

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОХРОМОВ P450 ПОДСЕМЕЙСТВА CYP74C

С.С. Горина, Е.О. Смирнова, В.С. Фатыхова, Т.М. Ильина, Я.Ю. Топоркова,
Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия, gsvetlana87@gmail.com

Аннотация. Представлены данные по характеристике бифункциональных ферментов подсемейства CYP74C и их мутантных форм.

Ключевые слова: оксипирины, подсемейство CYP74C, эпоксиалкогольсинтазы, гидропероксидлиазы, сайт-направленный мутагенез

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1219-1221

Окисленные производные жирных кислот – оксипирины – представляют собой важный класс сигнальных молекул, участвующих в ответных реакциях на механическое повреждение, воздействие патогенов и факторов окружающей среды. Помимо этого, оксипирины принимают участие в процессах роста и развития растения, регулируют рост корней и процессы старения. Оксипирины образуются в рамках липоксигеназного каскада, где ключевая роль принадлежит цитохромам P450 семейства CYP74 [Grechkin, 1998; Brash, 2009], на этапе функционирования которых происходит разделение пути на несколько ветвей: алленоксидсинтазную (АОС), гидропероксидлиазную (ГПЛ), дивинилэфирсинтазную (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазную (ЭАС), получивших свое название по ферментам, катализирующим превращение гидроперекисей жирных кислот в соответствующие метаболиты. Показано, что жасмоновая кислота (продукт АОС ветви) участвует в перекрестных взаимодействиях с салициловой и абсцизовой кислотами, обеспечивая индукцию защитных реакций растительного организма. Летучие метаболиты ГПЛ ветви являются сигналами взаимодействия растения с насекомыми, а C12- и ω-оксокислоты участвуют в заживлении ран.

Объектами данного исследования являются шесть предполагаемых 9/13-специфичных ГПЛ подсемейства CYP74C: CYP74C1_CS и CYP74C31 (*Cucumis sativus*) CYP74C4_ST (*Solanum tuberosum*), CYP74C2 (*Cucumis melo*), CYP74C13_GM (*Glycine max*) и CYP74C13_MT (*Medicago truncatula*). Все рекомбинантные ферменты в зависимости от используемого субстрата наряду с продуктами ГПЛ продуцируют продукты ЭАС. Ферменты CYP74C4_ST, CYP74C2, CYP74C31 и CYP74C13_MT в основном участвуют в биосинтезе продуктов ГПЛ из 13-гидроперекиси линолевой кислоты, тогда как CYP74C13_GM производит сопоставимые количества продуктов 13-ГПЛ и 13-ЭАС, а CYP74C1_CS обладает преимущественно активностью 13-ЭАС. Большинство ферментов преобразуют 13-гидроперекись альфа-линоленовой кислоты в продукты 13-ГПЛ. Все ферменты по отношению к 9-гидроперекисям обладают преимущественно 9-ЭАС активностью [Toporkova et al., 2018]. Продукты идентифицированы по данным ГХ-МС и ЯМР. Кроме того, были получены мутантные формы с заменами в каталитически важных доменах (I-спираль, «F/Ltoggle»), которые проявляли частичную или практически полную активность АОС.

Таким образом, результаты настоящей работы демонстрируют, что описанные ранее 9/13-ГПЛ подсемейства CYP74C помимо ГПЛ активности обладают активностью ЭАС. В зависимости от субстрата эти ферменты участвуют в образовании продуктов, которые в основном относятся к продуктам ГПЛ и ЭАС.

Кроме того, в настоящем исследовании впервые проведено превращение бифункциональных ферментов ГПЛ/ЭАС в АОС путем сайт-направленного мутагенеза.

		*		123456▼
CsAOS (145)	KVEKKDLFTGTYMPVT	(317)	RLGISREEACHNLLFTTCFNSFCGMKIFFFNMIKWIGRAG	
GmAOS (131)	KVEKKDVFTGTFFMPST	(303)	RLGITRDEACHNLLFATCFNSFCGMKIFFFNVLKWIGRAG	
HbAOS (137)	KVEKKDLFTGTFFMPST	(309)	KMGISREEACHNLLFATCFNTFCGLKIFFFNILKWIGRAG	
HnAOS (111)	KVEKKDLFTGTFFMPST	(283)	KLGISRDEACHNLLFATCFNSFCGMKIFFFNMMKSIKAG	
LjAOS (140)	KVDKTDVFTGTFFMPST	(312)	RLGVSREEACHNLLFATCFNSFCGMKIFFFNVLKWIGRGG	
AtAOS (130)	KVEKKDLFTGTYMPST	(302)	KLGISREBATHNLLFATCFNTWCGMKILFFNMVKRIGRAG	
LeAOS2 (124)	KVEKKDLFTGTFFVST	(296)	KLGISKDEACHNLLFATCFNSFCGMKIFFFNMLKSIKAG	
CYP74C13_MT (90)	KVEKRDVLDGTFFMPST	(296)	KLGISKDEACHNLLFATCFNSFCGMKIFFFNMLKSIKAG	
CYP74C13_Gm (86)	KVDKRDVLDGTFFMPST	(262)	RVGIKRDEACHNLLVFLSFAQCGGLVNQFPILLIKWLAG	
CYP74C4_ST (102)	KVEKKNVLDGTFFMPST	(278)	KSGIKRDEACHNLLVFLAGFNAYCGMKILFFSLMKWVASGG	
CYP74C1_CS (86)	KVEKRNILDTGTFFPSL	(261)	KQSIDREKACHNLLVFLAGFNAYCGMKVLFPTILKWVGTGG	
CYP74C2 (89)	KVEKRNILDTGTFFPSL	(264)	KQSIDREKACHNLLVFLAGFNAYCGMKVLFPTILKWVGTAG	
CYP74C31 (91)	KVEKRNVLDTGTFFPSL	(265)	KQGINREKACHNLLVFLAGFNAYCGMKVLLPTILLNVVSAG	
LeHPL (97)	IVEKANVLVDGDFMPSV	(271)	EFQLTEQEATHNLLVFLGFNAFCGFSIFLPTILLGNLDEK	
CjHPL (120)	IVEKKNILVDGDFMPSV	(294)	EFGLTKEEATHNLLVFLGFNAFCGFSIFVEKLINAIASDT	
NtHPL (115)	IVEKANVLVDGDFMPSV	(289)	EFGLTEQEATHNLLVFLGFNAFCGFSIFLPTILLGNLDEK	
AtHPL (111)	LVDKRDVLDGDFRPSL	(286)	EFRLTRDEATHNLLVFLGFNAFCGFSIFLPTILLGRITGDN	
PgHPL (112)	IVEKSNVLVDGDFMPSV	(286)	EFGLTHQEATHNLLVFLGFNAFCGFSIFLPTILLNLSLSDT	
LuDES (95)	IADKKDTLLGDFMPSV	(270)	EYGLTEEEATHNLLVFLAFNSFCGFTFLEIKLLITRLSDS	

