

## ФЕРМЕНТ СУР74В34 МОРКОВИ (*Daucus carota*) С ДВОЙНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ГИДРОПЕРОКСИДЛИАЗЫ И ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗЫ: ВЫЯВЛЕНИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

© 2024 Я.Ю. Топоркова\*, С.С. Горина, Т.М. Ильина, Н.В. Ланцова, А.Н. Гречкин

ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казанский институт биохимии и биофизики,  
420111 Казань, Россия; электронная почта: kibmail@kibb.knc.ru

Поступила в редакцию 17.06.2024

После доработки 08.07.2024

Принята к публикации 11.07.2024

Липоксигеназный каскад растений является источником окисленных производных жирных кислот – оксипинов, которые играют важную роль в регуляторных процессах, а также при формировании ответных реакций на воздействие стрессовых факторов. Одними из самых распространенных ферментов липоксигеназного каскада являются 13-специфичные гидропероксидлиазы (ГПЛ, синоним «гемиацетальсинтазы») подсемейства СУР74В. В настоящей работе описано обнаружение и клонирование гена *СУР74В34* моркови (*Daucus carota* L.), а также описание биохимических свойств соответствующего рекомбинантного фермента. Фермент СУР74В34 проявляет активность в отношении 9- и 13-гидроперекисей линолевой (9-ГПОД и 13-ГПОД соответственно) и  $\alpha$ -линоленовой (9-ГПОТ и 13-ГПОТ соответственно) кислот. СУР74В34 специфически превращает 9-ГПОТ и 13-ГПОТ в альдокислоты (продукты ГПЛ). Превращение 13-ГПОД приводит к образованию альдокислот (в качестве основных продуктов) и эпокиспиртов (в качестве минорных продуктов). Эпокиспирты являются продуктами активности эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). В то же время в случае превращения 9-ГПОД основными продуктами являются эпокиспирты, а минорными – альдокислоты. Таким образом, фермент СУР74В34 является первым описанным у моркови ферментом с двойной активностью ГПЛ и ЭАС. Присутствие соответствующих каталитических активностей подтверждено результатами анализа профилей оксипинов корней молодых проростков и зрелых растений. Кроме того, в работе описаны результаты замены аминокислотного остатка в одном из каталитически важных сайтов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** липоксигеназный каскад, цитохромы P450, семейство СУР74, гидропероксидлиаза, эпоксиалкогольсинтаза, *Daucus carota*.

DOI: 10.31857/S0320972524080092 EDN: KDMQSB

### ВВЕДЕНИЕ

Оксипины – биоактивные метаболиты, образующиеся при окислении полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), широко распространены во всех организмах: животных, растениях, бактериях, грибах и водорослях [1–6]. Это семейство структурно разнообразных соединений может образовываться в результате как неферментативных, так и ферментативных реакций [7–10]. Биосинтез большинства растительных оксипинов начинается с липоксигеназ (ЛОГ), превращающих линолевую и  $\alpha$ -линоленовую кислоты в соответствующие 9- или 13-гидроперекиси, которые являются субстратами для нескольких типов ферментов,

включая алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС), эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС), пероксигеназы, редуктазы, а также для вторичных превращений, катализируемых ЛОГ [10, 11]. Из этих ферментов четыре (АОС, ГПЛ, ДЭС и ЭАС) образуют отдельное семейство СУР74 цитохромов P450, основанное на сходстве белковых последовательностей и биохимических свойств [2, 12, 13]. Семейство СУР74 растений входит в состав клана СУР74, наряду с СУР74-подобными ферментами протеобактерий [2], бурых водорослей [14], а также некоторых животных [2, 15–18], которые по требованиям номенклатуры (более 40% идентичности аминокислотных последовательностей) нельзя отнести к семейству СУР74. Поэтому было введено понятие клана СУР74 [19], объединяющего ферменты

\* Адресат для корреспонденции.

семейства CYP74, а также представителей других семейств, проявляющих сходство с этими ферментами по структуре, механизмам каталитического действия и результатам филогенетических исследований. Интересно, что в последние годы среди членов клана CYP74 мы обнаружили ферменты, проявляющие несколько активностей, такие как LuDES/HPL с дополнительной эпоксиалкогольсинтазной активностью [20].

Одними из ферментов, обнаруженных у всех изученных к настоящему времени наземных растений, являются гидропероксилиаза, которые относятся к подсемействам CYP74B [21–31], CYP74C [23, 32–37], CYP74L [38, 39], CYP74E [40], CYP74F [41] и CYP74G [42]. При этом было показано, что 13-специфичные ГПЛ подсемейства CYP74B обладают дополнительной активностью ЭАС [31], а 13-специфичная ГПЛ CYP74L1 плаунка *Selaginella moellendorffii* обладает дополнительными активностями ЭАС и АОС [39]. Более того, ферменты подсемейства CYP74C обладают двойной активностью ГПЛ и ЭАС в зависимости от используемого субстрата [37].

В данной работе мы сообщаем о выявлении и клонировании гена *CYP74B34* моркови и биохимической характеристике соответствующего рекомбинантного фермента. До настоящей работы был известен единственный фермент CYP74 моркови – CYP74B33, который был определен как 9-специфичная алленоксидсинтаза с дополнительными активностями ГПЛ и ЭАС [43]. Последовательности CYP74B33 и CYP74B34 являются сходными по каталитически важным доменам; и в работе описано влияние единственного каталитически важного сайта, по которому различаются последовательности этих двух ферментов. Кроме того, в работе описываются профили оксипинов корней молодых и зрелых растений моркови.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** Линолевая и  $\alpha$ -линоленовая кислоты, соевая липоксигеназа V типа, а также метанол для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) были получены от фирмы «Sigma-Aldrich» (США); боргидрид натрия, силилирующие реагенты, N-нитрозотолуол-4-сульфометиламид (диазальд) и изопропанол – от фирмы «Fluka» (Швейцария). (9S,10E,12Z)-9-Гидро-

перокси-10,12-октадекадиеновую (9-ГПОД) и (9S,10E,12Z,15Z)-9-гидроперокси-10,12,15-октадекатриеновую (9-ГПОТ) кислоты получали в результате инкубации соответствующих кислот с рекомбинантной липоксигеназой ZmLOX3 (GeneBank: AAG61118.1) кукурузы (*Zea mays*) [44] в 100 мМ Na-фосфатном буфере (pH 6,0) при 0 °C при постоянном кислородном барботаже. (9Z,11E,13S)-13-Гидроперокси-9,11-октадекадиеновую (13-ГПОД) и (9Z,11E,13S,15Z)-13-гидроперокси-9,11,15-октадекатриеновую (13-ГПОТ) кислоты получали в результате инкубации соответствующих кислот с соевой липоксигеназой V типа в 50 мМ буфере Tris-HCl (pH 9,0) при 23 °C при постоянном кислородном барботаже. Экстрагированные гидроперекиси (в виде свободных карбоксильных кислот) дважды очищали методом ВЭЖХ на нормальной фазе на двух последовательно соединенных колонках Kromasil Si (7 мкм; 4,0 × 250 мм; «Elsico», Россия) в изократическом режиме (скорость потока – 0,4 мл/мин), используя смесь гексана, изопропанола и уксусной кислоты (98,1/1,8/0,1 (v/v)). Гидроперекиси были хроматографически чистыми и как минимум на 98% оптически чистыми, как было определено с помощью хирально-фазовой ВЭЖХ.

**Методы биоинформатики.** Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей представителей семейства CYP74 проводили в базах данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), а их сравнение проводили с помощью программы BLAST. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, анализ нуклеотидных последовательностей, а также конструирование праймеров проводили с помощью программы Vector NTI Advance 11.5 («Invitrogen», США). Для построения филогенетического дерева аминокислотные последовательности выравнивали с использованием программы ClustalW, интегрированной в пакет программ MEGA10 [45]. Молекулярно-филогенетический анализ проведен методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood method) с применением модели коррекции Пуассона [46]. Устойчивость полученного филогенетического дерева оценивали методом бутстрепа, используя 1000 бутстреп-реплик [47].

**Клонирование гена *CYP74B34*.** Корни (100 мг) молодых проростков моркови собирали, замораживали и гомогенизировали, растирая в жидком азоте. Тотальную РНК из корней выделяли

---

Принятые сокращения: АОС – алленоксидсинтаза; ГПЛ – гидропероксилиаза; 9-Г(П)ОД – (9S,10E,12Z)-9-гидро(перо)кси-10,12-октадекадиеновая кислота; 13-Г(П)ОД – (9Z,11E,13S)-13-гидро(перо)кси-9,11-октадекадиеновая кислота; 9-Г(П)ОТ – (9S,10E,12Z,15Z)-9-гидро(перо)кси-10,12,15-октадекатриеновая кислота; 13-Г(П)ОТ – (9Z,11E,13S,15Z)-13-гидро(перо)кси-9,11,15-октадекатриеновая кислота; ГХ-МС – газовая хромато-масс-спектрометрия; ДЭС – дивинилэфирсинтаза; ЭАС – эпоксиалкогольсинтаза; Ме/ТМС – триметилсилилированное производное метилового эфира.

**Таблица 1.** Олигонуклеотидные праймеры, использованные для клонирования гена, кодирующего фермент СУР74В34, и сайт-направленного мутагенеза

Название праймера	Последовательность 5'→3'
СУР74В34ЕкF	gACgACgACAAGATGTCAGCTAGCGATAAAACACC
СУР74В34ЕкR	gAggAgAAgCCCggTGCATGCTTAGCCTTTTCGAG
СУР74В34_P355Af	CTCAACCCGCCCGTTGCTCTCCAGTTCG
СУР74В34_P355Ar	CGAACTGGAGAGCAACGGGCGGGTTGAG
СУР74В33_A367Pf	GGCTCAACCCGCCCGTGCCATTACAATATGCGAG
СУР74В33_A367Pr	CTCGCATATTGTAATGGCACGGGCGGGTTGAGCC

Примечание. Серым цветом выделены последовательности, необходимые для безлигазного клонирования в векторе рЕТ-32 Ек/ЛІС. Полу жирным шрифтом выделены кодоны, измененные сайт-направленным мутагенезом.

