,22	76,1
	9-ГПОТ	132,1	277,4	2,1	10,5
	9-ГПОД	125,7	364,5	2,9	14,5
СУР74В16 F291V	13-ГПОТ	64,9	353,1	5,44	81,7
	13-ГПОД	50,3	335,2	6,66	100
	9-ГПОТ	29,1	76,8	2,64	39,6
	9-ГПОД	19,5	80,3	4,12	61,9
СУР74В16 A287G	13-ГПОТ	39,4	261,4	6,63	40,8
	13-ГПОД	14,4	233,9	16,24	100
	9-ГПОТ	56,6	13,9	0,25	1,5
	9-ГПОД	6,9	54,6	7,91	48,7

Превращение 13-ГПОТ при участии мутантной формы СУР74В16 F291V приводило к образованию сопоставимых количеств альдокислот (ГПЛ продуктов) и эпокиспиртов (ЭАС продуктов) с небольшим превалированием последних (рис. 128А).

Инкубация 13-ГПОД с обеими мутантными формами приводила к образованию тех же продуктов, но с небольшим превалированием альдокислот (ГПЛ продуктов) (рис. 128Б и 129Б, *Torokova et al.*, 2020в). Неожиданным

оказалось увеличение каталитической активности обоих мутантов в отношении 9-ГПОД и 9-ГПОТ по сравнению с ферментом дикого типа.

Таблица 26. Количественное соотношение (%) ДЭС, ГПЛ и ЭАС продуктов, образующихся при участии мутантных форм СУР74В16 F291V и А287G. Оценку проводили, исходя из площадей пиков дивиниловых эфиров (ДЭС продукты), эпокиспиртов (ЭАС продукты), 9-гидроксинонановой кислоты (восстановленный NaBH₄ 9-ГПЛ продукт) и (9Z)-12-гидрокси-9-додеценной и (10E)-12-гидрокси-10-додеценной кислот (восстановленные NaBH₄ 13-ГПЛ продукты) в хроматограммах по полному ионному току.

	Субстрат											
	9-ГПОД			9-ГПОТ			13-ГПОД			13-ГПОТ		
	ДЭС	ГПЛ	ЭАС	ДЭС	ГПЛ	ЭАС	ДЭС	ГПЛ	ЭАС	ДЭС	ГПЛ	ЭАС
СУР74В16 дикого типа	0	0	100	0	4,8	95,2	19,7	55,9	24,4	58,0	22,7	19,3
СУР74В16 F291V	0	1,9	98,1	0	12,5	87,5	0	58,0	42,0	0	46,2	53,8
СУР74В16 A287G	0	1,8	98,2	0	27,7	72,3	0	52,4	47,6	35,5	44,0	20,5

Оба мутанта проявляли основную ЭАС и минорную ГПЛ активности в отношении этих субстратов.

Полученные результаты свидетельствуют о значении сайта «F/L toggle» (СРС-1), участка перегиба I-спирали (СРС-4) и ERR-триады в катализе СУР74. Превращение фермента СУР74В16 в АОС в результате точечной мутации E292G подтверждает важность этого сайта (локализованного в середине I-спирали) как детерминанты дивинилэфирсинтазной активности. Все известные ферменты СУР74, кроме ДЭС, содержат консервативный глицин в этом сайте. У всех известных ДЭС этот остаток глицина заменен на другой. Вторую мутацию V379F вносили в последовательность NtDES табака. В отличие от большинства ГПЛ и АОС, содержащих остатки ароматических ами-

нокислот в данном сайте, NtDES (как и другие ферменты CYP74D) содержит остаток валина. Полученная мутантная форма NtDES V379F потеряла большую часть ДЭС активности и вела себя в основном как АОС, продуцируя преимущественно α -кетол.

Кроме того, в данной работе описано превращение алленоксидсинтазы LeAOS3 (CYP74C3) томата в гидропероксидлиазу, вызванное единичными заменами в участке перегиба I-спирали (CPC-4) или ERR-триаде: F295I, S297A, K302S и T366Y. Каталитическое значение участка перегиба I-спирали для катализа CYP74 подтверждено данными рентгеноструктурного анализа двух алленоксидсинтаз: AtAOS (Lee *et al.*, 2008) *A. thaliana* и PaAOS *P. argentatum* (Li *et al.*, 2008).

Два дополнительных эксперимента по введению замен в участок перегиба I-спирали в последовательности фермента CYP74B16, а именно – замены F291V и A287G, привели к смещению активности ДЭС в сторону ГПЛ и ЭАС. Единственным исключением была реакция превращения 13-ГПОТ при участии мутантной формы CYP74B16 A287G, в которой образовывалось некоторое количество дивинилового эфира (ω 5Z)-этеролоеновой кислоты наряду с ГПЛ и ЭАС продуктами.

В работе (Lee *et al.*, 2008) впервые показано значение еще одного каталитически важного сайта – «F/L toggle» (CPC-1), в котором у АОС и ЭАС содержится остаток фенилаланина, тогда как у ГПЛ и ДЭС – остаток лейцина. Замена F137L в последовательности AtAOS (CYP74A1) *A. thaliana* привела к частичному превращению этой АОС в ГПЛ. Мы продолжили эксперименты по изучению влияния этого сайта на каталитические свойства ферментов CYP74. Аналогичную замену остатка фенилаланина на лейцин провели в последовательностях АОС разных подсемейств (CYP74A и CYP74C). Результаты сильно различались. Замена в последовательности ZmAOS1 (CYP74A19) кукурузы, в целом, привела к результатам, сходным с полученными в статье (Lee *et al.*, 2008); эта АОС приобрела частичную ГПЛ активность (и минорную ЭАС активность). В то же время, аналогичные замены в последователь-

ностях LeAOS3 (CYP74C3) томата и PrAOS2 (CYP74A8) мха *P. patens* привели в большей мере к превращению в ЭАС. Причем в отношении 9-гидроперекисей мутантные формы ZmAOS1 и PrAOS2 больше проявляли ЭАС активность, тогда как в отношении 13-гидроперекисей – больше ГПЛ активность. Подобная тенденция наблюдалась и в случае ферментов дикого типа подсемейства CYP74C, проявляющих двойную ГПЛ/ЭАС активность. В то же время, аналогичная замена в последовательности LuAOS (CYP74A1) вообще не привела к изменению типа каталитической активности. Кроме того, в работе (Lee *et al.*, 2008) авторы пытались провести обратное превращение ГПЛ в АОС. Однако это превращение не удалось. В данной работе впервые представлены результаты превращения ферментов, проявляющие двойную ГПЛ/ЭАС активность, в АОС в результате сайт-направленного мутагенеза.

По-видимому, наряду с сайтом «F/L toggle» (CPC-1), участком перегиба I-спирали (CPC-4) и ERR-триадой, на катализ CYP74 также влияют некоторые другие каталитически важные домены. Для изучения этого необходимы дальнейшие работы по сайт-направленному мутагенезу ферментов CYP74. Тем не менее, результаты настоящей работы однозначно демонстрируют, что последовательность сайта «F/L toggle» (CPC-1), участка перегиба I-спирали (CPC-4) и ERR-триады определяет тип катализа CYP74. Совокупность этих доменов можно рассматривать как своеобразные «отпечатки пальцев» ферментов CYP74, позволяющие (как правило) предсказать тип катализа по последовательности.

До настоящей работы был опубликован ряд данных о результатах сайт-направленного мутагенеза ферментов CYP74, а именно – AtAOS (CYP74A1) *A. thaliana* (Lee *et al.*, 2008), PrAOS1 (CYP74A8) и PrHPL1 (CYP74G1) *P. patens* (Scholz *et al.*, 2012), а также гидропероксидлиазы CYP74C13_MТ *M. truncatula* (CYP74C3 в работе Hughes *et al.*, 2008). Сайты, выбранные для мутаций, локализованы в пределах трех каталитически важных доменов или около них: «F/L toggle», участок перегиба I-спирали и ERR-триада. В целом,

результаты сайт-направленного мутагенеза ферментов одного типа были сходными: АОС частично или полностью преобразовывались в ГПЛ или оставались неизменными; в то время как ГПЛ оставались неизменными. Кинетические параметры мутантов CYP74C13_MT были значительно ниже, чем у фермента дикого типа (Hughes *et al.*, 2008). Для других ферментов данные о кинетике мутантных форм не опубликованы.

В настоящей работе получили и проанализировали следующие мутантные формы: LeAOS3 (CYP74C3) F108L, F295I, S297A, K302S и T366Y; CYP74C13_MT L97F, TCFNSF и L97F/TCFNSF; CYP74C1_CS L93F, G283A и L93F/G283A; CYP74C31 L98F, A287G и L98F/A287G; NtDES (CYP74D3) V379F; CYP74B16 E292G, A287G и F291V; а также ZmAOS1 F95L; LuAOS F155L и PrAOS2 F93L. В результате экспериментов 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. Это указывает 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-ОН. Во-вторых, алкоксильный радикал перегруппируется в эпоксиаллильный радикал (рис. 130). Эпоксиаллильный радикал является общим промежуточным продуктом CYP74 (рис. 130). В зависимости от первичной структуры CYP74 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 подвергается гомолитическому раскрытию оксирана с образованием винилоксихарбинильного радикала, который (3) рекомбинирует с гидроксильным радикалом с образо-

ванием полуацетала (ГПЛ путь), либо (4) окисляется и теряет протоны с образованием дивинилового эфира (ДЭС путь), см. рис. 130.

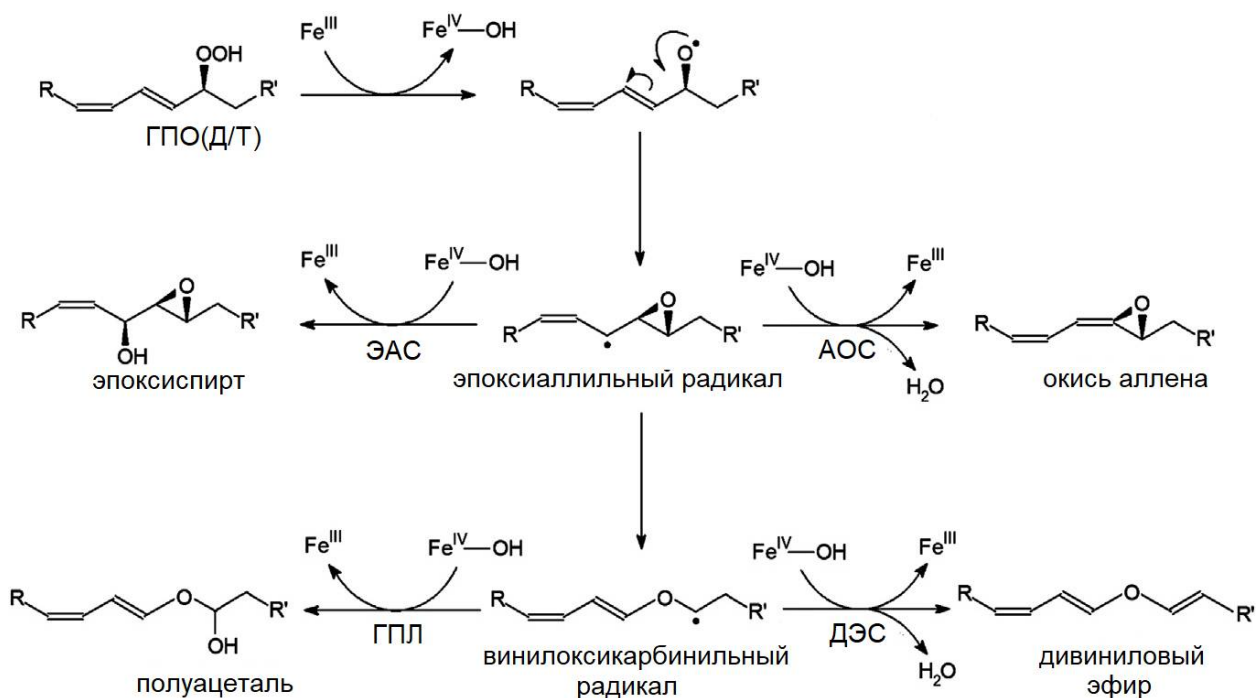


Рис. 130. Схема механизмов катализа АОС, ДЭС, ГПЛ и ЭАС.

Другими словами, заключительными стадиями ГПЛ и ЭАС реакций являются рекомбинации гидроксильного радикала (из соединения II, FeIV-OH) с эпоксиаллильным радикалом или винилоксикарбиным радикалом соответственно. С другой стороны, отщепление протонов от тех же радикальных интермедиатов приводит к образованию окиси аллена или дивинилового эфира. При этом в зависимости от свойств конкретной ДЭС стереоспецифичность депротонирования может различаться (Hamberg, 2005). Например, в случае NtDES и RaDES образуются *транс*- и *цис*-виниловые эфирные связи соответственно. Родство механизмов реакций ферментов СУР74 делает возможным их взаимное превращение посредством сайт-направленного мутагенеза.

В результате экспериментов по сайт-направленному метагенезу было также сделано предположение об эволюции реакций, катализируемых ферментами СУР74. Эволюция реакций, по-видимому, шла по пути эпоксиалкогольсинтазная – гидропероксидлиазная – алленоксидсинтазная – дивинилэфирсинтазная. С точки зрения молекулярной эволюции эпоксиалкогольсин-

тазная 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 СУР74 дикого типа, обладает двумя или тремя активностями. Возможное объяснение этому может быть в конформационной пластичности цитохромов Р450 в целом, которая позволяет им адаптироваться к разным субстратам. Для части цитохромов Р450 главной функцией является утилизация потенциально вредных и опасных молекул. Поскольку организм может сталкиваться все с новыми и новыми подобными соединениями – возможными субстратами Р450, а образование новых ферментов Р450 не может идти с той же скоростью, должна быть возможность утилизировать эти молекулы.

Появление предковых форм ферментов СУР74, по-видимому, связано с накоплением молекулярного кислорода в атмосфере, в результате чего появилась необходимость избавления клетки от окисленных активными формами кислорода жирных кислот, входящих в состав мембран. Предковые формы цитохромов Р450, в целом, могли участвовать в защитных процессах и обходиться только продуктом спонтанного окисления биополимеров, без молекулярного кислорода и партнеров. Возможно, ферменты СУР74, осуществляющие подобную реакцию в отношении гидроперекисей жирных кислот, являются рудиментарными представителями или непосредственными потомками этой древней группы кислород-независимых цитохромов Р450. Эти ферменты катализировали преобразование окисленных жирных кислот в ряд диффундирующих и летучих соединений. Закрепление ферментов СУР74 в

эволюции, по-видимому, произошло из-за того, что один из синтезируемых продуктов встроился в метаболизм и дал организму определенное преимущество в адаптации. А дальнейшая эволюция пошла не по пути специализации на синтезе этого продукта, а по пути встраивания другого (или других) продуктов также в метаболизм, вследствие чего сохранились ферменты с двойной и тройной активностью, что впоследствии также, по-видимому, дало определенное преимущество. В результате образовались разные по специализации ферменты СУР74. Их можно условно разделить на две группы.

К первой группе относятся алленоксидсинтазы – ферменты, специфически продуцирующие окиси аллена, которые, в свою очередь, являются предшественниками, как минимум, трех известных групп метаболитов: жасмонатов, циклопентенонов и кетолов. Для жасмонатов и циклопентенонов 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 (альдокислоты). Продукты ЭАС и ДЭС реакций изучены наименее подробно, однако для ряда продуктов этих ветвей показаны антимикробные и фунгицидные свойства. При этом в одном ферменте СУР74 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 СУР74, 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 СУР74 подтверждается особенностями механизмов каталитического действия, структуры и филогенетического положения. Практически все цитохромы Р450 являются монооксигеназами и для их каталитического действия необходимы молекулярный кислород, окислительно-восстановительный партнер и непосредственно окисляемый субстрат. Уникальной особенностью всех ферментов СУР74 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 СУР74 является более простым по сравнению с таковым классических цитохромов Р450 (рис. 131).

С точки зрения структурных особенностей, гем-связывающий домен ферментов СУР74 по сравнению с остальными цитохромами Р450 содержит дополнительный мотив из девяти аминокислотных остатков (рис. 132). С эволюционной точки зрения, делеция девяти аминокислотных остатков является более вероятным событием, чем встраивание. Гипотезу о древнем происхождении СУР74 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 Р450 (рис. 133), чтобы выяснить место, занимаемое на нем фермен-

тами CYP74. Для построения были взяты все цитохромы P450 четырех организмов: *C. sativus* (Cs), *S. moellendorffii* (Sm), *N. vectensis* (Nv) и *E. siliculosus* (Es). Ранее филогенетические исследования суперсемейства P450 уже проводились профессором Нельсоном (рис. 134). На обоих деревьях семейство CYP74 находится в корне. То есть, данные филогенетического анализа также подтверждают, что ферменты CYP74 являются наиболее древними из всех современных цитохромов P450.

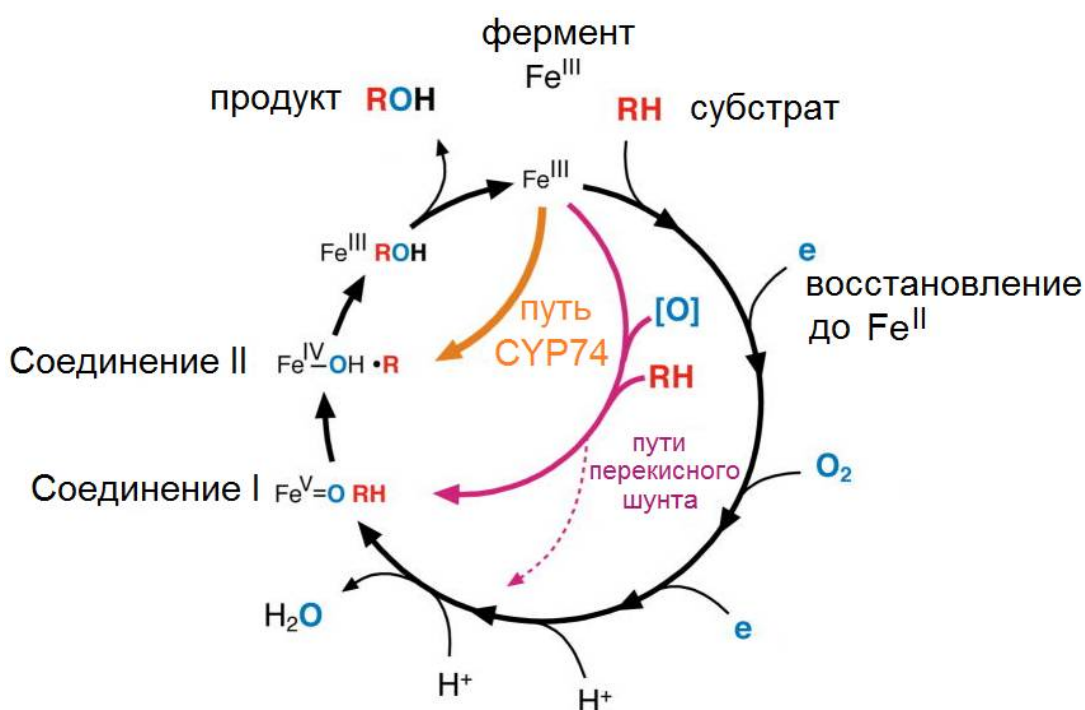


Рис. 131. Каталитический цикл цитохромов P450 (Brash, 2009). Типичный путь гидроксирования или эпоксицирования следует полному круговому маршруту (черный). В случае типичных цитохромов P450 (гидроксилаз и эпоксидаз) цикл может быть укорочен через путь перекисного шунта, в котором донор кислорода окисляет фермент Fe^{III} двумя эквивалентами с образованием непосредственно Соединения I (пурпурный путь). Если в качестве донора кислорода используется H₂O₂, она замыкает цикл на промежуточное соединение Fe[O₂] до образования Соединения I (перекисный шунт, пунктирная линия). В случае ферментов CYP74 и родственных ферментов, таких как простагландинсинтаза и тромбоксансинтаза, расщепление перекиси ферментом Fe^{III} приводит непосредственно к образованию Соединения II (оранжевый путь).

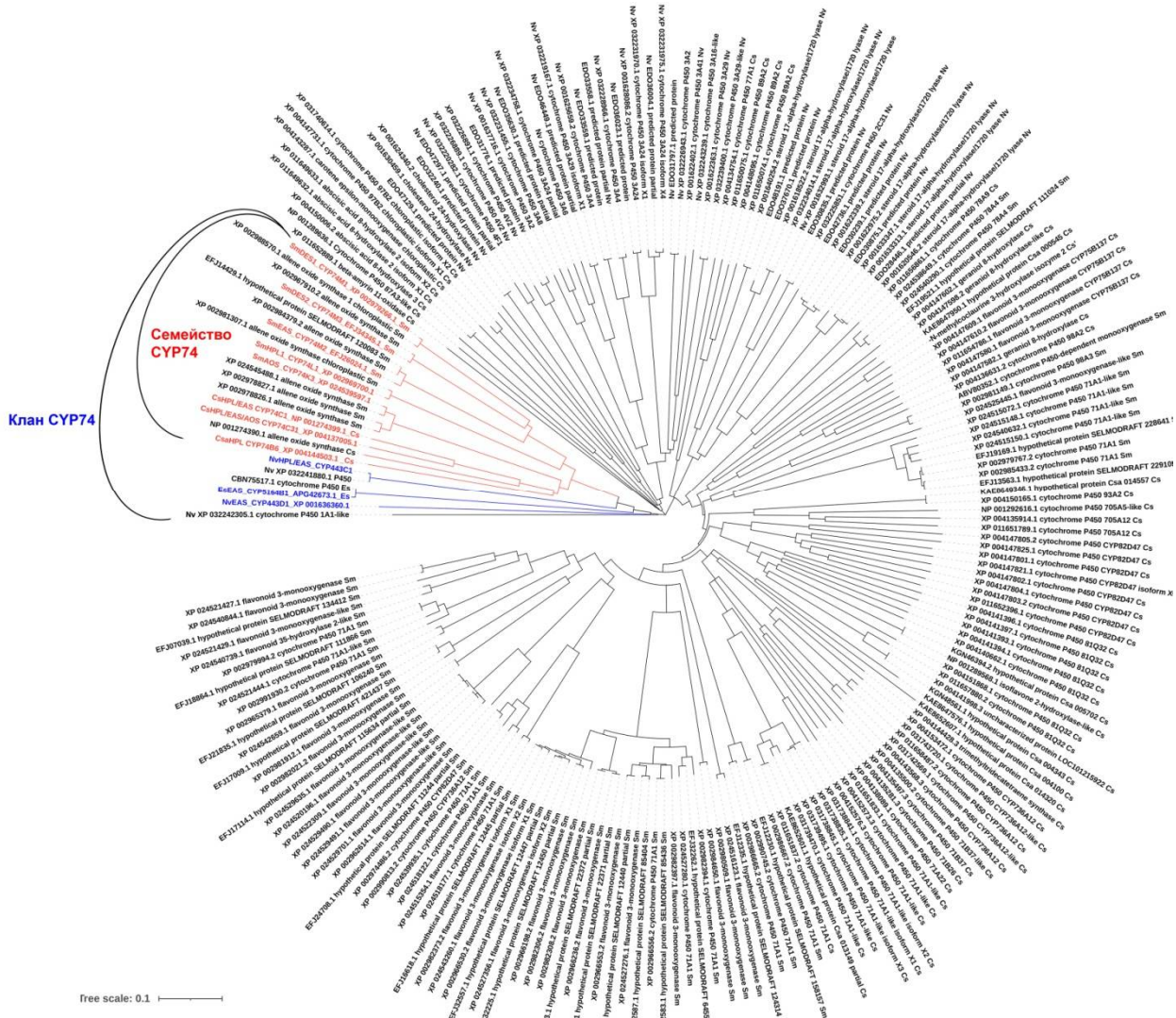


Рис. 133. Филогенетическое древо цитохромов P450 *C. sativus* (Cs), *S. moellendorffii* (Sm), *N. vectensis* (Nv) и *E. siliculosus* (Es). Красным цветом выделены охарактеризованные ферменты семейства CYP74, синим цветом – охарактеризованные ферменты клана CYP74.

Первой обнаруженной эпоксиалкогольсинтазой был фермент CYP440A1 (VfEAS) 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.

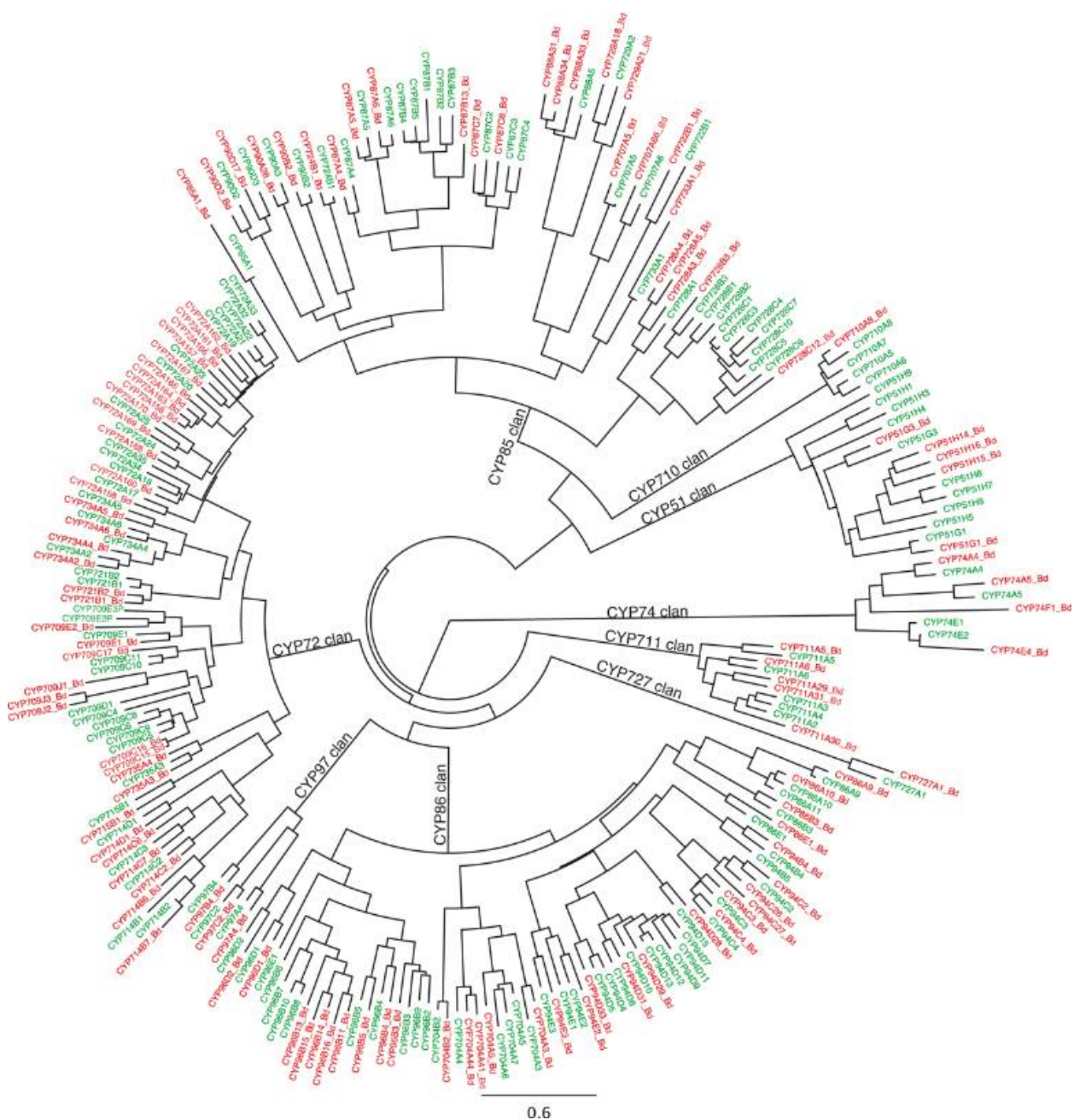


Рис. 136. Филогенетическое древо последовательностей P450 риса и *Brachypodium distachyon* (Nelson, Werck-Reichhart, 2011).

Таким образом, как мы предполагаем, ферменты CYP74 являются предшественниками или потомками древних кислород-независимых цитохромов P450, существовавшими уже около 850 млн лет назад (до разделения линий эукариот), а эпоксиалкогольсинтазы – наиболее древними среди ферментов CYP74.

В то время как АОС и ГПЛ широко распространены во всех геномах растений, ДЭС и ЭАС встречаются значительно реже. В то же время, посте-

пенно увеличивается разнообразие растений, у которых выявлены эти два типа ферментов. Иногда эти ферменты встречаются в новых подсемействах СУР74 (например, СУР74Н1 чеснока, СУР74Q1 лютика едкого или все ферменты подсемейства СУР74М *S. moellendorffii*) или хорошо известных подсемействах, в которых трудно было ожидать их присутствия, например RjEAS (СУР74А88) в подсемействе СУР74А или фермент СУР74В16 в подсемействе СУР74В. Таким образом, в будущем можно ожидать выявления новых белков семейства (клана) СУР74. Древо клана СУР74 продолжает расти, и, безусловно, есть еще большие пробелы, которые необходимо заполнить.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липоксигеназный каскад прочно занимает свое достойное место среди других жизненно необходимых систем, являясь источником таких широко изучаемых оксипиринов как, например, жасмонаты, летучие соединения и травматины 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 чис-

ло 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. Выявлена 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 изомеразы. 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 VfEAS 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 (VfEAS) 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 изомеразами. 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 эпоксиспирта.
3. Показано, что растительные эпоксиалкогольсинтазы, а также EsEAS бурой водоросли *E. siliculosus*, синтезируют, в основном, (S,S,S)-эпимеры эпоксиспиртов (*транс-эритро*), тогда как VfEAS 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 (ω 3)-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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aghofack-Nguemezi J., Schwab W. Spatiotemporal changes in the Content and Metabolism of 9, 12, 13-Trihydroxy-10 (E)-Octadecenoic Acid in Tomato (*Solanum Lycopersicum* L. CV Balkonsar) fruits //Journal of Science and Technology (Ghana). – 2013. – Т. 33. – №. 1. – С. 12-22.
2. Ali M. et al. Jasmonic acid signaling pathway in response to abiotic stresses in plants //International journal of molecular sciences. – 2020. – Т. 21. – №. 2. – С. 621.
3. Allmann S., Baldwin I. T. Insects betray themselves in nature to predators by rapid isomerization of green leaf volatiles //Science. – 2010. – Т. 329. – №. 5995. – С. 1075-1078.
4. Almosnino A. M., Bensoussan M., Belin J. M. Unsaturated fatty acid bioconversion by apple pomace enzyme system. Factors influencing the production of aroma compounds //Food chemistry. – 1996. – Т. 55. – №. 4. – С. 327-332.
5. An J. U. et al. Microbial synthesis of linoleate 9S-lipoxygenase derived plant C18 oxylipins from C18 polyunsaturated fatty acids //Journal of agricultural and food chemistry. – 2019. – Т. 67. – №. 11. – С. 3209-3219.
6. An J. U., Hong S. H., Oh D. K. Regiospecificity of a novel bacterial lipoxygenase from *Myxococcus xanthus* for polyunsaturated fatty acids //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2018. – Т. 1863. – №. 8. – С. 823-833.
7. Andersson M. X. et al. Oxylipin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*: formation of a novel oxo-phytodienoic acid-containing galactolipid, arabidopside E //Journal of Biological Chemistry. – 2006. – Т. 281. – №. 42. – С. 31528-31537.
8. Andreou A. Z. et al. Properties of a mini 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutant forms //Phytochemistry. – 2008. – Т. 69. – №. 9. – С. 1832-1837.

