

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 581.2

ЦИТОХРОМ CYP443C1 (КЛАН CYP74) АКТИНИИ
NEMATOSTELLA VECTENSIS — ПЕРВЫЙ ФЕРМЕНТ METAZOA,
ПРОЯВЛЯЮЩИЙ ДВОЙНУЮ АКТИВНОСТЬ ГИДРОПЕРОКСИДЛИАЗЫ /
ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗЫ

С. С. Горина*, Я. Ю. Топоркова, Л. Ш. Мухтарова, академик РАН А. Н. Гречкин

Поступило 01.11.2018 г.

Клонирован ген и охарактеризован соответствующий рекомбинантный цитохром CYP443C1 актинии (*Nematostella vectensis*) — первый фермент Metazoa, проявляющий двойную активность гидропероксидлиазы и эпоксиалкогольсинтазы в зависимости от субстрата.

Ключевые слова: *Nematostella vectensis*, клан CYP74, гидропероксидлиаза, эпоксиалкогольсинтаза.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524863384-388>

Окислительный метаболизм полиеновых жирных кислот является источником важных биорегуляторов — оксипинов, присутствующих в различных живых организмах [1]. Биосинтез оксипинов опосредован липоксигеназами, циклооксигеназами и цитохромами P450 [2], в частности, атипичными представителями этого суперсемейства — ферментами клана CYP74 [3]. Семейство CYP74 включает ферменты только высших растений, в то время как клан CYP74 — дополнительно ферменты зелёных [4] и бурых водорослей [5], протеобактерий [6], а также животных из разных таксонов, таких как Chordata [6], Cnidaria [7], Placozoa [6]. Семейство CYP74 включает в себя две дегидразы (алленоксидсинтазу (АОС) и дивинилэфирсинтазу (ДЭС)) и две изомеразы (гидропероксидлиазу (ГПЛ) и эпоксиалкогольсинтазу (ЭАС)). Единственными обнаруженными вне царства растений ГПЛ клана CYP74 являются ферменты протеобактерий MspHPL (*Methylobacterium* sp. 4–46) и MnHPL (*M. nodulans*) [6]. В то же время, например, у животных на данный момент описаны только ЭАС [6,7] и АОС [6].

Секвенирование геномов новых организмов расширяет наши знания о представителях CYP74. Ранее несколько предполагаемых генов CYP74 были обнаружены в геноме литоральной роющей актинии (*Nematostella vectensis*). Один из них, CYP443D1, был

клонирован и описан как ЭАС [7]. В настоящей работе сообщается о клонировании и характеристике другого фермента CYP443C1 *N. vectensis*.

Выделение РНК и синтез кДНК осуществляли, как описано ранее [7]. Открытую рамку считывания гена CYP443C1 (1455 п.о.) синтезировали в ПЦР с полученной кДНК и праймерами gACgACgACAAGATGGCAAAGCCTTTAAGAATCG и gAggAgAAgCCCggATGTTTCTGGAATGTGCTGG, после чего клонировали в векторе pET-32 EK/LIC. Нарботку и очистку рекомбинантного белка проводили, как описано ранее [7]. Фермент CYP443C1 инкубировали с 9- и 13-гидроперекисями линолевой ((9S)-гидроперокси-(10E,12Z)-октадекадиеновая (9-ГПОД) и (13S)-гидроперокси-(9Z,11E)-октадекадиеновая кислоты (13-ГПОД)), α -линоленовой ((9S)-гидроперокси-(10E,12Z,15Z)-октадекатриеновая (9-ГПОТ) и (13S)-гидроперокси-(9Z,11E,15Z)-октадекатриеновая кислоты (13-ГПОТ)) и эйкозапентаеновой ((15S)-13-гидроперокси-(5Z,8Z,11Z,13E,17Z)-эйкозапентаеновой (15-ГПЭПЕ)) кислот, которые получали, как описано ранее [7]. Продукты реакций анализировали газовой хромато-масс-спектрометрией (ГХ–МС) в виде метиловых эфиров триметилсилилпроизводных (Me/TМС) после восстановления NaBH₄. Пробоподготовку проводили, как описано ранее [7].

Фермент CYP443C1, как и растительные ферменты CYP74 проявлял каталитическую активность в Na-фосфатном буфере в диапазоне pH 6,0–8,0; максимальная активность наблюдалась при pH 7,0.

Казанский институт биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской Академии наук”

*E-mail: gsvetlana87@gmail.com

Ферментативную активность определяли по снижению оптической плотности реакционной среды при 234 нм. Наиболее предпочтительным субстратом для СУР443С1 оказался 9-ГПОТ.

