

УДК 594

ИЗМЕНЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗЫ СYP443D1 (NVEAS) РОЮЩЕЙ ЛИТОРАЛЬНОЙ АКТИНИИ *NEMATOSTELLA VECTENSIS* В РЕЗУЛЬТАТЕ ЕДИНИЧНОЙ АМИНОКИСЛОТНОЙ ЗАМЕНЫ

© 2025 г. С. С. Горина, Н. В. Ланцова, Я. Ю. Топоркова*, академик РАН А. Н. Гречкин

Поступило 15.09.2024 г.

После доработки 25.09.2024 г.

Принято к публикации 28.09.2024 г.

Цитохромы суперсемейства P450 широко распространены в природе; они обнаружены во всех изученных аэробных организмах. Несмотря на то что степень сходства цитохромов P450 разных семейств невысокая, все ферменты этого суперсемейства имеют сходную третичную структуру. Кроме того, у всех цитохромов P450, в том числе у ферментов клана СYP74, в последовательностях содержатся субстрат-распознающие сайты, формирующие каталитический центр. Изначально ферменты СYP74 были обнаружены у растений, у которых они широко распространены и играют важную роль в липоксигеназном каскаде. Позже СYP74-подобные ферменты других семейств были выявлены у представителей разных таксонов, в том числе у животных. На основании результатов филогенетических исследований, структуры и механизмов каталитического действия они были объединены наряду с семейством СYP74 в клан СYP74. Одним из представителей клана СYP74 является эпоксиалкогольсинтаза NvEAS (СYP443D1) роющей литоральной актинии *Nematostella vectensis*. Методом сайт-направленного мутагенеза была получена мутантная форма NvEAS с заменой P93G, которая приобрела дополнительную гидропероксидлиазную активность. До настоящей работы были описаны только результаты сайт-направленного мутагенеза ферментов семейства, но не клана СYP74. Более того, в настоящей работе впервые описано превращение эпоксиалкогольсинтазы в гидропероксидлиазу. Эти результаты подтверждают высказанное ранее предположение об эволюции ферментов СYP74 по пути эпоксиалкогольсинтаза – гидропероксидлиаза – алленоксидсинтаза – дивинилэфирсинтаза.

Ключевые слова: липоксигеназный каскад, цитохромы P450, клан СYP74, эпоксиалкогольсинтаза, гидропероксидлиаза, сайт-направленный мутагенез, *Nematostella vectensis*
DOI: 10.31857/S2686738925010186, **EDN:** tbqzts

ВВЕДЕНИЕ

Окисление полиненасыщенных жирных кислот является источником оксипинов, играющих важную роль в регуляторных процессах, а также ответных реакций на изменение условий окружающей среды [1–5]. Одним из основных источников оксипинов является липоксигеназный каскад, ключевыми ферментами которого, например, у растений являются липоксигеназы [6] и цитохромы P450 семейства СYP74 – алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ),

дивинилэфирсинтазы (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС) [7,8], а также ферменты с двойной и даже тройной активностью [9]. Семейство СYP74 растений входит в состав клана СYP74 [10], наряду с СYP74-подобными ферментами протеобактерий [11], бурых водорослей [12], а также некоторых животных [11]; например, у роющей литоральной актинии *Nematostella vectensis* Stephenson, 1935 (Cnidaria, Edwardsiidae) описано два фермента клана СYP74 – эпоксиалкогольсинтаза NvEAS (СYP443D1) [13] и фермент NvHPL/EAS (СYP443C1) с двойной активностью ГПЛ/ЭАС [14]. СYP74-подобные ферменты по требованиям номенклатуры нельзя отнести к семейству СYP74, однако они проявляют сходство с ферментами семейства СYP74 по структуре, механизмам каталитического действия и результатам филогенетических исследований (рис. 1).

Казанский институт биохимии и биофизики,
Федеральный исследовательский центр
“Казанский научный центр Российской академии наук”,
Казань, Россия