с помощью коммерческого набора RNeasy Plant Mini Kit («Qiagen», США), после чего препарат подвергали обработке ДНКазой («Qiagen»). Определение концентрации РНК проводили с помощью флуориметра Qubit («Invitrogen») и коммерческого набора Quant-iT™ RNA HS Assay Kit («Invitrogen»). Для постановки реакции обратной транскрипции и получения двуцепочечной кДНК использовали коммерческий набор MINT («Евроген», Россия). Полученную двуцепочечную кДНК использовали для амплификации открытой рамки считывания гена СУР74В34 моркови с помощью Q5® High-Fidelity 2X Master Mix («NEB», США) и праймеров, перечисленных в табл. 1. Полученную последовательность длиной 1437 п.н., кодирующую белок длиной 479 аминокислотных остатков, клонировали в векторе рЕТ-32 ЕК/ЛІС («Novagen», США) методом безлигазного клонирования.

**Сайт-направленный мутагенез генов СУР74В33 и СУР74В34.** Модификацию первичной структуры рекомбинантных белков проводили, используя метод сайт-направленного мутагенеза, разработанный для генов, клонированных на плазмидных векторах [48, 49]. Для синтеза мутантных плазмид проводили ПЦР с использованием Q5® High-Fidelity 2X Master Mix («NEB») и праймеров, перечисленных в табл. 1. Анализ результатов сайт-направленного мутагенеза проводили с помощью генетического анализатора Нанофор 5 («Синтол», Россия).

**Получение рекомбинантных ферментов дикого типа и мутантных форм.** Для наработки рекомбинантного фермента СУР74В34 использовали вектор рЕТ-32 ЕК/ЛІС системы рЕТ («Novagen»), реципиентом которого служили клетки штамма *Escherichia coli* Rosetta-gami(DE3) pLysS В («Novagen»). Клетки бактериального продуцента засеивали в 2 мл среды LB/M9 (1/1 (v/v)), содержащей 500 мг/литр ампициллина,

12,5 мг/литр тетрациклина, 35 мг/литр канамицина и 35 мг/литр хлорамфеникола. Культуру клеток выращивали в шейкере-инкубаторе в течение 14 ч при 37 °С, после чего суспендировали в 1 литре свежей среды LB/M9 с теми же антибиотиками. Культуру клеток продуцента выращивали при интенсивной аэрации (250 об./мин) и умеренной температуре (32 °С) до поглощения при 600 нм, равного 0,6–0,8. Клеточную суспензию быстро охлаждали до 20 °С на ледяной бане, немедленно добавляли индуктор изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 0,1 мМ и предшественник гема – δ-аминолевулиновую кислоту – из расчета 50 мг/литр. Индуцированные таким образом клетки инкубировали в течение 14 ч при умеренной аэрации (180 об./мин) и пониженной температуре (20 °С), после чего клетки собирали центрифугированием (7500 g, 5 мин, 4 °С).

Клеточные лизаты получали путем механического разрушения с помощью системы French Press Cell Disrupter («Thermo Scientific», США). Очистку рекомбинантного белка проводили металлоаффинной хроматографией на колонках Bio-Scale Mini Profinity IMAC в хроматографической системе BioLogic LP («Bio-Rad», США). Целевой белок элюировали Na-фосфатным буфером (рН 7,0), содержащим 30 мМ гистидина. Нарботку белка, а также степень очистки оценивали по результатам Ds-Na-ПААГ-электрофореза в системе PowerPac Universal MiniProtean («Bio-Rad»). Гели окрашивали Coomassie R250. Концентрацию фермента измеряли по содержанию гема [50].

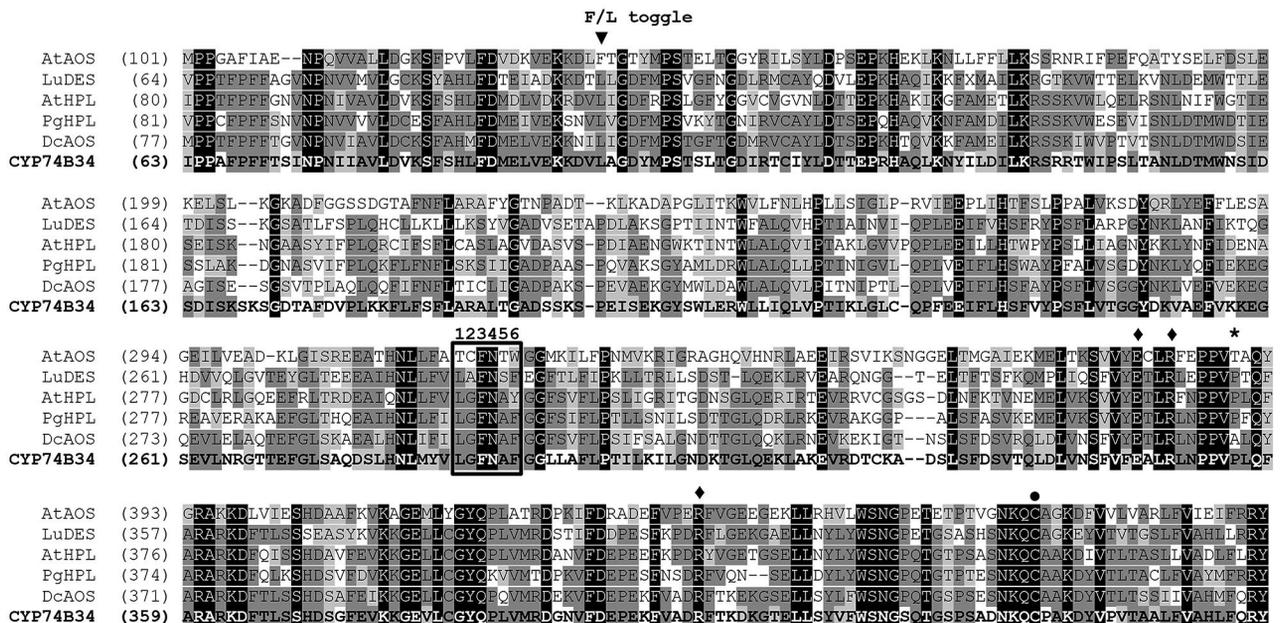
**Кинетические исследования.** Ферментативную активность очищенного рекомбинантного фермента СУР74В34 дикого типа определяли по снижению поглощения при 234 нм. Измерения проводили с использованием спектрофотометра РВ 2201 В («Солар», Беларусь). Концентрация суб-

страта составляла от 5 до 150 мкмоль. Анализ проводили при 25 °С в 100 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,0). Для расчета скорости реакций использовали первоначальные линейные участки кинетических кривых. Коэффициент молярной экстинкции для 9- и 13-гидроперекисей жирных кислот при 234 нм составляет 25 000 М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>. Кинетические параметры рассчитывали с помощью программного обеспечения SigmaPlot 11 («Systat Software Inc.», США). Для каждого варианта было поставлено пять независимых экспериментов; для расчетов использовали усредненные значения.

**Условия проведения и анализ продуктов реакций, катализируемых рекомбинантным ферментом CYP74B34 дикого типа и мутантных форм ферментов CYP74B33 и CYP74B34.** Рекомбинантные ферменты (10 мкг) инкубировали с 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ в течение 15 мин при 4 °С в 10 мл 100 мМ Na-фосфатного буфера (рН 7,0), после чего рН смеси снижали до 6,0 и продукты экстрагировали смесью гексана с этилацетатом (1/1 (v/v)), метилировали диазо-метаном и силилировали смесью пиридин/гексаметилдисилазан/триметилхлорсилана (1/1/1 (v/v)) в течение 30 мин при 23 °С. Затем силилирующие реагенты удаляли в вакууме. Сухой остаток растворяли в 100 мкл гексана и подвергали анализу методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) в виде триметилсилилированных

производных метилового эфира (Me/ТМС) с помощью масс-спектрометра QP2020A, соединенного с газовым хроматографом GC-17A («Shimadzu», Япония). В некоторых случаях продукты восстанавливали NaBH<sub>4</sub>, после чего метилировали и триметилсилилировали. Кроме того, в отдельных случаях перед метилированием и триметилсилилированием продукты восстановления NaBH<sub>4</sub> гидрировали над PtO<sub>2</sub>. Продукты (с/без восстановления NaBH<sub>4</sub>) анализировали в виде метиловых эфиров (Me) либо Me/ТМС методом ГХ-МС, как описано ранее [34].

**Профилирование оксипинов молодых и старых корней растений моркови.** Молодые и старые корни растений моркови (по 3 г) растирали в жидком азоте, после чего добавляли ледяную смесь гексана и этилацетата (1/1 (v/v)). Полученные гомогенаты центрифугировали (8000 g, 20 мин, 4 °С), супернатанты отбирали, растворитель упаривали в вакууме. Полученные экстракты растворяли в смеси хлороформ/изопропанол (2/1 (v/v)) и пропускали через картриджи Supelclean LC-NH<sub>2</sub> (3 мл; «Supelco», США). Свободные карбоновые кислоты элюировали смесью этилацетата и уксусной кислоты (98/2 (v/v)). Восстановление, метилирование и триметилсилилирование продуктов проводили, как описано выше. Продукты (Me/ТМС без или после восстановления NaBH<sub>4</sub>) анализировали методом ГХ-МС, как описано выше.