9. Andreou A., Brodhun F., Feussner I. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals //Progress in lipid research. – 2009. – T. 48. – №. 3-4. – C. 148-170.
10. Andreou A., Feussner I. Lipoxygenases—structure and reaction mechanism //Phytochemistry. – 2009. – T. 70. – №. 13-14. – C. 1504-1510.
11. Andrianarison R. H., Beneytout J. L., Tixier M. An enzymatic conversion of lipoxygenase products by a hydroperoxide lyase in blue-green algae (*Oscillatoria* sp.) //Plant physiology. – 1989. – T. 91. – №. 4. – C. 1280-1287.
12. Anke H., Morales P., Sterner O. Assays of the biological activities of two fatty acid derivatives formed in the edible mushrooms *Cantharellus cibarius* and *C. tubaeformis* as a response to injury //Planta medica. – 1996. – T. 62. – №. 02. – C. 181-183.
13. Arimura G., Matsui K., Takabayashi J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions //Plant and Cell Physiology. – 2009. – T. 50. – №. 5. – C. 911-923.
14. Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons //Annual review of plant biology. – 1999. – T. 50. – №. 1. – C. 601-639.
15. Aslund F. et al. Efficient production of disulfide bonded proteins in the cytoplasm in “oxidizing” mutants of *E. coli* //Innovations. – 1999. – T. 10. – C. 11-12.
16. Assaf S., Hadar Y., Dosoretz C. G. Biosynthesis of 13-hydroperoxylinoleate, 10-oxo-8-decenoic acid and 1-octen-3-ol from linoleic acid by a mycelial-pellet homogenate of *Pleurotus pulmonarius* //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1995. – T. 43. – №. 8. – C. 2173-2178.
17. Bai X. W. et al. Determination of Fatty Acids (C 1–C 10) from Bryophytes and Pteridophytes //Chromatographia. – 2010. – T. 71. – №. 11. – C. 1125-1129.

18. Baldauf S. L. et al. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data //Science. – 2000. – T. 290. – №. 5493. – C. 972-977.
19. Baldwin I. T. et al. Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era //science. – 2006. – T. 311. – №. 5762. – C. 812-815.
20. Ballaré C. L. Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals //Trends in plant science. – 2011. – T. 16. – №. 5. – C. 249-257.
21. Bandara P. et al. Cloning and functional characterization of key enzymes in putative octadecanoid pathway of *Physcomitrella patens* //Tropical Agricultural Research. – 2012. – T. 23. – №. 2.
22. Banks J. A. et al. The Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants //science. – 2011. – T. 332. – №. 6032. – C. 960-963.
23. Bannenberg G. et al. Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana* //Lipids. – 2009a. – T. 44. – №. 2. – C. 85.
24. Bannenberg G. et al. Functional analysis of α -DOX2, an active α -dioxygenase critical for normal development in tomato plants //Plant physiology. – 2009b. – T. 151. – №. 3. – C. 1421-1432.
25. Bate N. J. et al. Molecular characterization of an Arabidopsis gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible //Plant Physiology. – 1998a. – T. 117. – №. 4. – C. 1393-1400.
26. Bate N. J. et al. Quantitative and qualitative differences in C6-volatile production from the lipoxygenase pathway in an alcohol dehydrogenase mutant of *Arabidopsis thaliana* //Physiologia Plantarum. – 1998b. – T. 104. – №. 1. – C. 97-104.

27. Baur C., Grosch W. Investigation about the taste of di, tri-and tetrahydroxy fatty acid //Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-forschung. – 1977. – T. 165. – №. 2. – C. 82-84.
28. Beckwith J. et al. The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm //Journal of Biological Chemistry. – 1997. – T. 272. – №. 25. – C. 15661-15667.
29. Behrendorff J. B. Y. H., Huang W., Gillam E. M. J. Directed evolution of cytochrome P450 enzymes for biocatalysis: exploiting the catalytic versatility of enzymes with relaxed substrate specificity //Biochemical Journal. – 2015. – T. 467. – №. 1. – C. 1-15.
30. Bernart M. W., Gerwick W. H. Eicosanoids from the tropical red alga *Murrayella pericladus* //Phytochemistry. – 1994. – T. 36. – №. 5. – C. 1233-1240.
31. Bernart M. W., Whatley G. G., Gerwick W. H. Unprecedented oxylipins from the marine green alga *Acrosiphonia coalita* //Journal of natural products. – 1993. – T. 56. – №. 2. – C. 245-259.
32. Bernhardt R., Urlacher V. B. Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations //Applied microbiology and biotechnology. – 2014. – T. 98. – №. 14. – C. 6185-6203.
33. Bettinger H. F. The Oxyallyl Diradical: Observation of the Singlet and Triplet State by Negative-Ion Photoelectron Spectroscopy //Angewandte Chemie International Edition. – 2010. – T. 49. – №. 4. – C. 670-671.
34. Bhagwat S. S. et al. Synthesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A₂ //Nature. – 1985. – T. 315. – №. 6019. – C. 511-513.
35. Blée E. Biosynthesis of phytooxylipins: the peroxygenase pathway //Lipid/Fett. – 1998. – T. 100. – №. 4-5. – C. 121-127.
36. Blée E. et al. A non-canonical caleosin from *A. rabidopsis* efficiently epoxidizes physiological unsaturated fatty acids with complete

- stereoselectivity //The FEBS journal. – 2012. – T. 279. – №. 20. – C. 3981-3995.
37. Blée E. et al. Mechanism of reaction of fatty acid hydroperoxides with soybean peroxygenase //Journal of Biological Chemistry. – 1993. – T. 268. – №. 3. – C. 1708-1715.
38. Blée E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense //Trends in plant science. – 2002. – T. 7. – №. 7. – C. 315-322.
39. Blée E., Joyard J. Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides //Plant Physiology. – 1996. – T. 110. – №. 2. – C. 445-454.
40. Blée E., Schuber F. Stereochemistry of the epoxidation of fatty acids catalyzed by soybean peroxygenase //Biochemical and biophysical research communications. – 1990. – T. 173. – №. 3. – C. 1354-1360.
41. Boeglin W. E. et al. Investigation of substrate binding and product stereochemistry issues in two linoleate 9-lipoxygenases //Lipids. – 2008. – T. 43. – №. 11. – C. 979-987.
42. Bolton S., Null G., Troetel W. M. The medical uses of garlic fact and fiction //American pharmacy. – 1982. – T. 22. – №. 8. – C. 40-43.
43. Bonzom P. M. et al. NMR lipid profile of *Agaricus bisporus* //Phytochemistry. – 1999. – T. 50. – №. 8. – C. 1311-1321.
44. Boonprab K. et al. C6-aldehyde formation by fatty acid hydroperoxide lyase in the brown alga *Laminaria angustata* //Zeitschrift Für Naturforschung C. – 2003. – T. 58. – №. 3-4. – C. 207-214.
45. Böttcher C., Weiler E. W. cyclo-Oxylipin-galactolipids in plants: occurrence and dynamics //Planta. – 2007. – T. 226. – №. 3. – C. 629-637.
46. Bourel G. et al. Fatty acid hydroperoxide lyase of green bell pepper: cloning in *Yarrowia lipolytica* and biogenesis of volatile aldehydes //Enzyme and microbial technology. – 2004. – T. 35. – №. 4. – C. 293-299.
47. Bouwmeester H. et al. The role of volatiles in plant communication //The Plant Journal. – 2019. – T. 100. – №. 5. – C. 892-907.

48. Brandenberg O. F., Fasan R., Arnold F. H. Exploiting and engineering hemoproteins for abiological carbene and nitrene transfer reactions //Current opinion in biotechnology. – 2017. – T. 47. – C. 102-111.
49. Brash A. R. et al. An ancient relative of cyclooxygenase in cyanobacteria is a linoleate 10*S*-dioxygenase that works in tandem with a catalase-related protein with specific 10*S*-hydroperoxide lyase activity //Journal of Biological Chemistry. – 2014. – T. 289. – №. 19. – C. 13101-13111.
50. Brash A. R. et al. Isolation and characterization of natural allene oxides: unstable intermediates in the metabolism of lipid hydroperoxides //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988. – T. 85. – №. 10. – C. 3382-3386.
51. Brash A. R. et al. Isolation and characterization of two geometric allene oxide isomers synthesized from 9*S*-hydroperoxylinoleic acid by cytochrome P450 CYP74C3: stereochemical assignment of natural fatty acid allene oxides //Journal of Biological Chemistry. – 2013. – T. 288. – №. 29. – C. 20797-20806.
52. Brash A. R. et al. On non-cyclooxygenase prostaglandin synthesis in the sea whip coral, *Plexaura homomalla*: an 8(*R*)-lipoxygenase pathway leads to formation of an alpha-ketol and a racemic prostanoid //Journal of Biological Chemistry. – 1987. – T. 262. – №. 33. – C. 15829-15839.
53. Brash A. R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate //Journal of Biological Chemistry. – 1999. – T. 274. – C. 23679-23682.
54. Brash A. R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes //Phytochemistry. – 2009. – T. 70. – №. 13-14. – C. 1522-1531.
55. Brash A. R., Ingram C. D., Harris T. M. Analysis of a specific oxygenation reaction of soybean lipoxygenase-1 with fatty acids esterified in phospholipids //Biochemistry. – 1987. – T. 26. – №. 17. – C. 5465-5471.

56. Brodhun F., Feussner I. Oxylipins in fungi //The FEBS journal. – 2011. – T. 278. – №. 7. – C. 1047-1063.
57. Browse J. Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants //Vitamins & Hormones. – 2005. – T. 72. – C. 431-456.
58. Bryant R. W., Bailey J. M. Isolation of a new lipoxygenase metabolite of arachidonic acid, 8,11,12-trihydroxy-5,9,14-eicosatrienoic acid from human platelets //Prostaglandins. – 1979. – T. 17. – №. 1. – C. 9-18.
59. Bryant R. W., Bailey J. M. Role of selenium-dependent glutathione peroxidase in platelet lipoxygenase metabolism //Progress in lipid research. – 1981. – T. 20. – C. 189-194.
60. Bryant R. W., Simon T. C., Bailey J. M. Role of glutathione peroxidase and hexose monophosphate shunt in the platelet lipoxygenase pathway //Journal of Biological Chemistry. – 1982. – T. 257. – №. 24. – C. 14937-14943.
61. Buchhaupt M. et al. Synthesis of green note aroma compounds by biotransformation of fatty acids using yeast cells coexpressing lipoxygenase and hydroperoxide lyase //Applied microbiology and biotechnology. – 2012. – T. 93. – №. 1. – C. 159-168.
62. Buseman C. M. et al. Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in Arabidopsis leaves //Plant physiology. – 2006. – T. 142. – №. 1. – C. 28-39.
63. Busse W. W. Leukotrienes and inflammation //American journal of respiratory and critical care medicine. – 1998. – T. 157. – №. 6. – C. S210-S213.
64. Caldelari D., Farmer E. E. A rapid assay for the coupled cell free generation of oxylipins //Phytochemistry. – 1998. – T. 47. – №. 4. – C. 599-604.
65. Cameron C. B., Garey J. R., Swalla B. J. Evolution of the chordate body plan: new insights from phylogenetic analyses of deuterostome phyla

- //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – T. 97. – №. 9. – C. 4469-4474.
66. Cass B. J. et al. Production of tomato flavor volatiles from a crude enzyme preparation using a hollow-fiber reactor //Biotechnology and bioengineering. – 2000. – T. 67. – №. 3. – C. 372-377.
67. Carella P. Xylem-mobile oxylipins are critical regulators of induced systemic resistance in maize. – 2020.
68. Challis J. R. G., Gibb W. Control of parturition // Prenatal and Neonatal Medicine. – 1996. – T. 1. – C. 283-291.
69. Chan T. H., Ong B. S. Chemistry of allene oxides //Tetrahedron. – 1980. – T. 36. – №. 16. – C. 2269-2289.
70. Chang M. S. et al. Cytochrome P450-dependent transformations of 15*R*- and 15*S*-hydroperoxyeicosatetraenoic acids: stereoselective formation of epoxy alcohol products //Biochemistry. – 1996. – T. 35. – №. 2. – C. 464-471.
71. Chechetkin I. R. et al. A lipoxygenase-divinyl ether synthase pathway in flax (*Linum usitatissimum* L.) leaves //Phytochemistry. – 2008. – T. 69. – №. 10.
72. Chechetkin I. R. et al. Detection and identification of complex oxylipins in meadow buttercup (*Ranunculus acris*) leaves //Phytochemistry. – 2019. – T. 157. – C. 92-102.
73. Chechetkin I. R. et al. Isolation and structure elucidation of linolipins C and D, complex oxylipins from flax leaves //Phytochemistry. – 2013. – T. 96. – C. 110-116.
74. Chechetkin I. R. et al. Oxidation of glycerolipids by maize 9-lipoxygenase and its A562G mutant //Chemistry and physics of lipids. – 2011. – T. 164. – №. 3. – C. 216-220.
75. Chechetkin I. R. et al. Unprecedented pathogen-inducible complex oxylipins from flax–linolipins A and B //The FEBS journal. – 2009. – T. 276. – №. 16. – C. 4463-4472.

76. Chehab E. W. et al. Rice HYDROPEROXIDE LYASES with unique expression patterns generate distinct aldehyde signatures in *Arabidopsis* //Plant physiology. – 2006. – T. 141. – №. 1. – C. 121-134.
77. Chen X. et al. Plant specialized metabolism regulated by jasmonate signaling //Plant and Cell Physiology. – 2019. – T. 60. – №. 12. – C. 2638-2647.
78. Chiba T. et al. The precise structures and stereochemistry of trihydroxy-linoleates esterified in human and porcine epidermis and their significance in skin barrier function //Journal of Biological Chemistry. – 2016. – T. 291. – №. 28. – C. 14540-14554.
79. Choi H. et al. Cymatherelactone and cymatherols A– C, polycyclic oxylipins from the marine brown alga *Cymathere triplicata* //Phytochemistry. – 2012. – T. 73. – C. 134-141.
80. Choi H. G. et al. Inhibition of prostaglandin D2 production by trihydroxy fatty acids isolated from *Ulmus davidiana* var. *japonica* //Phytotherapy Research. – 2013. – T. 27. – №. 9. – C. 1376-1380.
81. Christensen S. A. et al. Maize death acids, 9-lipoxygenase-derived cyclopente(a)nonenes, display activity as cytotoxic phytoalexins and transcriptional mediators //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – T. 112. – №. 36. – C. 11407-11412.
82. Christie W. W., Harwood J. L. Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators //Essays in biochemistry. – 2020. – T. 64. – №. 3. – C. 401-421.
83. Činčala L. et al. Investigation of plant sources of hydroperoxide lyase for 2(*E*)-hexenal production //Acta Chimica Slovaca. – 2015. – T. 8. – №. 2. – C. 156-165.
84. Claeys M. et al. Metabolism of linoleic acid by porcine leukocytes //Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie. – 1984. – T. 92. – №. 2. – C. P17-P19.

85. Cock J. M. et al. The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae //Nature. – 2010. – T. 465. – №. 7298. – C. 617-621.
86. Coffa G., Brash A. R. A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: stereocontrol is linked to the position of oxygenation //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – T. 101. – №. 44. – C. 15579-15584.
87. Collado-González J. et al. Effects of deficit irrigation, rootstock, and roasting on the contents of fatty acids, phytoprostanes, and phytofurans in pistachio kernels //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2020. – T. 68. – №. 33. – C. 8915-8924.
88. Collado-González J. et al. Phytoprostanes //Lipid Technology. – 2015. – T. 27. – №. 6. – C. 127-130.
89. Collado-González J. et al. The phytoprostane content in green table olives is influenced by Spanish-style processing and regulated deficit irrigation //LWT-Food Science and Technology. – 2015. – T. 64. – №. 2. – C. 997-1003.
90. Corey E. J. et al. Biomimetic synthesis of a preclavulone a model //Tetrahedron letters. – 1987a. – T. 28. – №. 31. – C. 3547-3550.
91. Corey E. J. et al. Intermediacy of 8-(R)-HPETE in the conversion of arachidonic acid to pre-clavulone a by *Clavularia viridis*. Implications for the biosynthesis of marine prostanoids //Journal of the American Chemical Society. – 1987b. – T. 109. – №. 1. – C. 289-290.
92. Corey E. J., Lansbury Jr P. T., Yamada Y. Identification of a new eicosanoid from in vitro biosynthetic experiments with *clavularia viridis*. Implications for the biosynthesis of clavulones //Tetrahedron letters. – 1985. – T. 26. – №. 35. – C. 4171-4174.
93. Cowley T., Walters D. Local and systemic effects of oxylipins on powdery mildew infection in barley //Pest Management Science: formerly Pesticide Science. – 2005. – T. 61. – №. 6. – C. 572-576.

94. Cristea M., Oliw E. H. A G316A mutation of manganese lipoxygenase augments hydroperoxide isomerase activity: mechanism of biosynthesis of epoxyalcohols //Journal of Biological Chemistry. – 2006. – T. 281. – №. 26. – C. 17612-17623.
95. Croft K. P. C., Juttner F., Slusarenko A. J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* //Plant physiology. – 1993. – T. 101. – №. 1. – C. 13-24.
96. Croisier E., Rempt M., Pohnert G. Survey of volatile oxylipins and their biosynthetic precursors in bryophytes //Phytochemistry. – 2010. – T. 71. – №. 5-6. – C. 574-580.
97. Crombie L., Morgan D. O., Smith E. H. An isotopic study (²H and ¹⁸O) of the enzymic conversion of linoleic acid into colneleic acid with carbon chain fracture: the origin of shorter chain aldehydes //Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1. – 1991. – №. 3. – C. 567-575.
98. Croteau R., Kolattukudy P. E. Enzymatic epoxidation of 18-hydroxyoleic acid to 18-hydroxy-*cis*-9,10-epoxystearic acid by a particulate preparation from spinach (*Spinacia oleracea*) //Arch. Biochem. Biophys. – 1975. – T. 170. – C. 61-72.
99. D'Alessandro M., Turlings T. C. J. *In situ* modification of herbivore-induced plant odors: a novel approach to study the attractiveness of volatile organic compounds to parasitic wasps //Chemical senses. – 2005. – T. 30. – №. 9. – C. 739-753.
100. D'Auria J. C. et al. Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (*Z*)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana* //The Plant Journal. – 2007. – T. 49. – №. 2. – C. 194-207.
101. Dave A. et al. 12-Oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in *Arabidopsis* //The Plant Cell. – 2011. – T. 23. – №. 2. – C. 583-599.

102. Davoine C. et al. Adducts of oxylipin electrophiles to glutathione reflect a 13 specificity of the downstream lipoxygenase pathway in the tobacco hypersensitive response //Plant Physiology. – 2006. – T. 140. – №. 4. – C. 1484-1493.
103. De Domenico S. et al. Subcellular localisation of *Medicago truncatula* 9/13-hydroperoxide lyase reveals a new localisation pattern and activation mechanism for CYP74C enzymes //BMC plant biology. – 2007. – T. 7. – №. 1. – C. 1-13.
104. De Domenico S. et al. Oxylipin dynamics in *Medicago truncatula* in response to salt and wounding stresses //Physiologia plantarum. – 2019. – T. 165. – №. 2. – C. 198-208.
105. d'Ippolito G. et al. Lipoxygenases and lipoxygenase products in marine diatoms //Methods in enzymology. – Academic Press, 2018. – T. 605. – C. 69-100.
106. de León I. P., Hamberg M., Castresana C. Oxylipins in moss development and defense //Frontiers in plant science. – 2015. – T. 6. – C. 483.
107. Delsuc F. et al. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates //Nature. – 2006. – T. 439. – №. 7079. – C. 965-968.
108. De Montellano P. R. O. (ed.). Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry. – Springer Science & Business Media, 2005.
109. Deboever E. et al. Plant–pathogen interactions: underestimated roles of phyto-oxylipins //Trends in plant science. – 2020. – T. 25. – №. 1. – C. 22-34.
110. Denisov I. G. et al. Structure and chemistry of cytochrome P450 //Chemical reviews. – 2005. – T. 105. – №. 6. – C. 2253-2278.
111. Dittami S. M. et al. Integrative analysis of metabolite and transcript abundance during the short-term response to saline and oxidative stress in the brown alga *Ectocarpus siliculosus* //Plant, cell & environment. – 2011. – T. 34. – №. 4. – C. 629-642.

112. Dix T. A., Marnett L. J. Conversion of linoleic acid hydroperoxide to hydroxy, keto, epoxyhydroxy, and trihydroxy fatty acids by hematin //Journal of Biological Chemistry. – 1985. – T. 260. – №. 9. – C. 5351-5357.
113. Dix T. A., Marnett L. J. Hematin-catalyzed rearrangement of hydroperoxylinoleic acid to epoxy alcohols via an oxygen rebound //Journal of the American Chemical Society. – 1983. – T. 105. – №. 23. – C. 7001-7002.
114. Domínguez-Perles R. et al. Sorting out the phytoprostane and phytofuran profile in vegetable oils //Food Research International. – 2018. – T. 107. – C. 619-628.
115. Domínguez-Perles R. et al. Update on oxidative stress and inflammation in pregnant women, unborn children (nasciturus), and newborns– Nutritional and dietary effects //Free Radical Biology and Medicine. – 2019. – T. 142. – C. 38-51.
116. Dueckershoff K. et al. Impact of cyclopentenone-oxylipins on the proteome of *Arabidopsis thaliana* //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics. – 2008. – T. 1784. – №. 12. – C. 1975-1985.
117. Durand T. et al. New bioactive oxylipins formed by non-enzymatic free-radical-catalyzed pathways: the phytoprostanes //Lipids. – 2009. – T. 44. – №. 10. – C. 875-888.
118. Edin M. L. et al. Epoxide hydrolase 3 (Ephx3) gene disruption reduces ceramide linoleate epoxide hydrolysis and impairs skin barrier function //Journal of Biological Chemistry. – 2021. – T. 296.
119. Engelberth J. et al. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – T. 101. – №. 6. – C. 1781-1785.
120. Espelie K. E., Dean B. B., Kolattukudy P. E. Composition of lipid-derived polymers from different anatomical regions of several plant species //Plant Physiology. – 1979. – T. 64. – №. 6. – C. 1089-1093.

121. Espinel-Ingroff A. Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to caspofungin acetate (MK-0991) // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2003. – T. 41. – №. 1. – C. 403-409.
122. Esterbauer H., Schauenstein E. Isomeric trihydroxy-octadecenoic acids in beer: Evidence for their presence and quantitative determination (author's transl) // *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-forschung*. – 1977. – T. 164. – №. 4. – C. 255-259.
123. Falardeau P., Hamberg M., Samuelsson B. Metabolism of 8,11,14-eicosatrienoic acid in human platelets // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. – 1976. – T. 441. – №. 2. – C. 193-200.
124. Fammartino A. et al. Characterization of a divinyl ether biosynthetic pathway specifically associated with pathogenesis in tobacco // *Plant Physiology*. – 2007. – T. 143. – №. 1. – C. 378-388.
125. Fammartino A. et al. Coordinated transcriptional regulation of the divinyl ether biosynthetic genes in tobacco by signal molecules related to defense // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2010. – T. 48. – №. 4. – C. 225-231.
126. Farmer E. E. Surface-to-air signals // *Nature*. – 2001. – T. 411. – №. 6839. – C. 854-856.
127. Farmer E. E., Davoine C. Reactive electrophile species // *Current opinion in plant biology*. – 2007. – T. 10. – №. 4. – C. 380-386.
128. Farmer E. E., Ryan C. A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1990. – T. 87. – №. 19. – C. 7713-7716.
129. Farmer E. E., Ryan C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors // *The Plant Cell*. – 1992. – T. 4. – №. 2. – C. 129-134.

130. Fatouros N. E. et al. Herbivore-induced plant volatiles mediate in-flight host discrimination by parasitoids //Journal of chemical ecology. – 2005. – T. 31. – №. 9. – C. 2033-2047.
131. Fauconnier M. L. et al. Conversion of green note aldehydes into alcohols by yeast alcohol dehydrogenase //Biotechnology letters. – 1999. – T. 21. – №. 7. – C. 629-633.
132. Fauconnier M. L. et al. Potato tuber phospholipids contain colneleic acid in the 2-position //FEBS letters. – 2003. – T. 538. – №. 1-3. – C. 155-158.
133. Fauconnier M. L. et al. Purification and characterization of tomato leaf (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hydroperoxide lyase //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1997. – T. 45. – №. 11. – C. 4232-4236.
134. Fauconnier M. L., Marlier M. An efficient procedure for the production of fatty acid hydroperoxides from hydrolyzed flax seed oil and soybean lipoxygenase //Biotechnology techniques. – 1996. – T. 10. – №. 11. – C. 839-844.
135. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap //evolution. – 1985. – T. 39. – №. 4. – C. 783-791.
136. Fetalvero K. M., Martin K. A., Hwa J. Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle //Prostaglandins & other lipid mediators. – 2007. – T. 82. – №. 1-4. – C. 109-118.
137. Feussner I. et al. Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons: implication of lipid body lipoxygenase in lipid mobilization during germination //Journal of Biological Chemistry. – 1997. – T. 272. – №. 34. – C. 21635-21641.
138. Feussner I., Wasternack C. The lipoxygenase pathway //Annual review of plant biology. – 2002. – T. 53. – №. 1. – C. 275-297.
139. Fischer G. J., Keller N. P. Production of cross-kingdom oxylipins by pathogenic fungi: an update on their role in development and pathogenicity //Journal of Microbiology. – 2016. – T. 54. – №. 3. – C. 254-264.

140. Foyer C. H., Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub //Plant physiology. – 2011. – T. 155. – №. 1. – C. 2-18.
141. Frankel E. N . Lipid Oxidation. Bridgwater: The Oily Press Lipid Library; 2005.
142. Froehlich J. E., Itoh A., Howe G. A. Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope //Plant Physiology. – 2001. – T. 125. – №. 1. – C. 306-317.
143. Fukushige H., Hildebrand D. F. A simple and efficient system for green note compound biogenesis by use of certain lipoxygenase and hydroperoxide lyase sources //Journal of agricultural and food chemistry. – 2005. – T. 53. – №. 17. – C. 6877-6882.
144. Fukushige H., Hildebrand D. F. Watermelon (*Citrullus lanatus*) hydroperoxide lyase greatly increases C6 aldehyde formation in transgenic leaves //Journal of agricultural and food chemistry. – 2005. – T. 53. – №. 6. – C. 2046-2051.
145. Funk C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology //science. – 2001. – T. 294. – №. 5548. – C. 1871-1875.
146. Galliard T., Matthew J. A. Enzymic reactions of fatty acid hydroperoxides in extracts of potato tuber. I. Comparison 9D-and 13L-hydroperoxy-octadecadienoic acids as substrates for the formation of a divinyl ether derivative //Biochimica et biophysica acta. – 1975. – T. 398. – №. 1. – C. 1-9.
147. Galliard T., Phillips D. R. The enzymic conversion of linoleic acid into 9-(nona-1',3'-dienoxy)non-8-enoic acid, a novel unsaturated ether derivative isolated from homogenates of *Solanum tuberosum* tubers //Biochemical Journal. – 1972. – T. 129. – №. 3. – C. 743-753.
148. Galliard T., Phillips D. R., Frost D. J. Novel divinyl ether fatty acids in extracts of *Solanum tuberosum* //Chemistry and Physics of Lipids. – 1973. – T. 11. – №. 3. – C. 173-180.

149. Galliard T., Phillips D. R., Matthew J. A. Enzymic reactions of fatty acid hydroperoxides in extracts of potato tuber. II. Conversion of 9-and 13-hydroperoxy-octadecadienoic acids to monohydroxydienoic acid, epoxyhydroxy-and trihydroxymonoenoic acid derivatives //Biochimica et biophysica acta. – 1975. – T. 409. – №. 2. – C. 157-171.
150. Galliard T., Phillips D. R., Reynolds J. The formation of *cis*-3-nonenal, *trans*-2-nonenal and hexanal from linoleic acid hydroperoxide isomers by a hydroperoxide cleavage enzyme system in cucumber (*Cucumis sativus*) fruits //Biochimica et biophysica acta. – 1976. – T. 441. – №. 2. – C. 181-192.
151. Gao B. et al. Evidence for an ionic intermediate in the transformation of fatty acid hydroperoxide by a catalase-related allene oxide synthase from the cyanobacterium *Acaryochloris marina* //Journal of Biological Chemistry. – 2009. – T. 284. – №. 33. – C. 22087-22098.
152. Gao J. M. et al. A new trihydroxy fatty acid from the ascomycete, Chinese truffle *Tuber indicum* //Lipids. – 2001. – T. 36. – №. 12. – C. 1365-1370.
153. Gardner H. W. Decomposition of linoleic acid hydroperoxides. Enzymic reactions compared with nonenzymic //Journal of agricultural and food chemistry. – 1975. – T. 23. – №. 2. – C. 129-136.
154. Gardner H. W. et al. Acid-catalyzed transformation of 13(*S*)-hydroperoxylinoleic acid into epoxyhydroxyoctadecenoic and trihydroxyoctadecenoic acids //Chemistry and physics of lipids. – 1984a. – T. 35. – №. 2. – C. 87-101.
155. Gardner H. W. et al. Radical addition of linoleic hydroperoxides to α -tocopherol or the analogous hydroxychroman //Lipids. – 1972. – T. 7. – №. 5. – C. 324-334.
156. Gardner H. W. Lipid enzymes: Lipases, lipoxygenases, and “hydroperoxidases” //Autoxidation in Food and Biological Systems. – Springer, Boston, MA, 1980. – C. 447-504.

157. Gardner H. W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids //Free Radical Biology and Medicine. – 1989. – T. 7. – №. 1. – C. 65-86.
158. Gardner H. W., Crawford C. G. Degradation of linoleic acid hydroperoxides by a cysteine·FeCl₃ catalyst as a model for similar biochemical reactions: III. A novel product, *trans*-12,13-epoxy-11-oxo-*trans*-9-octadecenoic acid, from 13-l(*S*)-hydroperoxy-*cis*-9,*trans*-11-octadecadienoic acid //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism. – 1981. – T. 665. – №. 1. – C. 126-133.
159. Gardner H. W., Kleiman R. Degradation of linoleic acid hydroperoxides by a cysteine FeCl₃ catalyst as a model for similar biochemical reactions: II. Specificity in formation of fatty acid epoxides //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism. – 1981. – T. 665. – №. 1. – C. 113-125.
160. Gardner H. W., Kleiman R., Weisleder D. Homolytic decomposition of linoleic acid hydroperoxide: identification of fatty acid products //Lipids. – 1974. – T. 9. – №. 9. – C. 696-706.
161. Gardner H. W., Plattner R. D. Linoleate hydroperoxides are cleaved heterolytically into aldehydes by a Lewis acid in aprotic solvent //Lipids. – 1984. – T. 19. – №. 4. – C. 294-299.
162. Gardner H. W., Weisleder D., Kleiman R. Formation of *trans*-12,13-epoxy-9-hydroperoxy-*trans*-10-octadecenoic acid from 13-L-hydroperoxy-*cis*-9,*trans*-11-octadecadienoic acid catalyzed by either a soybean extract or cysteine-FeCl₃ // Lipids. – 1978. – T. 13. – C. 246-252.
163. Gardner H. W., Weisleder D., Nelson E. C. Acid catalysis of a linoleic acid hydroperoxide: formation of epoxides by an intramolecular cyclization of the hydroperoxide group //The Journal of Organic Chemistry. – 1984. – T. 49. – №. 3. – C. 508-515.
164. Gardner H. W., Weisleder D., Plattner R. D. Hydroperoxide lyase and other hydroperoxide-metabolizing activity in tissues of soybean, *Glycine max* //Plant physiology. – 1991. – T. 97. – №. 3. – C. 1059-1072.

