

ДУАЛИСТИЧНЫЕ ЦИТОХРОМЫ P450 ПОДСЕМЕЙСТВА CYP74B

Е.К. Бессолицына, С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, *bessolicina_elen@mail.ru*

Аннотация. Подсемейство ферментов CYP74B включает в себя 13-гидропероксидспецифичные гидропероксидлиазы (ГПЛ) и дивинилэфирсинтазы (ДЭС). Объектами настоящей работы являются рекомбинантные ферменты CYP74B3 (*Solanum tuberosum*), CYP74B4v1 (*Medicago sativa*), CYP74B6 (*Cucumis sativus*), CYP74B16 (*Linum usitatissimum*) и DcCYP74B (*Daucus carota subsp. Sativus*). Помимо основных продуктов данные ферменты катализируют образование дополнительных продуктов эпоксиалкогольсинтаз (ЭАС) оксиранил карбинолов.

Ключевые слова: оксипирины; цитохромы P450; ферменты подсемейства CYP74B; эпоксиалкогольсинтаза; гидропероксидлиаза; дивинилэфирсинтаза

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1187-1190

Важную роль в защите растений и передаче сигналов играют липоксигеназный каскад и его продукты – оксипирины, окисленные производные полиненасыщенных жирных кислот. Разнообразие оксипиринов обеспечивается липоксигеназами и неклассическими цитохромами P450 семейства CYP74 [Grechkin, 1998; Brash, 2009; Hughes et al., 2009]. Семейство CYP74 включает в себя четыре типа ферментов: две дегидразы – алленоксидсинтазу (АОС) и дивинилэфирсинтазу (ДЭС), а также две изомеразы – гидропероксидлиазу (ГПЛ) и эпоксиалкогольсинтазу (ЭАС). АОС являются членами подсемейств CYP74A и CYP74C, ДЭС являются членами подсемейств CYP74B, CYP74D, CYP74H, CYP74M и CYP74Q, а ГПЛ являются членами подсемейств CYP74B, CYP74C, CYP74E, CYP74F и CYP74G.

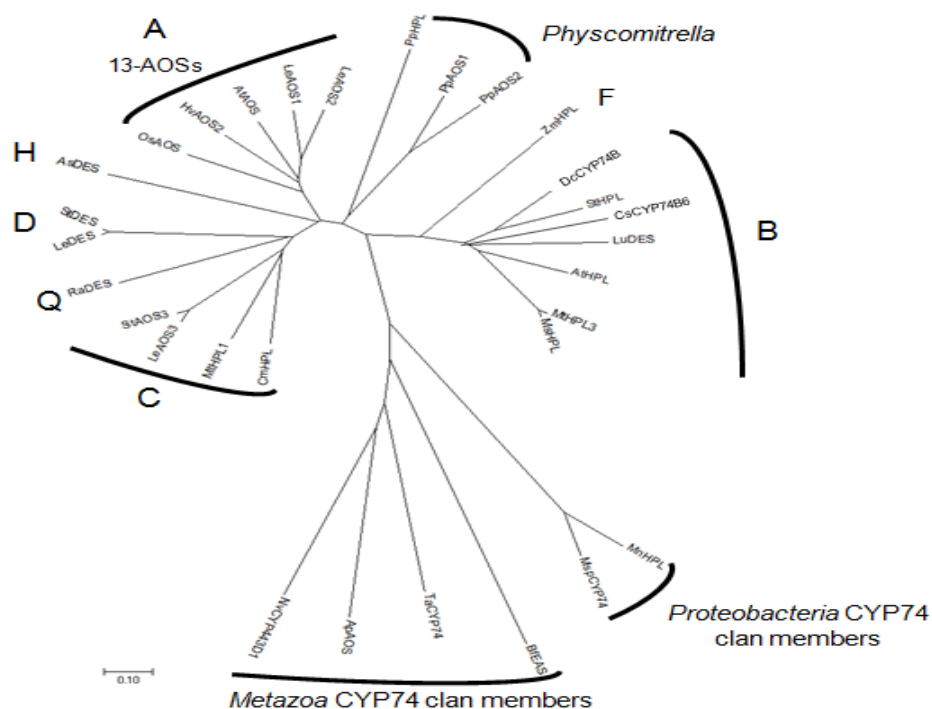


Рис. 1. Один из вариантов филогенетического дерева представителей клана CYP74.

Недавнее обнаружение CYP74-подобных ферментов у некоторых протеобактерий, многоклеточных животных [Lee et al., 2008; Toporkova et al., 2017] и у бурых водорослей [Toporkova et al., 2017] расширило определение CYP74 от семейства до клана. Истинные ЭАС до сих пор были обнаружены только у многоклеточных животных и бурых водорослей (рис.1).

Ферменты CYP74 превращают гидроперекиси жирных кислот в четыре типа продуктов, а именно окиси аллена (продукт АОС), дивиниловые эфиры (продукт ДЭС), полуацетали (продукт ГПЛ) и эпоксигидроксиоктадеценовые кислоты (продукт ЭАС).