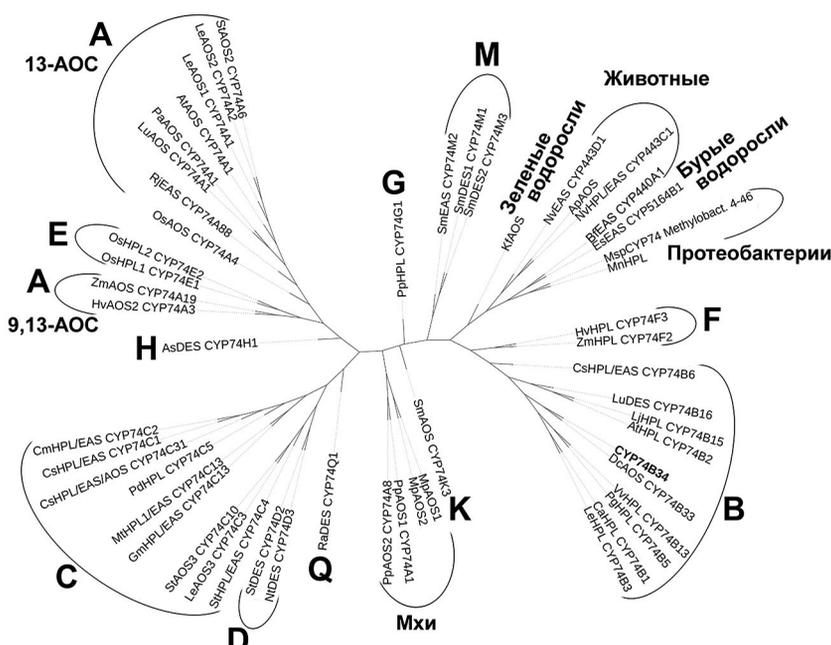
**Рис. 1.** Множественное выравнивание частичных аминокислотных последовательностей фермента CYP74B34 и описанных ранее представителей CYP74: At – *Arabidopsis thaliana*, AtAOS, NP\_199079.1, AtHPL Q9ZSY9.1; Lu – *Linum usitatissimum*, LuDES, ADP03054.2; Pg – *Psidium guajava*, PgHPL, AAK15070.1; Dc – *Daucus carota*, DcAOS WOH02659.1. Стрелкой указан сайт «F/L toggle»; участок перегиба I-спирали обведен рамкой и пронумерован. ERR-триада и цистеин в гем-связывающем домене указаны ♦ и ● соответственно. Сайт внутри PPV-мотива, в котором были произведены замены в последовательностях ферментов CYP74B33 (DcAOS) и CYP74B34, обозначен звездочкой

**Спектральные исследования.** Ультрафиолетовые спектры продуктов сканировали и записывали с помощью спектрофотометра Cary 50 («Varian», США) либо онлайн во время разделения методом ВЭЖХ с помощью диодно-матричного детектора SPD-M20A («Shimadzu»). Продукты инкубаций (с или без предварительного гидрирования и восстановления) анализировали в виде метиловых эфиров (Me) либо Me/ТМС методом ГХ-МС путем полного спектрального сканирования ионов в диапазоне отношений массы к заряду 50–650, как описано ранее [34]. Анализ ГХ-МС проводили с помощью масс-спектрометра QP2020A («Shimadzu»), соединенного с газовым хроматографом GC-17A. Исследуемый образец в режиме деления вводили

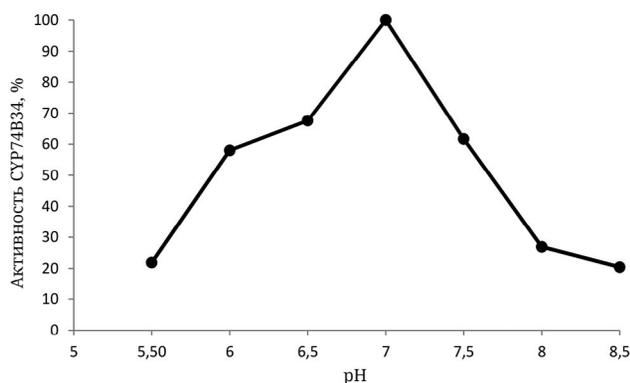
в кварцевую колонку MDN-5S (5% фенил, 95% метилполисилоксана) длиной 30 м, диаметром 0,25 мм и толщиной пленки 0,25 мкм («Supelco», США) при программировании температуры от 120 °С до 240 °С по 10 °С/мин, подавая в систему в качестве газа-носителя гелий с линейной скоростью 30 см/с. Полное сканирование или мониторинг селективных ионов проводили, используя электронную ионизацию (70 эВ) [34].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Биоинформатический и филогенетический анализ последовательности CYP74B34.** Первич-



**Рис. 2.** Неукорененное филогенетическое древо клана CYP74. Подсемейства обведены и обозначены А, В, С и т.д. Представители семейства CYP74 растений: As – *Allium sativum*; AsDES – CYP74H1, GI: 83414021; At – *Arabidopsis thaliana*; AtAOS – CYP74A1, GI: 15239032; AtHPL – CYP74B2, GI: 3822403; Ca – *Capsicum annuum*; CaHPL – CYP74B1, GI: 1272340; Cm – *Cucumis melo*; CmHPL/EAS – CYP74C2, GI: 14134199; Csa – *Cucumis sativus*; CsaHPL/EAS – CYP74C1\_CS, GI: 101211324; CsaHPL/EAS/AOS – CYP74C31, GI: 101211574; CsaHPL – CYP74B6, GI: 101223126; DcAOS – *Daucus carota*; CYP74B33 – GI: 108219710; Hv – *Hordeum vulgare*; HvAOS2 – CYP74A3, SI: AJ251304.1; HvHPL – CYP74F3, CAC82980.1; Gm – *Glycine max*; GmHPL/EAS – CYP74C13\_GM, XP\_028186824.1; Kf – *Klebsormidium flaccidum* (green alga); KfAOS – SI: LC032459.1; Le – *Solanum lycopersicum*; LeAOS1 – CYP74A1, GI: 7581989; LeAOS2 – CYP74A2, GI: 7677376; LeAOS3 – CYP74C3, GI: 25991603; LeHPL – CYP74B3, GI: 7677378; Lj – *Lotus japonicus*; LjHPL – CYP74B15, SI: AB600748.1; Lu – *Linum usitatissimum*; LuAOS – CYP74A1, GI: 1352186; LuDES – CYP74B16, GI: 379048766; Mp – *Marschandia polymorpha*; MpAOS1 – SI: LC032457.1, MpAOS2 – SI: LC032458.1; MthPL/EAS – CYP74C13\_MT, GI: 33504430; Nt – *Nicotiana tabacum*; NtDES – CYP74D3, GI: 107799697; Os – *Oryza sativa*; OsAOS – CYP74A4, GI: 115455571; OsHPL1 – CYP74E2, GI: 115445057; OsHPL2 – CYP74E1, GI: 125538638; Pa – *Parthenium argentatum*; PaAOS – CYP74A1, GI: 218511958; Pd – *Prunus dulcis*; PdHPL – CYP74C5, GI: 33300600; Pg – *Psidium guajava*; PgHPL – CYP74B5, GI: 13183137; Pp – *Physcomitrella patens*; PpAOS1 – CYP74A1, GI: 22217985; PpAOS2 – CYP74A8, GI: 168014176; PpHPL – CYP74G1, GI: 76057841; Ra – *Ranunculus acris*; RaDES – CYP74Q1, GI: 768564485; Rj – *Ranunculus japonicus*; RjEAS – CYP74A88, SI: MK061531; Sm – *Selaginella moellendorffii*; SmDES1 – CYP74M1, GI: 9660714; SmEAS – CYP74M2, GI: 9637471; SmDES2 – CYP74M3, GI: 9654395; SmaOS – CYP74K3, SI: EFJ20163.1; St – *Solanum tuberosum*; StAOS2 – CYP74A6, GI: 86769479; StAOS3 – CYP74C10, GI: 56605358; StHPL/EAS – CYP74C4, GI: 102588560; StDES – CYP74D2, GI: 12667099; Vv – *Vitis vinifera*; VvHPL – CYP74B13, FJ861082; Zm – *Zea mays*; ZmAOS – CYP74A19, GI: 223947589; ZmHPL – CYP74F2, GI: 162462890. Представители других семейств клана CYP74: Es – *Ectocarpus siliculosus* (brown alga); EsEAS – CYP5164B1, GI: 1109557544; Mn – *Methylobacterium nodulans* (proteobacteria); MnHPL – SI: WP\_015932840.1; Msp – *Methylobacterium* sp. 4–46; MspCYP74 – SI: WP\_012335549.1. Ap – *Acropora palmata* (Metazoa); ApAOS – GI: 187948710; Bf – *Branchiostoma floridae* (Metazoa); BfEAS – CYP440A1, GI: 189312561; Nv – *Nematostella vectensis* (Metazoa); NvEAS – CYP443D1, GI: 5516222; NvHPL/EAS – CYP443C1



**Рис. 3.** Зависимость уровня каталитической активности фермента СУР74В34 от значения pH реакционной смеси

ная структура фермента СУР74В34 имеет консервативные мотивы, общие для цитохромов P450 в целом (мотивы ETLR и P(E/D)RF, которые образуют так называемую ERR-триаду, участвующую в стабилизации структуры белка [51]) и ферментов СУР74 в частности, такие как участок перегиба I-спирали, соответствующий кислород-связывающему домену монооксигеназ P450, и сайт «F/L toggle» вблизи N-конца (рис. 1). Участок перегиба I-спирали фермента СУР74В34 имеет последовательность LGFNAF, характерную для 13-специфичных ГПЛ подсемейства СУР74В. В сайте «F/L toggle» фермента СУР74В34 находится остаток лейцина, как у всех описанных ранее гидропероксидлиаз и дивинилэфирсинтаз. У алленоксидсинтаз и эпоксиалкогольсинтаз в данном сайте, как правило, находится остаток фенилаланина. Единственным исключением, известным на данный момент, является алленоксидсинтаза DcAOS (СУР74В33) моркови, у которой в сайте «F/L toggle» находится остаток лейцина. Тем не менее DcAOS входит в состав подсемейства СУР74В. Таким образом, структура каталитически важных доменов указывает на принадлежность фермента СУР74В34 к подсемейству СУР74В. Филогенетический анализ также это подтверждает (рис. 2).