165. Garscha U., Oliw E. H. Leucine/valine residues direct oxygenation of linoleic acid by (10*R*)- and (8*R*)-dioxygenases: expression and site-directed mutagenesis of (10*R*)-dioxygenase with epoxyalcohol synthase activity // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – T. 284. – №. 20. – C. 13755-13765.
166. Garssen G. J. et al. The formation of *threo*-11-hydroxy-*trans*-12:13-epoxy-9-*cis*-octadecenoic acid by enzymic isomerisation of 13-*l*-Hydroperoxy-9-*cis*,11-*trans*-octadecadienoic acid by soybean lipoxygenase-1 // *European journal of biochemistry*. – 1976. – T. 62. – №. 1. – C. 33-36.
167. Gerritsen M. et al. Formation of α - and γ -ketols from ¹⁸O-labelled linoleic acid hydroperoxides by corn germ hydroperoxide isomerase // *FEBS letters*. – 1976. – T. 67. – №. 2. – C. 149-152.
168. Gerwick W. H. Epoxy allylic carbocations as conceptual intermediates in the biogenesis of diverse marine oxylipins // *Lipids*. – 1996. – T. 31. – №. 12. – C. 1215-1231.
169. Gerwick W. H., Moghaddam M., Hamberg M. Oxylipin metabolism in the red alga *Gracilaria lemaneiformis*: mechanism of formation of vicinal dihydroxy fatty acids // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1991. – T. 290. – №. 2. – C. 436-444.
170. Gerwick, W.H. Eicosanoids in nonmammals. In: Barton D, Nakanishi K, Meth-Cohn O, editors. *Comprehensive natural products chemistry: Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives*. Amsterdam: Elsevier. – 1999. – C. 207–254.
171. Gigot C. et al. Optimization and scaling up of a biotechnological synthesis of natural green leaf volatiles using *Beta vulgaris* hydroperoxide lyase // *Process biochemistry*. – 2012. – T. 47. – №. 12. – C. 2547-2551.
172. Gigot C. et al. The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles // *BASE*. – 2010. – T. 14. – №. 3. – C. 451-460.

173. Girotti A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems //Journal of lipid research. – 1998. – T. 39. – №. 8. – C. 1529-1542.
174. Glauser G. et al. High-resolution profiling of oxylipin-containing galactolipids in Arabidopsis extracts by ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry //Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry. – 2008. – T. 22. – №. 20. – C. 3154-3160.
175. Göbel C. et al. Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells //Journal of Biological Chemistry. – 2001. – T. 276. – №. 9. – C. 6267-6273.
176. Göbel C., Feussner I. Methods for the analysis of oxylipins in plants //Phytochemistry. – 2009. – T. 70. – №. 13-14. – C. 1485-1503.
177. Göbel C., Feussner I., Rosahl S. Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases //Journal of Biological Chemistry. – 2003. – T. 278. – №. 52. – C. 52834-52840.
178. Gogolev Y. V. et al. 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. – T. 1821. – №. 2. – C. 287-294.
179. Goldstone J. V. Environmental sensing and response genes in cnidaria: the chemical defensome in the sea anemone *Nematostella vectensis* //Cell biology and toxicology. – 2008. – T. 24. – №. 6. – C. 483-502.
180. Gomi K. Jasmonic acid: an essential plant hormone. – 2020.
181. González-Pérez A. B., Grechkin A., de Lera Á. R. Rearrangement of vinyl allene oxide geometric isomers to cyclopentenones. Further computational insights with biologically relevant model systems //Organic & biomolecular chemistry. – 2017. – T. 15. – №. 13. – C. 2846-2855.

182. Gorina S. S. et al. Detection and molecular cloning of CYP74Q1 gene: Identification of *Ranunculus acris* leaf divinyl ether synthase //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2014. – T. 1841. – №. 9. – C. 1227-1233.
183. Gorina S. S. et al. 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. – T. 1864. – №. 11. – C. 1580-1590.
184. Gorina S. S. et al. 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. – T. 1861. – №. 4. – C. 301-309.
185. Gossé-Kobo B., Mosset P., Grée R. Total synthesis of unsaturated trihydroxy C18 fatty acids //Tetrahedron letters. – 1989. – T. 30. – №. 32. – C. 4235-4236.
186. Gotoh O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences //Journal of Biological Chemistry. – 1992. – T. 267. – №. 1. – C. 83-90.
187. Goulah C. C. et al. The crystal structure of α -dioxygenase provides insight into diversity in the cyclooxygenase-peroxidase superfamily //Biochemistry. – 2013. – T. 52. – №. 8. – C. 1364-1372.
188. Grabovec I. P. et al. Ligand-binding properties and catalytic activity of the purified human 24-hydroxycholesterol 7 α -hydroxylase, CYP39A1 //The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. – 2019. – T. 193. – C. 105416.
189. Graça J., Pereira H. Diglycerol alkenedioates in suberin: building units of a poly(acylglycerol)polyester //Biomacromolecules. – 2000. – T. 1. – №. 4. – C. 519-522.

190. Graham S. E., Peterson J. A. How similar are P450s and what can their differences teach us? //Archives of biochemistry and biophysics. – 1999. – T. 369. – №. 1. – C. 24-29.
191. Graham A. Evolution and development: rise of the little squirts //Current biology. – 2004. – T. 14. – №. 22. – C. R956-R958.
192. Granér G., Hamberg M., Meijer J. Screening of oxylipins for control of oilseed rape (*Brassica napus*) fungal pathogens //Phytochemistry. – 2003. – T. 63. – №. 1. – C. 89-95.
193. Graveland A. Enzymatic oxidations of linoleic acid and glycerol-1-monolinoleate in doughs and flour-water suspensions //Journal of the American Oil Chemists Society. – 1970. – T. 47. – №. 9. – C. 352-361.
194. Grebner W. et al. Lipoxygenase6-dependent oxylipin synthesis in roots is required for abiotic and biotic stress resistance of Arabidopsis //Plant Physiology. – 2013. – T. 161. – №. 4. – C. 2159-2170.
195. Grechkin A. N. Cyclization of natural allene oxide fatty acids. The anchimeric assistance of β,γ -double bond beside the oxirane and the reaction mechanism //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism. – 1994. – T. 1213. – №. 2. – C. 199-206.
196. Grechkin A. N. et al. Allene oxide synthase pathway in cereal roots: detection of novel oxylipin graminoxins //ChemistryOpen. – 2018. – T. 7. – №. 5. – C. 336-343.
197. Grechkin A. N. et al. Hydroperoxide lyases (CYP74C and CYP74B) catalyze the homolytic isomerization of fatty acid hydroperoxides into hemiacetals //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2006. – T. 1761. – №. 12. – C. 1419-1428.
198. Grechkin A. N. et al. Novel Allene Oxide Synthase Products Formed via Favorskii-Type Rearrangement: Mechanistic Implications for 12-Oxo-10,15-phytodienoic Acid Biosynthesis //ChemBioChem. – 2011. – T. 12. – №. 16. – C. 2511-2517.

199. Grechkin A. N. et al. Role of structure and pH in cyclization of allene oxide fatty acids: Implications for the reaction mechanism //Chemistry and physics of lipids. – 2002. – T. 120. – №. 1-2. – C. 87-99.
200. Grechkin A. N. et al. Tomato CYP74C3 is a multifunctional enzyme not only synthesizing allene oxide but also catalyzing its hydrolysis and cyclization //ChemBioChem. – 2008. – T. 9. – №. 15. – C. 2498-2505.
201. Grechkin A. N. Hydroperoxide lyase and divinyl ether synthase //Prostaglandins & other lipid mediators. – 2002. – T. 68. – C. 457-470.
202. Grechkin A. N., Fazliev F. N., Mukhtarova L. S. The lipoxygenase pathway in garlic (*Allium sativum* L.) bulbs: detection of the novel divinyl ether oxylipins //FEBS letters. – 1995. – T. 371. – №. 2. – C. 159-162.
203. Grechkin A. N., Hamberg M. Biosynthesis of novel divinyl ether oxylipins by enzyme from garlic (*Allium sativum* L.) bulbs //Recent Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research. – Springer, Boston, MA, 1997. – C. 61-64.
204. Grechkin A. N., Hamberg M. Divinyl ether synthase from garlic (*Allium sativum* L.) bulbs: subcellular localization and substrate region- and stereospecificity //FEBS letters. – 1996. – T. 388. – №. 2-3. – C. 112-114.
205. Grechkin A. N., Hamberg M. The “heterolytic hydroperoxide lyase” is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2004. – T. 1636. – №. 1. – C. 47-58.
206. Grechkin A. N., Mukhtarova L. S., Hamberg M. Detection of an enol intermediate in the hydroperoxide lyase chain cleavage reaction //FEBS letters. – 2003. – T. 549. – №. 1-3. – C. 31-34.
207. Grechkin A. N., Mukhtarova L. S., Hamberg M. The lipoxygenase pathway in tulip (*Tulipa gesneriana*): detection of the ketol route //Biochemical Journal. – 2000. – T. 352. – №. 2. – C. 501-509.

208. Grechkin A. N., Mukhtarova L. S., Hamberg M. Thermal conversions of trimethylsilyl peroxides of linoleic and linolenic acids //Chemistry and physics of lipids. – 2005. – T. 138. – №. 1-2. – C. 93-101.
209. Grechkin A. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway //Progress in lipid research. – 1998. – T. 37. – №. 5. – C. 317-352.
210. Green M. T., Dawson J. H., Gray H. B. Oxoiron (IV) in chloroperoxidase compound II is basic: implications for P450 chemistry //Science. – 2004. – T. 304. – №. 5677. – C. 1653-1656.
211. Gricman Ł., Vogel C., Pleiss J. Identification of universal selectivity-determining positions in cytochrome P450 monooxygenases by systematic sequence-based literature mining //Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 2015. – T. 83. – №. 9. – C. 1593-1603.
212. Griffiths G. Biosynthesis and analysis of plant oxylipins //Free Radical Research. – 2015. – T. 49. – №. 5. – C. 565-582.
213. Griffiths G. Jasmonates: biosynthesis, perception and signal transduction //Essays in Biochemistry. – 2020. – T. 64. – №. 3. – C. 501-512.
214. Grodberg J. et al. Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the ompT gene of Escherichia coli K-12 //Nucleic acids research. – 1988. – T. 16. – №. 3. – C. 1209.
215. Grosch W., Schwarz J. M. Linoleic and linolenic acid as precursors of the cucumber flavor //Lipids. – 1971. – T. 6. – №. 5. – C. 351-352.
216. Groves J. T. The bioinorganic chemistry of iron in oxygenases and supramolecular assemblies //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – T. 100. – №. 7. – C. 3569-3574.
217. Grun C. et al. Early accumulation of non-enzymatically synthesised oxylipins in *Arabidopsis thaliana* after infection with *Pseudomonas syringae* //Functional plant biology. – 2007. – T. 34. – №. 1. – C. 65-71.

218. Guengerich F. P., Waterman M. R., Egli M. Recent structural insights into cytochrome P450 function //Trends in pharmacological sciences. – 2016. – T. 37. – №. 8. – C. 625-640.
219. Guijarro D., Yus M. The Favorskii rearrangement: synthetic applications //Current Organic Chemistry. – 2005. – T. 9. – №. 17. – C. 1713-1735.
220. Gullner G. et al. Up-regulated expression of lipoxygenase and divinyl ether synthase genes in pepper leaves inoculated with Tobamoviruses //Physiological and molecular plant pathology. – 2010. – T. 74. – №. 5-6. – C. 387-393.
221. Haeggström J. Z., Funk C. D. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease //Chemical reviews. – 2011. – T. 111. – №. 10. – C. 5866-5898.
222. Hall C. E. et al. Stabilization of an enzymatic extract from *Penicillium camemberti* containing lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities //Process Biochemistry. – 2008. – T. 43. – №. 3. – C. 258-264.
223. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free radicals in biology and medicine. – Oxford University Press, USA, 2015.
224. Hamberg M. A method for determination of the absolute stereochemistry of α , β -epoxy alcohols derived from fatty acid hydroperoxides //Lipids. – 1992. – T. 27. – №. 12. – C. 1042-1046.
225. Hamberg M. A pathway for biosynthesis of divinyl ether fatty acids in green leaves //Lipids. – 1998. – T. 33. – №. 11. – C. 1061-1071.
226. Hamberg M. An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylipins in leaves of potato //Lipids. – 1999. – T. 34. – №. 11. – C. 1131-1142.
227. Hamberg M. Biosynthesis of 12-oxo-10,15(*Z*)-phytodienoic acid: identification of an allene oxide cyclase //Biochemical and biophysical research communications. – 1988. – T. 156. – №. 1. – C. 543-550.
228. Hamberg M. Biosynthesis of new divinyl ether oxylipins in Ranunculus plants //Lipids. – 2002. – T. 37. – №. 4. – C. 427-433.

229. Hamberg M. Decomposition of unsaturated fatty acid hydroperoxides by hemoglobin: structures of major products of 13L-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid //Lipids. – 1975. – T. 10. – №. 2. – C. 87-92.
230. Hamberg M. et al. α -Dioxygenases //Biochemical and biophysical research communications. – 2005. – T. 338. – №. 1. – C. 169-174.
231. Hamberg M. Fatty acid allene oxides //Journal of the American Oil Chemists Society. – 1989. – T. 66. – №. 10. – C. 1445-1449.
232. Hamberg M. Fatty acid allene oxides II. Formation of two macrolactones from 12,13(*S*)-epoxy-9(*Z*),11-octadecadienoic acid //Chemistry and physics of lipids. – 1988. – T. 46. – №. 4. – C. 235-243.
233. Hamberg M. Fatty acid hydroperoxide isomerase in *Saprolegnia parasitica*: structural studies of epoxy alcohols formed from isomeric hydroperoxyoctadecadienoates //Lipids. – 1989. – T. 24. – №. 4. – C. 249-255.
234. Hamberg M. Hidden stereospecificity in the biosynthesis of divinyl ether fatty acids //The FEBS journal. – 2005. – T. 272. – №. 3. – C. 736-743.
235. Hamberg M. Hydroperoxide isomerases //Journal of lipid mediators and cell signalling. – 1995. – T. 12. – №. 2-3. – C. 283-292.
236. Hamberg M. Isolation and structures of lipoxygenase products from *Saprolegnia parasitica* //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism. – 1986. – T. 876. – №. 3. – C. 688-692.
237. Hamberg M. Isolation and structures of two divinyl ether fatty acids from *Clematis vitalba* //Lipids. – 2004. – T. 39. – №. 6. – C. 565-569.
238. Hamberg M. Mechanism of corn hydroperoxide isomerase: detection of 12,13(*S*)-oxido-9(*Z*),11-octadecadienoic acid //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism. – 1987. – T. 920. – №. 1. – C. 76-84.
239. Hamberg M. New cyclopentenone fatty acids formed from linoleic and linolenic acids in potato //Lipids. – 2000. – T. 35. – №. 4. – C. 353-363.

240. Hamberg M. Regio-and stereochemical analysis of trihydroxyoctadecenoic acids derived from linoleic acid 9-and 13-hydroperoxides //Lipids. – 1991. – T. 26. – №. 6. – C. 407-415.
241. Hamberg M. Stereochemical aspects of fatty acid oxidation: hydroperoxide isomerases //Acta Chemica Scandinavica (Copenhagen, Denmark: 1989). – 1996. – T. 50. – №. 3. – C. 219-224.
242. Hamberg M., Fahlstadius P. On the specificity of a fatty acid epoxygenase in broad bean (*Vicia faba* L.) //Plant physiology. – 1992. – T. 99. – №. 3. – C. 987-995.
243. Hamberg M., Gotthammar B. A new reaction of unsaturated fatty acid hydroperoxides: Formation of 11-hydroxy-12, 13-epoxy-9-octadecenoic acid from 13-hydroperoxy-9, 11-octadecadienoic acid //Lipids. – 1973. – T. 8. – №. 12. – C. 737-744.
244. Hamberg M., Hamberg G. Hydroperoxide-dependent epoxidation of unsaturated fatty acids in the broad bean (*Vicia faba* L.) //Archives of biochemistry and biophysics. – 1990. – T. 283. – №. 2. – C. 409-416.
245. Hamberg M., Hamberg G. Peroxygenase-catalyzed fatty acid epoxidation in cereal seeds (sequential oxidation of linoleic acid into 9(S),12(S),13(S)-trihydroxy-10(E)-octadecenoic acid) //Plant physiology. – 1996. – T. 110. – №. 3. – C. 807-815.
246. Hamberg M., Herman C. A., Herman R. P. Novel biological transformations of 15-*l*s-hydroperoxy-5, 8, 11, 13-eicosatetraenoic acid //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism. – 1986a. – T. 877. – №. 3. – C. 447-457.
247. Hamberg M., Herman R. P., Jacobsson U. Stereochemistry of two epoxy alcohols from *Saprolegnia parasitica* //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism. – 1986b. – T. 879. – №. 3. – C. 410-418.
248. Hamberg M., Olsson U. Efficient and specific conversion of 9-lipoxygenase hydroperoxides in the beetroot. Formation of pinellic acid //Lipids. – 2011. – T. 46. – №. 9. – C. 873-878.

249. Hamberg M., Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1974. – T. 71. – №. 9. – C. 3400-3404.
250. Hamberg M., Sanz A., Castresana C. α -Oxidation of fatty acids in higher plants: identification of a pathogen-inducible oxygenase (PIOX) as an α -dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid //Journal of Biological Chemistry. – 1999. – T. 274. – №. 35. – C. 24503-24513.
251. Hanano A. et al. Plant seed peroxygenase is an original heme-oxygenase with an EF-hand calcium binding motif //Journal of Biological Chemistry. – 2006. – T. 281. – №. 44. – C. 33140-33151.
252. Hasemann C. A. et al. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures //Structure. – 1995. – T. 3. – №. 1. – C. 41-62.
253. Hatanaka A. et al. Non-enzymatic isomerization of 12-hydroxy-(3Z)-dodecenal to the (2E)-isomer after enzymatic cleavage of 13-hydroperoxylinoleyl alcohol in tea chloroplasts //Zeitschrift für Naturforschung C. – 1989. – T. 44. – №. 1-2. – C. 161-164.
254. Hatanaka A. The biogenesis of green odour by green leaves //Phytochemistry. – 1993. – T. 34. – №. 5. – C. 1201-1218.
255. Hatanaka A. The fresh green odor emitted by plants //Food Reviews International. – 1996. – T. 12. – №. 3. – C. 303-350.
256. Hatanaka A., Harada T. Formation of *cis*-3-hexenal, *trans*-2-hexenal and *cis*-3-hexenol in macerated *Thea sinensis* leaves //Phytochemistry. – 1973. – T. 12. – №. 10. – C. 2341-2346.
257. Hebert S. P. et al. Investigation into 9 (S)-HPODE-derived allene oxide to cyclopentenone cyclization mechanism via diradical oxyallyl intermediates //Organic & biomolecular chemistry. – 2016. – T. 14. – №. 14. – C. 3544-3557.

258. Heimann W., Dresen P. Enzymatic hydroperoxide degradation in cereals-enzyme characterization and reaction-products //HELVETICA CHIMICA ACTA. – 1973. – T. 56. – №. 1. – C. 463-469.
259. Hellmann E., Helariutta Y. Plant Genetics: Advances in Regeneration Pathways //Current Biology. – 2019. – T. 29. – №. 14. – C. R702-R704.
260. Helm R. R. et al. Characterization of differential transcript abundance through time during *Nematostella vectensis* development //BMC genomics. – 2013. – T. 14. – №. 1. – C. 1-10.
261. Herman R. P., Hamberg M. Properties of the soluble arachidonic acid 15-lipoxygenase and 15-hydroperoxide isomerase from the oomycete *Saprolegnia parasitica* //Prostaglandins. – 1987. – T. 34. – №. 1. – C. 129-139.
262. Heshof R. et al. Industrial potential of lipoxygenases //Critical reviews in biotechnology. – 2016. – T. 36. – №. 4. – C. 665-674.
263. Hisamatsu Y. et al. Arabidopsides A and B, two new oxylipins from *Arabidopsis thaliana* //Tetrahedron letters. – 2003. – T. 44. – №. 29. – C. 5553-5556.
264. Hisamatsu Y. et al. Oxylipins Arabidopsides C and D from *Arabidopsis thaliana* //Journal of Natural Products. – 2005. – T. 68. – №. 4. – C. 600-603.
265. Hoffmann I., Jerneřen F., Oliw E. H. Epoxy alcohol synthase of the rice blast fungus represents a novel subfamily of dioxygenase-cytochrome P450 fusion enzymes //Journal of lipid research. – 2014. – T. 55. – №. 10. – C. 2113-2123.
266. Hoffmann I., Jerneřen F., Oliw E. H. Expression of fusion proteins of *Aspergillus terreus* reveals a novel allene oxide synthase //Journal of Biological Chemistry. – 2013. – T. 288. – №. 16. – C. 11459-11469.
267. Hoffmann I., Oliw E. H. Discovery of a linoleate 9S-dioxygenase and an allene oxide synthase in a fusion protein of *Fusarium oxysporum* //Journal of lipid research. – 2013. – T. 54. – №. 12. – C. 3471-3480.

268. Hofmann E., Zerbe P., Schaller F. The crystal structure of *Arabidopsis thaliana* allene oxide cyclase: insights into the oxylipin cyclization reaction //The Plant Cell. – 2006. – T. 18. – №. 11. – C. 3201-3217.
269. Holopainen J. K., Blande J. D. Molecular plant volatile communication //Sensing in nature. – 2012. – C. 17-31.
270. Holtman W. L. et al. Lipoxygenase-2 oxygenates storage lipids in embryos of germinating barley //European Journal of Biochemistry. – 1997. – T. 248. – №. 2. – C. 452-458.
271. Hornostaj A. R., Robinson D. S. Purification of hydroperoxide lyase from cucumbers //Food Chemistry. – 1999. – T. 66. – №. 2. – C. 173-180.
272. Hornostaj A. R., Robinson D. S. Purification of hydroperoxide lyase from pea seeds //Food Chemistry. – 2000. – T. 71. – №. 2. – C. 241-247.
273. Hörnsten L. et al. Cloning of linoleate diol synthase reveals homology with prostaglandin H synthases //Journal of Biological Chemistry. – 1999. – T. 274. – №. 40. – C. 28219-28224.
274. Hornung E. et al. Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1999. – T. 96. – №. 7. – C. 4192-4197.
275. Hou C. T. A novel compound, 12, 13, 17-trihydroxy-9 (Z)-Octadecenoic acid, from linoleic acid by a new microbial isolate *Clavibacter* sp. ALA2 //Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1996. – T. 73. – №. 11. – C. 1359-1362.
276. Howe G. A. et al. Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase //Plant Physiology. – 2000. – T. 123. – №. 2. – C. 711-724.
277. Howe G. A., Jander G. Plant immunity to insect herbivores //Annu. Rev. Plant Biol. – 2008. – T. 59. – C. 41-66.

278. Howe G. A., Schillmiller A. L. Oxylin metabolism in response to stress //Current opinion in plant biology. – 2002. – T. 5. – №. 3. – C. 230-236.
279. Hu Y. et al. Jasmonate regulates leaf senescence and tolerance to cold stress: crosstalk with other phytohormones //Journal of Experimental Botany. – 2017. – T. 68. – №. 6. – C. 1361-1369.
280. Huang H. et al. Jasmonate action in plant growth and development //Journal of experimental botany. – 2017. – T. 68. – №. 6. – C. 1349-1359.
281. Hubert J. et al. Acaricidal effects of natural six-carbon and nine-carbon aldehydes on stored-product mites //Experimental and Applied Acarology. – 2008. – T. 44. – №. 4. – C. 315-321.
282. Hughes R. K. et al. Allene oxide synthase from *Arabidopsis thaliana* (CYP74A1) exhibits dual specificity that is regulated by monomer-micelle association //FEBS letters. – 2006b. – T. 580. – №. 17. – C. 4188-4194.
283. Hughes R. K. et al. Characterization of *Medicago truncatula* (barrel medic) hydroperoxide lyase (CYP74C3), a water-soluble detergent-free cytochrome P450 monomer whose biological activity is defined by monomer-micelle association //Biochemical Journal. – 2006a. – T. 395. – №. 3. – C. 641-652.
284. Hughes R. K. et al. Evidence for communality in the primary determinants of CYP74 catalysis and of structural similarities between CYP74 and classical mammalian P450 enzymes //Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 2008. – T. 72. – №. 4. – C. 1199-1211.
285. Hughes R. K., Belfield E. J., Casey R. CYP74C3 and CYP74A1, plant cytochrome P450 enzymes whose activity is regulated by detergent micelle association, and proposed new rules for the classification of CYP74 enzymes //Biochem. Soc. Trans. – 2006c. – T. 34. – C. 1223-1227.
286. Hughes R. K., De Domenico S., Santino A. Plant cytochrome CYP74 family: biochemical features, endocellular localisation, activation mecha-

- nism in plant defence and improvements for industrial applications //ChemBioChem. – 2009. – T. 10. – №. 7. – C. 1122-1133.
287. Iassonova D. R. et al. Evidence of an enzymatic source of off flavors in “Lipoxygenase-Null” soybeans //Journal of the American Oil Chemists' Society. – 2009. – T. 86. – №. 1. – C. 59-64.
288. Ibrahim A. et al. The alphabet of galactolipids in *Arabidopsis thaliana* //Frontiers in Plant Science. – 2011. – T. 2. – C. 95.
289. Ichino T. et al. Photoelectron spectroscopic study of the oxyallyl diradical //The Journal of Physical Chemistry A. – 2011. – T. 115. – №. 9. – C. 1634-1649.
290. Ichino T. et al. The lowest singlet and triplet states of the oxyallyl diradical //Angewandte Chemie International Edition. – 2009. – T. 48. – №. 45. – C. 8509-8511.
291. Imbusch R., Mueller M. J. Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes F1 (phytoprostanes F1) in plants //Plant Physiology. – 2000a. – T. 124. – №. 3. – C. 1293-1304.
292. Imbusch R., Mueller M. J. Formation of isoprostane F2-like compounds (phytoprostanes F1) from α -linolenic acid in plants //Free Radical Biology and Medicine. – 2000b. – T. 28. – №. 5. – C. 720-726.
293. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids //Gene. – 1990. – T. 96. – №. 1. – C. 23-28.
294. Ishizaki T. et al. Increased nitric oxide biosynthesis in leukotoxin, 9,10-epoxy-12-octadecenoate injured lung //Biochemical and biophysical research communications. – 1995a. – T. 210. – №. 1. – C. 133-137.
295. Ishizaki T. et al. Leukotoxin, 9, 10-epoxy-12-octadecenoate causes edematous lung injury via activation of vascular nitric oxide synthase //American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. – 1995b. – T. 269. – №. 1. – C. L65-L70.

296. Isin E. M., Guengerich F. P. Substrate binding to cytochromes P450 //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2008. – T. 392. – №. 6. – C. 1019-1030.
297. Itoh A. et al. Identification of a jasmonate-regulated allene oxide synthase that metabolizes 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids //Journal of Biological Chemistry. – 2002. – T. 277. – №. 48. – C. 46051-46058.
298. Itoh A., Howe G. A. Molecular cloning of a divinyl ether synthase: identification as a CYP74 cytochrome P-450 //Journal of Biological Chemistry. – 2001. – T. 276. – №. 5. – C. 3620-3627.
299. Itoh A., Vick B. A. The purification and characterization of fatty acid hydroperoxide lyase in sunflower //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 1999. – T. 1436. – №. 3. – C. 531-540.
300. Jacopini S. et al. Activation and Stabilization of Olive Recombinant 13-Hydroperoxide Lyase Using Selected Additives //Applied biochemistry and biotechnology. – 2017. – T. 182. – №. 3. – C. 1000-1013.
301. Jacopini S. et al. Olive recombinant hydroperoxide lyase, an efficient biocatalyst for synthesis of green leaf volatiles //Applied biochemistry and biotechnology. – 2016. – T. 179. – №. 4. – C. 671-683.
302. Jadhav S., Singh B., Salunkhe D. K. Metabolism of unsaturated fatty acids in tomato fruit: linoleic and linolenic acid as precursors of hexanal //Plant and cell physiology. – 1972. – T. 13. – №. 3. – C. 449-459.
303. Jahn U., Galano J. M., Durand T. A cautionary note on the correct structure assignment of phytoprostanes and the emergence of a new prostane ring system //Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids. – 2010. – T. 82. – №. 2-3. – C. 83-86.
304. Jahn U., Galano J. M., Durand T. Beyond prostaglandins—chemistry and biology of cyclic oxygenated metabolites formed by free-radical path-

- ways from polyunsaturated fatty acids //Angewandte Chemie International Edition. – 2008. – T. 47. – №. 32. – C. 5894-5955.
305. Jamieson G. R., Reid E. H. The component fatty acids of some marine algal lipids //Phytochemistry. – 1972. – T. 11. – №. 4. – C. 1423-1432.
306. Jang G., Yoon Y., Choi Y. D. Crosstalk with jasmonic acid integrates multiple responses in plant development //International journal of molecular sciences. – 2020. – T. 21. – №. 1. – C. 305.
307. Jiang Z. D., Gerwick W. H. Novel oxylipins from the temperate red alga *Polysiphonia latissima*: evidence for an arachidonate 9(*S*)-lipoxygenase //Lipids. – 1997. – T. 32. – №. 3. – C. 231-235.
308. Jin J. et al. 8*R*-Lipoxygenase-catalyzed synthesis of a prominent cis-epoxyalcohol from dihomog- γ -linolenic acid: a distinctive transformation compared with *S*-lipoxygenases //Journal of lipid research. – 2012. – T. 53. – №. 2. – C. 292-299.
309. Johnson E. F., Stout C. D. Structural diversity of eukaryotic membrane cytochrome p450s //Journal of Biological Chemistry. – 2013. – T. 288. – №. 24. – C. 17082-17090.
310. Jones R. L. et al. The identification of trihydroxyeicosatrienoic acids as products from the incubation of arachidonic acid with washed blood platelets //Prostaglandins. – 1978. – T. 16. – №. 4. – C. 583-589.
311. Joo Y. C., Oh D. K. Lipoxygenases: potential starting biocatalysts for the synthesis of signaling compounds //Biotechnology advances. – 2012. – T. 30. – №. 6. – C. 1524-1532.
312. Kadiiska M. B. et al. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? //Free Radical Biology and Medicine. – 2005. – T. 38. – №. 6. – C. 698-710.
313. Kallenbach M. et al. C12 derivatives of the hydroperoxide lyase pathway are produced by product recycling through lipoxygenase-2 in *Nicotiana attenuata* leaves //New Phytologist. – 2011. – T. 191. – №. 4. – C. 1054-1068.

314. Kandzia R. et al. On the specificity of lipid hydroperoxide fragmentation by fatty acid hydroperoxide lyase from *Arabidopsis thaliana* //Journal of plant physiology. – 2003. – T. 160. – №. 7. – C. 803-809.
315. Kang J. H. et al. Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid–isoleucine–mediated defenses against *Manduca sexta* //The Plant Cell. – 2006. – T. 18. – №. 11. – C. 3303-3320.
316. Kato T. et al. Defense mechanism of the rice plant against rice blast disease [Pyricularia oryzae antifungal compounds] //Naturwissenschaften. – 1983. – T. 70. – C. 200.
317. Kato T. et al. Unsaturated hydroxyl fatty acids, the self defence substances in rice plant against rice blast disease //Chemistry Letters. – 1984. – C. 409-412.
318. Kato T. et al. Structure and synthesis of unsaturated trihydroxy c18 fatty: acids in rice plants suffering from rice blast disease //Tetrahedron letters. – 1985. – T. 26. – №. 19. – C. 2357-2360.
319. Kato T. et al. Structure and synthesis of 11,12,13-trihydroxy-9Z,15Z-octadecadienoic acids from rice plant suffering from rice blast disease //Chemistry Letters. – 1986. – T. 15. – №. 4. – C. 577-580.
320. Kato T. et al. Structural Elucidation of Naturally Occurring 9, 12, 13-Trihydroxy Fatty Acids by a Synthetic Study1 //Agricultural and biological chemistry. – 1991. – T. 55. – №. 5. – C. 1349-1357.
321. Kermasha S. et al. Production of flavor compounds by hydroperoxide lyase from enzymatic extracts of *Penicillium* sp //Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2002. – T. 19. – C. 479-487.
322. Khotimchenko S. V., Vaskovsky V. E., Titlyanova T. V. Fatty acids of marine algae from the Pacific coast of North California. – 2002.
323. Kihara H. et al. Arachidonic acid-dependent carbon-eight volatile synthesis from wounded liverwort (*Marchantia polymorpha*) //Phytochemistry. – 2014. – T. 107. – C. 42-49.