Объектами настоящей работы являются рекомбинантные ферменты подсемейства CYP74В: CYP74В3 (*Solanum tuberosum*), CYP74В4v1 (*Medicago sativa*), CYP74В6 (*Cucumis sativus*), CYP74В16 (*Linum usitatissimum*), а также DcCYP74В (*Daucus carota subsp. Sativus*). Подсемейство ферментов CYP74В включает в себя 13-специфичные ГПЛ и ДЭС.

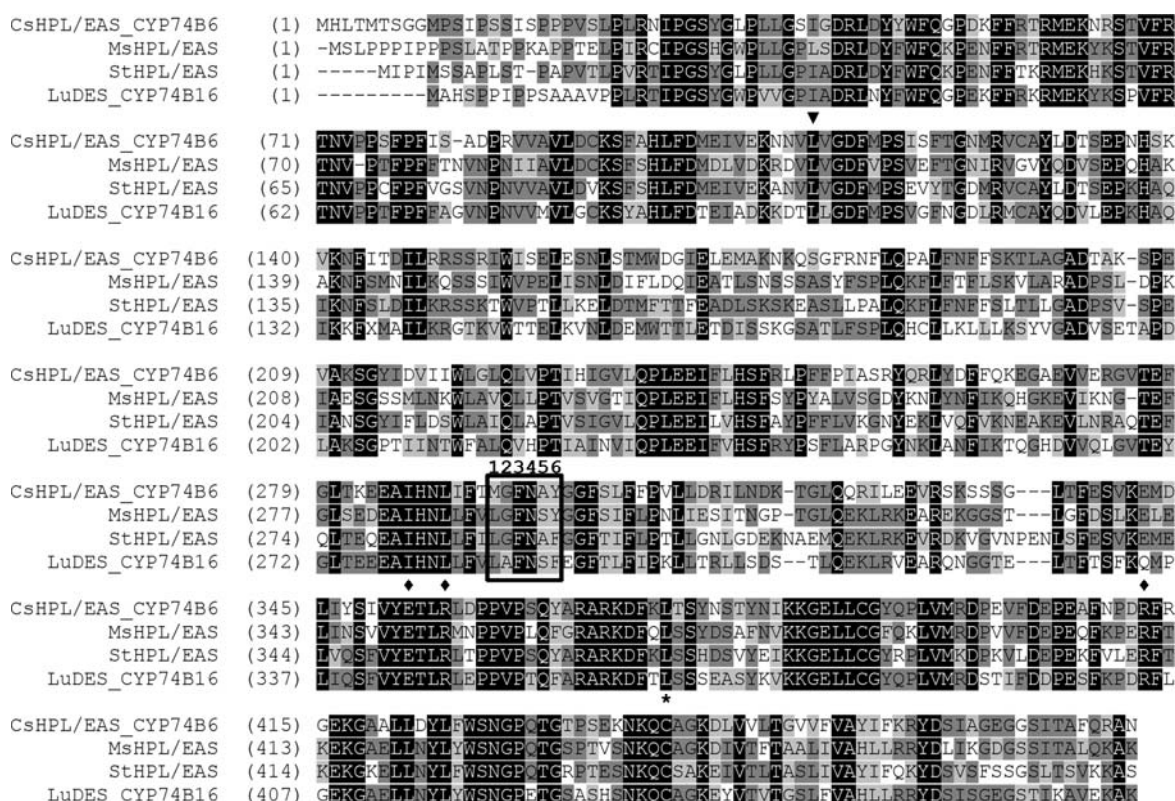


Рис. 2. Полные аминокислотные последовательности целевых ферментов. В рамке выделена последовательность гидропероксид-связывающего домена (домен ГСД).

Рекомбинантные ферменты CYP74В3, CYP74В4v1, CYP74В6, CYP74В16 и DcCYP74В были получены в гетерологичных системах экспрессии с использованием клеток *E. coli*. Полноразмерные открытые рамки считывания были клонированы для получения рекомбинантных белков, которые были экспрессированы в бактериальном продуценте, очищены методом металл-аффинной хроматографии, и методом ГХ-МС анализа были исследованы каталитические свойства. Полные аминокислотные последовательности целевых ферментов представлены на рис. 2. Все цитохромы P450 имеют сходную третичную структуру белковой молекулы в комплексе с гемом и имеют определенные консервативные, каталитически важные домены. В частности, в катализе непосредственно участвует гидропероксид-связывающий домен (домен ГСД), состоящий из 6 аминокислотных остатков.

Предпочтительными субстратами этих ферментов являются 13-гидроперекиси линолевой и альфа-линоленовой кислот (13-ГПОД и 13-ГПОТ, соответственно). 9-гидроперекиси являются неэффективными субстратами для всех ферментов, кроме DcCYP74B.