Наибольшим сходством последовательность СУР74В34 обладает с ферментом DcAOS (СУР74В33).

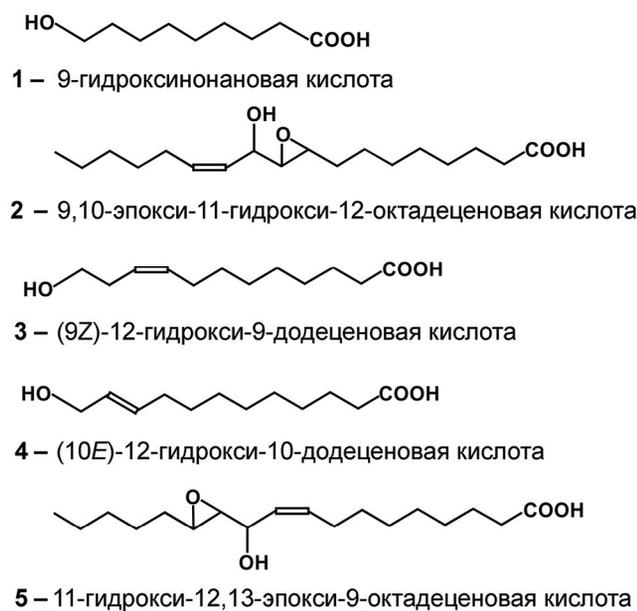
Основные каталитически важные домены у этих двух ферментов имеют идентичные последовательности. И основным отличием в каталитически важных доменах является сайт Pro355 у фермента СУР74В34 (Ala367 – у фермента СУР74В33; рис. 1), расположенный внутри PPV-мотива, который находится в составе ERR-триады.

**Получение рекомбинантного фермента СУР74В34 дикого типа и мутантных форм ферментов СУР74В33 и СУР74В34.** Ген *СУР74В34* локализован в 4-й хромосоме в локусе LOC108217632 (34,138,074; 34,140,278). Ген *СУР74В34* (Gene ID: 108217632) состоит из двух экзонов и одного интрона и имеет длину 2205 п.н. Для получения рекомбинантного белка СУР74В34 ОРС соответствующего гена (1437 п.н.) клонировали в экспрессирующем векторе pET-32 Ek/LIC методом безлигазного клонирования. Для клонирования использовали полную последовательность, поскольку целевой ген не содержит последовательности, транспортирующей в хлоропласты. Целевой белок получали в клетках *E. coli* Rosetta-gami(DE3) pLysS V; очистку проводили металлоаффинной хроматографией (рис. П1 в Приложении). Очищенный фермент использовали для определения каталитических свойств. Полные нуклеотидная и аминокислотная последовательности представлены на рис. П2 в Приложении. Сайт-направленный мутагенез генов *СУР74В33* и *СУР74В34* проводили с помощью ПЦР с использованием праймеров, перечисленных в табл. 1. Получение и очистку мутантных форм СУР74В33\_A367P и СУР74В34\_P355A проводили по тем же методикам, что и фермента СУР74В34 дикого типа.

**Определение кинетических параметров реакций, катализируемых рекомбинантным ферментом СУР74В34.** Для характеристики каталитических свойств рекомбинантного фермента СУР74В34 использовали 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ в качестве субстратов. Оптимальным pH для каталитической активности рекомбинантного фермента СУР74В34 является 7,0 (рис. 3). Поэтому для определения каталитических свойств этого фермента использовали Na-фосфатный буфер (100 мМ; pH 7,0). Фермент СУР74В34

**Таблица 2.** Кинетические параметры реакций, катализируемых ферментом СУР74В34

Субстрат	$k_{cat}$ (с <sup>-1</sup> )	$K_m$ (мкМ)	$k_{cat}/K_m$ (мкМ <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup> )	Субстратная специфичность, % 9(S)-ГПОТ
9-ГПОТ	283 ± 17	42 ± 3,3	6,9	100
9-ГПОД	225 ± 15,6	58 ± 7,3	3,8	55
13-ГПОТ	125 ± 4,5	67 ± 9,1	1,8	26
13-ГПОД	88 ± 6,3	72 ± 5,1	1,2	17



**Рис. 4.** Структурные формулы продуктов каталитического действия фермента СУР74В34 моркови дико-го типа

проявляет слабую активность в отношении 13-гидроперекисей линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот, однако эффективно утилизирует 9-гидроперекиси. Сродство и каталитическая активность рекомбинантного фермента СУР74В34 к (9S)-ГПОТ были значительно выше, чем к другим субстратам, о чем свидетельствуют значения  $K_M$  и  $k_{cat}$  (табл. 2). Наименее предпочтительным субстратом для фермента СУР74В34 является 13-ГПОД.

**Выявление продуктов каталитического действия рекомбинантного фермента СУР74В34.** Для определения продуктов реакций гидроперекиси (100 мкг) инкубировали в течение 15 мин при 25 °С в 10 мл Na-фосфатного буфера (100 мМ; рН 7,0) в присутствии фермента СУР74В34. Продукты инкубаций в виде Ме/ТМС после восстановления с помощью  $NaBH_4$  подвергали анализу методом ГХ-МС. Структурные формулы продуктов реакций представлены на рис. 4.

Предпочтительными субстратами фермента СУР74В34 были (9S)-ГПОТ и (9S)-ГПОД. Результаты анализа ГХ-МС восстановленных  $NaBH_4$  продуктов (Ме/ТМС) инкубации фермента с 9-ГПОТ представлены на рис. 5, а. Был обнаружен единственный относительно летучий продукт **1** (рис. 5, а). Электронный масс-спектр продукта **1** (Ме/ТМС) содержал следующие фрагменты:  $[M-Me]^+$  при  $m/z$  245 (9%);  $[M-MeO]^+$  при  $m/z$  229 (2%);  $[245-MeOH]^+$  при  $m/z$  213 (37%),  $m/z$  138 (4%),  $m/z$  107 (7%);  $[CH_2=O^+-SiMe_3]^+$  при  $m/z$  103 (16%),  $m/z$  89 (19%),  $m/z$  75 (30%);  $[SiMe_3]^+$  при  $m/z$  73 (100%),  $m/z$  69 (37%). Параметры фрагментации полностью соответствовали спектру 9-гидроксинонановой кислоты

(Ме/ТМС) [52]. Кроме того, когда продукты (Ме/ТМС) инкубации фермента СУР74В34 с 9-ГПОТ анализировали методом ГХ-МС без предварительного восстановления  $NaBH_4$ , был обнаружен продукт, масс-спектр электронного удара которого (Ме) содержал  $[M^+-H]$  при  $m/z$  185 (5%);  $[M-CO]^+$  при  $m/z$  158 (1,5%);  $[M-OMe]^+$  при  $m/z$  155 (2%);  $[M-C_8/C_9]^+$  при  $m/z$  143 (22%),  $m/z$  87 (66%), а также ион перегруппировки Маклафферти метилового эфира при  $m/z$  74 (100%). Спектр соответствовал таковому 9-оксононановой кислоты (Ме) [52]. Таким образом, данные ГХ-МС подтверждают структуру 9-оксононановой кислоты для продукта ферментативного превращения 9-ГПОТ.

После инкубации СУР74В34 с 9-ГПОД соединение **1** образовывалось лишь в следовом количестве, о чем свидетельствуют данные ГХ-МС-анализа продуктов. Основными продуктами превращения 9-ГПОД были значительно более полярные продукты, из которых основным был пик **2** и два минорных пика, элюируемых непосредственно после пика **2** (рис. 5, б). Масс-спектр электронного удара продукта **2** (Ме/ТМС) содержал  $M^+$  при  $m/z$  398 (1%);  $[M-Me]^+$  при  $m/z$  383 (2%);  $[M-C_1/C_8]^+$  при  $m/z$  241 (4%);  $[M-C_1/C_9]^+$  при  $m/z$  212 (7%);  $[M-C_1/C_{10}]^+$  при  $m/z$  199 (85%) и  $[SiMe_3]^+$  при  $m/z$  73 (100%). Интенсивный пик при  $m/z$  199 в спектре свидетельствовал о присутствии оксиранилкарбинольной группы, включая оксиран при C9/C10 и смежную с ним окси-ТМС группу (C11) [14]. Каталитическое гидрирование соединения **2** над  $PtO_2$  с последующими метилированием и триметилсилилированием приводили к образованию продукта, масс-спектр которого содержал следующие основные фрагменты:  $[M-Me]^+$  при  $m/z$  385 (3%);  $[M-MeO]^+$  при  $m/z$  369 (1%);  $[M-Me-MeOH]^+$  при  $m/z$  353 (1%);  $[M-n-гептил]^+$  при  $m/z$  301 (12%);  $[M-C_{11}/C_{18} + TMS-Me]^+$  при  $m/z$  257 (18%);  $[M-C_1/C_9-H]^+$  при  $m/z$  215 (22%);  $[M-C_1/C_{10}]^+$  при  $m/z$  201 (61%);  $[SiMe_3]^+$  при  $m/z$  73 (100%) и соответствовал таковому 9,10-эпокси-11-гидроксиоктадекановой кислоты (Ме/ТМС) [14]. Таким образом, данные масс-спектрометрии подтвердили, что соединение **2** является 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислотой. Минорные пики, элюируемые непосредственно после пика **2** (рис. 5, б), имели идентичные масс-спектры, таким образом, являясь стереоизомерами соединения **2**, предположительно, различающимися стереоконфигурацией при C11 или C12.

