

УДК 577.151

ПРОИСХОЖДЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ СЕМЕЙСТВА CYP74 ЦИТОХРОМОВ P450 ПО РЕЗУЛЬТАТАМ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА

Я.Ю. Топоркова¹, Л.Ш. Мухтарова¹, Ю.В. Гоголев², А.Н. Гречкин¹

(¹лаборатория оксипинов и ²группа молекулярной биологии Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН; e-mail: yanchens@yandex.ru)

Биоинформационный анализ и сайт-направленный мутагенез позволили идентифицировать детерминанты катализа ферментов CYP74 в центре I-спирали и ERR-триаде. Замены K302S и T366Y в алленоксидсинтазе LeAOS3 томата привели к появлению активности гидропероксидлиазы. Мутантные формы F284I, F287V, G288I, N285A и N285T гидропероксидлиазы MtHPL люцерны в отличие от фермента дикого типа, образующего C₁₂-альдокислоту, синтезировали C₁₃- и C₁₁-фрагменты. Полученные данные подтверждают эволюционное происхождение разнообразия семейства CYP74 от единого предка, обладавшего активностью гидропероксидлиазы.

Ключевые слова: липоксигеназная сигнальная система, цитохромы P450 семейства CYP74, рекомбинантные ферменты, сайт-направленный мутагенез.

В онтогенезе растений и в формировании у них ответа на стрессовые факторы важную роль играют ферменты липоксигеназной сигнальной системы, катализирующие образование окисленных производных жирных кислот (оксипинов) [1–4] — липоксигеназы и цитохромы P450 семейства CYP74, которое включает три типа ферментов: две дегидразы — алленоксидсинтаза (АОС) и дивинилэфирсинтаза (ДЭС) и одна изомераза — гидропероксидлиаза (ГПЛ).

Ранее были описаны три сайта в последовательностях ферментов CYP74, замены в которых приводили к изменению типа катализа: Phe295 и Ser297 у LeAOS3 томата [5] и Phe137 в АОС *Arabidopsis thaliana* (GenBank PDB: 3CLI) [6]. Две детерминанты [5] находятся внутри центрального домена I-спирали (“I-helix central domain”, IHCD), соответствующего “кислород-связывающему” домену цитохромов P450. IHCD ферментов CYP74 является вырожденным. В отличие от “классических” представителей суперсемейства P450, таких как монооксигеназы, ферменты семейства CYP74 не используют кислород в качестве субстрата, не зависят от систем транспорта электронов и катализируют превращения гидроперекисей жирных кислот. Два описанных сайта, соответствующие остаткам Phe [5, 6], необходимы для формирования типа катализа и консервативны у ферментов, катализирующих соответствующие реакции. Все обнаруженные на данный момент АОС содержат в обоих сайтах Phe, а ДЭС — Leu или Ile. ГПЛ содержат Phe в домене IHCD и Leu или Ile в сайте, описанном в работе [6].

В данной работе на основе сопоставления последовательностей консервативных для всех цитохромов P450 доменов IHCD и ERR-триады, примыкающих непосредственно к гему, были выбраны дополнительные сайты для сайт-направленного мутагенеза в алленоксидсинтазе LeAOS3 томата (GenBank AF454634.1) и ряд сайтов в гидропероксидлиазе MtHPL люцерны (GenBank AJ316562.1). На основании полученных данных о сравнении каталитического действия ферментов дикого типа и их мутантных форм сделано предположение о происхождении всего существующего разнообразия ферментов семейства CYP74 цитохромов P450.

Материалы и методы

Для наработки рекомбинантных плазмид, содержащих точечные мутации в генах *leAOS3* и *mtHPL*, были сконструированы и синтезированы специфичные праймеры (НПО “Синтол”): в LeAOS3 K302S TCAATTCgTATggCggTTTgA gCgTgTTCTTCCCATCTTTgATC, D359R TTATgAAACCCTAAggATgCgTCCTCCggTTCC ATTCCAA, T366Y gCgTCCTCCggTTCCATTTCCAATACgTTAAgGCTAgg, в MtHPL F284I CTTgTCTTCACgTTAggggTCAACgCTTTTggTgg, N285T gTCTTCACgTTAggggTTCACCgC TTTTggTgg. Сайт-направленный мутагенез проводили с помощью набора QuickChange (Invitrogene, США). Полученными плазмидами трансформировали штамм *E. coli* Rosetta-gami(DE3)pLysS. Рекомбинантные ферменты очищали с помощью металлоаффинной хроматографии, элюируя их 50 мМ раствором гистидина. Гидроперекиси жирных кислот получали инкубацией линолевой и α-линоленовой кислот с сое-