324. Kim H., Gardner H. W., Hou C. T. Production of isomeric 9, 10, 13 (9, 12, 13)-trihydroxy-11*E*(10*E*)-octadecenoic acid from linoleic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3 //Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2000. – T. 25. – №. 2. – C. 109-115.
325. Kishimoto K. et al. Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana* //Journal of General Plant Pathology. – 2007. – T. 73. – №. 1. – C. 35-37.
326. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes //Archives of biochemistry and biophysics. – 1958. – T. 75. – №. 2. – C. 376-386.
327. Kobayashi T., Narumiya S. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice //Prostaglandins & other lipid mediators. – 2002. – T. 68. – C. 557-573.
328. Koeduka T. et al. Biochemical characterization of allene oxide synthases from the liverwort *Marchantia polymorpha* and green microalgae *Klebsormidium flaccidum* provides insight into the evolutionary divergence of the plant CYP74 family //Planta. – 2015. – T. 242. – №. 5. – C. 1175-1186.
329. Koeduka T. et al. Kinetics of barley FA hydroperoxide lyase are modulated by salts and detergents //Lipids. – 2003. – T. 38. – №. 11. – C. 1167-1172.
330. Koeduka T., Kajiwara T., Matsui K. Cloning of lipoxygenase genes from a cyanobacterium, *Nostoc punctiforme*, and its expression in *Escherichia coli* //Current microbiology. – 2007. – T. 54. – №. 4. – C. 315-319.
331. Kolattukudy P. E. Polyesters in higher plants //Biopolyesters. – 2001. – C. 1-49.
332. Koljak R. et al. Identification of a naturally occurring peroxidase-lipoxygenase fusion protein //Science. – 1997. – T. 277. – №. 5334. – C. 1994-1996.

333. Kolomiets M. V. et al. A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection //Plant physiology. – 2000. – T. 124. – №. 3. – C. 1121-1130.
334. Koo A. J. K., Cooke T. F., Howe G. A. Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isooleucine //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – T. 108. – №. 22. – C. 9298-9303.
335. Kourtchenko O. et al. Oxo-phytodienoic acid-containing galactolipids in Arabidopsis: jasmonate signaling dependence //Plant physiology. – 2007. – T. 145. – №. 4. – C. 1658-1669.
336. Kousaka K. et al. Novel oxylipin metabolites from the brown alga *Eisenia bicyclis* //Journal of natural products. – 2003. – T. 66. – №. 10. – C. 1318-1323.
337. Krischke M., Loeffler C., Mueller M. J. Biosynthesis of 14, 15-dehydro-12-oxo-phytodienoic acid and related cyclopentenones via the phytoprostane D1 pathway //Phytochemistry. – 2003. – T. 62. – №. 3. – C. 351-358.
338. Krumbein A., Auerswald H. Characterization of aroma volatiles in tomatoes by sensory analyses //Food/Nahrung. – 1998. – T. 42. – №. 06. – C. 395-399.
339. Kuhn H., Banthiya S., Van Leyen K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2015. – T. 1851. – №. 4. – C. 308-330.
340. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets //Molecular biology and evolution. – 2016. – T. 33. – №. 7. – C. 1870-1874.
341. Kunishima M. et al. Identification of (Z)-3:(E)-2-hexenal isomerases essential to the production of the leaf aldehyde in plants //Journal of Biological Chemistry. – 2016. – T. 291. – №. 27. – C. 14023-14033.

342. Kuo T. M., Manthey L. K., Hou C. T. Fatty acid bioconversions by *Pseudomonas aeruginosa* PR3 //Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1998. – T. 75. – №. 7. – C. 875-879.
343. La Camera S. et al. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways //Immunological reviews. – 2004. – T. 198. – №. 1. – C. 267-284.
344. Lam B. K. et al. Hydroperoxide lyase in rabbit leukocytes: conversion of 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid to 15-keto-pentadeca-5, 8, 11, 13-tetraenoic acid //Biochemical and biophysical research communications. – 1987. – T. 149. – №. 3. – C. 1111-1117.
345. Lamari N. et al. Specificity of lipoxygenase pathways supports species delineation in the marine diatom genus *Pseudo-nitzschia* //PLoS One. – 2013. – T. 8. – №. 8. – C. e73281.
346. Lang I. et al. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection //BMC plant biology. – 2011. – T. 11. – №. 1. – C. 1-16.
347. Lang I., Feussner I. Oxylipin formation in *Nostoc punctiforme* (PCC73102) //Phytochemistry. – 2007. – T. 68. – №. 8. – C. 1120-1127.
348. Lau B. H. S., Adetumbi M. A., Sanchez A. *Allium sativum* (garlic) and atherosclerosis: a review //Nutrition Research. – 1983. – T. 3. – №. 1. – C. 119-128.
349. Laudert D., Weiler E. W. Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling //The Plant Journal. – 1998. – T. 15. – №. 5. – C. 675-684.
350. Lee D. S. et al. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes //Nature. – 2008. – T. 455. – №. 7211. – C. 363-368.
351. Leffler C. W. et al. Permissive role of prostacyclin in cerebral vasodilation to hypercapnia in newborn pigs //American Journal of Physiology-

- Heart and Circulatory Physiology. – 1994. – T. 267. – №. 1. – C. H285-H291.
352. León J. et al. Lipoxygenase H1 gene silencing reveals a specific role in supplying fatty acid hydroperoxides for aliphatic aldehyde production //Journal of Biological Chemistry. – 2002. – T. 277. – №. 1. – C. 416-423.
353. León J., Rojo E., Sánchez-Serrano J. J. Wound signalling in plants //Journal of experimental botany. – 2001. – T. 52. – №. 354. – C. 1-9.
354. Lequeu J. et al. Formation of plant cuticle: evidence for the occurrence of the peroxygenase pathway //The Plant Journal. – 2003. – T. 36. – №. 2. – C. 155-164.
355. Leverentz M. K. et al. Characterization of a novel lipoxygenase-independent senescence mechanism in *Alstroemeria peruviana* floral tissue //Plant Physiology. – 2002. – T. 130. – №. 1. – C. 273-283.
356. Lewis R. A., Austen K. F., Soberman R. J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway: biochemistry and relation to pathology in human diseases //New England Journal of Medicine. – 1990. – T. 323. – №. 10. – C. 645-655.
357. Li L. et al. Modes of heme binding and substrate access for cytochrome P450 CYP74A revealed by crystal structures of allene oxide synthase //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – T. 105. – №. 37. – C. 13883-13888.
358. Li Y., Wei K. Comparative functional genomics analysis of cytochrome P450 gene superfamily in wheat and maize //BMC plant biology. – 2020. – T. 20. – №. 1. – C. 1-22.
359. Liavonchanka A., Feussner I. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis //Journal of plant physiology. – 2006. – T. 163. – №. 3. – C. 348-357.
360. Lin J. T., Chen G. Q. Acylglycerols containing trihydroxy fatty acids in castor oil and the regiospecific quantification of triacylglycerols //Journal

- of the American Oil Chemists' Society. – 2010. – T. 87. – №. 11. – C. 1371-1379.
361. Lipan L. et al. Phytoprostanes and Phytofurans – Oxidative Stress and Bioactive Compounds – In Almonds are Affected by Deficit Irrigation in Almond Trees //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2020. – T. 68. – №. 27. – C. 7214-7225.
362. Liu M. et al. Characterization and biological effects of dihydroxylated compounds deriving from the lipoxygenation of ALA //Journal of lipid research. – 2013. – T. 54. – №. 8. – C. 2083-2094.
363. Liu Q. et al. Immobilisation of a hydroperoxide lyase and comparative enzymological studies of the immobilised enzyme with membrane-bound enzyme //Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2013. – T. 93. – №. 8. – C. 1953-1959.
364. Lõhelaid H. et al. Up-regulated expression of AOS-LOXa and increased eicosanoid synthesis in response to coral wounding //PLoS One. – 2014. – T. 9. – №. 2. – C. e89215.
365. Lončarić M. et al. Lipoxygenase Inhibition by Plant Extracts //Biomolecules. – 2021. – T. 11. – №. 2. – C. 152.
366. Long Z. et al. Stability of hydroperoxide lyase activity from *Amaranthus tricolor* (*Amaranthus mangostanus* L.) leaves: influence of selected additives //Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2010. – T. 90. – №. 5. – C. 729-734.
367. Márczy J. S. et al. Production of hexanal from hydrolyzed sunflower oil by lipoxygenase and hydroperoxid lyase enzymes //Biotechnology letters. – 2002. – T. 24. – №. 20. – C. 1673-1675.
368. Martin-Arjol I. et al. Identification of oxylipins with antifungal activity by LC–MS/MS from the supernatant of *Pseudomonas* 42A2 //Chemistry and physics of lipids. – 2010. – T. 163. – №. 4-5. – C. 341-346.
369. Mashhadi Z., Newcomer M. E., Brash A. R. The Thr-His connection on the distal heme of catalase-related hemoproteins: a hallmark of reaction

- with fatty acid hydroperoxides //Chembiochem: a European journal of chemical biology. – 2016. – T. 17. – №. 21. – C. 2000.
370. Masui H., Kondo T., Kojima M. An antifungal compound, 9,12,13-trihydroxy-(*E*)-10-octadecenoic acid, from *Colocasia antiquorum* inoculated with *Ceratocystis fimbriata* //Phytochemistry. – 1989. – T. 28. – №. 10. – C. 2613-2615.
371. Matsui K. et al. Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B) //Febs Letters. – 1996. – T. 394. – №. 1. – C. 21-24.
372. Matsui K. et al. Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber //Phytochemistry. – 2006. – T. 67. – №. 7. – C. 649-657.
373. Matsui K. et al. Fatty acid 9-and 13-hydroperoxide lyases from cucumber //FEBS letters. – 2000. – T. 481. – №. 2. – C. 183-188.
374. Matsui K. et al. Fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme, hydroperoxide lyase, from tea leaves //Phytochemistry. – 1991. – T. 30. – №. 7. – C. 2109-2113.
375. Matsui K. et al. Molecular cloning and expression of Arabidopsis fatty acid hydroperoxide lyase //Plant and cell physiology. – 1999. – T. 40. – №. 5. – C. 477-481.
376. Matsui K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism //Current opinion in plant biology. – 2006. – T. 9. – №. 3. – C. 274-280.
377. Matsui K., Kajiwara T., Hatanaka A. Inactivation of tea leaf hydroperoxide lyase by fatty acid hydroperoxide //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1992. – T. 40. – №. 2. – C. 175-178.
378. Matsui K., Koeduka T. Green leaf volatiles in plant signaling and response //Lipids in Plant and Algae Development. – 2016. – C. 427-443.

379. MAU J. E. N. G. L., BEELMAN R. O. B., ZIEGLER G. R. R. 1-Octen-3-ol in the Cultivated Mushroom, *Agaricus bisporus* //Journal of food science. – 1992. – T. 57. – №. 3. – C. 704-706.
380. Mau J. L. et al. Effect of nutrient supplementation on flavor, quality, and shelf life of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* //Mycologia. – 1991. – T. 83. – №. 2. – C. 142-149.
381. McIntosh J. A., Farwell C. C., Arnold F. H. Expanding P450 catalytic reaction space through evolution and engineering //Current opinion in chemical biology. – 2014. – T. 19. – C. 126-134.
382. Medina S. et al. Evaluation of *Phoenix dactylifera* Edible Parts and Byproducts as Sources of Phytoprostanes and Phytofurans //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2020. – T. 68. – №. 33. – C. 8942-8950.
383. Medina S. et al. Structural/functional matches and divergences of phytoprostanes and phytofurans with bioactive human oxylipins //Antioxidants. – 2018. – T. 7. – №. 11. – C. 165.
384. Mellor N. et al. Reduction of Off-Flavor Generation in Soybean Homogenates: A Mathematical Model //Journal of food science. – 2010. – T. 75. – №. 7. – C. R131-R138.
385. Mercier J., Agoh B. Behavior of long-chain allylic hydroperoxides in presence of complexes of certain transition-metals. 1. Structure of epoxy alcohols formed from hydroxyperoxides of methyl-10-undeceneoate in presence of vanadyl acetylacetonate. – 1974. – T. 12. – №. 3. – C. 232-238.
386. Mikolajczak K. L., Smith C. R. Optically active trihydroxy acids of Chamaepeuce seed oils //Lipids. – 1967. – T. 2. – №. 3. – C. 261-265.
387. Miller S. B. Prostaglandins in health and disease: an overview //Seminars in arthritis and rheumatism. – WB Saunders, 2006. – T. 36. – №. 1. – C. 37-49.
388. Milne G. L. et al. Isoprostane generation and function //Chemical reviews. – 2011. – T. 111. – №. 10. – C. 5973-5996.

389. Minghetti L. et al. Nonenzymatic oxygenated metabolites of α -linolenic acid B1-and L1-phytoprostanes protect immature neurons from oxidant injury and promote differentiation of oligodendrocyte progenitors through PPAR- γ activation //Free Radical Biology and Medicine. – 2014. – T. 73. – C. 41-50.
390. Miralto A. et al. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction //Nature. – 1999. – T. 402. – №. 6758. – C. 173-176.
391. Mita G. et al. Molecular cloning and characterization of an almond 9-hydroperoxide lyase, a new CYP74 targeted to lipid bodies //Journal of experimental botany. – 2005. – T. 56. – №. 419. – C. 2321-2333.
392. Morrow J. D. et al. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1990. – T. 87. – №. 23. – C. 9383-9387.
393. Mosblech A., Feussner I., Heilmann I. Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation //Plant Physiology and Biochemistry. – 2009. – T. 47. – №. 6. – C. 511-517.
394. Mu W. et al. Molecular cloning, expression, and enzymatic characterization of *Solanum tuberosum* hydroperoxide lyase //European Food Research and Technology. – 2012. – T. 234. – №. 4. – C. 723-731.
395. Mueller M. J. Archetype signals in plants: the phytoprostanes //Current opinion in plant biology. – 2004. – T. 7. – №. 4. – C. 441-448.
396. Mukhtarova L. S. et al. Hydroperoxide lyase cascade in pea seedlings: Non-volatile oxylipins and their age and stress dependent alterations //Phytochemistry. – 2011. – T. 72. – №. 4-5. – C. 356-364.
397. Mukhtarova L. S. et al. Plant hydroperoxide-cleaving enzymes (CYP74 family) function as hemiacetal synthases: structural proof of hemiacetals by NMR spectroscopy //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2018. – T. 1863. – №. 10. – C. 1316-1322.

398. Murphy M. P. et al. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species //Cell metabolism. – 2011. – T. 13. – №. 4. – C. 361-366.
399. Musiek E. S. et al. Quantification of F-ring isoprostane-like compounds (F4-neuroprostanes) derived from docosahexaenoic acid in vivo in humans by a stable isotope dilution mass spectrometric assay //Journal of Chromatography B. – 2004. – T. 799. – №. 1. – C. 95-102.
400. Nagai T. et al. Anti-allergic activity of a Kampo (Japanese herbal) medicine “Sho-seiryu-to (Xiao-Qing-Long-Tang)” on airway inflammation in a mouse model //International immunopharmacology. – 2004. – T. 4. – №. 10-11. – C. 1353-1365.
401. Nagai T. et al. Pinellic acid from the tuber of *Pinellia ternata* Breitenbach as an effective oral adjuvant for nasal influenza vaccine //International Immunopharmacology. – 2002. – T. 2. – №. 8. – C. 1183-1193.
402. Nakajyo H. et al. Arabidopside F, a new oxylipin from *Arabidopsis thaliana* //Heterocycles. – 2006. – T. 69. – C. 295-301.
403. Nakamura S., Hatanaka A. Green-leaf-derived C6-aroma compounds with potent antibacterial action that act on both gram-negative and gram-positive bacteria //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2002. – T. 50. – №. 26. – C. 7639-7644.
404. Nakashima A. et al. Monogalactosyl diacylglycerol is a substrate for lipoxygenase: its implications for oxylipin formation directly from lipids //Journal of Plant Interactions. – 2011. – T. 6. – №. 2-3. – C. 93-97.
405. Nakashima A. et al. Traumatins and dinortraumatins-containing galactolipids in Arabidopsis: their formation in tissue-disrupted leaves as counterparts of green leaf volatiles //Journal of Biological Chemistry. – 2013. – T. 288. – №. 36. – C. 26078-26088.
406. Nelson D. R. Cytochrome P450 diversity in the tree of life //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2018. – T. 1866. – №. 1. – C. 141-154.

407. Nelson D. R. Cytochrome P450 nomenclature //Cytochrome P450 Protocols. – Humana Press, 1998. – C. 15-24.
408. Nelson D. R. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450 //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2011. – T. 1814. – №. 1. – C. 14-18.
409. Nelson D. R., Goldstone J. V., Stegeman J. J. The cytochrome P450 genesis locus: the origin and evolution of animal cytochrome P450s //Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2013. – T. 368. – №. 1612. – C. 20120474.
410. Németh Á. S. et al. Biocatalytic production of 2 (E)-hexenal from hydrolysed linseed oil //Enzyme and microbial technology. – 2004. – T. 34. – №. 7. – C. 667-672.
411. Niki E., Noguchi N. Dynamics of antioxidant action of vitamin E //Accounts of chemical research. – 2004. – T. 37. – №. 1. – C. 45-51.
412. Noordermeer M. A. et al. Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics //European journal of biochemistry. – 2000. – T. 267. – №. 9. – C. 2473-2482.
413. Noordermeer M. A. et al. Development of a biocatalytic process for the production of C6-aldehydes from vegetable oils by soybean lipoxygenase and recombinant hydroperoxide lyase //Journal of agricultural and food chemistry. – 2002. – T. 50. – №. 15. – C. 4270-4274.
414. Noordermeer M. A., Veldink G. A., Vliegthart J. F. G. Alfalfa contains substantial 9-hydroperoxide lyase activity and a 3Z: 2E-enal isomerase //Febs Letters. – 1999. – T. 443. – №. 2. – C. 201-204.
415. Noordermeer M. A., Veldink G. A., Vliegthart J. F. G. Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance //Chembiochem. – 2001a. – T. 2. – №. 7-8. – C. 494-504.

416. Noordermeer M. A., Veldink G. A., Vliegthart J. F. G. Spectroscopic studies on the active site of hydroperoxide lyase; the influence of detergents on its conformation //FEBS letters. – 20016. – T. 489. – №. 2-3. – C. 229-232.
417. Nourooz-Zadeh J. Key issues in F2-isoprostane analysis //Biochemical Society Transactions. – 2008. – T. 36. – №. 5. – C. 1060-1065.
418. Nugteren D. H. Arachidonate lipoxygenase in blood platelets //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism. – 1975. – T. 380. – №. 2. – C. 299-307.
419. Ogliaro F., de Visser S. P., Shaik S. The ‘push’effect of the thiolate ligand in cytochrome P450: a theoretical gauging //Journal of inorganic biochemistry. – 2002. – T. 91. – №. 4. – C. 554-567.
420. Ogorodnikova A. V. et al. Detection of divinyl ether synthase in Lily-of-the-Valley (*Convallaria majalis*) roots //Phytochemistry. – 2008. – T. 69. – №. 16. – C. 2793-2798.
421. Ogorodnikova A. V. et al. Stereospecific biosynthesis of (9*S*,13*S*)-10-oxo-phytoenoic acid in young maize roots //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2015a. – T. 1851. – №. 9. – C. 1262-1270.
422. Ogorodnikova A. V., Mukhitova F. K., Grechkin A. N. Oxylipins in the spikemoss *Selaginella martensii*: Detection of divinyl ethers, 12-oxophytodienoic acid and related cyclopentenones //Phytochemistry. – 20156. – T. 118. – C. 42-50.
423. Ogorodnikova A. V., Mukhitova F. K., Grechkin A. N. Screening of divinyl ether synthase activity in nonphotosynthetic tissue of asparagales //Doklady. Biochemistry and biophysics. – Springer Nature BV, 2013. – T. 449. – №. 1. – C. 116.
424. Ohta H. et al. The occurrence of lipid hydroperoxide-decomposing activities in rice and the relationship of such activities to the formation of anti-

- fungal substances //Plant and cell physiology. – 1990. – T. 31. – №. 8. – C. 1117-1122.
425. Oldham M. L., Brash A. R., Newcomer M. E. The structure of coral allene oxide synthase reveals a catalase adapted for metabolism of a fatty acid hydroperoxide //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – T. 102. – №. 2. – C. 297-302.
426. Olias J. M. et al. Fatty acid hydroperoxide lyase in germinating soybean seedlings //Journal of agricultural and food chemistry. – 1990. – T. 38. – №. 3. – C. 624-630.
427. Oliw E. H. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450 monooxygenases //Progress in lipid research. – 1994. – T. 33. – №. 3. – C. 329-354.
428. Oliw E. H. et al. Stereoselective oxidation of regioisomeric octadecenoic acids by fatty acid dioxygenases //Journal of lipid research. – 2011. – T. 52. – №. 11. – C. 1995-2004.
429. Oliw E. H., Hamberg M. An allene oxide and 12-oxophytodienoic acid are key intermediates in jasmonic acid biosynthesis by *Fusarium oxysporum* //Journal of lipid research. – 2017. – T. 58. – №. 8. – C. 1670-1680.
430. Oliw E. H. Linoleate diol synthase related enzymes of the human pathogens *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis* //Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2020. – T. 696. – C. 108669.
431. Oliw E. H. Fatty acid dioxygenase-cytochrome P450 fusion enzymes of filamentous fungal pathogens //Fungal Genetics and Biology. – 2021. – T. 157. – C. 103623.
432. Omura T., Gotoh O. Evolutionary origin of mitochondrial cytochrome P450 //The Journal of Biochemistry. – 2017. – T. 161. – №. 5. – C. 399-407.
433. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature //J Biol Chem. – 1964. – T. 239. – №. 7. – C. 2370-2378.

434. Ono E. et al. CYP74B24 is the 13-hydroperoxide lyase involved in biosynthesis of green leaf volatiles in tea (*Camellia sinensis*) //Plant Physiology and Biochemistry. – 2016. – T. 98. – C. 112-118.
435. Oshima H., Oshima M. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models //Journal of gastroenterology. – 2012. – T. 47. – №. 2. – C. 97-106.
436. Pace-Asciak C. R. et al. Oxygenation of arachidonic acid into 8,11,12- and 10,11,12-trihydroxyeicosatrienoic acid by rat lung //Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research. – 1983b. – T. 11. – C. 133-139.
437. Pace-Asciak C. R., Granström E., Samuelsson B. Arachidonic acid epoxides. Isolation and structure of two hydroxy epoxide intermediates in the formation of 8,11,12- and 10,11,12-trihydroxyeicosatrienoic acids //Journal of Biological Chemistry. – 1983a. – T. 258. – №. 11. – C. 6835-6840.
438. Pace-Asciak C. R., Keiko M., Shozo Y. The enzymatic conversion of arachidonic acid into 8,11,12-trihydroxyeicosatrienoic acid Resolution of rat lung enzyme into two active fractions //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism. – 1982. – T. 712. – №. 1. – C. 142-145.
439. Padilla M. N. et al. Isolation, expression, and characterization of a 13-hydroperoxide lyase gene from olive fruit related to the biosynthesis of the main virgin olive oil aroma compounds //Journal of agricultural and food chemistry. – 2010. – T. 58. – №. 9. – C. 5649-5657.
440. Pallan P. S. et al. Research resource: correlating human cytochrome P450 21A2 crystal structure and phenotypes of mutations in congenital adrenal hyperplasia //Molecular Endocrinology. – 2015. – T. 29. – №. 9. – C. 1375-1384.

441. Panagakou I., Touloupakis E., Ghanotakis D. F. Structural characterization of hydroperoxide lyase in dodecyl maltoside by using circular dichroism //The protein journal. – 2013. – T. 32. – №. 1. – C. 1-6.
442. Panossian A. G. et al. Unsaturated polyhydroxy acids having prostaglandin-like activity from *Bryonia alba* II. Major components //Planta medica. – 1983. – T. 47. – №. 01. – C. 17-25.
443. Park J. H. et al. A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in Arabidopsis due to a block in jasmonic acid biosynthesis //The Plant Journal. – 2002. – T. 31. – №. 1. – C. 1-12.
444. Peña-Cortés H., Fisahn J., Willmitzer L. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1995. – T. 92. – №. 10. – C. 4106-4113.
445. Pérez A. G. et al. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1999. – T. 47. – №. 1. – C. 249-253.
446. Pettersen E. F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis //Journal of computational chemistry. – 2004. – T. 25. – №. 13. – C. 1605-1612.
447. Phillips D. R. et al. Partial purification and properties of a *cis*-3:*trans*-2-enal isomerase from cucumber fruit //Phytochemistry. – 1979. – T. 18. – №. 3. – C. 401-404.
448. Phillips I. R., Shephard E. A., de Montellano P. R. O. (ed.). Cytochrome P450 protocols. – Totowa: : Humana Press, 1998. – T. 320. – C. 364.
449. Piazza G. J., Foglia T. A., Nuñez A. Enantioselective formation of an α , β -epoxy alcohol by reaction of methyl 13(*S*)-hydroperoxy-9(*Z*),11(*E*)-octadecadienoate with titanium isopropoxide //Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1997. – T. 74. – №. 11. – C. 1385-1390.

450. Piazza G. J., Foglia T. A., Nuñez A. Preparation of fatty epoxy alcohols using oat seed peroxygenase in nonaqueous media //Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1999. – T. 76. – №. 5. – C. 551-555.
451. Pinciroli M. et al. Impact of Salicylic Acid Content and Growing Environment on Phytoprostane and Phytofuran (Stress Biomarkers) in *Oryza sativa* L //Journal of agricultural and food chemistry. – 2018. – T. 66. – №. 47. – C. 12561-12570.
452. Pinciroli M. et al. Statement of foliar fertilization impact on yield, composition, and oxidative biomarkers in rice //Journal of agricultural and food chemistry. – 2018. – T. 67. – №. 2. – C. 597-605.
453. Piotrowska A. et al. Jasmonic acid as modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae) //Environmental and experimental botany. – 2009. – T. 66. – №. 3. – C. 507-513.
454. Piotrowska A., Bajguz A. Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates //Phytochemistry. – 2011. – T. 72. – №. 17. – C. 2097-2112.
455. Poulos T. L. et al. The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450 //Journal of Biological Chemistry. – 1985. – T. 260. – №. 30. – C. 16122-16130.
456. Poulos T. L. Thirty years of heme peroxidase structural biology //Archives of biochemistry and biophysics. – 2010. – T. 500. – №. 1. – C. 3-12.
457. Poulos T. L., Johnson E. F. Structures of cytochrome P450 enzymes. Ortiz de Montellano Paul R, editor. Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry, vols. 3–32. Cham: Springer International Publishing; 2015.
458. Prost I. et al. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens //Plant physiology. – 2005. – T. 139. – №. 4. – C. 1902-1913.

459. Proteau P. J., Gerwick W. H. Divinyl ethers and hydroxy fatty acids from three species of *Laminaria* (brown algae) //Lipids. – 1993. – T. 28. – №. 9. – C. 783-787.
460. Proteau P. J., Rossi J. V., Gerwick W. H. Absolute stereochemistry of neohalicholactone from the brown alga *Laminaria sinclairii* //Journal of natural products. – 1994. – T. 57. – №. 12. – C. 1717-1719.
461. Putnam N. H. et al. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization //science. – 2007. – T. 317. – №. 5834. – C. 86-94.
462. Rabetafika H. N. et al. Sugar beet leaves as new source of hydroperoxide lyase in a bioprocess producing green-note aldehydes //Biotechnology letters. – 2008. – T. 30. – №. 6. – C. 1115-1119.
463. Ramos L. L. P. et al. Phenolic, oxylipin and fatty acid profiles of the Chilean hazelnut (*Gevuina avellana*): Antioxidant activity and inhibition of pro-inflammatory and metabolic syndrome-associated enzymes //Food chemistry. – 2019. – T. 298. – C. 125026.
464. Rancé I., Fournier J., Esquerré-Tugayé M. T. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – T. 95. – №. 11. – C. 6554-6559.
465. Ravichandran K. G. et al. Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's //Science. – 1993. – T. 261. – №. 5122. – C. 731-736.
466. Rehbock B., Berger R. G. Covalent immobilization of a hydroperoxide lyase from mung beans (*Phaseolus radiatus* L.) //Biotechnology techniques. – 1998. – T. 12. – №. 7. – C. 539-544.
467. Reich E. E. et al. Formation of novel D-ring and E-ring isoprostane-like compounds (D4/E4-neuroprostanes) *in vivo* from docosahexaenoic acid //Biochemistry. – 2000. – T. 39. – №. 9. – C. 2376-2383.

468. Renault H. et al. Cytochrome P450-mediated metabolic engineering: current progress and future challenges //Current opinion in plant biology. – 2014. – T. 19. – C. 27-34.
469. Reyes-Díaz M. et al. Methyl jasmonate: an alternative for improving the quality and health properties of fresh fruits //Molecules. – 2016. – T. 21. – №. 6. – C. 567.
470. Riley J. C. M., Willemot C., Thompson J. E. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening tomato fruit //Postharvest Biology and Technology. – 1996. – T. 7. – №. 1-2. – C. 97-107.
471. Ritter A. et al. Transcriptomic and metabolomic analysis of copper stress acclimation in *Ectocarpus siliculosus* highlights signaling and tolerance mechanisms in brown algae //BMC plant biology. – 2014. – T. 14. – №. 1. – C. 1-17.
472. Roberts L. J., Fessel J. P., Davies S. S. The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran pathways of lipid peroxidation //Brain Pathology. – 2005. – T. 15. – №. 2. – C. 143-148.
473. Royo J. et al. Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns //Journal of Biological Chemistry. – 1996. – T. 271. – №. 35. – C. 21012-21019.
474. Ruan J. et al. Jasmonic acid signaling pathway in plants //International journal of molecular sciences. – 2019. – T. 20. – №. 10. – C. 2479.
475. Rundhaug J. E. et al. The role of the EP receptors for prostaglandin E₂ in skin and skin cancer //Cancer and Metastasis Reviews. – 2011. – T. 30. – №. 3. – C. 465-480.
476. Ruocco N. et al. Multiple roles of diatom-derived oxylipins within marine environments and their potential biotechnological applications //Marine Drugs. – 2020. – T. 18. – №. 7. – C. 342.
477. Salas J. J. et al. Impact of the suppression of lipoxygenase and hydroperoxide lyase on the quality of the green odor in green leaves

- //Journal of agricultural and food chemistry. – 2005. – T. 53. – №. 5. – C. 1648-1655.
478. Salas J. J., García-González D. L., Aparicio R. Volatile compound biosynthesis by green leaves from an *Arabidopsis thaliana* hydroperoxide lyase knockout mutant //Journal of agricultural and food chemistry. – 2006. – T. 54. – №. 21. – C. 8199-8205.
479. Salas J. J., Sánchez J. Alcohol dehydrogenases from olive (*Olea europaea*) fruit //Phytochemistry. – 1998. – T. 48. – №. 1. – C. 35-40.
480. Salaün J. P. et al. Epoxidation of *cis* and *trans* Δ 9-unsaturated lauric acids by a cytochrome P-450-dependent system from higher plant microsomes //Febs Letters. – 1989. – T. 246. – №. 1-2. – C. 120-126.
481. Samuelsson B. Identification of a smooth muscle-stimulating factor in bovine brain. Prostaglandins and related factors 25 //Biochimica et biophysica acta. – 1964. – T. 84. – C. 218-219.
482. Sánchez S. M. et al. Bioavailable phytoprostanes and phytofurans from *Gracilaria longissima* have anti-inflammatory effects in endothelial cells //Food & Function. – 2020. – T. 11. – №. 6. – C. 5166-5178.
483. Santiago-Gómez M. P. et al. Characterization of purified green bell pepper hydroperoxide lyase expressed by *Yarrowia lipolytica*: radicals detection during catalysis //Enzyme and microbial technology. – 2007. – T. 41. – №. 1-2. – C. 13-18.
484. Santiago-Gómez M. P. et al. Predicted secondary structure of hydroperoxide lyase from green bell pepper cloned in the yeast *Yarrowia lipolytica* //Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2010. – T. 65. – №. 1-4. – C. 63-67.
485. Santiago-Gómez M. P. et al. Secondary structure conformation of hydroperoxide lyase from green bell pepper, cloned in *Yarrowia lipolytica*, and its activity in selected media //Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2008. – T. 52. – C. 128-132.