Инкубация фермента СУР443С1 с 9-ГПОТ приводила к образованию основного продукта 1 (Ме/ТМС) (рис. 1). Его масс-спектр был идентичен таковому 9-гидроксинонановой кислоты [8] — продукта восстановления NaBH_4 9-оксононановой кислоты, свидетельствующей о присутствии 9-ГПЛ активности. Дополнительным продуктом реакции являлось соединение 2 (Ме/ТМС). Его масс-спектр, особенно характерный пик при $m/z = 197$, свидетельствовал о структуре эпокиспирта с ТМС-оксигруппой при С11 и оксираном при С9, С10 и соответствовал таковому 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновой кислоты (Ме/ТМС) [9].

В результате инкубации СУР443С1 с 13-ГПОД происходило образование двух продуктов 3а и 3б, обладающих идентичными масс-спектрами, соответствующими таковому 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценной кислоты (Ме/ТМС) [5]. Среди продуктов реакции были также обнаружены тригидроксикислоты (4а–4в) — продукты спонтанного гидролиза эпокиспиртов. Продуктов ГПЛ-активности обнаружено не было.

В то же время 9-ГПОД, 13-ГПОТ и 15-ГПЭПЕ оказались неэффективными субстратами для фермента СУР443С1. Результатом превращения 9-ГПОД было образование 9-оксононановой кислоты, а также соединений, масс-спектры которых соответствовали таковому 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценной (α -кетол) [9] и 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценной кислот [7] (Ме/ТМС), т.е. происходило образование продуктов ГПЛ-, АОС- и ЭАС-активности — 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 и 13-гидрокси-14,15-эпокси-5,8,11,17-эйкозотетраеновой кислот [7] соответственно. 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. Ранее подобные ферменты были описаны среди растительных ферментов подсемейства СУР74С [9]. Ферменту СУР443С1 было присвоено тривиальное название *NvHPL/EAS* (*N. vectensis* ГПЛ/ЭАС) и гену СУР443С1 — название *NvHPL/EAS*.

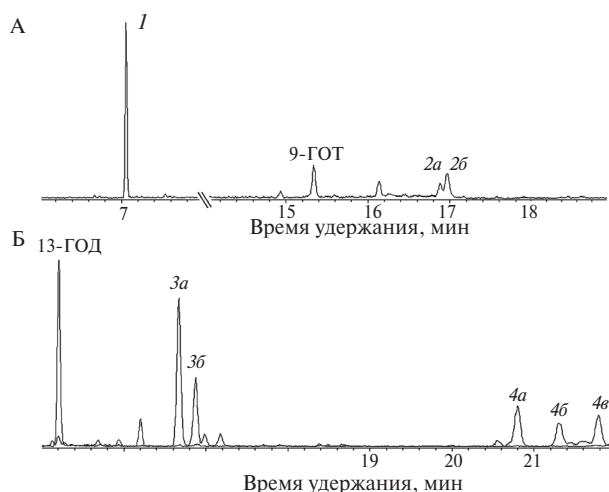


Рис. 1. ГХ–МС анализ продуктов, синтезируемых при участии фермента СУР443С1 из 9-ГПОТ (А) и 13-ГПОД (Б). 1 — 9-оксононановая кислота, 2а, 2б — изомеры 9,10-эпокси-11-гидрокси-12,15-октадекадиеновой кислоты, 3а, 3б — изомеры 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценной кислоты, 4а–4в — тригидроксикислоты.

Механизмы каталитического действия ферментов ГПЛ и ЭАС тесно взаимосвязаны. Оба фермента являются изомеразы, что было показано в экспериментах с использованием $^{18}\text{O}_2$ [5, 7, 10]. Общим промежуточным продуктом является эпоксиаллильный радикал, который в зависимости от типа фермента рекомбинирует с гидроксильным радикалом с образованием эпокиспирта (ЭАС-путь) либо претерпевает преобразование в винилоксикарбинильный радикал, который затем рекомбинирует с гидроксильным радикалом с образованием полуацетала (ГПЛ-путь) (рис. 2).