Каталитическая активность фермента СУР74В34 по отношению к 13-гидроперекисям линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот была значительно ниже, о чем свидетельствуют данные кинетических параметров (табл. 2). Большие пики 13-ГОД и 13-ГОТ на хроматограммах (рис. 5, в и г) восстановленных  $NaBH_4$  продуктов (Ме/ТМС) свидетельствуют

о значительных остатках гидроперекисей после инкубации с ферментом.

Анализ продуктов инкубации фермента СУР74В34 с 13-ГПОТ методом ГХ-МС выявил два основных относительно летучих продукта **3** и **4** (Me/TMC производные  $\text{NaBH}_4$ -восстановленных продуктов; рис. 5, в). Масс-спектр продукта **3** содержал следующие характерные фрагменты:  $\text{M}^+$  при  $m/z$  300 (0,04%);  $[\text{M}-\text{Me}]^+$  при  $m/z$  285 (1%);  $[\text{285}-\text{MeOH}]^+$  при  $m/z$  253 (5%);  $[\text{M}-\text{TMCОН}]^+$  при  $m/z$  210 (3%);  $[\text{210}-\text{MeOH}]^+$  при  $m/z$  178 (12%),  $m/z$  159 (10%),  $m/z$  123 (12%);  $[\text{CH}_2=\text{O}^+-\text{SiMe}_3]$  при  $m/z$  103 (100%) и  $[\text{SiMe}_3]^+$  при  $m/z$  73 (93%). Спектр соответствовал таковому (9Z)-12-гидрокси-9-додеценной кислоты (Me/TMC), которая образуется в результате восстановления с помощью  $\text{NaBH}_4$  альдокислоты (9Z)-12-оксо-9-додеценной кислоты, продукта реакции 13-ГПЛ [52]. Каталитическое гидрирование продукта **3** с последующими метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию соединения, идентифицированного по его масс-фрагментации:  $\text{M}^+$  при  $m/z$  302 (0,3%);  $[\text{M}-\text{Me}]^+$  при  $m/z$  287 (43%);  $[\text{285}-\text{MeOH}]^+$  при  $m/z$  255 (100%),  $m/z$  159 (9%),  $m/z$  107 (28%),  $m/z$  89 (30%);  $[\text{Me}_2\text{Si}^+-\text{OH}]$  при  $m/z$  75 (88%) и  $[\text{SiMe}_3]^+$  при  $m/z$  73 (84%), как 12-гидроксидодекановая кислота (Me/TMC) [52].

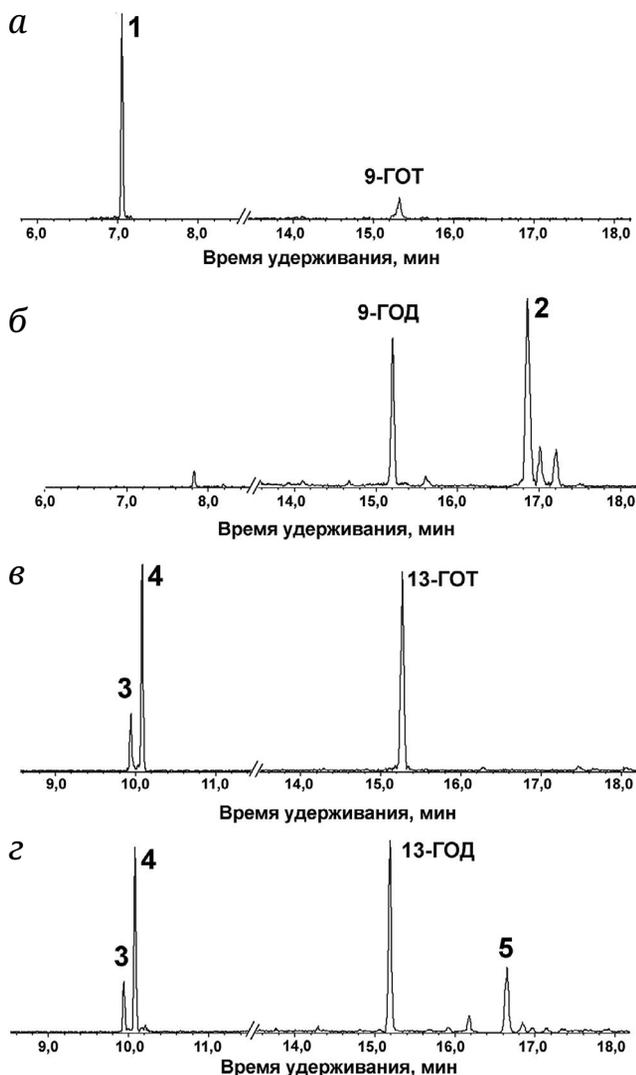
Масс-спектр продукта **4** (элюируемого непосредственно после пика **3**) содержал  $[\text{M}]^+$  при  $m/z$  300 (0,5%);  $[\text{M}-\text{Me}]^+$  при  $m/z$  285 (0,7%);  $[\text{285}-\text{MeOH}]^+$  при  $m/z$  253 (4%);  $[\text{M}-\text{TMCОН}-\text{MeOH}]^+$  при  $m/z$  178 (0,6%),  $m/z$  159 (5%),  $m/z$  143 (2%),  $m/z$  129 (19%);  $[\text{Me}_2\text{Si}^+-\text{OH}]$  при  $m/z$  75 (17%) и  $[\text{SiMe}_3]^+$  при  $m/z$  73 (86%). Спектр соответствовал таковому (10E)-12-гидрокси-10-додеценной кислоты (Me/TMC), образующейся в результате восстановления с помощью  $\text{NaBH}_4$  травматина, (10E)-12-оксо-10-додеценной кислоты – продукта спонтанной аллильной изомеризации альдокислоты (9Z)-12-оксо-9-додеценной кислоты. Таким образом, соединение **4** также является продуктом 13-ГПЛ. Каталитическое гидрирование продукта **4** с последующими метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию 12-гидроксидодекановой кислоты (Me/TMC), описанной выше.

В результате ГХ-МС-анализа продуктов (Me/TMC-производных, восстановленных с помощью  $\text{NaBH}_4$  продуктов) инкубации фермента СУР74В34 с 13-ГПОД выявили те же основные продукты **3** и **4** (рис. 5, г). Дополнительным продуктом этой реакции являлись соединения **5** и несколько минорных пиков, элюируемых непосредственно после соединения **5**. Масс-спектр продукта **5** содержал  $\text{M}^+$  при  $m/z$  398 (0,1%);  $[\text{M}-\text{Me}]^+$  при  $m/z$  383 (0,7%);  $[\text{M}-\text{n-пентил}]^+$  при  $m/z$  327 (2%);  $[\text{M}-\text{Me}(\text{CH}_2)_4\text{CHO}]^+$  при  $m/z$  298 (3%);  $[\text{M}-\text{C12/C18}]^+$  при  $m/z$  285 (69%),  $m/z$  129 (40%) и  $[\text{SiMe}_3]^+$  при  $m/z$  73 (100%). Спектр

соответствовал таковому 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценной кислоты (Me/TMC) [14]. Гидрирование соединения **5** над  $\text{PtO}_2$  с последующими метилированием и триметилсилилированием приводило к образованию соединения, идентифицированного как 11-гидрокси-12,13-эпоксиоктадекановая кислота (Me/TMC) по следующему масс-спектру:  $[\text{M}-\text{Me}]^+$  при  $m/z$  385 (7%);  $[\text{385}-\text{MeOH}]^+$  при  $m/z$  353 (2%);  $[\text{M}-\text{Me}(\text{CH}_2)_4\text{CHO} + \text{H}]^+$  при  $m/z$  301 (7%);  $[\text{M}-\text{C12/C18}]^+$  при  $m/z$  287 (42%),  $m/z$  271 (13%);  $[\text{M}-(\text{CH}_2)_9\text{COOMe}]^+$  при  $m/z$  215 (7%),  $m/z$  129 (20%),  $m/z$  95 (26%),  $m/z$  81 (35%),  $m/z$  75 (50%);  $[\text{Me}_2\text{Si}^+-\text{OH}]$  при  $m/z$  75 (53%) и  $[\text{SiMe}_3]^+$  при  $m/z$  73 (100%). Таким образом, полученные данные подтвердили структуру соединения **5** как 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценной кислоты (Me/TMC) [14]. Минорные пики, элюируемые непосредственно после пика **5** (рис. 5, г), имели идентичные масс-спектры, таким образом, являясь стереоизомерами соединения **5**, по-видимому, различающимися стереоконфигурацией при C11 или C12.