486. Sanz A., Moreno J. I., Castresana C. PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase //The Plant Cell. – 1998. – T. 10. – №. 9. – C. 1523-1537.
487. Sauveplane V. et al. *Arabidopsis thaliana* CYP77A4 is the first cytochrome P450 able to catalyze the epoxidation of free fatty acids in plants //The FEBS journal. – 2009. – T. 276. – №. 3. – C. 719-735.
488. Savchenko T. et al. Insect herbivores selectively suppress the HPL branch of the oxylipin pathway in host plants //The Plant Journal. – 2013. – T. 73. – №. 4. – C. 653-662.
489. Savchenko T. V., Zastrijnaja O. M., Klimov V. V. Oxylipins and plant abiotic stress resistance //Biochemistry (Moscow). – 2014. – T. 79. – №. 4. – C. 362-375.
490. Schade F., Thompson J. E., Legge R. L. Use of a plant-derived enzyme template for the production of the green-note volatile hexanal //Biotechnology and bioengineering. – 2003. – T. 84. – №. 3. – C. 265-273.
491. Schaller A., Stintzi A. Enzymes in jasmonate biosynthesis—structure, function, regulation //Phytochemistry. – 2009. – T. 70. – №. 13-14. – C. 1532-1538.
492. Schaller F., Hennig P., Weiler E. W. 12-Oxophytodienoate-10, 11-reductase: occurrence of two isoenzymes of different specificity against stereoisomers of 12-oxophytodienoic acid //Plant physiology. – 1998. – T. 118. – №. 4. – C. 1345-1351.
493. Schenkman J. B., Jansson I. Spectral analyses of cytochromes P450 //Cytochrome P450 protocols. – Humana Press, Totowa, NJ, 2006. – C. 11-18.
494. Schilmiller A. L., Howe G. A. Systemic signaling in the wound response //Current opinion in plant biology. – 2005. – T. 8. – №. 4. – C. 369-377.
495. Schmidt W. M., Mueller M. W. CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated

- analysis of mRNAs //Nucleic acids research. – 1999. – T. 27. – №. 21. – C. e31-i-e31-iv.
496. Schneider C. et al. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis //Chemistry & biology. – 2007. – T. 14. – №. 5. – C. 473-488.
497. Scholz J. et al. Biosynthesis of allene oxides in *Physcomitrella patens* //BMC plant biology. – 2012. – T. 12. – №. 1. – C. 1-15.
498. Schreier P., Lorenz G. Separation, partial purification and characterization of a fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme from apple and tomato fruits //Zeitschrift für Naturforschung C. – 1982. – T. 37. – №. 3-4. – C. 165-173.
499. Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution //Mycological research. – 2001. – T. 105. – №. 12. – C. 1413-1421.
500. Scott E. E. et al. An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-Å resolution //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – T. 100. – №. 23. – C. 13196-13201.
501. Seifert A., Pleiss J. Identification of selectivity-determining residues in cytochrome P450 monooxygenases: A systematic analysis of the substrate recognition site 5 //Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 2009. – T. 74. – №. 4. – C. 1028-1035.
502. Senger T. et al. A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens* //Journal of Biological Chemistry. – 2005. – T. 280. – №. 9. – C. 7588-7596.
503. Serizawa N. Biochemical and molecular approaches for production of pravastatin, a potent cholesterol-lowering drug //Biotechnology annual review. – 1996. – T. 2. – C. 373-389.
504. Shibata Y. et al. Fatty acid hydroperoxide lyase is a heme protein //Biochemical and biophysical research communications. – 1995. – T. 207. – №. 1. – C. 438-443.

505. Shibata Y. et al. Purification and properties of fatty acid hydroperoxide lyase from green bell pepper fruits //Plant and cell physiology. – 1995. – T. 36. – №. 1. – C. 147-156.
506. Shiojiri K. et al. Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: an approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – T. 103. – №. 45. – C. 16672-16676.
507. Simon L. M. et al. Immobilization of spinach leaf hydroperoxide lyase //Progress in Biotechnology. – Elsevier, 1998. – T. 15. – C. 547-552.
508. Smith D. M. et al. Ring opening of the cyclopropylcarbinyl radical and its N- and O-substituted analogues: a theoretical examination of very fast unimolecular reactions //Journal of the American Chemical Society. – 1998. – T. 120. – №. 39. – C. 10223-10233.
509. Smith W. L., DeWitt D. L., Garavito R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology //Annual review of biochemistry. – 2000. – T. 69. – №. 1. – C. 145-182.
510. Song W. C. et al. Formation of epoxyalcohols by a purified allene oxide synthase. Implications for the mechanism of allene oxide synthesis //Journal of Biological Chemistry. – 1993. – T. 268. – №. 9. – C. 6293-6298.
511. Song W. C., Funk C. D., Brash A. R. Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1993. – T. 90. – №. 18. – C. 8519-8523.
512. Spickett C. M. et al. Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products //Free radical research. – 2010. – T. 44. – №. 10. – C. 1172-1202.
513. Splivallo R. et al. Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana* //New Phytologist. – 2007. – T. 175. – №. 3. – C. 417-424.

514. Spyropoulou E. A. et al. Identification and characterization of (3Z):(2E)-hexenal isomerases from cucumber //Frontiers in plant science. – 2017. – T. 8. – C. 1342.
515. Stadler M. et al. Fatty acids and other compounds with nematocidal activity from cultures of Basidiomycetes //Planta medica. – 1994. – T. 60. – №. 02. – C. 128-132.
516. Stelmach B. A. et al. A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl diglyceride, from *Arabidopsis thaliana* //Journal of Biological Chemistry. – 2001. – T. 276. – №. 16. – C. 12832-12838.
517. Stenzel I. et al. ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC) gene family members of *Arabidopsis thaliana*: tissue-and organ-specific promoter activities and *in vivo* heteromerization //Journal of experimental botany. – 2012. – T. 63. – №. 17. – C. 6125-6138.
518. Stenzel I. et al. Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato—amplification in wound signalling //The Plant Journal. – 2003. – T. 33. – №. 3. – C. 577-589.
519. Stern P. H. et al. Human transforming growth factor-alpha stimulates bone resorption in vitro //The Journal of clinical investigation. – 1985. – T. 76. – №. 5. – C. 2016-2019.
520. Stintzi A. et al. Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – T. 98. – №. 22. – C. 12837-12842.
521. Stodola F. H., Deinema M. H., Spencer J. F. Extracellular lipids of yeasts //Bacteriological reviews. – 1967. – T. 31. – №. 3. – C. 194-213.
522. Stolterfoht H. et al. Recombinant lipoxygenases and hydroperoxide lyases for the synthesis of green leaf volatiles //Journal of agricultural and food chemistry. – 2019. – T. 67. – №. 49. – C. 13367-13392.

523. Stumpe M. et al. A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells //FEBS letters. – 2001. – T. 507. – №. 3. – C. 371-376.
524. Stumpe M. et al. Biosynthesis of C9-aldehydes in the moss *Physcomitrella patens* //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2006. – T. 1761. – №. 3. – C. 301-312.
525. Stumpe M. et al. Divinyl ether synthesis in garlic bulbs //Journal of experimental botany. – 2008. – T. 59. – №. 4. – C. 907-915.
526. Stumpe M. et al. Identification of an allene oxide synthase (CYP74C) that leads to formation of α -ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below-ground organs of potato //The Plant Journal. – 2006. – T. 47. – №. 6. – C. 883-896.
527. Stumpe M., Feussner I. Formation of oxylipins by CYP74 enzymes //Phytochemistry Reviews. – 2006. – T. 5. – №. 2. – C. 347-357.
528. Su C., Oliw E. H. Manganese lipoxygenase: purification and characterization //Journal of Biological Chemistry. – 1998. – T. 273. – №. 21. – C. 13072-13079.
529. Suemune H., Harabe T., Sakai K. Syntheses of unsaturated trihydroxy C-18 fatty acids isolated from rice plants suffering from rice blast disease //Chemical and pharmaceutical bulletin. – 1988. – T. 36. – №. 9. – C. 3632-3637.
530. Sugimoto K. et al. Intake and transformation to a glycoside of (Z)-3-hexenol from infested neighbors reveals a mode of plant odor reception and defense //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – T. 111. – №. 19. – C. 7144-7149.
531. Suurmeijer C. N. S. P. et al. Purification, stabilization and characterization of tomato fatty acid hydroperoxide lyase //Phytochemistry. – 2000. – T. 53. – №. 2. – C. 177-185.
532. Syed K. et al. CYP63A2, a catalytically versatile fungal P450 monooxygenase capable of oxidizing higher-molecular-weight polycyclic

- aromatic hydrocarbons, alkylphenols, and alkanes //Applied and environmental microbiology. – 2013. – T. 79. – №. 8. – C. 2692-2702.
533. Taki N. et al. 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis* //Plant physiology. – 2005. – T. 139. – №. 3. – C. 1268-1283.
534. Tanaka T. et al. Identification of a hexenal reductase that modulates the composition of green leaf volatiles //Plant physiology. – 2018. – T. 178. – №. 2. – C. 552-564.
535. Teder T. et al. A catalase-related hemoprotein in coral is specialized for synthesis of short-chain aldehydes: Discovery of P450-type hydroperoxide lyase activity in a catalase //Journal of Biological Chemistry. – 2015. – T. 290. – №. 32. – C. 19823-19832.
536. Teder T., Löhelaid H., Samel N. Structural and functional insights into the reaction specificity of catalase-related hydroperoxide lyase: A shift from lyase activity to allene oxide synthase by site-directed mutagenesis //PloS one. – 2017. – T. 12. – №. 9. – C. e0185291.
537. Thomas C. P. et al. Steric analysis of epoxyalcohol and trihydroxy derivatives of 9-hydroperoxy-linoleic acid from hematin and enzymatic synthesis //Chemistry and physics of lipids. – 2013. – T. 167. – C. 21-32.
538. Tijet N. et al. Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9-and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids //Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2001. – T. 386. – №. 2. – C. 281-289.
539. Tijet N. et al. Purification, molecular cloning, and expression of the gene encoding fatty acid 13-hydroperoxide lyase from guava fruit (*Psidium guajava*) //Lipids. – 2000. – T. 35. – №. 7. – C. 709-720.
540. Toporkova Y. Y. et al. Catalysis by allene oxide synthases (CYP74A and CYP74C): alterations by the Phe/Leu mutation at the SRS-1 region //Phytochemistry. – 2020a. – T. 169. – C. 112152.

541. Toporkova Y. Y. et al. Detection of the first higher plant epoxyalcohol synthase: Molecular cloning and characterisation of the CYP74M2 enzyme of spikemoss *Selaginella moellendorffii* //Phytochemistry. – 2018b. – T. 156. – C. 73-82.
542. Toporkova Y. Y. et al. Determinants governing the CYP74 catalysis: conversion of allene oxide synthase into hydroperoxide lyase by site-directed mutagenesis //FEBS letters. – 2008. – T. 582. – №. 23-24. – C. 3423-3428.
543. Toporkova Y. Y. et al. 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. – 2018a. – T. 1863. – №. 4. – C. 369-378.
544. Toporkova Y. Y. et al. Epoxyalcohol synthase activity of the CYP74B enzymes of higher plants //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2020b. – T. 1865. – №. 9. – C. 158743.
545. Toporkova Y. Y. et al. 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. – 2017a. – T. 1862. – №. 2. – C. 167-175.
546. Toporkova Y. Y. et al. 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. – 2017b. – T. 1862. – №. 10. – C. 1099-1109.
547. Toporkova Y. Y. et al. Structure-function relationship in the CYP74 family: conversion of divinyl ether synthases into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis //FEBS letters. – 2013. – T. 587. – №. 16. – C. 2552-2558.

548. Toporkova Y. Y. et al. 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. – 2020B. – T. 179. – C. 112512.
549. Tulin S. et al. A quantitative reference transcriptome for *Nematostella vectensis* earlyembryonic development: a pipeline for de novo assembly in emerging model systems //EvoDevo. – 2013. – T. 4. – №. 1. – C. 1-15.
550. Turner J. G., Ellis C., Devoto A. The jasmonate signal pathway //The Plant Cell. – 2002. – T. 14. – №. suppl 1. – C. S153-S164.
551. Turro N. J. Cyclopropanones //Accounts of Chemical Research. – 1969. – T. 2. – №. 1. – C. 25-32.
552. Ueda M., Kaji T., Kozaki W. Recent advances in plant chemical biology of jasmonates //International journal of molecular sciences. – 2020. – T. 21. – №. 3. – C. 1124.
553. ul Hassan M. N., Zainal Z., Ismail I. Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology //Plant biotechnology journal. – 2015. – T. 13. – №. 6. – C. 727-739.
554. Uotila P., Matintalo M., Dahl M. L. Arachidonic acid induced platelet aggregation and thromboxane formation is inhibited by OKY-1581 //Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine. – 1983. – T. 12. – №. 3. – C. 299-303.
555. Üstünes L. et al. Isolation and identification of two isomeric trihydroxy octadecenoic acids with prostaglandin E-like activity from onion bulbs (*Allium cepa*) //Prostaglandins. – 1985. – T. 29. – №. 5. – C. 847-865.
556. van der Stelt M. et al. Formation of a new class of oxylipins from N-acyl (ethanol) amines by the lipoxygenase pathway //European journal of biochemistry. – 2000. – T. 267. – №. 7. – C. 2000-2007.
557. Van Poecke R. M. P., Posthumus M. A., Dicke M. Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid

- toid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis //Journal of chemical ecology. – 2001. – T. 27. – №. 10. – C. 1911-1928.
558. Vancanneyt G. et al. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance //Proceedings of the national academy of sciences. – 2001. – T. 98. – №. 14. – C. 8139-8144.
559. Varvas K. et al. Evidence of a cyclooxygenase-related prostaglandin synthesis in coral: the allene oxide pathway is not involved in prostaglandin biosynthesis //Journal of Biological Chemistry. – 1999. – T. 274. – №. 15. – C. 9923-9929.
560. Vicente J. et al. Role of 9-lipoxygenase and α -dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense //Molecular Plant. – 2012. – T. 5. – №. 4. – C. 914-928.
561. Vick B. A., Feng P., Zimmerman D. C. Formation of 12-[18O]Oxo-*cis*-10,*cis*-15-phytodienoic acid from 13-[18O]hydroperoxylinolenic acid by hydroperoxide cyclase //Lipids. – 1980. – T. 15. – №. 6. – C. 468-471.
562. Vick B. A., Zimmerman D. C. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedlings //Plant Physiology. – 1976. – T. 57. – №. 5. – C. 780-788.
563. Vick B. A., Zimmerman D. C. Metabolism of fatty acid hydroperoxides by *Chlorella pyrenoidosa* //Plant physiology. – 1989. – T. 90. – №. 1. – C. 125-132.
564. Vidi P. A. et al. Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles //Journal of biological chemistry. – 2006. – T. 281. – №. 16. – C. 11225-11234.
565. Villena J. F. et al. Characterization and biosynthesis of non-degradable polymers in plant cuticles //Planta. – 1999. – T. 208. – №. 2. – C. 181-187.
566. von Saint Paul V. et al. The Arabidopsis glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence //The Plant Cell. – 2011. – T. 23. – №. 11. – C. 4124-4145.

567. Walker I. C., Jones R. L., Wilson N. H. The identification of an epoxy-hydroxy acid as a product from the incubation of arachidonic acid with washed blood platelets //Prostaglandins. – 1979. – T. 18. – №. 2. – C. 173-178.
568. Walters D. R., Cowley T., Weber H. Rapid accumulation of trihydroxy oxylipins and resistance to the bean rust pathogen *Uromyces fabae* following wounding in *Vicia faba* //Annals of Botany. – 2006. – T. 97. – №. 5. – C. 779-784.
569. Wan X. H. et al. Isolation, expression, and characterization of a hydroperoxide lyase gene from cucumber //International journal of molecular sciences. – 2013. – T. 14. – №. 11. – C. 22082-22101.
570. Wang J. Z., Wang F. B. Studies on chemical constituents of *Codonopsis pilosula* //Nat Prod Res Dev. – 1996. – T. 8. – C. 8-12.
571. Wang K. D. et al. Oxylipins other than jasmonic acid are xylem-resident signals regulating systemic resistance induced by *Trichoderma virens* in maize //The Plant Cell. – 2020. – T. 32. – №. 1. – C. 166-185.
572. Wang L. et al. Independently silencing two JAR family members impairs levels of trypsin proteinase inhibitors but not nicotine //Planta. – 2007. – T. 226. – №. 1. – C. 159-167.
573. Wasserman H. H., Clark G. M., Turley P. C. Recent aspects of cyclopropanone chemistry //Stereochemistry I. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1974. – C. 73-156.
574. Wasternack C. et al. The wound response in tomato—role of jasmonic acid //Journal of plant physiology. – 2006. – T. 163. – №. 3. – C. 297-306.
575. Wasternack C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development //Annals of botany. – 2007. – T. 100. – №. 4. – C. 681-697.
576. Wasternack C., Feussner I. The oxylipin pathways: biochemistry and function //Annual review of plant biology. – 2018. – T. 69. – C. 363-386.

577. Wasternack C., Hause B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany* // *Annals of botany*. – 2013. – T. 111. – №. 6. – C. 1021-1058.
578. Wasternack C., Song S. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription // *Journal of Experimental Botany*. – 2017. – T. 68. – №. 6. – C. 1303-1321.
579. Weber H. et al. Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves // *The Plant Cell*. – 1999. – T. 11. – №. 3. – C. 485-493.
580. Weber H. Fatty acid-derived signals in plants // *Trends in plant science*. – 2002. – T. 7. – №. 5. – C. 217-224.
581. Wennman A., Oliw E. H. Secretion of two novel enzymes, manganese 9S-lipoxygenase and epoxy alcohol synthase, by the rice pathogen *Magnaporthe salvinii* // *Journal of lipid research*. – 2013. – T. 54. – №. 3. – C. 762-775.
582. Werck-Reichhart D., Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story // *Genome biology*. – 2000. – T. 1. – №. 6. – C. 1-9.
583. White R. E., Coon M. J. Oxygen activation by cytochrome P-4501 // *Annual review of biochemistry*. – 1980. – T. 49. – №. 1. – C. 315-356.
584. Williams P. A. et al. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity // *Molecular cell*. – 2000. – T. 5. – №. 1. – C. 121-131.
585. Wilson D. E., Phillips C., Levine R. A. Inhibition of gastric secretion in man by prostaglandin A1 // *Gastroenterology*. – 1971. – T. 61. – №. 2. – C. 201-206.
586. Wilson D. H. Effects of intermittent versus continuous renal arterial occlusion on hemodynamics and function of the kidney // *Invest Urol*. – 1971. – T. 8. – C. 6507-6515.

587. Wilson R. A., Gardner H. W., Keller N. P. Cultivar-dependent expression of a maize lipoxygenase responsive to seed infesting fungi //Molecular plant-microbe interactions. – 2001. – T. 14. – №. 8. – C. 980-987.
588. Wolff R. L. et al. Arachidonic, eicosapentaenoic, and biosynthetically related fatty acids in the seed lipids from a primitive gymnosperm, *Agathis robusta* //Lipids. – 1999. – T. 34. – №. 10. – C. 1083-1097.
589. Wu X., Ye J. Manipulation of jasmonate signaling by plant viruses and their insect vectors //Viruses. – 2020. – T. 12. – №. 2. – C. 148.
590. Wurzenberger M., Grosch W. Stereochemistry of the cleavage of the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid to 1-octen-3-ol by a hydroperoxide lyase from mushrooms (*Psalliota bispora*) //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism. – 1984a. – T. 795. – №. 1. – C. 163-165.
591. Wurzenberger M., Grosch W. The formation of 1-octen-3-ol from the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid by a hydroperoxide lyase in mushrooms (*Psalliota bispora*) //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism. – 1984b. – T. 794. – №. 1. – C. 25-30.
592. Xiong J. et al. Production of (2*E*)-hexenal by a hydroperoxide lyase from *Amaranthus tricolor* and salt-adding steam distillation for the separation //European Food Research and Technology. – 2012. – T. 235. – №. 5. – C. 783-792.
593. Xu F. et al. The heme monooxygenase cytochrome P450cam can be engineered to oxidize ethane to ethanol //Angewandte Chemie. – 2005. – T. 117. – №. 26. – C. 4097-4100.
594. Xu L. H., Du Y. L. Rational and semi-rational engineering of cytochrome P450s for biotechnological applications //Synthetic and systems biotechnology. – 2018. – T. 3. – №. 4. – C. 283-290.
595. Yamanashi H. et al. Catalytic activities of mammalian epoxide hydrolases with cis and trans fatty acid epoxides relevant to skin barrier function //Journal of lipid research. – 2018. – T. 59. – №. 4. – C. 684-695.

596. Yang Z. et al. Jasmonate signaling enhances RNA silencing and anti-viral defense in rice //Cell Host & Microbe. – 2020. – T. 28. – №. 1. – C. 89-103. e8.
597. Yokoyama M. et al. Stress-induced factor involved in flower formation of Lemna is an α -ketol derivative of linolenic acid //Plant and cell physiology. – 2000. – T. 41. – №. 1. – C. 110-113.
598. Yonny M. E. et al. Thermal stress in melon plants: phytoprostanes and phytofurans as oxidative stress biomarkers and the effect of antioxidant supplementation //Journal of agricultural and food chemistry. – 2016. – T. 64. – №. 44. – C. 8296-8304.
599. You J. et al. Determination of long-chain fatty acids in bryophyte plants extracts by HPLC with fluorescence detection and identification with MS //Journal of Chromatography B. – 2007. – T. 848. – №. 2. – C. 283-291.
600. You L. et al. LanceletDB: an integrated genome database for lancelet, comparing domain types and combination in orthologues among lancelet and other species //Database. – 2019. – T. 2019.
601. Yu X. et al. The roles of methyl jasmonate to stress in plants //Functional Plant Biology. – 2018. – T. 46. – №. 3. – C. 197-212.
602. Yu Z. et al. The lipoxygenase gene ALOXE3 implicated in skin differentiation encodes a hydroperoxide isomerase //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – T. 100. – №. 16. – C. 9162-9167.
603. Zhai Q., Li C. The plant Mediator complex and its role in jasmonate signaling //Journal of experimental botany. – 2019. – T. 70. – №. 13. – C. 3415-3424.
604. Zhang G. et al. Jasmonate-mediated wound signalling promotes plant regeneration //Nature Plants. – 2019. – T. 5. – №. 5. – C. 491-497.
605. Zheng Y. et al. A 49-kDa mini-lipoxygenase from Anabaena sp. PCC 7120 retains catalytically complete functionality //Journal of Biological Chemistry. – 2008. – T. 283. – №. 8. – C. 5138-5147.

606. Zhou M., Memelink J. Jasmonate-responsive transcription factors regulating plant secondary metabolism //Biotechnology Advances. – 2016. – Т. 34. – №. 4. – С. 441-449.
607. Zhou Y. et al. Synthetic molecular mimics of naturally occurring cyclopentenones exhibit antifungal activity towards pathogenic fungi //Microbiology. – 2011. – Т. 157. – №. 12. – С. 3435-3445.
608. Zhu G., Koszelak-Rosenblum M., Malkowski M. G. Crystal structures of α -dioxygenase from *Oryza sativa*: Insights into substrate binding and activation by hydrogen peroxide //Protein Science. – 2013. – Т. 22. – №. 10. – С. 1432-1438.
609. Zhu Z. et al. A lipoxygenase from red alga *Pyropia haitanensis*, a unique enzyme catalyzing the free radical reactions of polyunsaturated fatty acids with triple ethylenic bonds //PloS one. – 2015. – Т. 10. – №. 2. – С. e0117351.
610. Zhuo M., Sakuraba Y., Yanagisawa S. A Jasmonate-Activated MYC2-Dof2. 1-MYC2 Transcriptional Loop Promotes Leaf Senescence in Arabidopsis //The Plant Cell. – 2020. – Т. 32. – №. 1. – С. 242-262.
611. Ziegler J., Wasternack C., Hamberg M. On the specificity of allene oxide cyclase //Lipids. – 1999. – Т. 34. – №. 10. – С. 1005-1015.
612. Zoller M. J., Smith M. Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA //Nucleic Acids Research. – 1982. – Т. 10. – №. 20. – С. 6487-6500.
613. Гловер Д. Клонирование ДНК. Методы. – 1988.
614. Гоголев Ю. В. и др. Выявление и первичная характеристика нового цитохрома CYP74B1 льна (*Linum usitatissimum*) //Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российская академия наук", 2011. – Т. 440. – №. 4. – С. 540-543.
615. Горина С. и др. Превращение алленоксидсинтазы LeAOS3 (CYP74C3) томата в эпоксиалкогольсинтазу в результате сайт-

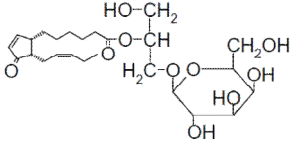
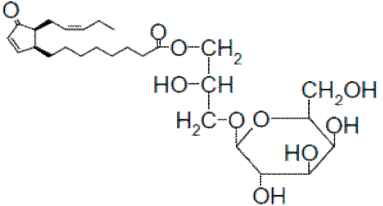
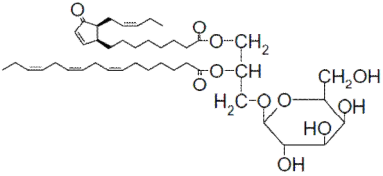
- специфического мутагенеза //Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", 2018. – Т. 483. – №. 3. – С. 341-344.
616. Горина С. С. и др. Цитохром CYP443C1 (клан CYP74) актинии *Nematostella vectensis* – первый фермент Metazoa, проявляющий двойную активность гидропероксидлиазы/эпоксиалкогольсинтазы //Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", 2019. – Т. 486. – №. 3. – С. 384-388.
617. Ермилова В. С. и др. Изменение каталитических свойств дивинилэфирсинтаз в результате единичных аминокислотных замен //Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российская академия наук", 2013. – Т. 452. – №. 5. – С. 567-570.
618. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. – Мир, 1984.
619. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование:(практическое пособие). – Наука, 1981.
620. Тарчевский, И.А. Метаболизм растений при стрессе (избранные труды) / К.: Фэн, 2001. – 448 с.
621. Топоркова Я. Ю. и др. Антимикробная активность геометрических изомеров этероленовой кислоты – продуктов липоксигеназного каскада растений //Доклады академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", 2018. – Т. 480. – №. 1. – С. 117-120.
622. Топоркова Я. Ю. и др. Изменение катализа ферментов подсемейства CYP74C в результате сайт-направленного мутагенеза //Доклады Академии наук. – Федеральное государственное унитарное предприятие Академический научно-издательский, производственно-

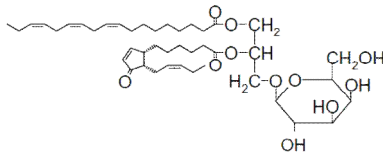
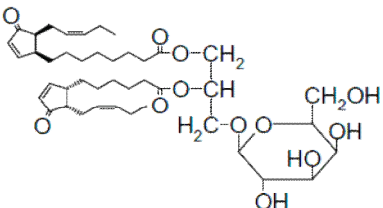
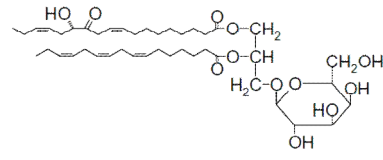
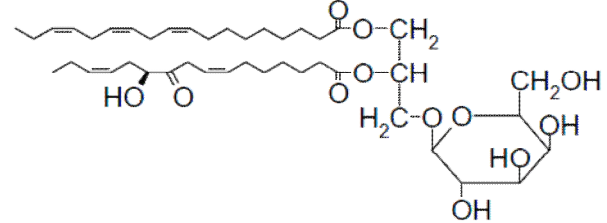
полиграфический и книгораспространительский центр Наука, 2010. – Т. 435. – №. 1. – С. 117-120.

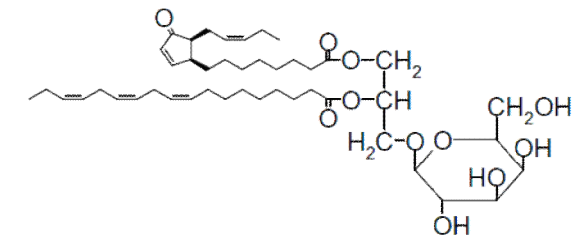
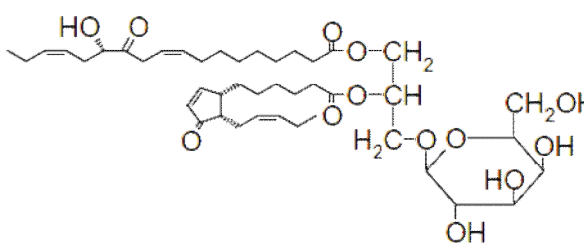
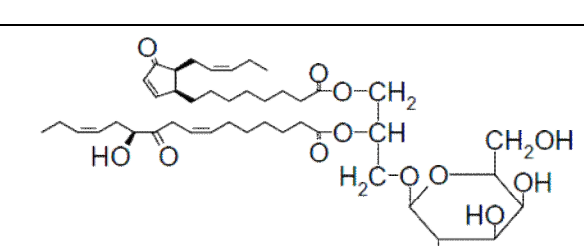
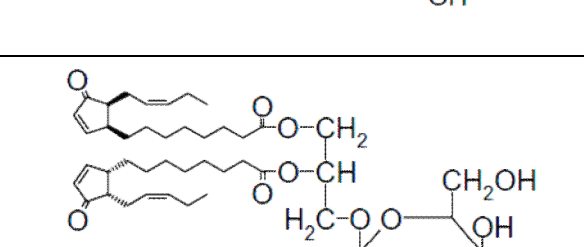
623. Топоркова Я. Ю. и др. Эпоксидалькогильсинтаза RjEAS (CYP74A88) лютика японского (*Ranunculus japonicus*): клонирование и характеристика каталитических свойств //Биохимия. – 2019. – Т. 84. – №. 2. – С. 269-280.