вой и томатной липоксигеназами. Эксперименты по изучению каталитического действия ферментов проводили по следующей схеме: (1) инкубация рекомбинантного фермента с гидроперекисью; (2) быстрая экстракция продуктов холодным гексаном; (3) их этерификация диазометаном; (4) восстановление NaBH_4 или NaB^2H_4 ; (5) гидрирование над платиной; (6) упаривание растворителя в вакууме; (7) перерастворение в метаноле и выдерживание в течение 30 мин при 23° ; (8) триметилсилирование. Продукты очищали с помощью ВЭЖХ и анализировали газовой хромато-масс-спектрометрией (ГХ-МС).

Результаты и обсуждение

К настоящему времени все более вероятным становится предположение о том, что предковый фермент CYP74 мог обладать активностью гидропероксидлиазы (гипотеза 1) [6]. Дупликация генов привела к возможности появления новых функций и появлению разнообразия ферментов семейства CYP74. Альтернативным является предположение, что пред-

ковый фермент CYP74 обладал некой иной активностью, нежели АОС, ГПЛ или ДЭС (гипотеза 2).

Мы в некоторой степени воспроизводим процесс возникновения точечных мутаций строго в выбранных нами сайтах с помощью сайт-направленного мутагенеза.

При инкубации LeAOS3 дикого типа с субстратом — 9-гидроперекисью линолевой кислоты (9-ГПОД) — основным продуктом был характерный для АОС α -кетол, выявленный в виде метилового эфира ТМС-производного, и ничтожно малое количество 9-оксононановой кислоты (9-оксо-9:0) в виде метилового эфира — продукта, характерного для ГПЛ, — что означает, что LeAOS3 дикого типа продуцирует 9-оксононановую кислоту в качестве минорного продукта (рис. 1, А).

Мутантные формы LeAOS3 также инкубировали с 9-ГПОД. Было показано, что все полученные мутантные формы LeAOS3 сохранили способность утилизировать 9-ГПОД. Однако наряду с α -кетолом, появилось значительное количество 9-оксо-9:0 (рис. 1, Б—Д).

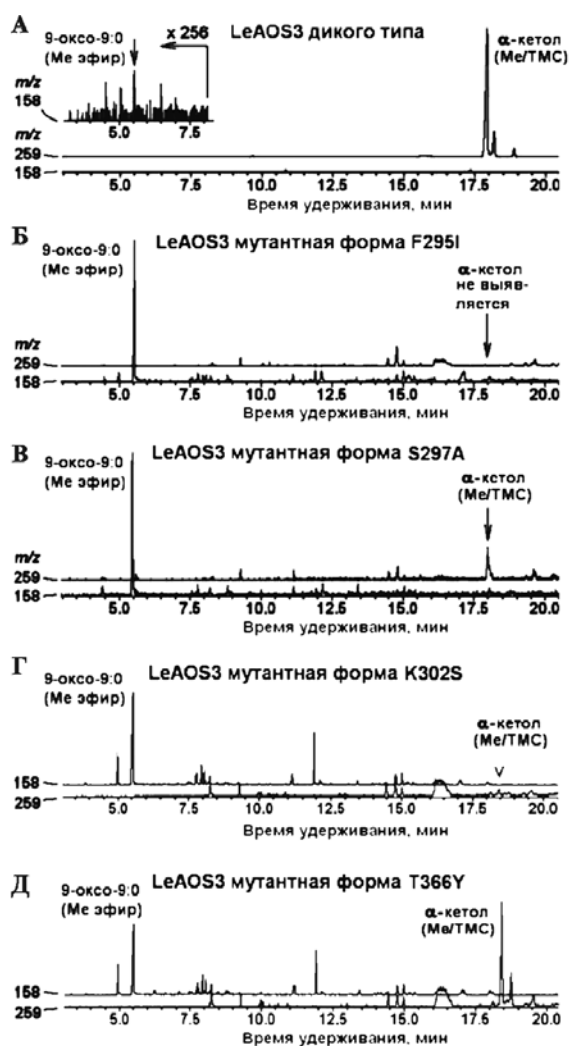


Рис. 1. Хроматограмма продуктов инкубации LeAOS3 дикого типа и ее мутантных форм с 9-ГПОД