Фермент CYP74B16 (LuDES) катализирует превращения 13-ГПОД и 13-ГПОТ в (ω 5Z)-этеролевую и (ω 5Z)-этероленовую кислоты, соответственно. Однако превращение 13-ГПОД и 9-ГПОД привело к получению дополнительных соединений эпокиспиртов.

Фермент CYP74B3 (StHPL) приводит к образованию полуацеталей, продуктов ГПЛ, в качестве основных продуктов из 13-ГПОД, а также из 13-ГПОТ. Кроме того, побочными продуктами превращения 13-ГПОД ферментом StHPL являются эпоксигидроксикислоты. Аналогичная ситуация наблюдается в случае фермента CYP74B6. Наибольшая активность фермента CYP74B6 наблюдается в отношении 13-ГПОТ. Фермент CYP74B6 обладает активностью ГПЛ при превращении 13-ГПОТ, основным продуктом был определен как 12-оксо-9-додеценонная кислота, продукт 13-ГПЛ. При взаимодействии с 13-ГПОД основным продуктом являются 11-гидрокси-12,13-эпоксиоктадеценонная кислота и ее стереоизомеры, продукты ЭАС.

В то же время фермент CYP74B4v1 (MsHPL) обладает другими особенностями. Фермент MsHPL катализирует превращение 13-ГПОД в полуацетали в качестве основного продукта и оксиранил карбинолы - в качестве побочного продукта. В то же время, 13-ГПОТ, а также 9-ГПОТ были неэффективными субстратами для фермента MsHPL.

По выравниванию аминокислотных последовательностей доменов ГСД DcCYP74B абсолютно аналогичен домену ГСД типичных ГПЛ. Предпочтительными субстратами для этого фермента являются 9-ГПОД / ОТ. Таким образом, DcCYP74B обладает 9-специфичностью, в отличие от других 13-специфичных членов подсемейства CYP74B. Основными продуктами превращения гидроперекисей при участии этого фермента являются альфа-кетолы, продукты АОС. В качестве минорных продуктов были определены 9-оксононановая кислота, продукт ГПЛ, а также эпокиспирты, продукты ЭАС. Таким образом, фермент моркови является первым представителем подсемейства CYP74B, представляющим собой 9-специфичную АОС.

Работа выполнена при поддержке грантов 18-34-01012-мол_a и МК-5989.2018.4.

Литература

Brash A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes // *Phytochemistry*. – 2009. – V. 70. – P. 1522–1531.

Grechkin A.N. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway // *Prog. Lipid Res.* – 1998. – V. 37. – P. 317–352.

Hughes R.K., De Domenico S., Santino A. Plant cytochrome CYP74 family: biochemical features, endocellular localisation, activation mechanism in plant defence and improvements for industrial applications // *ChemBioChem*. – 2009. – V. 10. – P. 1122–1133.

Lee D.-S., Nioche P., Hamberg M., Raman C.S. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthesis enzymes // *Nature*. – 2008. – V. 455. – P. 363–370.

Toporkova Y.Y., Fatykhova V.S., Gogolev Y.V., Khairutdinov B.I., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Epoxyalcohol synthase of *Ectocarpus siliculosus*. First CYP74-related enzyme of oxylipin biosynthesis in brown algae // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2017. – V. 1862. – P. 167–175.

Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Bessolitsyna E.K., Smirnova E.O., Fatykhova V.S., Brühlmann F., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into

allene oxide synthases by site-directed mutagenesis // BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2018. – V. 1863. – P. 369–378.

Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Mukhitova F.K., Hamberg M., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Identification of CYP443D1 (CYP74 clan) of *Nematostella vectensis* as a first cnidarian epoxyalcohol synthase and insights into its catalytic mechanism // Biochim. Biophys. Acta. – 2017. – V. 1862. – P. 1099–1109.

DOUBLE FUNCTION CYTOCHROMES P450 OF THE CYP74 FAMILY

E.K. Bessolitsyna, S.S. Gorina, Y.Y. Toporkova, L.Sh. Mukhtarova, A.N. Grechkin

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Science Center of the Russian Academy of sciences, Kazan, Russia, Kazan, *bessolicina_elen@mail.ru*

Abstract. The CYP74B subfamily of fatty acid hydroperoxide transforming enzymes includes 13-hydroperoxide specific hydroperoxide lyases (HPLs) and divinyl ether synthases (DEs). The objects of the present work are the recombinant CYP74B3 (*Solanum tuberosum*), CYP74B4v1 (*Medicago sativa*), CYP74B6 (*Cucumis sativus*), and CYP74B16 (*Linum usitatissimum*) enzymes. Along with major products these enzymes produced oxiranyl carbinols. The preferred substrates of these enzymes are 13-hydroperoxides of linoleic and α -linolenic acids.

Keywords: *Oxylipins; Cytochrome P450; CYP74B subfamily enzymes; Epoxyalcohol synthase; Hydroperoxide lyase; Divinyl ether synthase*