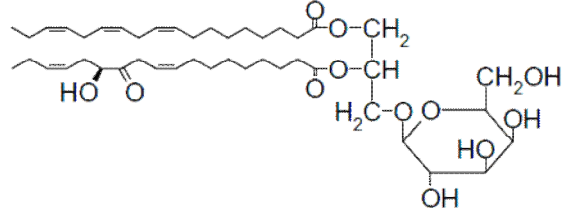
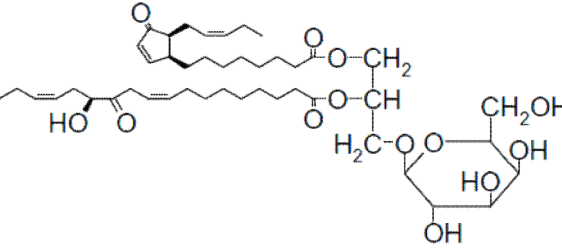
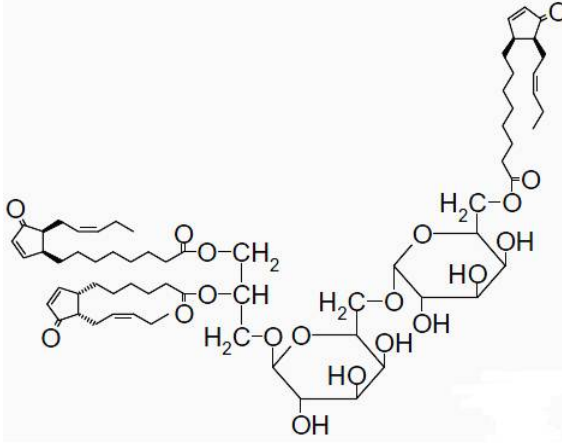
ПРИЛОЖЕНИЕ

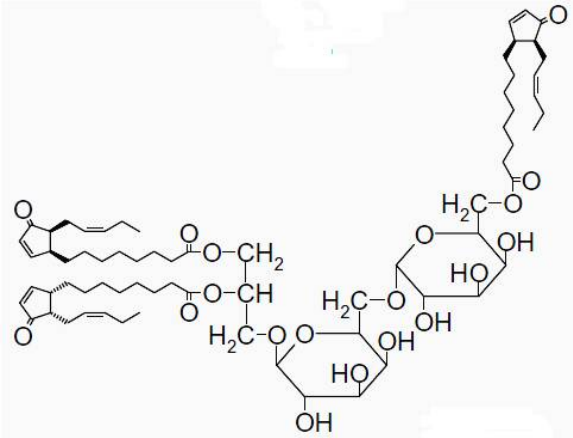
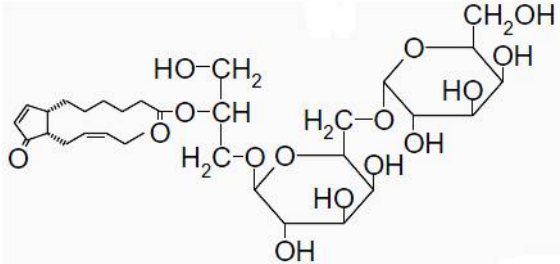
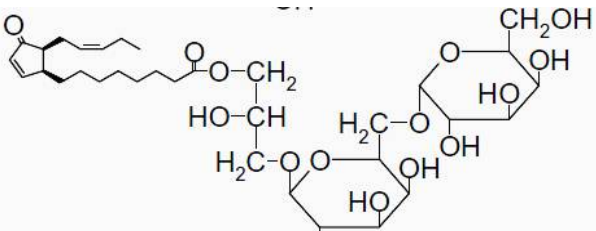
Таблица 1. Окисленные глицеролипиды.

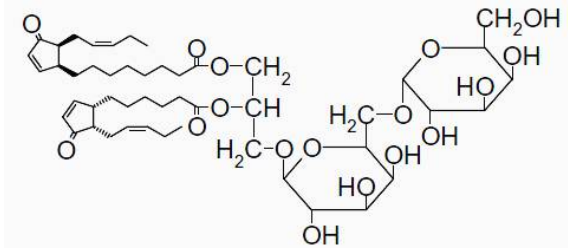
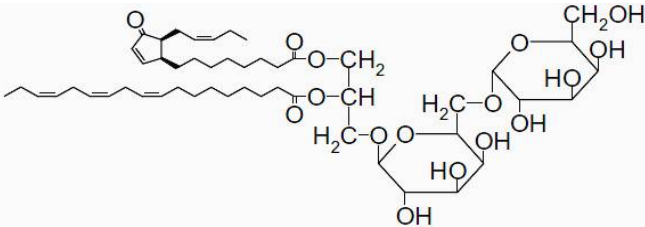
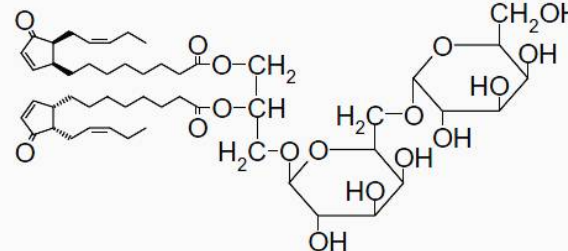
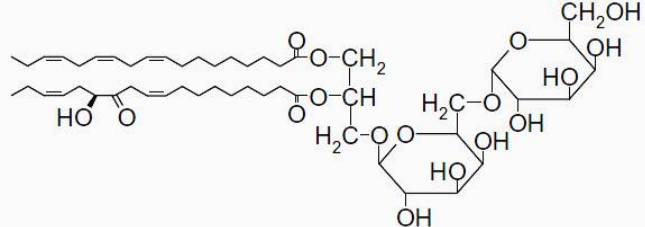
Класс липидов	Разновидность липидов	Молекулярные структуры	Структура соединений	Первая публикация
Гликолипиды	Моногалактозил моноацилглицерид (МГМГ)	Н/дн-ОФДК-МГМГ		Glauser <i>et al.</i> , 2008
		ОФДК/Н-МГМГ		Glauser <i>et al.</i> , 2008
	Моногалактозил диацилглицерид (МГДГ)	ОФДК/16:3-МГДГ		Stelmach <i>et al.</i> , 2001

		18:3/дн-ОФДК- МГДГ (Арабидопсид F)		Nakajyo <i>et al.</i> , 2006
		ОФДК/дн-ОФДК- МГДГ (Арабидопсид А)		Hisamatsu <i>et al.</i> , 2003
		C18-кетол/16:3- МГДГ		Buseman <i>et al.</i> , 2006
		18:3/C16-кетол- МГДГ		Buseman <i>et al.</i> , 2006

		ОФДК/18:3-МГДГ	 <p>The structure shows a glycerol backbone with a phosphate group at the sn-3 position, linked to a galactose molecule. The sn-1 position is esterified with a long-chain polyunsaturated fatty acid (18:3 n-3), and the sn-2 position is esterified with a shorter-chain polyunsaturated fatty acid (18:3 n-3).</p>	Buseman <i>et al.</i> , 2006
		C18-кетол/дн- ОФДК-МГДГ	 <p>The structure shows a glycerol backbone with a phosphate group at the sn-3 position, linked to a galactose molecule. The sn-1 position is esterified with a long-chain polyunsaturated fatty acid (C18-кетол), and the sn-2 position is esterified with a shorter-chain polyunsaturated fatty acid (дн-ОФДК).</p>	Buseman <i>et al.</i> , 2006
		ОФДК/C16-кетол- МГДГ	 <p>The structure shows a glycerol backbone with a phosphate group at the sn-3 position, linked to a galactose molecule. The sn-1 position is esterified with a shorter-chain polyunsaturated fatty acid (ОФДК), and the sn-2 position is esterified with a long-chain polyunsaturated fatty acid (C16-кетол).</p>	Buseman <i>et al.</i> , 2006
		ОФДК/C16-МГДГ (Арабидопсид В)	 <p>The structure shows a glycerol backbone with a phosphate group at the sn-3 position, linked to a galactose molecule. The sn-1 position is esterified with a shorter-chain polyunsaturated fatty acid (ОФДК), and the sn-2 position is esterified with a long-chain polyunsaturated fatty acid (C16).</p>	Hisamatsu <i>et al.</i> , 2003

		18:3/C18-кетол- МГДГ		Buseman <i>et al.</i> , 2006
		ОФДК/C18-кетол- МГДГ		Buseman <i>et al.</i> , 2006
	Ацилированная МГДГ	ОФДК/дн-ОФДК- МГДГ-ОФДК (Арабидопсид E)		Andersson <i>et al.</i> , 2006

		ОФДК/ОФДК- МГДГ-ОФДК (Арабидопсид G)		Kourtchenko <i>et al.</i> , 2007
	Дигалактозил моно- ацилглицерид (ДГМГ)	Н/дн-ОФДК-ДГМГ		Glauser <i>et al.</i> , 2008
		ОФДК/Н-ДГМГ		Glauser <i>et al.</i> , 2008

	Дигалактозил диацилглицерид (ДГДГ)	ОФДК/дн-ОФДК-ДГДГ (Арабидопсид С)		Hisamatsu <i>et al.</i> , 2005
		ОФДК/18:3-ДГДГ		Buseman <i>et al.</i> , 2006
		ОФДК/ОФДК-ДГДГ (Арабидопсид D)		Hisamatsu <i>et al.</i> , 2005
		18:3/C18-кетол-ДГДГ		Buseman <i>et al.</i> , 2006

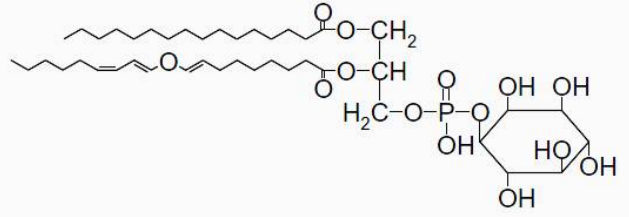
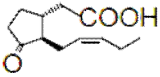
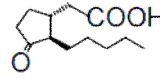
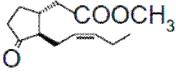
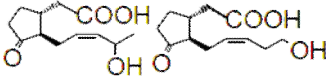
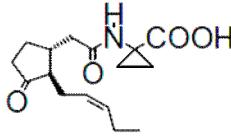
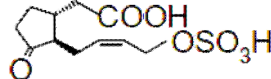
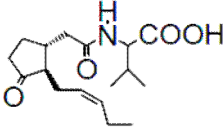
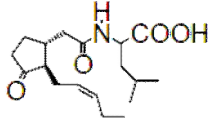
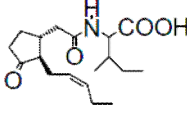
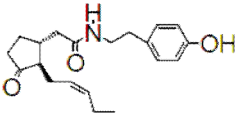
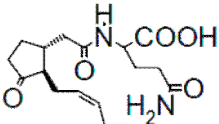
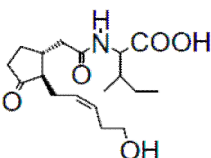
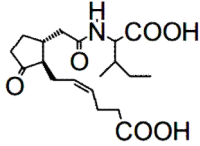
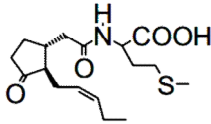
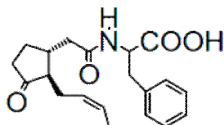
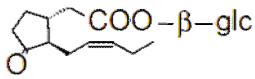
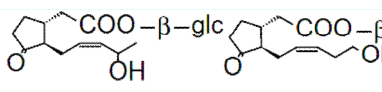
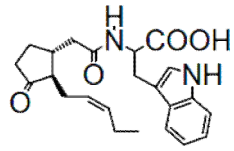
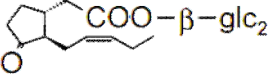
	<p>Фосфатидил-инозитол (ФИ)</p>	<p>16:0/колнелевая кислота-ФИ</p>	 <p>The image shows the chemical structure of 16:0/colnoleic acid-PI. It consists of a glycerol backbone. The first two carbons of the glycerol are esterified with fatty acids: a saturated palmitic acid (16:0) and an unsaturated colnoleic acid. The third carbon of the glycerol is linked to a phosphate group, which is in turn linked to an inositol ring. The inositol ring is shown in its cyclic form with hydroxyl groups at various positions.</p>	<p>Fauconnier <i>et al.</i>, 2003</p>
--	-------------------------------------	---------------------------------------	--	---------------------------------------

Таблица 2. Жасмонаты.

Реакция образования из жасмоновой кислоты	Название соединения	Структура	Публикация
	Жасмоновая кислота		Durgbanshi <i>et al.</i> , 2005 и Swiatek <i>et al.</i> , 2004
Восстановление	Дигидрожасмоновая кислота		Swiatek <i>et al.</i> , 2004
Метилирование	Метилвый эфир жасмоновой кислоты		Pan <i>et al.</i> , 2008
Гидроксилирование	11/12-Гидрокси жасмоновая кислота		Swiatek <i>et al.</i> , 2004
Конъюгация с аминокислотой	Жасмоноил аминоклопропан-карбоновая кислота		Wang <i>et al.</i> , 2007
Гидроксилирование/сульфатация	12-Гидрокси жасмоноил сульфат		Gidda <i>et al.</i> , 2003
Конъюгация с аминокислотой	Жасмоноил валин		Wang <i>et al.</i> , 2007
Конъюгация с аминокислотой	Жасмоноил лейцин		Göbel and Feussner (неопубликованные данные)

Конъюгация с аминокислотой	Жасмоноил изолейцин		Kang <i>et al.</i> , 2006
Конъюгация с аминокислотой	Жасмоноил тирамин		Miersch <i>et al.</i> 1998
Конъюгация с аминокислотой	Жасмоноил глутамин		Wang <i>et al.</i> , 2007
Гидроксилирование/ конъюгация с аминокислотой	12-Гидрокси жасмоноил изолейцин		Glauser <i>et al.</i> , 2008
Окисление/ конъюгация с аминокислотой	12-Карбокси-жасмоноил-L-изолейцин		Glauser <i>et al.</i> , 2008
Конъюгация с аминокислотой	Жасмоноил метионин		Wang <i>et al.</i> , 2007
Конъюгация с аминокислотой	Жасмоноил фенилаланин		Göbel and Feussner (неопубликованные данные)
Гликозилирование	Жасмоноил-1-β-глюкоза		Swiatek <i>et al.</i> , 2004
Гидроксилирование/ гликозилирование	11/12-Гидрокси-жасмоноил-1-β-глюкоза		Swiatek <i>et al.</i> , 2004

<p>Конъюгация с аминокислотой</p>	<p>Жасмоноил триптофан</p>		<p>Wang <i>et al.</i>, 2007</p>
<p>Гликозилирова- ние</p>	<p>Жасмоноил-1-β- гентиобиоза</p>		<p>Swiatek <i>et al.</i>, 2004</p>

AtAOS (49) ---SKDLELRNIPGNYGLPLVGPDKDRWYFYDQG-AEEFFKSRIRKYNSTVYRVNMPF--GAFIARENEQ
 LuAOS (64) SDETTLELRQIPGDYGLPGIGPIQDRLDYFYNOG-REEFFKSRLOKQKSTVYRANMPF--GPFIASNER
 LeAOS3 (17) ESSIPSELRKIPGDYGVVFFGAIKDRYDFHYNOG-ADEFFSRMKKYDSTVFRINMPF--GPFNARNK
 MtAOS (53) -PQTTKLELRKIPGDYGVVFFGAIKDRYDFHYNOG-RDEYFKSRIOKQYOSTVFRINMPF--GPFIAQNE
 NaAOS (53) ----TKLELRQIPGDYGLPLIGPWKDRQOYFYNOG-KEEFFRSRIQKQKSTVFKTNMPF--GPFISSNE
 OsAOS (1) MELGVPLERRFVVPESYGVVFSAVRDRLLDFYLOG-CKYFESPAERYGSTVVRINMPF--GPFMARDP
 PaAOS (1) -MDPSSKLELRIPGSYGIPIFFQIKDRLEVFYGTGRDEYERSMOKYOSTVFRANMPF--GPFVSSNEK
 StAOS1 (58) FVKQAKLELRKVPGDYGLPLVGPWKDRLDYFYNOG-KNEFFKSRIOKQKSTVFRINMPF--GPFISFNE
 StAOS2 (44) ----TKLELRQIPGDYGLPGIGPWKDRLDYFYNOG-KDEFFESRVVYKQKSTVFRINMPF--GPFISSNEK
 StAOS3 (17) ESSIPNLELRKIPGDYGVVFFGAIKDRYDFHYNOG-ADEFFRSRMEKHDSTVFRINMPF--GPFNARNK
 ZmAOS1 (5) VRFSSAPCRDVPESYGLPLVGAVRDRLLDFYFQG-CKYFESRVERVYSTVVRINMPF--GPFMARDP
 AtHPL (26) SPPSQ-LELRITMPSYGNPLVGLSDRLDYFWFQG-PDKFERTRAEKYKSTVFRINMPF--GPFVSSNEK
 BvHPL (22) PFPSSNLELRITLPGYGFPIIGPIGDRLDYFWFQG-PTTEFRKMDYTKSSVFRINMPF--GPFVSSNEK
 CaHPL (12) TATPISLELRKIPGSYGFPIIGPIGDRLDYFWFQG-LPDEFSKVEKYNSTVFRINMPF--GPFVSSNEK
 CmHPL (5) SSSPELELRKIPGSYGFPIIGPIGDRLDYFWFQG-RDEFFRSRITKYNSTVFRANMPF--GPFISSDSR
 LeHPL (11) TPAPVTELRVSIPEYGLPLVGPIDRDLDFYFWFQG-PENFEFKRMEKHKSTVFRINMPF--GPFVSSNEK
 MtHPL (9) SSTNKLELRKIPGSYGLPIIGPIGDRLDYFWFQG-RDKFERTRAEKYKSTVFRINMPF--GPFISSNEK
 NaHPL (28) TFPASLELRVITPEYGNWPLLGPISDRLDYFWFQG-PNTEFKRMEKHKSTVFRINMPF--GPFVSSNEK
 NtHPL (29) TFPASLELRVITPEYGNWPLLGPISDRLDYFWFQG-PNTEFKRMEKHKSTVFRINMPF--GPFVSSNEK
 PgHPL (26) SPRPTTELRVITPEYGNWPLLGPISDRLDYFWFQG-PETEFRKMEKHKSTVFRINMPF--GPFVSSNEK
 CaDES (5) SESPK-LEVRTEPESYGFPIISAIKDRYDFYNOG-EDAWFHGKAEKYKSTVVKINMAP--GPFISNDYK
 LeDES (5) SELSN-LEVRTEPESYGFPIISAIKDRYDFYNOG-EDAWFHGKAEKYKSTVVKINMAP--GPFISNDYK
 NtDES (5) LVSSNNLEVRTEPESYGFPIISAIKDRYDFYNOG-EDVWFHSAEKYKSTVVKINMAP--GPFISNDYK
 StDES (5) SELSN-LEVRTEPESYGFPIISAIKDRYDFYNOG-EDAWFHGKAEKYKSTVVKINMAP--GPFISNDYK
 AsDES (7) STENIQKLELRKIPDITGPIILTAIKDRLEDFYNOG-OYEYFQSRVKNSTVILMNMPF--GPFAS-NEK

F/L

AtAOS (113) VVALLDGKSFVLFVDFVSKVEKQDFIGTYMPSTELTGGYRILSYLDPESEKHEKLEKLLFFLQKSSRNRI
 LuAOS (131) VIVLDAKSFVLFVDFVSKVEKQDFIGTYMPSTELTGGYRILSYLDPESEKHTTKKQLLNFNLIKNRDIYV
 LeAOS3 (84) VVVLVDAYSFHLFDNSQVDEKNEYEGTFMSSPSENGGYKVCGLGTIDPKHTTLKGLFLSTLTRLHDKF
 MtAOS (119) VVVLDDGKSFVLFVDFVSKVEKQDFIGTYMPSTELTGGYRILSYLDPESEKHEKLEKLLFFLQKSSRNRI
 NaAOS (116) VVVLDDGKSFVLFVDFVSKVEKQDFIGTYMPSTELTGGYRILSYLDPESEKHEKLEKLLFFLQKSSRNRI
 OsAOS (68) VVALLDGKSFVLFVDFVSKVEKQDFIGTYMPSTELTGGYRILSYLDPESEKHAQLEKLLFLSLVSRKDAF
 PaAOS (68) VIVLDAKSFVLFVDFVSKVEKQDFIGTYMPSTKLTGGYRILSYLDPESEKHAQLEKLLFFLQKSSRNRI
 StAOS1 (125) VVVLDDGKSFVLFVDFVSKVEKQDFIGTYMPSTDLTGGYRILSYLDPESEKHAQLEKLLFFLQKSSRNRI
 StAOS2 (107) VIVLDDGKSFVLFVDFVSKVEKQDFIGTYMPSTELTGGYRILSYLDPESEKHEKLEKLLFFLQKSSRNRI
 StAOS3 (84) VVVLVDAYSFHLFDNSQVDEKNEYEGTFMSSPSENGGYKVCGLGTIDPKHTTLKGLFLSTLTRLHDKF
 ZmAOS1 (72) VVVLDDGKSFVLFVDFVSKVEKQDFIGTYMPSTELTGGYRILSYLDPESEKHAQLEKLLFFLQKSSRNRI
 AtHPL (94) VVAVLDVKSFSHLFDMDLVDRVLDLGGTFRPSLGFYGGVCGVNLDTSEKHAQLEKLLFFLQKSSRNRI
 BvHPL (91) VVAVLDVKSFSHLFDMDLVDRVLDLGGTFRPSLGFYGGVCGVNLDTSEKHAQLEKLLFFLQKSSRNRI
 CaHPL (81) VVAVLDVKSFSHLFDMEIVEKANVLDGDMPSVYVYGMIRVCAAYLDTSEKHTQLEKLLFFLQKSSRNRI
 CmHPL (72) VVVLDDGKSFVLFVDFVSKVEKQDFIGTYMPSTELTGGYRILSYLDPESEKHAQLEKLLFFLQKSSRNRI
 LeHPL (80) VVAVLDVKSFSHLFDMEIVEKANVLDGDMPSVYVYGMIRVCAAYLDTSEKHAQLEKLLFFLQKSSRNRI
 MtHPL (76) VVAVLDVKSFSHLFDMEIVEKANVLDGDMPSVYVYGMIRVCAAYLDTSEKHAQLEKLLFFLQKSSRNRI
 NaHPL (97) VVAVLDVKSFSHLFDMEIVEKANVLDGDMPSVYVYGMIRVCAAYLDTSEKHTQLEKLLFFLQKSSRNRI
 NtHPL (98) VVAVLDVKSFSHLFDMEIVEKANVLDGDMPSVYVYGMIRVCAAYLDTSEKHTQLEKLLFFLQKSSRNRI
 PgHPL (95) VVAVLDVKSFSHLFDMEIVEKANVLDGDMPSVYVYGMIRVCAAYLDTSEKHAQLEKLLFFLQKSSRNRI
 CaDES (71) VVAVLDVKSFSHLFDMEIVEKANVLDGDMPSVYVYGMIRVCAAYLDTSEKHAQLEKLLFFLQKSSRNRI
 LeDES (71) VVAVLDVKSFSHLFDMEIVEKANVLDGDMPSVYVYGMIRVCAAYLDTSEKHAQLEKLLFFLQKSSRNRI
 NtDES (72) VVAVLDVKSFSHLFDMEIVEKANVLDGDMPSVYVYGMIRVCAAYLDTSEKHAQLEKLLFFLQKSSRNRI
 StDES (71) VVAVLDVKSFSHLFDMEIVEKANVLDGDMPSVYVYGMIRVCAAYLDTSEKHAQLEKLLFFLQKSSRNRI
 AsDES (73) VVAVLDVKSFSHLFDMEIVEKANVLDGDMPSVYVYGMIRVCAAYLDTSEKHAQLEKLLFFLQKSSRNRI

AtAOS (183) FREFQATYSELSDLEKEAFLR-ESGRRFRQRNRLLFLGSSFLRDESR-RY-KKADAPGLITKWLWF
 LuAOS (201) IPESSSFTDLCEVWEYDIAKKG-KAFAFNDPAEQAAFNELSRAFFGVKPI-DT-PLGKDAPSLISKWLWF
 LeAOS3 (154) IRIPTTITSMTSLSLEKELSEK-GTSYFNPIGDNLSEDFLFRFLFCEGKNP-IDTSVGPNGPKIVDKWVFL
 MtAOS (189) IREFQSCYREFNALDNQLAENG-HASADNNDQAAFNFLNRAFFGVNPEV-DT-ELGLDGEKMQKWLWF
 NaAOS (186) IQQEHESYTELEKTLLEKEMEKNG-KADLNSANDQAAFNFLARSIIYGANEV-ET-KLGTDTGTLIGKWLWF
 OsAOS (138) VVFRSFRNFALLDITVQSQLASGGGKSDFTALNDATSEDFIGKAYFVVRPS-ASSSLGTGGLDQGRILWLW
 PaAOS (138) IQQETTYTELEGLAEALAKNG-KAFAFNDVGEQAAFRFLGRAYFNSNPE-ET-KLGTSAFTLISSWLWF
 StAOS1 (195) IPEPHNSYSELRETLENELSTKG-KARLNAANDQAAFNFLARSIIYGINPQ-DT-KLGTDTGPKLIGKWLWF
 StAOS2 (177) IPEPHETYTEFRETLDKEMAEGK-TAGLNSGNDQAAFNFLARSIIYGINPEV-ET-KLGTDTGTLIGKWLWF
 StAOS3 (154) IRIPTTITSITQTETSIEKELSEK-GTSYFNPISDNLSEDFLFRFLFCEGKNP-VETSVGTNGPKIVDKWVFL
 ZmAOS1 (142) IPEFRSFRNFSSLLAIVESDLAQGG-KAEFNKLNVDVTEDFIGEAYFVVRPS-AT-DLGGKGGPTKAAKWIW
 AtHPL (164) LQELRSNLNIFWGTPESEISKNG-AASYIFPLQRCIFSLCASAGVDAS-VSPDIAENGWKTINWIAL
 BvHPL (161) VSSLINLNDTMTTIEQSISKDK-TANLFXPXQKCLFNFLCQGMGLGADFINYSKELCETGHVMVDKWIIV
 CaHPL (151) VETLVKELDTLGTTFSDLSKSK-SASLLPALQKFLFNFFSLTFLGADPS-ASPEIANSQFAYLDWIAI
 CmHPL (142) IHLFRSSLSEMFKLEKLEKSEKKINDFNISIDSMSDYVFRLLSDG--T-PDSKLAAGEGFMFDLWVFF
 LeHPL (150) VETLVKELDTMTTIEADLSKSN-TASLLPALQKFLFNFFSLTFLGADPS-VSPEIANSQYIFLDSWIAI
 MtHPL (146) IPLFKTILSDGNEIDGLSSKSGKDFNSMVSVASFNEMFKLFCDDKNP-SETILGDCGPKMFDTWLWF
 NaHPL (167) VETLVNELNSMGETTFSDLSKSN-SASLLPTMQKFLFNFFSLTFLGANPS-ASPEIANSQYVMLDPIAI
 NtHPL (168) VETLVNELNTMGETTFSDLSKSN-SASLLPTMQKFLFNFFSLTFLGANPS-ASPEIANSQYVMLDPIAI
 PgHPL (165) ESEVISNLDTMTDTESSAKDG-NASVIFPLQKFLFNFLSKSIIIGADPA-ASPOVAKSGYAMLDRWIAL
 CaDES (141) IPLFRNSLSDHLENDLEKQVSEQKSDFNALLPNMTEGFIIFRLLCDQTNP-SDTVLGACGPEHLRQWVFF
 LeDES (141) IPLFRNTLSDHLENNLEKQVTEQKSDFNALLPTMTDFFIIFRLLCDQKNP-SDTVLGACGPEHLRQWVFF
 NtDES (142) IHLFRNSVSDHLENNLEKQVSDQKSDFNALLPNMTEGFIIFRLLCDQTNP-SDTVLGACGPEHLRQWVFF
 StDES (141) IPLFRNSLSDHLENNLEKQVTEQKSDFNALLPTMTDFFIIFRLLCDQTNP-SDTVLGACGPEHLRQWVFF
 AsDES (143) IPEFVSTFNSMADKMDAEVESKK-KAEKTFNEAAVEEIVGLAVGPKP---A---REVFDASAKVSVFF

I-спираль

AtAOS (250) NIHPILLSIG---LERVIEEPLIHTESLPPALVKSDYQRLYDFLRIRG-EIIVVAD-KIETISREEACHNLI
 LuAOS (268) NIAPILSVG---LEKEVEEATLHVSRLPPLVQNDYHRLYDFETSAAGSVMDEAE-QSISIRDEACHNLI
 LeAOS3 (222) QIAPLISLGLKVENFLEDLVLHTFPLPYFLVKRQDQKLYNAGYNSMKDIDDEAE-KIIVKRDEACHNFI
 MtAOS (256) QIGPVLKLG---LEKFFVEDSMIHNRLEPFRILKQDYQRLYDFEYASSGFADEAE-RIDVSKEEACHNLI
 NaAOS (253) QIHPLLTLG---LEKVLDDFLLNFRLEPAPLVKQDYQRLYDFEYESSSTAVNEAG-NFISIRDEACHNLI
 OsAOS (207) QIAPLTTLG---LRMIIEDPLLHTLPLPPLLISSDYKALYAYGAAASQADDAE-GIETISREEACHNLI
 PaAOS (205) NIAPITLDLG---LEWFLQEPPLLHTFRLEPAPLIRKSTYANKLYDYEQSVATPVMEQAE-KIIVPKDEAVHNLI
 StAOS1 (262) QIHPLLIILG---LEKVLDDFLLNFRLEPAPLVKQDYQRLYDFEYENSTSVLDEAE-KIETISREEACHNLI
 StAOS2 (244) QIHPVLTIG---LEKFLDLDLHTFRLEPFLVKQDYQRLYDFEYTNNSASLFAEAE-KIETISKEEACHNLI
 StAOS3 (222) QIAPLISLGLKYVENFLEDLVLHTFPLPYFLVKRQDQKLYNAGYNSMKDIDDEAE-KIIVKRDEACHNFI
 ZmAOS1 (209) QIHPLLTLG---LEWVLEPPLLHTFHLPPFLVKGDYGALYKYESTVAKQALDTAE-GIETISREEACHNLI
 AtHPL (232) QVIPTAKLGVVP--QPLEEILLHTWPYPSLLIAGNYKLYNFDENAGDCRIGQEEHRLTRDEAICQNLII
 BvHPL (230) QLLPTIINIGIL---QPFEEIFLHSEFTYPLLVKGDYKELCSFVSKERREVIERGKSEFGLTEEDIIHNLI
 CaHPL (219) QIAPIVSIGVL---QPLEEIFVHSEFSYFPLVRGGYKLIKVKSEKKEVTRAQTDQLTEQEAHNLII
 CmHPL (209) QIAPLASIGLPKIFSVFEDLVIHTIPLPEFPVKSGYRKLVEAYSSSGSEFDEAE-KCIDREKACHNLV
 LeHPL (218) QIAPIVSIGVL---QPLEEILVHSEAYPEFLVKGNVEKLVQVKNKKEVSPAQTEHGLTEQEAHNLW
 MtHPL (215) QIAPLATLGPPIFNYLEDLILLRTVPEPAQLTRSSKLYEASTSATTMNEAE-KAFLKRSEALHNII
 NaHPL (235) QIAPIVSIGLL---QPLEEIFVHSEFNYPFLVKGSEKLIQVKNKKEVNRGKSEFGLTEQEAHNLII
 NtHPL (236) HIAPIVSIGVL---QPLEEIFVHSEFSYFPLVKGGYKLIQVKNKKEVNRGKSEFGLTEQEAHNLII
 PgHPL (233) QLLPTIINIGVL---QPLVEIFLHSWAYPEALVSGDYKLYQPLEKEGREAVERAKAEHGLTHQEAHNLII
 CaDES (210) QIIPSLSAR--KLESFIEDLLFHNFLIPGPFVKSQYQKLVDAASKSQVSMDEAE-KIETIKREEAVHNLI
 LeDES (210) QIIPSLSAK--KLENIIEDMLFHNFLIPGFIKSDYKLVDAASKSQVSMDEAE-KIETIKREEAVQNLII
 NtDES (211) QIIPSLSAR--KLESFIEDLLFHNFLIPGLVKSQYKLVDAASKNSGSMDEAE-KIETIKREEAVHNLI
 StDES (210) QIIPSLSAK--KLENIIEDTLFHNFLIPGFIKSDYKLVDAASKSQVSMDEAE-KIETIKREEAVQNLII
 AsDES (205) QIHPFITAG---LEALVEELAEHMFPEPFSVAKSSKILYVEYESTGGSWLDNAE-EIETISREEACHNLI