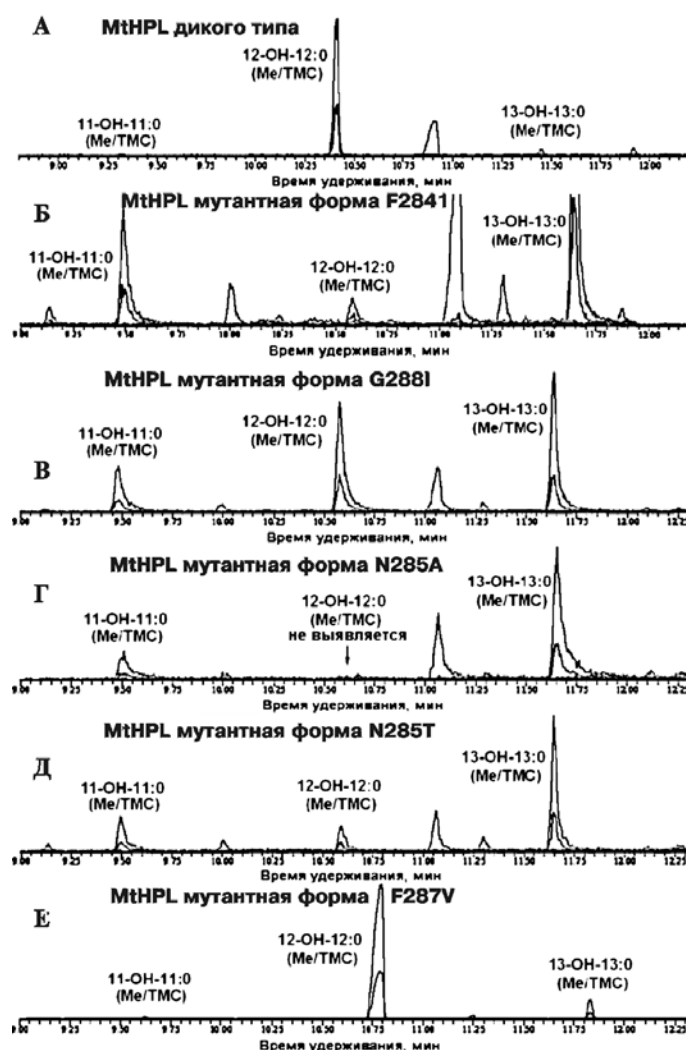


Рис. 2. Хроматограмма продуктов инкубации 13-ГПОТ с MthPL дикого типа (А) и ее мутантными формами: F284I (Б), G288I (В), N285A (Г), N285T (Д) и F287V (Е)

Все четыре мутанта проявляли активность гидропероксидлиазы (изомеразы), тогда как алленоксидсинтазная (дегидразная) активность была сильно снижена (S297A, K302S и T366Y) или отсутствовала (F295I).

Для получения дополнительных данных о зависимости между последовательностью ИНСД и определенным типом катализа и поиска фактов в пользу гипотез 1 или 2 мы проверили действие мутантных форм гидропероксидлиазы MtHPL люцерны: F284I, F287V, N285A, G288I и N285T, инкубируя их с 13-гидроперекисью α -линоленовой кислоты (13-ГПОТ). В отличие от ГПЛ дикого типа, образующей преимущественно C₁₂-альдокислоту (рис. 2, А), (9Z)-12-оксодеценоную кислоту, мутанты MtHPL синтезировали C₁₃- и C₁₁-фрагменты — (9Z,11E)-13-оксо-тридекадиеновую и (9Z)-11-оксоун-деценоную кислоты (рис. 2, Б—Е), что является результатом спонтанного α или β -разрезания и свидетельствует о нарушениях катализа.

У мутантной формы MtHPL F284I сайты, необходимые для формирования типа катализа, описанные ранее [5, 6], соответствуют таковым у ДЭС, поэтому, если верна гипотеза 2, то в качестве продуктов реакции должны были появиться дивиниловые эфиры по аналогии с мутантной формой АОС *Arabidopsis thaliana* F137L [6], у которой данные сайты и продукты реакции соответствуют таковым у ГПЛ. Однако среди продуктов реакции дивиниловых эфиров обнаружено не было, что подтверждает гипотезу 1. У всех мутантов MtHPL наблюдалось появление новых продуктов, однако не вследствие приобретения новой специфической активности.