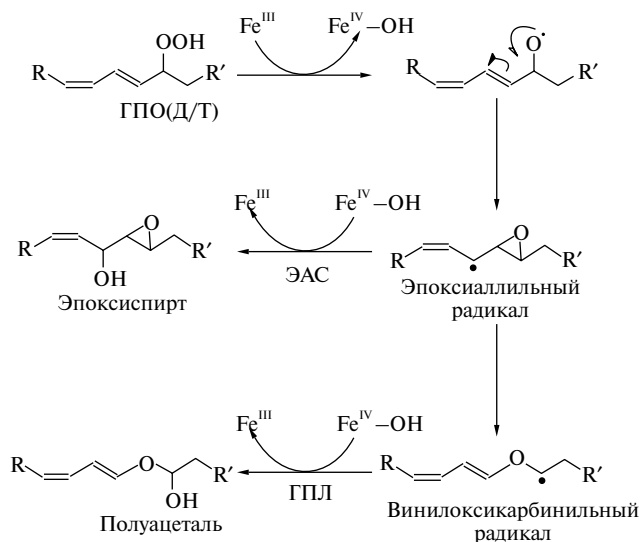


Рис. 2. Схема переключения между механизмами ЭАС и ГПЛ реакций. R = $\text{MeOOC}(\text{CH}_2)_7$, R' = *n*-бутил.

Фермент CYP443C1 содержит в своей структуре элементы, характерные как для всех цитохромов P450 (ERR-триада, остаток цистеина в гем-связывающем домене, рис. 3), так и только для ферментов CYP74 ("F/L toggle", гидропероксид-связывающий домен (ГСД)). Филогенетические анализы, выпол-

ненные с помощью программ Clustal Omega и MEGA7 (метод максимального правдоподобия, метод минимальной эволюции), подтверждают принадлежность фермента CYP443C1 к клану CYP74 (рис. 4). Таким образом, филогенетические, механистические и структурные особенности указывают



Рис. 3. Множественное выравнивание CYP443C1 с частичными последовательностями CYP74: *Arabidopsis thaliana*, AtAOS, NP_199079; *Lycopersicon esculentum*, LeAOS3, NP_001265949; LeHPL, AAF67142; *Klebsormidium flaccidum*, KfAOS, BAS32649; *Acropora palmata*, ApAOS, ACD42778; *M. nodulosum*, MnHPL, WP_015932840; *Branchiostoma floridae*, BfEAS, ACD88492; *N. vectensis*, NvEAS, ASS83181. Домены "F/Ltoggle" и ГСД выделены рамкой, ERR-триада и остаток цистеина в гем-связывающем домене отмечены символами ▼ и ◆.