123456

↓ ↓

```

AtAOS (315) FATSNNTWFGMKILFFPNMVARIGPGG-HQVHNRLEETIRSVIKSNG-SELTMGAIEMDLTKSVVVEQDR
LuAOS (334) FAVCNSWFGFKILFFPSLMKVI GRAG-LELHTKLAQEIIRSAIQSTGGGKVMMAAMEQMPMKSVVYETLR
LeAOS3 (291) FLAGNSYFGKLVFFPSPLIKNI GTSG-PSLHARLVKEIRTAVKEAG--GVLSAIDKMLVKSVVYETLR
MtAOS (322) FATCNSPFGKILFFPNLMKVI GRGG-VRLHTKLETEIREAVRSAG-SEIDMAAMENMPLMKSVVYEAFR
NaAOS (319) FATCNSPFGKILFFPNLMKVI ARAG-VELHIRLNEIRSAVKSAG-GKIDMSAMEKMPVMKSVVYEALR
OsAOS (273) FATVNSYFGKLLLPQILSRVAQAG-EKLHERLPAEIRSAVADAG-GNVLLAALAEKMLTRSVVVEALR
PaAOS (271) FAVCNTPFGVKILFFPNTLKNIGLAG-ENLHTQLPEEIRGAIKSYGDGNVLEAIEQMPMTKSVVYESLR
StAOS1 (328) FATCNSPFGKILFFPNLMKVI GRAG-AKLHSQLAQEIRSVISSNS-GKVMMAAMEKMPMKSVVYESLR
StAOS2 (310) FATCNSPFGKILFFPNLMKVI AKAG-VEVHTRLNEIRSEVKSAG-GKIDMSAMEKMPMKSVVYEALR
StAOS3 (291) FLAGNSYFGKLVFFPSPLIKNI GTSG-PSLHTRLVKEIRTAVKEAG--GVLSAIDKMLVKSVVYETLR
ZmAOS1 (275) FATTNSYFGKLVFFPGILANVASAG-EKLHERLVAEIRGAIAEAG-GKVLAAAVEKMLVKSVVVEALR
AtHPL (300) FVLGENAYFGFSVLPPLIGRITGDN-SGLQERIRTEVRRVCGS-G-SDLNFKTVNEMPLVKSVVYETLR
BvHPL (297) FNLGENAFSGFSIELPALINLVLNN-GAIQEVLRKEVRENCSS-P-SSLSTFAIQDMPNVCSFVYETLR
CaHPL (286) FILGENAFSGFTIELPTLLGNL GDEKNAEMQEKLRKEVREKVGITNQ-ENLSFESVKEMPLVCSFVYESLR
CmHPL (278) FLAGNAYFGKLVFFPNTLKNVGTAG-EDLHRKLEEVRTTVKEEG--GLVLSALEKMSLVKSVVYEALR
LeHPL (285) FILGENAFSGFSIELPTLLGNL GDEKNAEMQEKLRKEVRDKVGNP-ENLSFESVKEMPLVCSFVYETLR
MtHPL (284) FLAGNAYFGKLVNQFPILFKVLGSSG-EEDHKELENEIRTVWKEG--GVVLSQLEKMLVKSVVYEAMR
NaHPL (302) FILGENAFSGFSIELPTLLGNL GDEKNAEMQEKLRNEVREKVGKLT-ENLSFESVKEMPLVCSFVYETLR
NtHPL (303) FILGENAFSGFSIELPTLLGNL GDEKNAEMQEKLRNEVREKVGKLP-ENLSFESVKEMPLVCSFVYETLR
PgHPL (300) FILGENAFSGFSIELPTLLSNILSDT-TGLQDRLRKEVRAKGGP---ALSFAVSKEMPLVKSVVYETLR
CaDES (277) FIVGINMEAGLNAPPHLIRFVGEAG-PNLHTRLNEIRTAIKEEG-GAIVLSAINKMSLVKSVVYETLR
LeDES (277) FIVGINMEAGLNAPPHLIRFVGEAG-ASLHTQLAKEIRSVIKEEG-GAIVLSAINKMSLVKSVVYETLR
NtDES (278) FIVGINMEAGLNAPPHLIRFVGEAG-PTLHARLPAEIRTAIKEEG-GAVVLSAINKMSLVESIVYETLR
StDES (277) FIVGINMEAGLNAPPHLIRFVGEAG-ASLHTQLAKEIRTVIKEEG-GAIVLSAINKMSLVKSVVYETLR
AsDES (271) FTWAINAYLGIRTCLMRLFKWIVASG-PDLQEKLRREVRSVWRSEE-GKIDFAGIEKMLVKSVAVESFR

```

↓

```

AtAOS (383) FEPPVITAOYGRAKKDLVIESHDAAPKVMKAGEMLYGYOPLATRDPKIFDR-ADEFVPERFVGEEGEKLLRH
LuAOS (403) IEPPVALOYGAKKDFILESHDAAYQVKEGEMLFGYOPFATKDPKIFDR-PEEFVADREVGGE-GEKLMDEY
LeAOS3 (358) MDPPVVEFQTVKARKNIITVNSHESSFLIKKDELIFGYOPLATKDSKVFKN-AEEFNPDREVGGE-GEKLLKY
MtAOS (390) IDPPVELQFGRARQDMVIENHENGEFLVKKGELLGYPFATKDPKIFER-AEEFVADREVGDEGEKLLKH
NaAOS (387) IDPPVASOYGRARQDLMIESHDAVFEVKKGEMLFGYOPFATRDPKIFDR-PDEFVPERFVGEEGEKLLKH
OsAOS (341) LDPPVRFQYGRARQDLIEESHDAVFAIKKGEMLFGYOPFATRDPRVFGATAREFVGDRFVGDEGEKLLQY
PaAOS (340) IEPPVVEFQYGRARQDLIEESHDAVFEVKKGEMLFGYOPFATKDPKIFDR-PEEYVPERFVGDE-GEKLLKY
StAOS1 (396) IEPPVASOYGRARQDMVIESHDAVFEIKGELLGYPFATKDPKIFDR-SEEFVADREVGEEGEKLLKH
StAOS2 (378) VDPFVASOYGRARQDLKIESHDAVFEVKKGEMLFGYOPFATKDPKIFDR-PEEFVADREVGEEGEKLLKY
StAOS3 (358) MDPPVVEFQTVKARKNIITVNSHESSFLIKKDELIFGYOPLATKDSKVFKN-GEEFNPDREVGGE-GEKLLKY
ZmAOS1 (343) LDPPVRFQYGRARQDLQVQSHDAVFEVKKGEMLFGYOPFATKDRVFGATAKEFVGEGLGEEGSKLLQY
AtHPL (367) FNPPVELQFARARQDFQISSHDAVFEVKKGELLGYPQLVMDANVFDE-PEEFKPPDRVGETGSELLNY
BvHPL (364) LKPPVELOYGRARQDFVLQSHDSYVEIVKKGELLGYPQLVMDPKVFDD-PEFVPPDRPMGEKGDLELNY
CaHPL (355) LSPPVESQYARARQDFMLS SHDSVYEIKKGELLGYPQLVMDPKVFDE-PEKFMLERETKEKGGKELLY
CmHPL (345) IEPPVVEFQYGRARQDVIQSHDSSEKIKKGETIFGYOPFATKDPKIFKD-SEKVFVDRFVGDEGEKLLKY
LeHPL (354) LSPPVESQYARARQDFKLS SHDSVYEIKKGELLGYPQLVMDPKVFDE-PEKFMLERETKEKGGKELLY
MtHPL (351) IEPPVVEFQYARARQDLIVKSHDAVFEIKKGEMLFGYOPFATKDRVFD-PEVFAKREFVGE-GEKLLKY
NaHPL (371) LSPPVESQYARARQDFKLS SHDSVYEIKKGELLGYPQLVMDPKVFDD-PEKFMLERETKEKGGKELLY
NtHPL (372) LSPPVETQYARARQDFKLS SHDSVYEIKKGELLGYPQLVMDPKVFDD-PEKFMLERETKEKGGKELLY
PgHPL (365) LNPPVVEFQYARARQDFQKLSHDSVFEIVKKGELLGYPQVVMTPKVFDE-PESENSDRFVQN--SELLDY
CaDES (345) LRPPVELOYGAKKDFMVQSHDASYKINKGQFLVGNEMASRDPKIFAN-PDEFVPPDRPMGD-GEKMLKH
LeDES (345) LRPPVELOYGAKKDFMVQSHDASYKINKGQFVVGYPMASRDPKIFAN-PDEFVPPDRPMND-GEKMLKH
NtDES (346) LRPPVELOYGAKKDFMVQSHDASYMIKKGQFLVGYOPMASRDPKIFEK-PDDFIPDRPMGE-GEKMLKH
StDES (345) LRPPVELOYGAKKDFMVQSHDASYKINKGQFVVGYPMASRDPKIFAN-PDEFVPPDRPMND-GEKMLKH
AsDES (339) FDPVQVQYGAKSDLIIESHDKGYQVKKGEMLCSEFOPMATRDPKVFDR-ADEFVPPDRPMGD-GEKMLKH

```

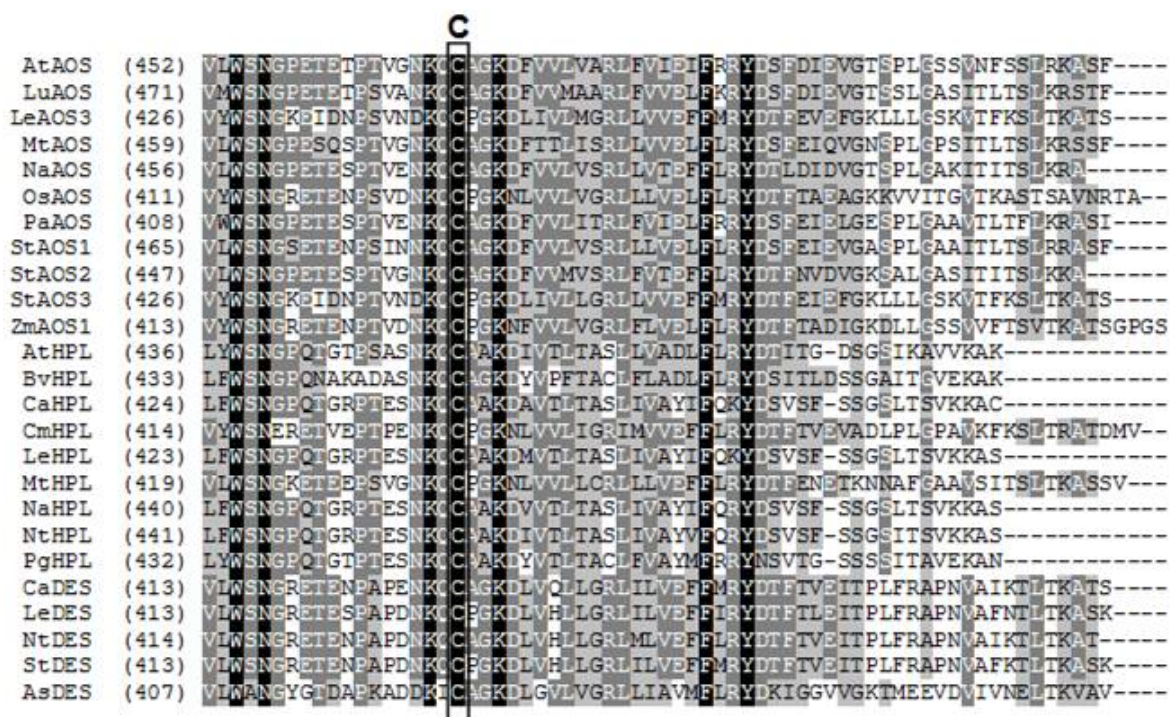



Рис. 1. Множественное выравнивание последовательностей изученных АОС, ГПЛ и ДЭС семейства CYP74. As, *A. sativum*; AsDES, CAI30435; At, *A. thaliana*; AtAOS, NP_199079; AtHPL, AAC69871; Bv, *Beta vulgaris*; BvHPL, ADV29797; Ca, *C. annuum*; CaDES, ABH03632; CaHPL, AAK27266; Cm, *C. melo*; CmHPL, AAK54282; Le, *S. lycopersicum*; LeDES, AAG42261; LeAOS3, NP_001234833; LeHPL, NP_001234420; Lu, *L. usitatissimum*; LuAOS, AAA03353; Mt, *M. truncatula*; MtAOS, XP_013462090; MtHPL, CAC86897; Na, *N. attenuata*; NaAOS, CAC82911; NaHPL, CAC91565; Nt, *N. tabacum*; NtDES, AAL40900; NtHPL, AAZ39884; Os, *O. sativa*; OsAOS, AAL17675; Pa, *P. argentatum*; PaAOS, Q40778; Pd, *P. dulcis*; PdHPL, CAE18065; Pg, *P. guajava*; PgHPL, AAK15070; St, *S. tuberosum*; StAOS1, CAD29736; StAOS2, ABD15176; StAOS3, CAD29735; StDES, CAC28152; Zm, *Z. mays*; ZmAOS1, ACG28578. Выделены консервативные каталитически важные домены: подписаны сайт «F/L toggle», I-спираль и гем-связывающий остаток цистеина; участок перегиба I-спирали пронумерован 1 – 6; ERR-триада отмечена стрелками.

Таблица 3. Праймеры для клонирования генов ферментов CYP74.

Праймер	5'-3' последовательность	Рест-риктазы	Век-тор
CYP74C1_C ScF	CATATGGCTTCTTCCCTCCCCTGAACTTC	NdeI	pET-23a

CYP74C1_C ScR	CTCGAGAACCGAAGCGGTGGCTCTGG	XhoI	
CYP74C4cF	CATATGTCTTCAATTTTCTCCAAATCTTC	NdeI	pET- 23a
CYP74C4cR	CTCGAGAATCGCCTTTTTCTCCAATG	XhoI	
CYP74C13_ GMcF	GACGACGACAAGATGGCTTCTTCCGACAG CAAG	Ek/LIC метод	pET- 32Ek/ LIC
CYP74C13_ GMcR	GAGGAGAAGCCCGGGAAGGAAGAAGCCT TGGCGAG		
CYP74C31c F	CATATGACTTCATCTTCTTCAGAACACCC	NdeI	pET- 23a
CYP74C31c R	CTCGAGGGCTTTAGTCAACGATTTCAACC	XhoI	
LuAOScF	CATATGGCTTCCTCTGCTCTCAACAAC	NdeI	pET- 23a
LuAOScR	CTCGAGAAACGTTGACCTCTTAAGCGAAG TC	XhoI	
PpAOS2cF	CATATGGCAGTTCCAGTTTCTAATCTGCC GCTG	NdeI	pET- 23a
PpAOS2cR	CTCGAGAGCTTTCTGAAGAGCGGAGAAA AG	XhoI	
StHPLcF	CATATGATACCGATAATGAGTTCTGCTC	NdeI	pET- 23a
StHPLcR	CTCGAGACTGGCTTTTTTTCACAGATG	XhoI	
CsHPLcF	GGTACCATGCACCTCACCATGACCTCC	KpnI	pET- 23a
CsHPLcR	GCGGCCGCATTAGCCCTTTGAAAAGCTGT AATG	NotI	
CYP74M1c F	AGATCTATGTCTGCAAGTGGAAAAGAGA AG	BglII	pET- 40b
CYP74M1c R	GCGGCCGCGGATCGCTTGACGAGC	NotI	

CYP74M2c F	GACGACGACAAGATGGAGAACGAAGAAG C	Ek/LIC метод	pET- 32Ek/ LIC
CYP74M2c R	GAGGAGAAGCCCGGTGAAGAAATTTGTG CACGG		
CYP74M3c F	GACGACGACAAGATGTCTAAGCCAGCAG CAGCAG	Ek/LIC метод	pET- 32Ek/ LIC
CYP74M3c R	GAGGAGAAGCCCGGCACGCTTCGTTTCTT GAGCG		
ZmAOScF	GACGACGACAAGATGGCGACCTCCGTTTCG TGG	Ek/LIC метод	pET- 32Ek/ LIC
ZmAOScR	GAGGAGAAGCCCGGTTCGCTGCCCGGACC GGAG		
CYP74B16c F	GACGACGACAAGATGGCTCATTCACCACC TATTCCTC	Ek/LIC метод	pET- 32Ek/ LIC
CYP74B16c R	GAGGAGAAGCCCGGTTGCTTAGCCTTTTC AACGGCCTTGATCGTC		
CYP74Q1cF	GACGACGACAAGATGCGGGGGATTACAA CCTTTTTC	Ek/LIC метод	pET- 32Ek/ LIC
CYP74Q1cR	GAGGAGAAGCCCGGTTGCCTTCTTCAAAG ATGTAATTGTGAC		
CYP74A88c F	CATATGGCTACTTCAACATCTCTAGTC	NdeI	pET- 23a
CYP74A88c R	CTCGAGCCCGTTTAAGAGACGTCAAAG	XhoI	
CYP443D1c F	CATATGGAGGGGGAGGACGGGG	NdeI	pET- 23a
CYP443D1c R	CTCGAGTTCATCGTCTTCTTCCATG	XhoI	
CYP443C1c F	GACGACGACAAGATGGCAAAGCCTTTA AGAATCG	Ek/LIC метод	pET- 32Ek/ LIC
CYP443C1c R	GAGGAGAAGCCCGGATGTTTCTGGA		

Таблица 4. ^1H -ЯМР данные (^1H -ЯМР, 2D-COSY) двух C13 эпимеров продукта 4 (Me) инкубации фермента CYP74C1_CS с 9-ГПОД. 600 МГц, [$^2\text{H}_6$]бензол, 303 К.

Номер позиции	Эпимер 1		Эпимер 2	
	Функциональная группа	^1H химический сдвиг (ppm); множественность; константа взаимодействия (Гц)	Функциональная группа	^1H химический сдвиг (ppm); множественность; константа взаимодействия (Гц)
2	CH ₂	2,11; t; 7,5 (H3)	CH ₂	2,11; t; 7,5 (H3)
3	CH ₂	1,54; m;	CH ₂	1,54; m
4	CH ₂	1,14; m	CH ₂	1,14; m
5	CH ₂	1,14-1,40; m	CH ₂	1,14-1,40; m
6	CH ₂	1,14-1,40; m	CH ₂	1,14-1,40; m
7	CH ₂	1,14-1,40; m	CH ₂	1,34-1,40; m
8a	CH ₂	1,34-1,46; m	CH ₂	1,38; m
8b		1,34-1,46; m		1,38; m
9	CH	2,66; ddd; 7,1 (H8a); 5,1 (H8b); 2,0 (H10)	CH	2,66; dt; 5,5 (H8a,b); 2,0(H10)
10	CH	2,98; dd; 7,7 (H11); 2,0 (H9)	CH	2,97; dd; 7,7 (H11); 2,0 (H9)
11	CH	5,43; ddd; 15,6 (H12); 7,7 (H10); 1,3	CH	5,41; ddd; 15,5 (H12); 7,7 (H10); 1,3
12	CH	5,79; ddd; 15,6 (H11); 5,8 (H13); 0,5	CH	5,79; dd; 15,5 (H11); 6,0 (H13)
13	CHON	3,88; m	CHON	3,87; m
14a	CH ₂	1,42; m	CH ₂	1,42; m
14b	CH ₂	1,37; m		1,37; m

15	CH ₂	1,10-1,40; m	CH ₂	1,10-1,40; m
16	CH ₂	1,10-1,40; m	CH ₂	1,10-1,40; m
17	CH ₂	1,24; m	CH ₂	1,24; m
18	CH ₃	0,87; t; 7,2 (H17)	CH ₃	0,87; t; 7,1 (H17)
(1)	COO <u>CH</u> ₃	3,37; s	COO <u>CH</u> ₃	3,37; s

CYP74C1 (Cs)	(1)	-----MASSSPFLPLKPIPGGYGFPIIGPIKDRYDYFYFOGRDEFFRSRITK
CYP74C2 (Cm)	(1)	-----MATPSS--SSPELPLKPIPGGYGFPIIGPIKDRYDYFYFOGRDEFFRSRITK
CYP74C4 (St)	(1)	MSSIFSKSSAIVNSSDNESCKPLLOVREIPGDIYGFPPGAIKDRYDYFYSLGAEFFRTKSLK
CYP74C13_Gm	(1)	-----MASSDSKPLKPIPGSYGLPFFGMSDRHDYFYNOGRDKFFABRTKK
CYP74C13_Mt	(1)	-----MASSSETSSNTLPLKPIPGSYGLEIIGPLHDRHDYFYNOGRDKYFQTRIEK
CYP74C31 (Cs)	(1)	-----MTSSSEHPQIPLPLKPIPGSYGFPIIGPIIDRYHYFYIQGRETFFRSRMAK
♦		
CYP74C1 (Cs)	(48)	YNSTVTHANMPPGPFISSDSRVWLLDALSFPILFDITKVEKRNILDGTYMPSISFTGGIRTC
CYP74C2 (Cm)	(51)	YNSTVFRANMPPGPFISSDSRVWLLDALSFPILFDITKVEKRNILDGTYMPSISFTGNIRTC
CYP74C4 (St)	(64)	YNSTVFRINMPPGPFIAKPKVIVLLDAISFPILFDCSKVEKKNVLDGTEMPSTIDFFGGYRPC
CYP74C13_Gm	(48)	YNSTVIRINMPPGPFISSNPRVIALLDGVSFPILFDNSKVDKRDVLDGTEMPSTISFTGGYRAC
CYP74C13_Mt	(52)	YNSTVLKINMPPGPFIAFIPKVIALLDGASFPILFDNAKVEKRDVLDGTEMPSTIDFFGGYRTC
CYP74C31 (Cs)	(53)	YNSTVFRINMPPGPFISNSRVIVLLDALIFPILFDITKVEKRNILDGTYMPSLAFTGGIRTC
CYP74C1 (Cs)	(111)	AYLDPSETEHIVLKRILFLSFLASHHDFIPLFRSSLSEMFKVLEDKLADRNKTIADFNSISDAV
CYP74C2 (Cm)	(114)	AYLDPSETEHIVLKRILFLSFLASRHDFIPLFRSSLSEMFKVLEDKLSEKKTIADFNSISDSM
CYP74C4 (St)	(127)	AFILDASEPKHATHKGFYLSIISKLHTCFIPLFKNSVSVLQONLEIEMSKNM-KGNFNDISDAM
CYP74C13_Gm	(111)	AFQDTTEPSHALKRFYLNFLASKHETFIPLFRNNLSDFSDLEDKLAGKSGKASFNSSVGSAA
CYP74C13_Mt	(115)	AFQDTAEPESHILKRFIFHILSKHDTFIPLFQTNLTQHTDLEKELAGKHOQASFNSTISGGI
CYP74C31 (Cs)	(116)	AYLDPSETEHIVLKRIFLFLASRHDFIPLFRSSISEMFKKLEKELQNNN-VANFNPLISDYA
CYP74C1 (Cs)	(174)	SFDYVFRLLSDGT-P-DSTLAADGPGMFDLWGLQLOLAPLASTIGLPKIFSVFEDLIHTIPIPF
CYP74C2 (Cm)	(177)	SFDYVFRLLSDGTE--DSKLAABGPGMFDLWVIFOLAPLASTIGLPKIFSVFEDLVIHTIPIPF
CYP74C4 (St)	(189)	SFDYVFRLLCANNINPHDTNLGTNGPKCFDLWMLPOLAPLVTIIGLKFVPNFLEDDMLHTFQIPF
CYP74C13_Gm	(174)	TANLFRLLSDKDES-ETIIGSEGESLVQTLAAOLAPLATLGLPRTFNVVEFLIRSIFFPA
CYP74C13_Mt	(178)	TANLFRLLSDKDES-ETIKIGSEGETLVQTLAAOLAPLATAGLPKIFNYLEDVLRITIEIPA
CYP74C31 (Cs)	(178)	SFDYVFRLLSDRSE--DKNFSSEGGLVDRWLTMLAPLATLGLPKIFSCFEDLIHTFRUPF
123456		
CYP74C1 (Cs)	(235)	EPVKSRYRKLKAFYSSSGSFLDEAEKQGDREKACHNLVFLAGFNAYGGMKVLFPTILKLVG
CYP74C2 (Cm)	(238)	EPVKSRYRKLKAFYSSSGSFLDEAEKQGDREKACHNLVFLAGFNAYGGMKVLFPTILKLVG
CYP74C4 (St)	(252)	ELIKSKYQKLYDAENHAGSTLDDAEKSGIKRDEACHNLVFLAGFNAYGGMKLIFPSLKWVA
CYP74C13_Gm	(236)	WTVKSSYRKLKAFYGLSTAGTAILDEAERVGIKRDDEACHNLVFLMFLNAYGGGLVQCFPIILKLVG
CYP74C13_Mt	(240)	WTVKSSYRKLKAFYGLMAGTIVLDEAEKMGIKRDEACHNLVFLTFNAYGGGLINQCFPIILKLVG
CYP74C31 (Cs)	(239)	ALVKSRYRKLKAFYSFGSFLDEAEKQGINREKACHNLVFLAGFNAYAGMKVLFPIILKLVG
CYP74C1 (Cs)	(298)	TGGEHLHRKLAEEVRIIVYKEEGG-LTFSALEKMSLLKSVVYEALRIEPPVPEFOYGKAKEDIVI
CYP74C2 (Cm)	(301)	TGGEHLHRKLAEEVRIIVYKEEGG-LTFSALEKMSLLKSVVYEALRIEPPVPEFOYGKAKEDIVI
CYP74C4 (St)	(315)	SGGKSLHTRLANEIRTIIEKEEGGSITLSAINKMSLIKSTVYEVLRIEPPPIPEFOYGKAKEDIMV
CYP74C13_Gm	(299)	LAGEGLHKQLAEEIRIVKDEGG-VSLRALDQMTLTKSVVYEVLRIEPAVPEFOYAKAREDIVV
CYP74C13_Mt	(303)	LAGEGLHKQLAEEIRAVREEGG-VNLYALDKMILTSTVYEVLRIEPAVPEFOYAKAREDIVV
CYP74C31 (Cs)	(302)	SAGEHLHRKLVGEIRAAVKIDGG-LTFGALEKMSLLKSVVYEVLRIEPPVPEFOYAKAKQDIVI
CYP74C1 (Cs)	(360)	QSHDSCEKIKKGETIFGYOPEATKDKPKIFDKSEKFGVDRFVGEEGEKLLKYVWNSNERITVEP
CYP74C2 (Cm)	(363)	QSHDSSFKIKKGETIFGYOPEATKDKPKIFDKSEKFGVDRFVGEEGEKLLKYVWNSNERITVEP
CYP74C4 (St)	(378)	QSHDSNELIKKGETIFGYOPEATKDANI FENAEEDFVAHRFLGHEGKLLRHWVWNSNGPCTDEP
CYP74C13_Gm	(361)	ESHDAAYEIKKGETIFGYOPEATKDKPKIFENAEEDFVAHRFLGHEGKLLRHWVWNSNGPCTDEP
CYP74C13_Mt	(365)	QSHDASFEIKKGETIFGYOPEATKDKPKIFDKFEEDFVAHRFLGHEGKLLRHWVWNSNGRETDEA
CYP74C31 (Cs)	(364)	ESHDSAFEIKKGETIFGYOPEATKDKPEFENAEEDFVGERFVGEKGEKLLKYVWNSNGRETDEP
CYP74C1 (Cs)	(423)	TEENKOCFQKLVVLMGRITVVEFFLRYDTFTVDVADLALGPAVKFKSLTRATASV
CYP74C2 (Cm)	(426)	TEENKOCFQKLVVLMGRIMVVEFFLRYDTFTVEVADLPLGPAVKFKSLTRATDMV
CYP74C4 (St)	(441)	TVDNKOCACKLAVLLGRIMVEFFRYDTFTVESSKYLAGEPLITFKTLEKKAII--
CYP74C13_Gm	(424)	TEDDKOCFQKLVVLMGRILYVVEFFLRYDTFTDFKFPVVLGPDVIKSLAKASSF-
CYP74C13_Mt	(427)	TEDNKICFQKLVVLMGRILYVVEFFLRYDTFTDFKFPVVLGPTIIVKSLVKAASIV
CYP74C31 (Cs)	(427)	TEENKOCFQKLVVLMGRVVLVEFFLRYDTFTVEGTRSSLGWSVVKVSLIKA----

Рис. 2. Множественное сопоставление аминокислотных последовательностей CYP74C1_CS, CYP74C2, CYP74C4_ST, CYP74C13_MT, CYP74C13_GM и CYP74C31. Выделены консервативные каталитически важные домены: сайт «F/L toggle» отмечен символом ♦; участок перегиба I-спирали пронумерован 1 – 6.

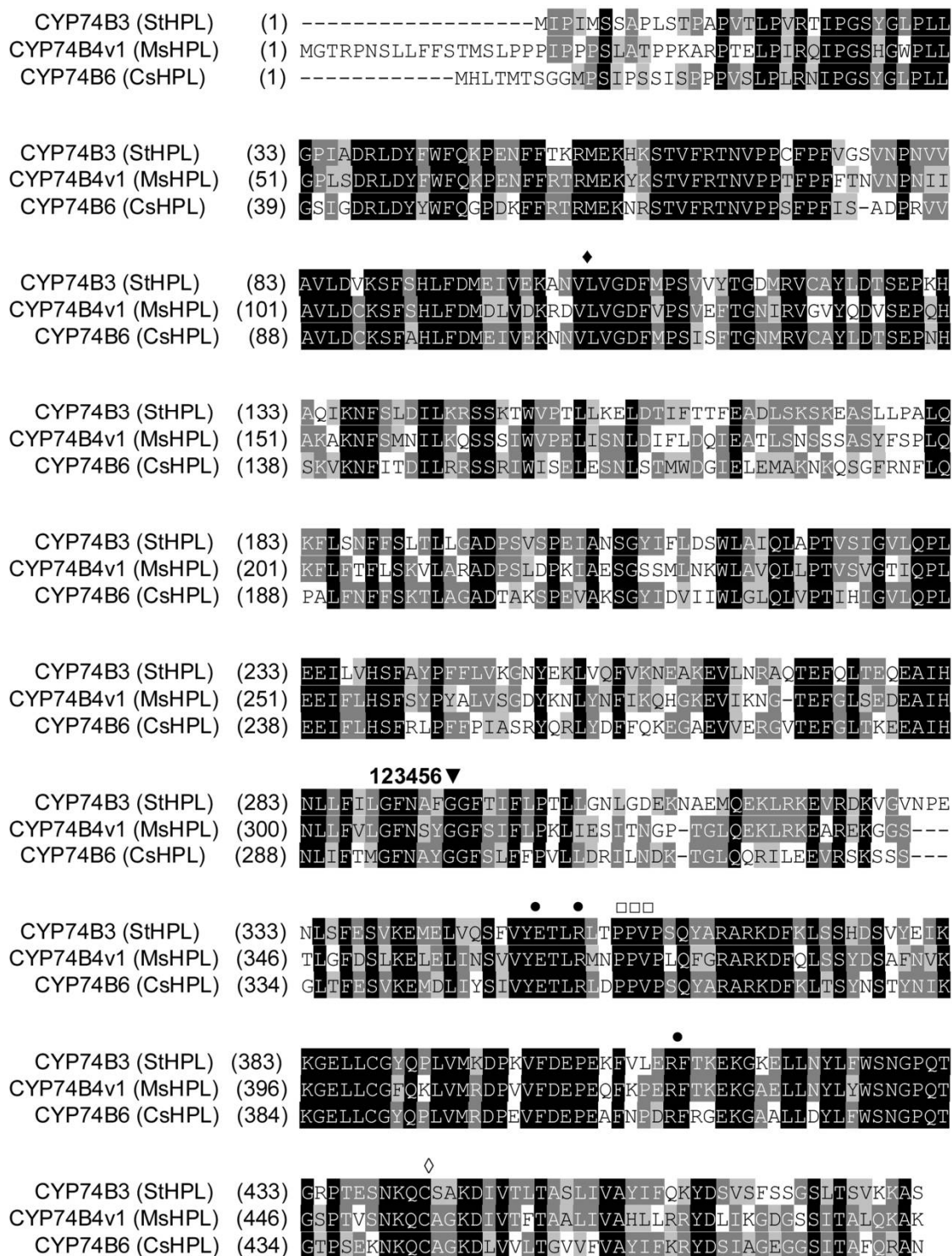


Рис. 3. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей StHPL (CYP74B3), MsHPL (CYP74B4v1) и CsHPL (CYP74B6). Консервативные структуры обозначены следующим образом: гидропероксид-связывающий домен пронумерован 1 – 6, сайт «F/L toggle», ERR-триада, домен PPV и цистеин – лиганд железа – помечены символами ◆, ●, □ и ◇ соответственно.