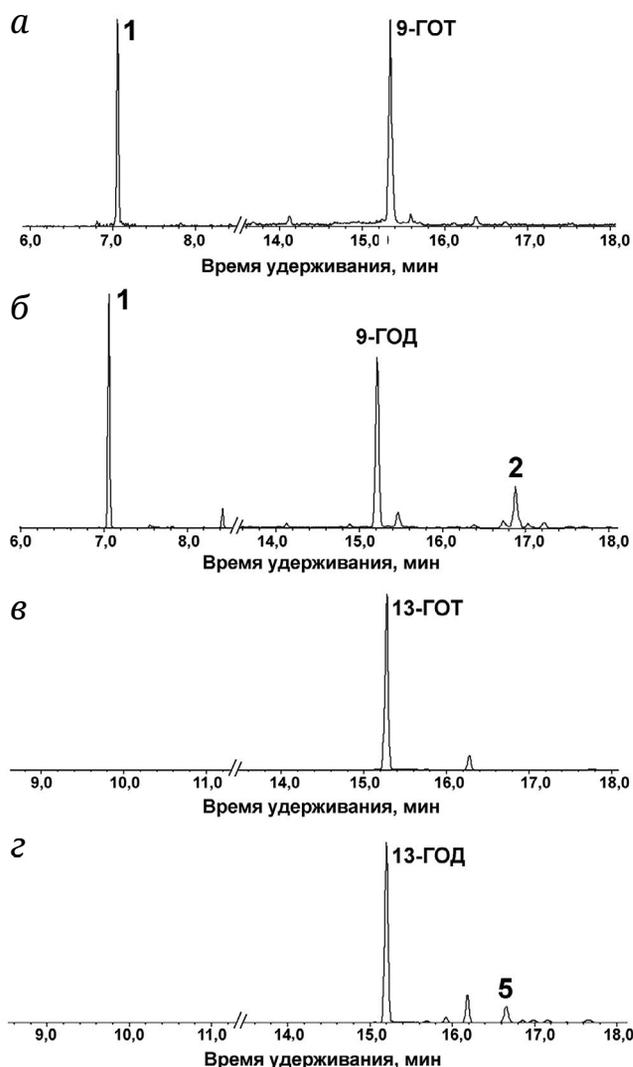
**Выявление продуктов каталитического действия мутантных форм ферментов СУР74В33 и СУР74В34.** Для выявления изменений в катализе мутантных форм СУР74В33\_А367Р и СУР74В34\_Р355А по сравнению с соответствующими ферментами дикого типа проводили инкубации с 9-ГПОД, 9-ГПОТ, 13-ГПОД и 13-ГПОТ. Анализ хроматограмм продуктов инкубации показал, что замена А367Р, внесенная в последовательность фермента СУР74В33, являющегося 9-специфичной АОС, привела к практически полной потере способности катализировать превращения субстратов (рис. ПЗ в Приложении). Эта мутантная форма полностью потеряла способность превращать предпочтительные субстраты – 9-ГПОД и 9-ГПОТ. Слабая активность наблюдалась в отношении 13-ГПОД и 13-ГПОТ. Единственными обнаруженными продуктами, присутствующими в минорном количестве при инкубации с 13-гидроперекисями, были соединения **3** и **4** – (9Z)-12-гидрокси-9-додеценная и (10E)-12-гидрокси-10-додеценная кислоты соответственно (рис. ПЗ в Приложении). Присутствие данных продуктов свидетельствует о сохранении у мутантной формы СУР74В33\_А367Р небольшой 13-ГПЛ активности при полной потере активностей АОС и ЭАС.

Замена Р355А в ферменте СУР74В34 также повлияла на катализ. Мутантная форма СУР74В34\_Р355А сохранила способность катализировать превращение 9-гидроперекисей жирных кислот (рис. 6), тогда как способность утилизировать 13-гидроперекиси, по сравнению с дикой формой, была утеряна полностью. Единственным минорным продуктом превращения 13-ГПОД при участии этой мутантной формы был эпокси спирт –



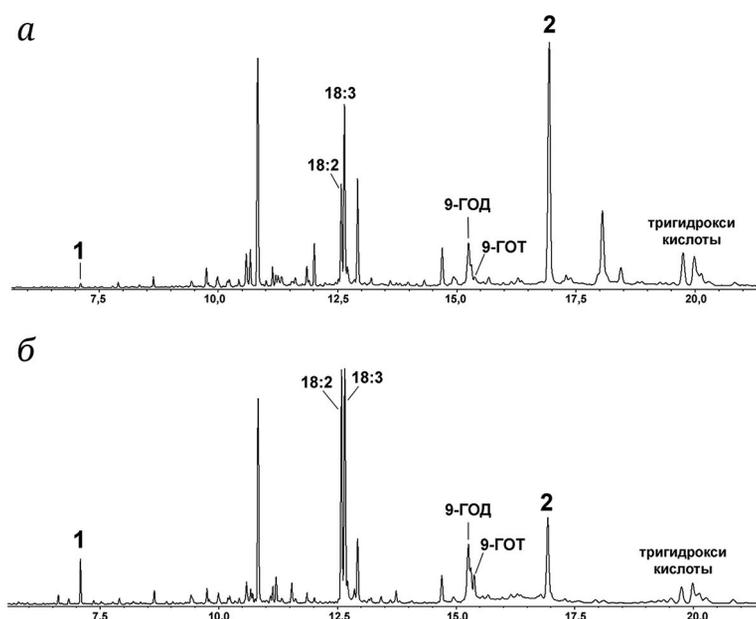
**Рис. 5.** Хроматограммы полного ионного тока продуктов (Me/TMS после восстановления с помощью  $\text{NaBH}_4$ ) превращения 9-ГПОТ (а), 9-ГПОД (б), 13-ГПОД (в) и 13-ГПОТ (г) при участии рекомбинантного фермента СУР74В34 дикого типа. 9-ГОД – (9S,10E,12Z)-9-гидрокси-10,12-октадекадиеновая кислота; 9-ГОТ – (9S,10E,12Z,15Z)-9-гидрокси-10,12,15-октадекатриеновая кислота; 13-ГОД – (9Z,11E,13S)-13-гидрокси-9,11-октадекадиеновая кислота; 13-ГОТ – (9Z,11E,13S,15Z)-13-гидрокси-9,11,15-октадекатриеновая кислота

9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценивая кислота. В то же время мутантная форма СУР74В34\_P355A катализировала превращение 9-ГПОД с образованием соединения **1** – 9-гидроксинонановой кислоты (9-ГПЛ-продукт) в качестве основного продукта. Минорным продуктом в той же реакции было соединение **2** – эпокиспирт 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценивая кислота (Me/TMS). Единственным продуктом превращения 9-ГПОТ при участии этой мутантной формы, так же как при участии фермента дикого типа, была 9-гидроксинонановая кислота.



**Рис. 6.** Хроматограммы полного ионного тока продуктов (Me/TMS после восстановления с помощью  $\text{NaBH}_4$ ) превращения 9-ГПОД (а), 9-ГПОТ (б), 13-ГПОД (в) и 13-ГПОТ (г) при участии мутантной формы СУР74В34\_P355A. 9-ГОД – (9S,10E,12Z)-9-гидрокси-10,12-октадекадиеновая кислота; 9-ГОТ – (9S,10E,12Z,15Z)-9-гидрокси-10,12,15-октадекатриеновая кислота; 13-ГОД – (9Z,11E,13S)-13-гидрокси-9,11-октадекадиеновая кислота; 13-ГОТ – (9Z,11E,13S,15Z)-13-гидрокси-9,11,15-октадекатриеновая кислота

**Профилирование оксипинов корней молодых и старых растений моркови.** Поскольку 9-липоксигеназный каскад характерен, как правило, для подземных органов, для проверки присутствия продуктов каталитического действия фермента СУР74В34 выбрали корни растений моркови – молодых и старых. Предпочтительными субстратами фермента СУР74В34 являются 9-гидроперекиси линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот, поэтому активность этого фермента в растении оценивали после инкубации гомогенатов корней с линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислотами.



**Рис. 7.** Хроматограммы полного ионного тока продуктов (Me/TМС после восстановления с помощью  $\text{NaBH}_4$ ) инкубации гомогенатов молодых (а) и старых (б) корней растений моркови с линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислотами. 1 – 9-гидроксинонановая кислота; 2 – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценная кислота; 9-ГОД – (9S,10E,12Z)-9-гидрокси-10,12-октадекадиеновая кислота; 9-ГОТ – (9S,10E,12Z,15Z)-9-гидрокси-10,12,15-октадекариеновая кислота; 18:2 – линолевая кислота; 18:3 –  $\alpha$ -линоленовая кислота

Результаты согласуются с данными, полученными для рекомбинантного фермента СУР74В34. В обоих случаях на хроматограммах выявили как 9-гидроксинонановую кислоту (соединение 1, продукт превращения 9-ГПОТ при участии фермента СУР74В34), так и 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценную кислоту (соединение 2, основной продукт превращения 9-ГПОД при участии фермента СУР74В34) (рис. 7). При этом в старых корнях наблюдается снижение количества 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценной кислоты и увеличение количества 9-гидроксинонановой кислоты по сравнению с молодыми корнями.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В геноме моркови выявлено два гена, кодирующие ферменты СУР74 – GI: 108219710 и Gene ID: 1082176320. Первый фермент – DcAOS (СУР74В33) – был описан ранее как первая 9-специфичная АОС с дополнительными активностями ГПЛ и ЭАС, принадлежащая к подсемейству СУР74В [43]. До настоящей работы считалось, что подсемейство СУР74В включает в основном 13-специфичные гидропероксилиазы с двумя исключениями: DcAOS и фермент LuDES/HPL льна-долгунца с двойной активностью ДЭС и ГПЛ с дополнительной активностью ЭАС [20]. Выявленный в настоящей работе фермент стал третьим исключением подсемейства СУР74В. Предпочти-

тельными субстратами для этого фермента, так же как для DcAOS, являются не 13-, а 9-гидроперекиси линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислоты, то есть фермент СУР74В34 является не 13-, а 9-специфичным. Более того, в зависимости от используемой 9-гидроперекиси – 9-ГПОТ или 9-ГПОД – фермент СУР74В34 проявляет активность либо ГПЛ, либо ЭАС соответственно. В случае превращения неpreferred субстратов – 13-ГПОД и 13-ГПОТ – фермент также проявляет активности ГПЛ и ЭАС. Таким образом, ферменту присвоено тривиальное название DcHPL/EAS (ГПЛ *Daucus carota*), тогда как гену – *DcHPL/EAS*.