Полученные нами результаты по сайт-направленному мутагенезу LeAOS3 также частично подтверждают эту гипотезу. Четыре мутации привели к появлению активности ГПЛ, но не ДЭС, как можно было ожидать в случае мутантов F295I и D359R, исходя из сопоставления первичных последовательностей. Видимо, для превращения АОС в ДЭС одной точечной мутации недостаточно. В отличие от этого для превращения АОС в ГПЛ нужна замена в любом каталитически важном сайте.

Мы предполагаем, что гидропероксидлиазная реакция по механизму является базовой, а алленоксидсинтазная и дивинилэфирсинтазная реакции формируются в процессе видоизменения этой базовой реакции из-за дополнительного влияния боковых групп определенных аминокислот. Результатом мутации в любом каталитически важном домене является устранение этого влияния в той или иной степени и, как следствие, возвращение к базовому типу катализа — гидропероксидлиаз.

Авторы выражают благодарность Р. Хьюзу, любезно предоставившему рекомбинантные плазмиды, содержащие ген *mtHPL* дикого типа и его мутантов.

* * *

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 09-04-01023-а и 09-04-12222-офи_м), грантом по программе фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blee E. Phytooxylipins and plant defense reactions // Prog. Lipid Res. 1998. Vol. 37. P. 33—72.
2. Grechkin A.N. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway // Prog. Lipid Res. 1998. Vol. 37. P. 317—352.
3. Grechkin A.N. Hydroperoxide lyase and divinyl ether synthase // Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002. Vol. 68—69. P. 457—470.
4. Stumpe M., Feussner I. Formation of oxylipins by CYP74 enzymes // Phytochem. Rev. 2006. Vol. 5. P. 347—357.
5. Toporkova Y.Y., Gogolev Y.V., Muchtarova L.S., Grechkin A.N. Determinants governing the CYP74 catalysis: conversion of allene oxide synthase into hydroperoxide lyase by site-directed mutagenesis // FEBS Letters. 2008. Vol. 582. P. 3423—3428.
6. Lee D.-S., Nioche P., Hamberg M., Raman C.S. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes // Nature. 2008. Vol. 455. P. 363—370.

Поступила в редакцию
15.04.10

HYPOTHETICAL OF THE CYP74 FAMILY OF CYTOCHROMES P450 DIVERSITY BASED ON RESULTS OF SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

Ya.Yu. Toporkova, L.Sh. Muchtarova, Yu.V. Gogolev, A.N. Grechkin

Bioinformatics analyses and site-directed mutagenesis enabled us to identify determinants of catalysis by CYP74 family enzymes in I-helix central domain and ERR-triad. Substitutions K302S and T366Y in tomato allene oxide synthase LeAOS3 led to hydroperoxide lyase activity appearance. Mutant forms F284I, F287V, G288I, N285A and N285T of alfalfa hydroperoxide lyase MtHPL,

unlike wild-type enzyme produced predominantly C12-aldoacid, synthesized C13- and C11-fragments. The data obtained confirm the evolutionary origin of CYP74 family diversity from a common ancestor with hydroperoxide lyase activity.

Key words: *lipoxygenase signaling cascade, CYP74 family of cytochromes P450, recombinant enzymes, site-directed mutagenesis.*

Сведения об авторах

Топоркова Яна Юрьевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории оксипинов КИББ КазНЦ РАН. Тел. 8(843)231-90-35; e-mail: yanchens@yandex.ru

Мухтарова Люция Шакировна — науч. сотр. лаборатории оксипинов КИББ КазНЦ РАН. Тел. 8(843)231-90-44; e-mail: lucia74@yandex.ru

Гоголев Юрий Викторович — канд. биол. наук, руководитель группы молекулярной биологии КИББ КазНЦ РАН. Тел. 8(843)231-90-35; e-mail: gogolev21@mail.ru

Гречкин Александр Николаевич — акад. РАН, зав. лабораторией оксипинов КИББ КазНЦ РАН. Тел. 8(843)292-75-35; e-mail: grechkin@mail.knc.ru