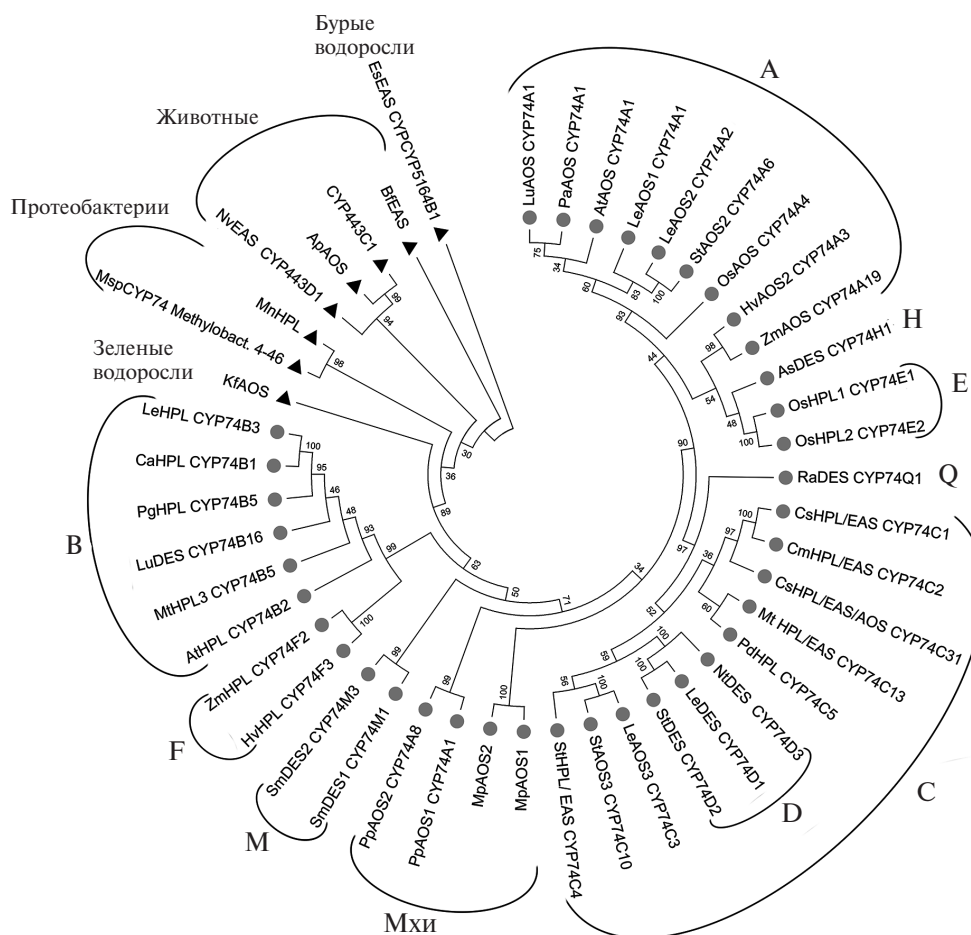


Рис. 4. Филогенетическое древо клана CYP74. Подсемейства обведены и обозначены буквами (А, В, С и т.д.). Ферменты растений были взяты из [9] и обозначены серыми кружками. Члены клана CYP74 (обозначены черными треугольниками): KfAOS, SI: LC032459; MnHPL, GI:220926268; MspCYP74, GI:170743950; NvEAS, ASS83181; ApAOS, GI:187948710; BfEAS, GI:189312561; Es, *Ectocarpus siliculosus*, EsEAS, GI: 1109557544.

на принадлежность фермента CYP443C1 к клану CYP74.

Ранее у представителей Metazoa были обнаружены ЭАС [6, 7] и АОС [6], принадлежащие к клану CYP74. Кроме того был описан фермент, проявляющий свойства ГПЛ, у мягкого коралла (*Capnella imbricata*), однако он является каталазным доменом химерного белка, вторым доменом которого является липоксигеназа [11]. Фермент CYP443C1 — первый фермент CYP74, обнаруженный у представителей Metazoa, проявляющий активность гидропероксилиазы.

Благодарности. Авторы признательны И.А. Косевичу (МГУ им. М.В. Ломоносова) за предоставление живых полипов *N. vectensis*.

Источники финансирования. Клонирование гена и получение фермента CYP443C1 выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18–04–00508), исследование продуктов реакции (№ 16–

34–60231 мол_а_дк). Филогенетические исследования клана CYP74 поддержаны грантом 16–14–10286 Российского Научного Фонда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gerwick W.H., Moghaddam M., Hamberg M. // Arch. Biochem. Biophys. 1991. V. 290. P. 436–444.
2. Gabbs M., Leng S., Devassy J.G., Monirujjaman M., Aukema H.M. // Adv. Nutr. 2015. V. 6. P. 513–540.
3. Stumpe M., Feussner I. // Phytochem. Rev. 2005. P. 347–357.
4. Koeduka T., Ishizaki K., Mwenda C.M., Hori K., Sasaki-Sekimoto Y., Ohta H., Kohchi T., Matsui K. // Planta. 2015. V. 242. P. 1175–1186.
5. Toporkova Y.Y., Fatykhova V.S., Gogolev Y.V., Khairutdinov B.I., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. // Biochim. Biophys. Acta. 2017. V. 1761. P. 1419–1428.

6. Lee D.-S., Nioche P., Hamberg M., Raman C.S. // Nature. 2008. V. 455, P. 363–370.
7. Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Mukhitova F.K., Hamberg M., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. // Biochim. Biophys. Acta. 2017. V. 1862. P. 1099–1109.
8. Mukhtarova L.S., Mukhitova F.K., Gogolev Y.V., Grechkin A.N. // Phytochemistry. 2011. V. 72. P. 356–364.
9. 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. // Biochim. Biophys. Acta. 2018. V. 1863. P. 369–378.
10. Grechkin A.N., Brühlmann F., Mukhtarova L.S., Gogolev Y.V., Hamberg M. // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1761. P. 1419–1428.
11. Teder T., Löhelaid H., Boeglin W.E., Calcutt W.M., Brash A.R., Samel N. // J Biol Chem. 2015. V. 290. P. 19 823–19 832.

**THE CYP443C1 (CYP74 CLAN) CYTOCHROME OF SEA ANEMONE
NEMATOSTELLA VECTENSIS – THE FIRST METAZOAN ENZYME POSSESSING
HYDROPEROXIDE LYASE / EPOXYALCOHOL SYNTHASE ACTIVITY**

S. S. Gorina, Y. Y. Toporkova, L. S. Mukhtarova, Academician of the RAS A. N. Grechkin

Federal Research Center “Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, Kazan, Russian Federation

Received November 01, 2018

A novel CYP74 clan gene CYP443C1 of the starlet sea anemone (*Nematostella vectensis*, Cnidaria) has been cloned, and the properties of the corresponding recombinant protein have been studied. Depending on the substrate, CYP443C1 exhibited double function hydroperoxide lyase/epoxyalcohol synthase activity.

Keywords: *Nematostella vectensis*, CYP74 clan, epoxyalcohol synthase, hydroperoxide lyase.