Присутствие каталитической активности DcHPL/EAS в растениях моркови доказано в результате экспериментов по инкубации гомогенатов корней растений моркови с линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислотами. В профилях оксипинов обнаружены 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценная (эпоксиспирт, продукт превращения 9-ГПОД при участии DcHPL/EAS) и 9-гидроксинонановая (альдокислота, продукт превращения 9-ГПОТ при участии DcHPL/EAS) кислоты. При этом в старых корнях, по сравнению с молодыми, наблюдается уменьшение содержания 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценной кислоты (эпоксиспирт, продукт ЭАС) и увеличение содержания 9-оксононановой кислоты (альдокислоты, продукта ГПЛ). Поскольку эпоксиспирт и альдокислота являются продуктами превращения 9-ГПОД и 9-ГПОТ соответственно, очевидно, что изменение соотноше-

ния конечных продуктов связано с изменением соотношения 9-ГПОД и 9-ГПОТ, что, по-видимому, связано с изменением содержания определенных липаз или липоксигеназ, ответственных за биосинтез этих гидроперекисей.

Ранее было описано присутствие дополнительной активности ЭАС у 13-специфичных ГПЛ подсемейства CYP74B [31], однако ферменты с двойной активностью ГПЛ и ЭАС были описаны до сих пор только в подсемействе CYP74C [37]. До настоящей работы в подсемействе CYP74B был описан только один фермент с двойной активностью – LuDES/HPL [20].

Результаты биоинформатических исследований свидетельствуют, что, несмотря на разную каталитическую активность, наибольшим сходством DcHPL/EAS (CYP74B34) обладает с DcAOS (CYP74B33). Основные каталитически важные домены у этих двух ферментов являются практически идентичными, и основным отличием является сайт Ala367 у фермента DcAOS и Pro355 – у фермента DcHPL/EAS, отмеченный на рис. 1. В структуре белка, как правило, остаток пролина нарушает  $\alpha$ -спираль, поворачивая следующую за остатком пролина часть спирали на 90 градусов. По-видимому, вследствие этого замена остатка аланина на остаток пролина привела к практически полной потере каталитической активности у DcAOS. При этом обратная замена в последовательности DcHPL/EAS привела к обратному эффекту. Мутантная форма DcHPL/EAS P355A является более специфичной 9-ГПЛ, чем фермент дикого типа. Мутантная форма, в отличие от фермента дикого типа, не проявляет активности в отношении 13-гидроперекисей. Более того, мутантная форма превращает 9-ГПОД в основном в альдокислоту (продукт ГПЛ),

тогда как в случае фермента дикого типа основным продуктом превращения 9-ГПОД являются эпокиспирты.

Активности ГПЛ и ЭАС приводят к образованию разных продуктов, участвующих в защите растений – продуцируются заживляющие соединения, сигнализирующие об опасности и непосредственно защитные – антимикробные и фунгицидные. При этом наличие двух активностей у одного фермента (как правило, ГПЛ и ЭАС) позволяет растению применять одновременно более широкий спектр соединений, участвующих в защите от изменений окружающей среды.

**Вклад авторов.** Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин – концепция и руководство работой; С.С. Горина, Т.М. Ильина, Н.В. Ланцова – проведение экспериментов; С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин – обсуждение результатов исследования; Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин – написание текста.

**Финансирование.** Эксперименты по получению рекомбинантного фермента CYP74B34 дикого типа и мутантных форм ферментов CYP74B33 и CYP74B34 и изучению их каталитических свойств проводили при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00350). Эксперименты по изучению профилей оксипинов растений моркови проводили при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра «КазНЦ РАН».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grechkin, A. N. (1998) Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway, *Prog. Lipid Res.*, **37**, 317-352, [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(98\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(98)00014-9).
2. Lee, D.-S., Nioche, P., Hamberg, M., and Raman, C. S. (2008) Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes, *Nature*, **455**, 363-368, <https://doi.org/10.1038/nature07307>.
3. Brodhun, F., and Feussner, I. (2011) Oxylipins in fungi, *FEBS J.*, **278**, 1047-1063, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08027.x>.
4. Barbosa, M., Valentão, P., and Andrade, P. B. (2016) Biologically active oxylipins from enzymatic and nonenzymatic routes in macroalgae, *Mar. Drugs*, **14**, 23, <https://doi.org/10.3390/md14010023>.
5. Jiang, Z.-D., and Gerwick, W. H. (1997) Novel oxylipins from the temperate red alga *Polyneura latissima*: evidence for an arachidonate 9(S)-lipoxygenase, *Lipids*, **32**, 231-235, <https://doi.org/10.1007/s11745-997-0029-9>.
6. Calder, P. C. (2020) Eicosanoids, *Essays Biochem.*, **64**, 423-441, <https://doi.org/10.1042/EBC20190083>.
7. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, USA, <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.
8. Göbel, C., and Feussner, I. (2009) Methods for the analysis of oxylipins in plants, *Phytochemistry*, **70**, 1485-1503, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.040>.
9. Kuhn, H., Banthiya, S., and Van Leyen, K. (2015) Mammalian lipoxygenases and their biological relevance, *Biochim. Biophys. Acta*, **1851**, 308-330, <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.10.002>.

10. Toporkova, Y. Y., Smirnova, E. O., and Gorina, S. S. (2024) Epoxyalcohol synthase branch of lipoxygenase cascade, *Curr. Issues Mol. Biol.*, **46**, 821-841, <https://doi.org/10.3390/cimb46010053>.
11. Feussner, I., and Wasternack, C. (2002) The lipoxygenase pathway, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**, 275-297, <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248>.
12. Nelson, D. R., Goldstone, J. V., and Stegeman, J. J. (2013) The cytochrome P450 genesis locus: the origin and evolution of animal cytochrome P450s, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **368**, 20120474, <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0474>.
13. Savchenko, T. V., Zastrijnaja, O. M., and Klimov, V. V. (2014) Oxylipins and plant abiotic stress resistance, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 362-375, <https://doi.org/10.1134/S0006297914040051>.
14. Toporkova, Y. Y., Fatykhova, V. S., Gogolev, Y. V., Khairutdinov, B. I., Mukhtarova, L. S., and Grechkin, A. N. (2017) Epoxyalcohol synthase of *Ectocarpus siliculosus*. First CYP74-related enzyme of oxylipin biosynthesis in brown algae, *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 1419-1428, <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.11.007>.
15. Toporkova, Y. Y., Gorina, S. S., Mukhitova, F. K., Hamberg, M., Ilyina, T. M., Mukhtarova, L. S., and Grechkin, A. N. (2017) Identification of CYP443D1 (CYP74 clan) of *Nematostella vectensis* as a first cnidarian epoxyalcohol synthase and insights into its catalytic mechanism, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**(10 Pt A), 1099-1109, <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2017.07.015>.
16. Горина С. С., Топоркова Я. Ю., Мухтарова Л. Ш., Гречкин А. Н. (2019) Цитохром CYP443C1 (клан CYP74) актинии *Nematostella vectensis* – первый фермент Metazoa, проявляющий двойную активность гидропероксидазы и эпоксиалкогольсинтазы, *Доклады Академии наук*, **486**, 384-388, <https://doi.org/10.31857/S0869-56524863384-388>.
17. Toporkova, Y. Y., Smirnova, E. O., Lantsova, N. V., Mukhtarova, L. S., and Grechkin, A. N. (2021) Detection of the first epoxyalcohol synthase/allene oxide synthase (CYP74 clan) in the lancelet (*Branchiostoma belcheri*, Chordata), *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 4737, <https://doi.org/10.3390/ijms22094737>.
18. Smirnova, E. O., Lantsova, N. V., Hamberg, M., Toporkova, Y. Y., and Grechkin, A. N. (2024) The versatile CYP74 clan enzyme CYP440A19 from the European lancelet *Branchiostoma lanceolatum* biosynthesizes novel macrolactone, epoxydiene, and related oxylipins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1869**, 159507, <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2024.159507>.
19. Hansen, C. C., Nelson, D. R., Moller, B. L., Werck-Reichhart, D. (2021) Plant cytochrome P450 plasticity and evolution, *Mol. Plant.*, **14**, 1244-1265, <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.06.028>.
20. Toporkova, Y. Y., Smirnova, E. O., Iljina, T. M., Mukhtarova, L. S., Gorina, S. S., and Grechkin, A. N. (2020) 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*, **179**, 112512, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112512>.
21. Ono, E., Handa, T., Koeduka, T., Toyonaga, H., Tawfik, M. M., Shiraishi, A., Murata, J., and Matsui, K. (2016) CYP74B24 is the 13-hydroperoxide lyase involved in biosynthesis of green leaf volatiles in tea (*Camellia sinensis*), *Plant Physiol. Biochem.*, **98**, 112-118, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.11.016>.
22. Matsui, K., Shibutani, M., Hase, T., and Kajiwara, T. (1996) Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B), *FEBS Lett.*, **394**, 21-24, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00924-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00924-6).
23. Matsui, K., Ujita, C., Fujimoto, S.H., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., Kajiwara, T., and Feussner, I. (2000) Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyases from cucumber, *FEBS Lett.*, **481**, 183-188, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01997-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01997-9).
24. Matsui, K., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., and Kajiwara, T. (1999) Molecular cloning and expression of *Arabidopsis* fatty acid hydroperoxide lyase, *Plant Cell Physiol.*, **40**, 477-481, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029567>.
25. Matsui, K., Miyahara, C., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., and Kajiwara, T. (2000) Fatty acid hydroperoxide lyase in tomato fruits: cloning and properties of a recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1189-1196, <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1189>.
26. Kandzia, R., Stumpe, M., Berndt, E., Szalata, M., Matsui, K., and Feussner, I. (2003) On the specificity of lipid hydroperoxide fragmentation by fatty acid hydroperoxide lyase from *Arabidopsis thaliana*, *J. Plant Physiol.*, **160**, 803-809, <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01026>.
27. Noordermeer, M. A., van Dijken, A. J., Smeekens, S. C., Veldink, G. A., and Vliegthart, J. F. (2000) Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2473-2482, <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01283.x>.
28. Howe, G. A., Lee, G. I., Itoh, A., Li, L., and DeRocher, A. E. (2000) Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, *Plant Physiol.*, **123**, 711-724, <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.711>.