Таблица 5. Последовательности праймеров, комплементарных последовательностям генов представителей семейства CYP74.

Название	Последовательность праймера 5' – 3'	T _m , °C
LDF	gTCAAAATCAACATggCACC	50,1
LDF4	gATgAAgC(A/T)gAAAACTTgg	46,7
LDF3	CCCTCATCT(C/A)TTCAggTTTg	48,6/46,2
LDR3	CAAACCTgAA(G/T)AgATGAggg	48,6/46,2
LDR	gTTTCCCTTCCATTAgACC	45,0
LHF	gA(A/g)AAg(C/g)ACAAGAgCAC(g/C)gT(g/T)TTC	58,2/60,2
LHR	CA(T/A)Ag(A/C)A(g/A)CTC(C/g/A)CCTTTCTTg	43,6/57,9
LHF3	CT(T/C)gT(T/C)gg(T/C/g)gA(T/C)TTCATgCC	50,3/59,0
LHR3	ggCATgAA(g/A)TC(C/g/A)CC(g/A)AC(g/A)Ag	50,3/60,2
LAF	CCAACATgCC(T/A)CC(T/g/C)ggCCC(C/T/A)TTC	68,5/ 69,5
LAF3	CCggT(T/g)(g/C)C(g/A)(C/T)T(g/C)CAgTACg	54,8/ 60,9
LAR3	CgTACTg(g/C)A(A/g)(T/C)g(g/C)(C/A)ACCgg	52,7/60,9
LAR	gTCTC(A/C)(C/g)gC(T/C)C(A/g)TT(T/C)gACC	47,3/ 61,1

Таблица 6. Ген-специфичные праймеры, использованные для определения 3' и 5' концов кДНК гена *CYP74Q1*.

Название	5'-3' последовательность
RaF3	gATTTCTATggTggCTATgTTCCTTAg
RaR3	gTTTgTCACTggTggCTgAATCC
RaF4	gCTTggTACAgATggTCCTgg
RaR4	CAAATggTAACCTAAATgTgTgAATC
RaF5	CTggAgAgggAACAATCACTTTAgC
RaR5	CCAggACCATCTgTACCAAgC

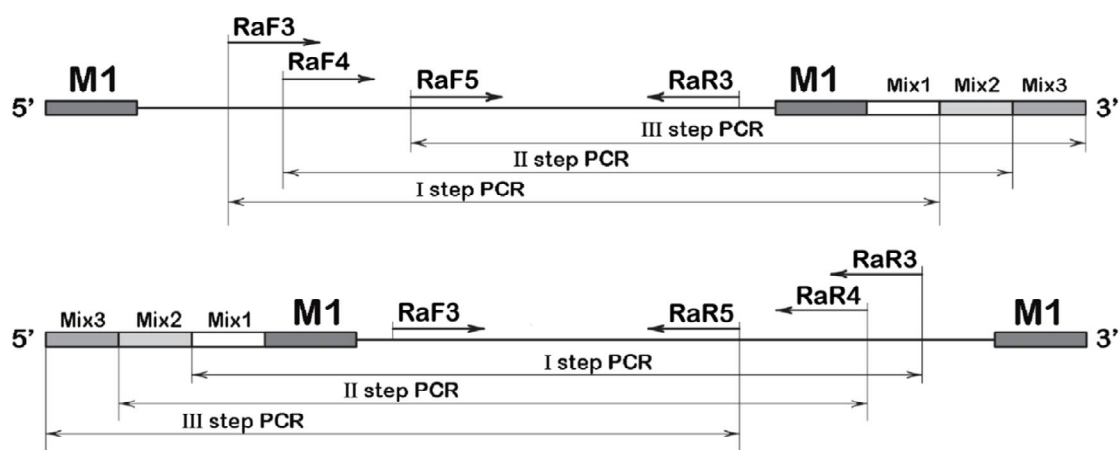


Рис. 4. Схема 3' и 5' RACE-ПЦР с ген-специфичными праймерами (таблица 4 приложения). Универсальные праймеры (Evrogen, Россия), использованные на этой стадии, обозначены следующим образом: Step-out primer mix1 – Mix 1, Step-out primer mix2 – Mix 2, Step-out primer mix3 – Mix 3; M1 – универсальный праймер для синтеза двуцепочечной кДНК (Evrogen, Россия).

Таблица 7. Данные ^1H -ЯМР спектров соединения **13** (Me, 600 МГц, $[\text{}^2\text{H}_6]$ бензол, 296 К). Соотнесение сигналов проведено на основе данных 2D-COSY.

Протон	Химический сдвиг, δ , ppm	Множественность (число протонов)	Константа взаимодействия (Гц)
H2	2,10	<i>t</i> (2)	7,5 (H3)
H3	1,52	<i>m</i> (2)	
H4	1,13	<i>m</i> (2)	
H5	1,26	<i>m</i> (2)	
H6	1,26	<i>m</i> (2)	
H7	1,26	<i>m</i> (2)	
H8	2,04	<i>ddt</i> (2)	7,5 (H7); 7,5 (H9); 1,4 (H10)
H9	5,31	<i>dt</i> (1)	10,8 (H10)
H10	5,87	<i>ddt</i> (1)	11,1 (H11)
H11	6,21	<i>ddd</i> (1)	12,1 (H12); 1,1 (H9)
H12	6,34	<i>d</i> (1)	
H1'	5,97	<i>dt</i> (1)	6,1 (H2'); 1,4 (H3')
H2'	4,50	<i>dt</i> (1)	7,4 (H3')
H3'	2,23	<i>ddt</i> (1)	7,4 (H4')
H4'	1,31	<i>m</i> (1)	
H5'	1,26	<i>m</i> (2)	
H6'	0,86	<i>t</i> (3)	7,2 (H5')
H(OMe)	3,36	<i>s</i> (3)	

Таблица 8. Данные ^1H -ЯМР спектров соединения **13a** (Me, 600 МГц, $[\text{}^2\text{H}_6]$ бензол, 296 К). Соотнесение сигналов проведено на основе данных 2D-COSY.

Протон	Химический сдвиг, δ , ppm	Множественность (число протонов)	Константа взаимодействия (Гц)
H2	2,10	<i>t</i> (2)	7,5 (H3)
H3	1,53	<i>m</i> (2)	
H4	1,13	<i>m</i> (2)	
H5	1,26	<i>m</i> (2)	
H6	1,26	<i>m</i> (2)	
H7	1,26	<i>m</i> (2)	
H8	2,03	<i>m</i> (2)	
H9	5,32	<i>dt</i> (1)	10,8 (H10); 7,5 (H8)
H10	5,84	<i>ddt</i> (1)	11,0 (H11); 1,5 (H8)
H11	6,22	<i>ddd</i> (1)	12,1 (H12); 1,1 (H9)
H12	6,28	<i>d</i> (1)	
H1'	5,88	<i>d</i> (1)	6,2 (H2')
H2'	5,42	<i>ddd</i> (1)	11,5 (H3'); 1,2 (H4');
H3'	6,67	<i>ddt</i> (1)	10,9 (H4'); 1,5 (H5')
H4'	5,36	<i>dt</i> (1)	7,5 (H5')
H5'	2,04	<i>m</i> (2)	
H6'	0,88	<i>t</i> (3)	7,5 (H5')
H(OMe)	3,36	<i>s</i> (3)	

Таблица 9. Данные ^1H -ЯМР (^1H -ЯМР, 2D-COSY, HSQC, HMBC) для соединения **14** (Me). 600 МГц, [$^2\text{H}_6$]бензол, 303 К.

Номер положения	^{13}C химический сдвиг (ppm); функциональная группа	^1H химический сдвиг (ppm); множественность; константа взаимодействия (Гц)	Корреляция множественных связей гетероядер
1	173,44 ; <u>COOMe</u>		H2, COO <u>Me</u>
2	34,26; CH ₂	2,11; t; 7,5 (H3)	H3; COO <u>Me</u> , <u>COOMe</u> , C3
3	25,38; CH ₂	1,54; m	H2, H4, C2, C4
4	29,50; CH ₂	1,15; m	H3, C3
5	29,50; CH ₂	1,15; m	
6	29,50; CH ₂	1,19; m	H7
7	29,98; CH ₂	1,29; m	H6, H8, C6
8	28,11; CH ₂	2,11; ddt, 7,5 (H9); 7,5 (H7); 1,5 (H10)	H7, H9, H10, C7, C9, C10
9	130,53; CH	5,40; dddt; 11,0 (H10); 7,5 (H8); 1,4 (H12); 1,2 (H11)	H8, H10, C11
10	121,57; CH	6,79; dddd; 11,5 (H11); 11,0 (H9); 1,5 (H8); 1,3 (H12)	H8, H9, H11
11	105,29; CH	5,50; ddd; 11,5 (H10); 6,3 (H12); 1,2 (H9)	H10, C9, C12
12	142,85; CH	6,00; ddd; 6,3 (H11); 1,4 (H9); 1,3 (H10)	H10, H11, C1', C10, C11
1'	144,70; CH	6,10; dt; 12,2 (H2'); 1,3 (H3')	H2', H3', C2', C3', C12
2'	109,70; CH	5,12; dt; 12,2 (H1'); 7,5 (H3')	H1', H3', C1'
3'	27,31; CH ₂	1,76; m	H2', H4', C1', C2', C4', C5'
4'	32,64; CH ₂	1,19; m	H3'
5'	22,45; CH ₂	1,19; m	H6', C4'

6'	14,09; CH ₃	0,83; t; 7,1 (H5')	H3', H4', C4', C5'
(1)	51,00; COO <u>Me</u>	3,37; s	H2

Таблица 10. Данные ¹H-ЯМР (¹H-ЯМР, 2D-COSY, HSQC, HMBC) для соединения **14a** (Me). 600 МГц, [²H₆]бензол, 303 К.

Номер положения	¹³ C химический сдвиг (ppm); функциональная группа	¹ H химический сдвиг (ppm); множественность; константа взаимодействия (Гц)	Корреляция множественных связей гетероядер
1	173,37; COO <u>Me</u>		COO <u>Me</u> , H2
2	34,13; CH ₂	2,11; t; 7,5 (H3)	H3, COO <u>Me</u> , C3, C4
3	25,34; CH ₂	1,55; m	H2, H4, C4
4	29,40; CH ₂	1,15; m	H3, H5
5	29,50; CH ₂	1,20; m	H4
6	29,54; CH ₂	1,18; m	H7
7	29,80; CH ₂	1,28; m	H6, H8
8	28,05; CH ₂	2,08; ddt, 7,5 (H9); 7,5 (H7); 1,4 (H10)	H7, H9, H10, C7, C9, C10
9	131,34; CH	5,42; dddt; 11,0 (H10); 7,5 (H8); 1,3 (H12); 1,1 (H11)	H8, H10
10	121,13; CH	6,74; dddt; 11,5 (H11); 11,0 (H9); 1,4 (H8); 1,3 (H12)	H9, H11
11	106,10; CH	5,49; ddd; 11,5 (H10); 6,2 (H12); 1,1 (H9)	H10, H12, C9, C12
12	142,44; CH	5,91; ddd; 6,2 (H11); 1,3 (H10); 1,3 (H9)	H11, C10, C11
1'	107,52; CH ₂	6,26; d; 12,0 (H2')	H2', C3, C12
2'	107,33; CH	6,18; ddd; 12,0 (H1'); 11,0 (H3'); 1,0 (H4')	H1', H3'

3'	123,26; CH	5,79; ddt; 11,0 (H2'); 10,8 (H4'); 1,5 (H5');	H2', H4'
4'	131,40; CH	5,29; dt; 10,8 (H3'), 7,5 (H5')	H3', H5'
5'	21,35; CH ₂	1,99; ddq; 7,5 (H4'); 7,5 (H6'); 1,5 (H3')	H4', H6', C3, C4, C6
6'	14,33; CH ₃	0,88; t; 7,5 (H5')	H5', C4
(1)	50,97; COO <u>Me</u>	3,37; s	<u>COOMe</u>

Таблица 11. Данные ¹H-ЯМР (¹H-ЯМР, 2D-COSY, HSQC, HMBC) для соединения **15** (Me). 600 МГц, [²H₆]бензол, 303 К.

Номер положения	¹³ C химический сдвиг (ppm); функциональная группа	¹ H химический сдвиг (ppm); множественность; константа взаимодействия (Гц)	Корреляция множественных связей гетероядер
1	173,34 ; <u>COOMe</u>		H2, H3, <u>COOMe</u>
2	34,22; CH ₂	2,10; t; 7,5 (H3)	H3, <u>COOMe</u> , C3, C4
3	25,35; CH ₂	1,53; m	H2, C2, C4
4	29,48; CH ₂	1,13; m	H2, H3
5	29,48; CH ₂	1,13; m	
6	29,46; CH ₂	1,16; m	H7
7	30,04; CH ₂	1,28; m	H6, H8, C6, C8, C9
8	28,09; CH ₂	2,05; ddt, 7,5 (H9); 7,5 (H7); 1,4 (H10)	H7, H9, H10, C6, C7, C9, C10
9	129,16; CH	5,33; dt; 10,8 (H10); 7,5 (H8)	H10, H11, C7, C8, C11
10	124,21; CH	5,93; ddt; 11,4 (H11); 10,8 (H9); 1,5 (H8)	H9, H11, H12, C8, C11

11	107,36; CH	6,26; ddd; 12,1 (H12); 11,4 (H10); 1,1 (H9)	H10, H12, C9, C12
12	147,71; CH	6,40; d; 12,1 (H11)	H10, H11, C1', C10, C11
1'	143,60; CH	6,11; dt; 12,2 (H2'); 1,4 (H4')	H2', H3', C12, C2', C3'
2'	110,98; CH	5,15; dt; 12,2 (H1'); 7,5 (H3')	H1', H3', C1', C4'
3'	27,29; CH ₂	1,77; m	H2', H4', C2', C4', C5'
4'	32,51; CH ₂	1,20; m	H3', H5', C2'
5'	22,43; CH ₂	1,19; m	H3', H6'
6'	14,05; CH ₃	0,83; t; 7,1 (H5')	H4', H5', C5', C4'
(1)	50,94; COOMe	3,37; s	H2, COOMe

Таблица 12. Данные ¹H-ЯМР (¹H-ЯМР, 2D-COSY, HSQC, HMBC) для соединения **15a** (Me). 600 МГц, [²H₆]бензол, 303 К.

Номер положения	¹³ C химический сдвиг (ppm); функциональная группа	¹ H химический сдвиг (ppm); множественность; константа взаимодействия (Гц)	Корреляция множественных связей гетероядер
1	173,37 ; COOMe		H2, H3, COOMe
2	34,20; CH ₂	2,10; t; 7,5 (H3)	H3, H4, COOMe, C3, C4, COOMe
3	25,33; CH ₂	1,54; m	H2, COOMe, C2, C4, COOMe
4	29,44; CH ₂	1,13; m	H2; H3; H5
5	29,44; CH ₂	1,16; m	H3; H4; H6
6	29,44; CH ₂	1,13; m	H7
7	30,02; CH ₂	1,25; m	H6, H8, C8
8	28,07; CH ₂	2,02; ddt, 7,5 (H9); 7,5 (H7); 1,5 (H10)	H7, H9, H10, C9, C10

9	129,97; CH	5,33; dt; 10,8 (H10); 7,5 (H8)	H8, H10, C11
10	123,79; CH	5,87; ddt; 10,8 (H9); 10,8 (H11); 1,5 (H8)	H9, H11, C11, C12
11	108,31; CH	6,26; ddd; 12,0 (H12); 10,8 (H10); 1,1 (H9)	H10, C12, C9
12	147,25; CH	6,30; d; 12,0 (H11)	H10, H11, C10, C11
1'	147,25; CH	6,29; d; 12,0 (H2')	H2', C2', C3'
2'	108,18; CH	6,20; ddd; 12,0 (H1'); 11,2 (H3'); 1,1 (H4')	H1', H3', C1', C4'
3'	123,18; CH	5,80; ddt; 11,2 (H2'); 10,8 (H4'); 1,5 (H5')	H2', H4', C1', C5'
4'	131,48; CH	5,29; dt; 10,8 (H3'); 7,5 (H5')	H3', H5', C2'
5'	21,39; CH ₂	1,98; ddq; 7,50 (H4'); 7,50 (H6'); 1,5 (H3');	H3', H4', H6', C3', C4'
6'	14,37; CH ₃	0,88; t; 7,5 (H5')	H4', H5', C4', C5'
(1)	50,98; COO Me	3,37; s	H2, H3, <u>COO</u> Me

Таблица 13. Данные ¹H-ЯМР для стереоизомеров соединения **2** (Me) – продуктов инкубации фермента СУР74М2 с 13-ГПОД.

Номер положения	Функциональная группа	¹ H химический сдвиг (ppm); множественность; константа взаимодействия (Гц)		
		Стереоизомер 1 (57%)	Стереоизомер 2 (29%)	Стереоизомер 3 (14%)
2	CH ₂	2,11 ppm, t, 7,4 Hz (H3)	2,11 ppm, t, 7,4 Hz (H3)	2,12 ppm, t, 7,4 Hz (H3)
3	CH ₂	1,54 ppm, m	1,54 ppm, m	1,54 ppm, m
4	CH ₂	1,15 ppm, m	1,14 ppm, m	1,14 ppm, m
5	CH ₂	1,13–1,31 ppm, m	1,14–1,31 ppm, m	1,14–1,31 ppm, m

Номер по- ложения	Функциональная группа	¹ H химический сдвиг (ppm); множественность; константа взаи- модействия (Гц)		
		Стереоизомер 1 (57%)	Стереоизомер 2 (29%)	Стереоизомер 3 (14%)
6	CH ₂	1,13 ppm, m	1,14 ppm, m	1,14–1,31 ppm, m
7	CH ₂	1,21 ppm, m	1,27 ppm, m	1,22 ppm, m
8a	CH ₂	1,99 ppm, m, AM	2,05 ppm, m	1,96 ppm, m
8b		1,92 ppm, m, AM	2,05 ppm, m	1,96 ppm, m
9	CH	5,44 ppm, ddt, 11,0 Hz (H10), 7,4 Hz (H8a,b), 1,1 Hz (H11)	5,51 ppm, dt, 11,0 Hz (H10), 6,6 Hz (H8a,b)	5,50 ppm, dt, 11,0 Hz (H10); 7,1 Hz (H8a,b)
10	CH	5,53 ppm, ddt, 8,5 Hz (H11), 1,5 Hz (H8a,b)	5,54 ppm, ddt, 7,2 Hz (H11), 1,0 Hz (H8a,b)	5,46 ppm, dd, 11,0 Hz (H10), 7,8 Hz (H8a,b)
11	CH	4,25 ppm, ddd, 5,3 Hz (OH), 5,1 Hz (H12)	4,38 ppm, ddd, 7,4 Hz (H12), 3,6 Hz (OH)	4,52 ppm, ddd, 3,3 Hz (H12), 2,7 Hz (OH)
12	CH	2,71 ppm, dd, 2,2 Hz (H13)	2,83 ppm, dd, 4,0 Hz (H13)	2,70 ppm, dd, 2,3 Hz (H13)
13	CH	2,83 ppm, ddd, 6,2 Hz (H14a), 5,0 Hz (H14b)	2,78 ppm, ddd, 6,9 Hz (H14a), 5,6 (H14b)	2,93 ppm, ddd, 6,0 Hz (H14a), 5,2 Hz (H14b)
14a	CH ₂	1,42 ppm, m (AM)	1,61 ppm, m, AB	1,44 ppm, m, (AM)
14b		1,36 ppm, m (AM)	1,61 ppm, m, AB	1,36 ppm, m (AM)
15	CH ₂	1,28–1,36 ppm, m	1,40 ppm, m	1,19–1,36 ppm, m
16	CH ₂	1,28–1,36 ppm, m	1,32 ppm, m	1,19–1,36 ppm, m
17	CH ₂	1,20 ppm, m	1,22 ppm, m	1,19 ppm, m
18	CH ₃	0,85 ppm, t, 7,1 (H17)	0,86 ppm, t, 7,1 (H17)	0,85 ppm, t, 7,0 (H17)
(1)	COOMe	3,37 ppm, s	3,37 ppm, s	3,37 ppm, s
(11)	OH	1,58 ppm, d	1,14 ppm, d	1,59 ppm, d

Таблица 14. ^1H -ЯМР данные (^1H -ЯМР, 2D-COSY, HSQC, HMBC) для основного эписмера соединения **1** (Me эфир), синтезируемого при участии фермента CYP5164B1 *E. siliculosus*. 600 МГц, [$^2\text{H}_6$]бензол, 303 К.

Номер по- ложения	^{13}C химический сдвиг (ppm); функциональная группа	^1H химический сдвиг (ppm); множественность; константа взаимодействия (Гц)	Корреляция множественных связей гетероядер
1	173,37 ; <u>COOMe</u>		<u>COOMe</u> , H2
2	34,22; CH ₂	2,11; t; 7,5 (H3)	H3, <u>COOMe</u>
3	25,35; CH ₂	1,53; m; 7,5 (H2)	H2, H4
4	29,48; CH ₂	1,14; m	H3
5	29,48 ; CH ₂	1,07-1,31; m	
6	29,47-29,85 ; CH ₂	1,07-1,31; m	
7	29,83 ; CH ₂	1,20-1,31; m	H8a, H8b
8 ^a	31,97; CH ₂	1,43; m	H7, H9
8b	31,97; CH ₂	1,35; m	H7, H9
9	54,87; CH	2,92; ddd; 6,3 (H8a); 5,7 (H8b); 2,3 (H10)	H8a, H8b, H10
10	60,47; CH	2,70; dd; 3,3 (H11); 2,3 (H9)	H9, H11
11	65,91; CH	4,52 ddd (dt-like); 8,0 (H12); 3,3 (H10); 2,7 (OH)	H10, H12, OH
12	128,35; CH	5,47; ddt (AM); 11,0 (H13); 8,0 (H11); 1,4 (H14)	H11, H13
13	133,60; CH	5,51; ddt (AM); 11,0 (H12); 7,3 (H14); 1,0 (H11)	H12, H14
14	28,45; CH ₂	1,98; m	H13, H15
15	26,36; CH ₂	1,27; m	H14, H16
16	31,82; CH ₂	1,17-1,31; m	H15

17	23,05; CH ₂	1,23; m	H18
18	14,29; CH ₃	0,87; t; 7,1 (H17)	H17
(1)	51,03; COOMe	3,37; s	H2
(11)	ОН	1,56; d; 2,7 (H11)	H11

Таблица 15. ¹H-ЯМР данные (¹H-ЯМР, 2D-COSY, HSQC, HMBC) для минорного эпимера соединения **1** (Me эфир), синтезируемого при участии фермента CYP5164B1 *E. siliculosus*. 600 МГц, [²H₆]бензол, 303 К.

Номер положения	¹³ C химический сдвиг (ppm); функциональная группа	¹ H химический сдвиг (ppm); множественность; константа взаимодействия (Гц)	Корреляция множественных связей гетероядер
1	173,37; COOMe		COOMe, H2
2	34,25; CH ₂	2,11; t; 7,5 (H3)	H3, COOMe
3	25,35; CH ₂	1,53; m;	H2, H4
4	29,51; CH ₂	1,14; m	H3
5	29,51; CH ₂	1,07-1,20; m	
6	29,87-29,50; CH ₂	1,07-1,30; m	
7	30,32-29,80; CH ₂	1,19-1,38; m	H8a, H8b
8 ^a	32,03; CH ₂	1,40; m	H7, H9
8b	32,03; CH ₂	1,34; m	H7, H9
9	56,63; CH	2,82; ddd; 6,1 (H8a); 5,1 (H8b); 2,2 (H10)	H8a, H8b, H10
10	61,70; CH	2,71; dd; 5,1 (H11); 2,2 (H9)	H9, H11
11	68,27; CH	4,25 dddd; 8,5 (H12); 5,3 (OH); 5,1 (H10); 1,1 (H13)	H10, H12
12	133,69; CH	5,53; ddt; 11,0 (H13); 8,5 (H11); 1,4 (H14)	H11, H13

13	133,55; CH	5,45; ddt; 11,0 (H12); 7,4 (H14); 1,1 (H11)	H12, H14
14	28,41; CH ₂	1,97; m	H13, H15
15	26,39; CH	1,25; m	H14, H16
16	31,83; CH	1,15-1,24; m	H15
17	23,07; CH ₂	1,23; m	H18
18	14,35; CH ₃	0,87; t; 7,2 (H17)	H17
(1)	51,05; COOMe	3,37; s	H2
(11)	OH	1,54; d; 5,3 (H11)	H11

Таблица 16. Данные ЯМР-спектра (¹H-ЯМР, 2D-COSY, HSQC и HMBSC) для продукта **1** (Me эфир), образуемого при участии фермента CYP443D1.

Номер положения	¹³ C химический сдвиг (ppm); функциональная группа	¹ H химический сдвиг (ppm); множественность; константа взаимодействия (Гц)	Корреляция множественных связей гетероядер
1	173,41; COOMe		COOMe, H2, H3,
2	34,31; CH ₂	2,11; t; 7,5 (H3)	C1, C3, COOMe, H3
3	25,43; CH ₂	1,54; m	C1, C2, C4, H2, H4
4	29,65; CH ₂	1,15; m	C2, C3, H2, H3
5	27,39; CH ₂	1,15-1,28; m	C4, C6, H6
6	30,45; CH ₂	1,17; m	C5, H5
7	27,41; CH ₂	1,24; m	C6, C8, H8
8	29,13; CH ₂	1,49-1,58; m	C7, C9, H9
9	57,87; CH	2,74; ddd; 7,1 (H8a); 5,0 (H8b); 4,3 (H10)	C8, C10, H8, H10
10	60,74; CH	2,90; dd; 7,7 (H11)	C9, C11, H9, H11, OH

11	66,85; CH	4,26; ddd, dt-like; 7,7 (H12); 7,7 (14a); 3,1 (OH)	C10, C12, H10, H12, OH
12	128,43; CH	5,48; dd; 11,0 (H13)	C11, C13, C14, H11, H12, H14a,b, OH
13	134,12; CH	5,45; dt; 6,7 (H14a,b)	C12, C14, H11, H12, H14a,b
14a	28,57; CH ₂	1,94; m	C13, C12, C15
14b		2,02; m	
15	29,88; CH ₂	1,26; m	C14,C16, H14a,b, H16
16	31,99; CH ₂	1,18; m	C17, C18
17	23,09; CH ₂	1,23; m	C18, H17, H18
18	14,44; CH ₃	0,87; t; 7,1 (H17)	C17, H17, H18
(1)	51,14; COOMe	3,37; s	C1, C2,
(11)	OH	1,62; d; 3,1 (H13)	

Таблица 17. Праймеры для сайт-направленного мутагенеза.

CYP74C13_MT_TCFN SFf	CTTGTCTTCACGACATGCTTCAACTCTTTTGGTG G
CYP74C13_MT_TCFN SFr	CCACCAAAGAGTTGAAGCATGTCGTGAAGAC AAG
CYP74C13_MT_LFf	GAAAAACGTGACGTGTTTCGACGGTACTTTC
CYP74C13_MT_LFr	GAAAGTACCGTCGAACACGTCACGTTTTTC
CYP74C1LFf	GAGAAACGCAACATTTTCGACGGAACCTTACATG
CYP74C1LFr	CATGTAAGTTCCGTCGAAAATGTTGCGTTTTCTC

CYP74C1GAf	GGATTCAACGCATACGCGGGAATGAAAGTCC
CYP74C1GAR	GGACTTTCATTCCCGCGTATGCGTTGAATCC
CYP74C31Lff	GAGAAACGCAACGTTtTCGATGGA ACTTACATG C
CYP74C31Lfr	GCATGTAAGTTCCATCGAAAACGTTGCGTTTCT C
CYP74C31AGf	GATTCAACGCATACGGCGGAATGAAAGTG
CYP74C31AGr	CACTTTCATTCCGCCGTATGCGTTGAATC
LeAOS3FLf	CGACAAGGAAA ACTACTTGGAAGG
LeAOS3FLr	CCTTCCAAGTAGTTTTTCCTTGTCG
ZmAOS1FLf	GAAGAAGGACCTGTTGACGGGCACC
ZmAOS1FLr	GGTGCCCGTCAACAGGTCCTTCTTC
LuAOSFLf	GTCGAGAAGAAGGATCTCTTGACTGGA ACTTAC ATGCC
LuAOSFLr	GGCATGTAAGTTCCAGTCAAGAGATCCTTCTTC TCGAC
PpAOS2FLf	CGAGAAGAGAGACCTCCTCTTG GGGACTTACAT G
PpAOS2FLr	CATGTAAGTCCCAAGAgGAGGTCTCTCTTCTC G
LeAOSKSf	tcaattcGtatGGcGGtttGaGcGtGttettccatctttGatc
LeAOSKsr	GatcaaaGatGGGaaGaacacGctcaaaccGccatacGaattGa
LeAOSDRf	ttatgaaaccctaaGGatGcGtcctccGttccattccaa
LeAOSDRr	ttGGaatGGaaccGGaGGacGcatccttaGGGtttcataa

LeAOSFIf	CTTTgTTTTCTAgCAggAATCAATTCgTATggCgg
LeAOSFIr	CAAACCgCCATACgAATTgATTCCTgCTAggAAAA
LeAOSSAf	CCTAgCAggATTCAATGCgTATggCggTTTgAAAgt
LeAOSSAr	CACTTTCAAACCgCCATACgCATTgAATCCTgCTA
LeAOSTYf	GCGTCCTCCGGTTCCATTCCAATACGTTAAGGC
LeAOSTYr	CCTAGCCTTAACGTATTGGAATGGAAC
CYP74B16EGf	TTCAACTCgTTCGggATTTACCCTATTTATC
CYP74B16EGr	gTAAATAgggTAAATCCTCCgAACgAgTTgAA
NtDESVFf	AAggTCAgTTCCTCTTCggATATCAgCCC
NtDESVFr	gggCTgATATCCgAAGAggAACTgACCTT
CYP74B16FVf	CTGGCATTCAACTCGgTCGAAGGATTTACCC
CYP74B16FVr	GGGTAAATCCTTCGAcCGAGTTGAATGCCAG
CYP74B16AGf	CAATTTATTATTTGTTCTGGgATTCAACTCGTTC
CYP74B16AGr	GAACGAGTTGAATcCCAGAACAAATAATAAATT