Рисунок. Множественное выравнивание частичных последовательностей ферментов CYP74. Показаны последовательности CPC-1 и I-спирали. ГСД домен пронумерован 1-6, первый глицин после него отмечен символом ▼, «F/L toggle» отмечен звездочкой. Для выравнивания использовались следующие последовательности ферментов CYP74: At, *A. thaliana*; AtAOS, AED94842.1; AtHPL, AAC69871; Cj, *Citrusjambhiri*; 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, AAŸ27751; Hn, *Hyoscyamus niger*; HnAOS, ABS50433; Le, *L. esculentum*; LeAOS2, NP_001274707; LeHPL, CAB43022.1; Lj, *Lotus japonicus*; LjAOS, BAJ78216; Mt., *M. truncatula*; MthPL/EAS, CYP74C13_MT, CAC86897; Nt, *Nicotiana tabacum*; NtHPL, AAZ39884; Pg, *P. guajava*; PgHPL, AF239670.1; St, *S. tuberosum*; StHPL/EAS, CYP74C4_ST, XP_006365486.1.

Для этого было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ферментов CYP74 (рисунок). На основе этого были выявлены предполагаемые сайты в каталитически важных доменах, а именно – в первом субстрат-распознающем сайте (CPC) (сайте, называемом «F/L toggle») и гидропероксид-связывающем домене (ГСД), расположенном в CPC-4 [Gotoh O., 1998]. На основе проведенного анализа были получены следующие мутантные формы рекомбинантных ферментов: CYP74C1_CS G283A, CYP74C31 A287G, CYP74C1_CS L93F, CYP74C31 L98F, а также соответствующие двойные мутанты. Все полученные мутантные формы ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 обладают главным образом активностью АОС при использовании с 9-ГПОД и 9-ГПОТ в качестве субстратов. В случае 13-ГПОТ, все мутантные формы обладают преимущественно активностью ГПЛ. Исключением являются мутантные формы CYP74C1_CS L93F и CYP74C1_CS G283A/L93F. Первая из них катализирует конверсию 13-ГПОТ в альфа-кетол (АОС продукт), а вторая производит примерно равные количества продуктов ГПЛ и АОС. Другая ситуация наблюдается в случае 13-ГПОД. Оба рекомбинантных фермента с мутацией в домене ГСД, а также мутантная форма CYP74C31 A287G/L98F обладают в основном активностью ГПЛ [Toporkova et al., 2018]. Анализ продуктов реакции проводили методом ГХ-МС и ЯМР. Полученные данные указывают на тесную связь катализа ферментов CYP74 и то, что тип катализа может быть изменен с помощью сайт-направленного мутагенеза.

Исследования ферментов CYP74C13_MT и CYP74C13_GM проводились при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-10286).

Исследования ферментов CYP74C1_CS и CYP74C31 были поддержаны грантом РФФИ 16-34-60231-мол_а_дк. Исследования фермента CYP74C2 были поддержаны грантом МК-2873.2017.4. Эксперименты по сайт-направленному мутагенезу были поддержаны грантом РФФИ 18-04-00508_а.

Литература

Brash A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes // *Phytochemistry*. – 2009. – V. 70, No.13-14. – P. 1522–1531.

Gotoh O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 Family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. // *The Journal of biological chemistry*. – 1992. – V. 267. – P. 83–90.

Grechkin A.N. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway // *Prog Lipid Res*. – 1998. – V. 37, No. 5. – P. 317–352.

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. // *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2018. – V. 1863 (4). – P. 369–378.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CYTOCHROMES P450 CYP74B SUBFAMILY

S.S. Gorina, E.K. Bessolitsyna, E.O. Smirnova, V.S. Fatykhova, T.M. Ilyina,
Y.Y. Toporkova, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin

The Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics is a separate structural subdivision of the Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Kazan, gsvetlana87@gmail.com

Abstract. This paper presents data on the characteristics of double function enzymes of the CYP74C subfamily and their mutant forms.

Keywords: *oxylipins, cytochrome P450, CYP74C subfamily enzymes, epoxyalcohol synthase, hydroperoxidelyase, site-directed mutagenesis*