29. Tijet, N., Waspi, U., Gaskin, D. J., Hunziker, P., Muller, B. L., Vulfson, E. N., Slusarenko, A., Brash, A. R., and Whitehead, I. M. (2000) Purification, molecular cloning, and expression of the gene encoding fatty acid 13-hydroperoxide lyase from guava fruit (*Psidium guajava*), *Lipids*, **35**, 709-720, <https://doi.org/10.1007/s11745-000-0577-z>.
30. Noordermeer, M. A., Veldink, G. A., and Vliegthart, J. F. (2001) Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance, *ChemBiochem*, **2**, 494-504, [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20010803\)2:7/8<494::AID-CBIC494>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20010803)2:7/8<494::AID-CBIC494>3.0.CO;2-1).
31. Toporkova, Y. Y., Askarova, E. K., Gorina, S. S., Ogorodnikova, A. V., Mukhtarova, L. S., and Grechkin, A. N. (2020) Epoxyalcohol synthase activity of the CYP74B enzymes of higher plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **1865**, 158743, <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2020.158743>.
32. Tijet, N., Schneider, C., Muller, B. L., and Brash, A. R. (2001) 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, *Arch. Biochem. Biophys.*, **386**, 281-289, <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2218>.
33. Mita, G., Quarta, A., Fasano, P., De Paolis, A., Di Sansebastiano, G. P., Perrotta, C., Iannacone, R., Belfield, E., Hughes, R., Tsesmetzis, N., Casey, R., and Santino, A. (2005) Molecular cloning and characterization of an almond 9-hydroperoxide lyase, a new CYP74 targeted to lipid bodies, *J. Exp. Bot.*, **56**, 2321-2333, <https://doi.org/10.1093/jxb/eri225>.
34. Grechkin, A. N., Brühlmann, F., Mukhtarova, L. S., Gogolev, Y. V., and Hamberg, M. (2006) Hydroperoxide lyases (CYP74C and CYP74B) catalyze the hemolytic isomerization of fatty acid hydroperoxides into hemiacetals, *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 1419-1428, <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2006.09.002>.
35. Hughes, R. K., Belfield, E. J., Muthusamay, M., Khan, A., Rowe, A., Harding, S. E., Fairhurst, S. A., Bornemann, S., Ashton, R., Thorneley, R. N. F., and Casey, R. (2006) 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, *Biochem. J.*, **395**, 641-652, <https://doi.org/10.1042/BJ20051667>.
36. Wan, X.-H., Chen, S.-X., Wang, C.-Y., Zhang, R.-R., Cheng, S.-Q., Meng, H.-W., and Shen, X.-Q. (2013) Isolation, expression, and characterization of a hydroperoxide lyase gene from cucumber, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 22082-22101, <https://doi.org/10.3390/ijms141122082>.
37. Toporkova, Y. Y., Gorina, S. S., Bessolitsyna, E. K., Smirnova, E. O., Fatykhova, V. S., Brühlmann, F., Ilyina, T. M., Mukhtarova, L. S., and Grechkin, A. N. (2018) Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 369-378, <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2018.01.002>.
38. Tanaka, M., Koeduka, T., and Matsui, K. (2021) Green leaf volatile-burst in *Selaginella moellendorffii*, *Front Plant Sci.*, **12**, 731694, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.731694>.
39. Toporkova, Y. Y., Askarova, E. K., Gorina, S. S., Mukhtarova, L. S., and Grechkin, A. N. (2022) Oxylin biosynthesis in spikemoss *Selaginella moellendorffii*: Identification of allene oxide synthase (CYP74L2) and hydroperoxide lyase (CYP74L1), *Phytochemistry*, **195**, 113051, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.113051>.
40. Kuroda, H., Oshima, T., Kaneda, H., and Takashio, M. (2005) Identification and functional analyses of two cDNAs that encode fatty acid 9-/13-hydroperoxide lyase (CYP74C) in rice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1545-1554, <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1545>.
41. Li, Y., and Wei, K. (2020) Comparative functional genomics analysis of cytochrome P450 gene superfamily in wheat and maize, *BMC Plant Biol.*, **20**, 93, <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2288-7>.
42. Stumpe, M., Bode, J., Göbel, C., Wichard, T., Schaaf, A., Frank, W., Frank, M., Reski, R., Pohnert, G., and Feussner, I. (2006) Biosynthesis of C9-aldehydes in the moss *Physcomitrella patens*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 301-312, <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2006.03.008>.
43. Gorina, S. S., Mukhitova, F. K., Ilyina, T. M., Toporkova, Y. Y., and Grechkin, A. N. (2019) Detection of unprecedented allene oxide synthase member of CYP74B subfamily: CYP74B33 of carrot (*Daucus carota*), *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, 1580-1590, <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2019.07.004>.
44. Wilson, R. A., Gardner, H. W., and Keller, N. P. (2001) Cultivar-dependent expression of a maize lipoxygenase responsive to seed infesting fungi, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **14**, 980-987, <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.8.980>.
45. Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 1870-1874, <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
46. Zuckerkandl, E., and Pauling, L. (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins (Bryson, V., and Vogel, H. J., eds) *Evolving Genes and Proteins*, Academic Press, New York, pp. 97-166, <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-2734-4.50017-6>.
47. Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, **39**, 783-791, <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.

48. Zoller, M. J., and Smith, M. (1982) 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 Res.*, **10**, 6487-6500, <https://doi.org/10.1093/nar/10.20.6487>.
49. Toporkova, Y. Y., Gogolev, Y. V., Mukhtarova, L. S., and Grechkin, A. N. (2008) Determinants governing the CYP74 catalysis: conversion of allene oxide synthase into hydroperoxide lyase by site-directed mutagenesis, *FEBS Lett.*, **582**, 3423-3428, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.09.005>.
50. Schenkman, J. B., and Jansson, I. (2006) Spectral analyses of cytochromes P450, *Cytochrome P450 protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 11-18, <https://doi.org/10.1385/1-59259-998-2:11>.
51. Werck-Reichhart, D., and Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story, *Genome Biol.*, **1**, REVIEWS3003, <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003>.
52. Mukhtarova, L. S., Mukhitova, F. K., Gogolev, Y. V., and Grechkin, A. N. (2011) Hydroperoxide lyase cascade in pea seedlings: non-volatile oxylipins and their age and stress dependent alterations, *Phytochemistry*, **72**, 356-364, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.013>.

## THE CYP74B34 ENZYME OF CARROT (*Daucus carota*) WITH DOUBLE HYDROPEROXYDE LYASE/EPOXYALCOHOL SYNTHASE ACTIVITY: IDENTIFICATION AND BIOCHEMICAL PROPERTIES

Y. Y. Toporkova\*, S. S. Gorina, T. M. Iljina, N. V. Lantsova, and A. N. Grechkin

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,  
Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences",  
420111 Kazan, Russia; email: kibmail@kibb.knc.ru*

The lipoxygenase cascade of plants is a source of oxidized fatty acid derivatives, oxylipins, which play an important role in regulatory processes, as well as in the formation of responses to stress factors. One of the most common enzymes of the lipoxygenase cascade are 13-specific hydroperoxide lyases (HPL, synonym "hemiacetal synthase") of the CYP74B subfamily. This work described the discovery and cloning of the *CYP74B34* gene of the carrot (*Daucus carota*), as well as a description of the biochemical properties of the corresponding recombinant enzyme. The CYP74B34 enzyme was active towards 9- and 13- hydroperoxides of linoleic (9-HPOD and 13-HPOD, respectively) and  $\alpha$ -linolenic acids (9-HPOT and 13-HPOT, respectively). CYP74B34 specifically converted 9-HPOT and 13-HPOT into aldoacids (HPL products). The transformation of 13-HPOD led to the formation of aldoacids (as main products) and epoxyalcohols (as minor products). Epoxyalcohols are products of the epoxyalcohol synthase (EAS) activity. At the same time, 9-HPOD conversion resulted in the formation of the epoxyalcohols as main products and aldoacid as the minor one. Thus, the CYP74B34 enzyme is the first enzyme with double HPL/EAS activity described in carrot. The presence of corresponding catalytic activities was confirmed by the results of analyses of oxylipin profiles of roots of young seedlings and mature plants. In addition, the work describes the results of substitution of amino acid residues in one of the catalytically essential sites.

*Keywords:* lipoxygenase cascade, cytochromes P450, CYP74 family, hydroperoxide lyase, epoxyalcohol synthase, *Daucus carota*