*e-mail: kibmail@kibb.knc.ru

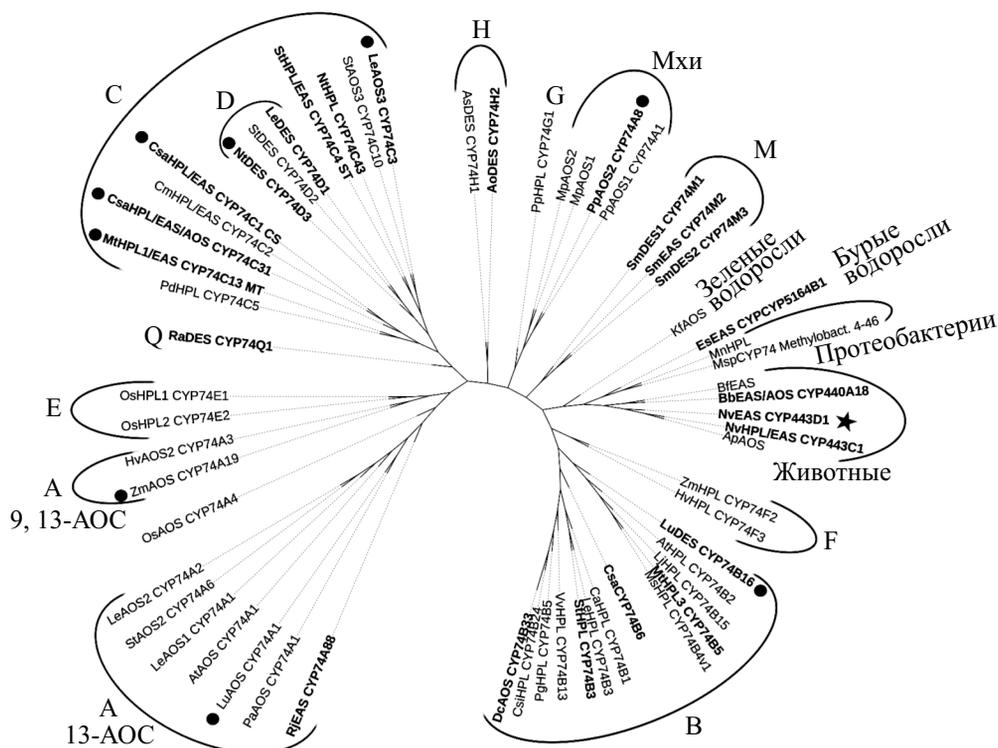


Рис. 1. Филогенетическое древо клана CYP74. Подсемейства обведены и обозначены буквами (А, В, С и т.д.). Представители ферментов CYP74 растений: As, *Allium sativum*; AsDES, CYP74H1, GI:83414021; At, *Arabidopsis thaliana*; AtAOS, CYP74A1, GI:15239032; AtHPL, CYP74B2, GI:3822403; Ca, *Capsicum annuum*; CaHPL, CYP74B1, GI:1272340, CaDES, CYP74D4, GI: 107840369; 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; Csi, *Camellia sinensis*; CsiHPL, CYP74B24, SI: BAU24783.1; Dc, *Daucus carota*; CYP74B33, GI: 108219710; Hv, *Hordeum vulgare*; HvAOS2, CYP74A3, SI: AJ251304.1; HvHPL, CYP74F3, CAC82980.1; Kf, *Klebsormidium flaccidum* (зеленые водоросли); KfAOS, SI: LC032459.1; Le, *Lycopersicon esculentum*; LeAOS1, CYP74A1, GI:7581989; LeAOS2, CYP74A2, GI:7677376; LeAOS3, CYP74C3, GI:25991603; LeHPL, CYP74B3, GI:7677378; LeDES, CYP74D4, GI: 543675; Lj, *Lotus japonicus*; LjHPL, CYP74B15, SI: AB600748.1; Lu, *Linum usitatissimum*; LuAOS, CYP74A1, GI:1352186; LuDES, CYP74B16, GI:379048766; Mp, *Marchantia polymorpha*; MpAOS1, SI:LC032457.1, MpAOS2, SI:LC032458.1; Mt, *Medicago truncatula*; MtHPL3, CYP74B5, GI:63081244; MtHPL1/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; 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 клана ферментов CYP74: Es, *Ectocarpus siliculosus* (бурые водоросли); EsEAS, CYP5164B1, GI:1109557544; Mn, *Methylobacterium nodulans* (протеобактерии); 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; Bb, *Branchiostoma belcheri*, BbEAS/AOS, CYP440A18, XP_019641998.1; Nv, *N. vectensis* (Metazoa); NvEAS CYP443D1, GI:5516222; NvHPL/EAS CYP443C1. Черными кружочками обозначены ферменты CYP74, для которых проведены эксперименты по сайт-направленному мутагенезу [16]. Звездочкой обозначена NvEAS, мутантная форма которой описана в этой статье.

Цитохромы P450 сильно различаются по аминокислотным последовательностям. При этом они характеризуются высокой степенью сходства пространственных структур, а также наличием каталитически важных участков, так называемых

“субстрат-распознающих сайтов” (СРС) [15], формирующих каталитический центр.

Для изучения взаимосвязи структуры и каталитических свойств ферментов CYP74 используется сайт-направленный мутагенез. Ранее было

показано, что в результате единичных замен в каталитически важных доменах ферментов семейства CYP74 растений, а именно – в участке перегиба I-спирали в СРС-4 [16] и сайте “F/L toggle” в СРС-1 – происходило частичное или полное превращение АОС в ГПЛ и ЭАС, ДЭС – в АОС, ГПЛ и ЭАС, ферментов с двойной активностью ГПЛ/ЭАС – в АОС [17]. На основании этих данных было высказано предположение о направлении эволюции внутри семейства CYP74. При этом к настоящему времени не опубликовано ни одного сообщения о результатах сайт-направленного мутагенеза ферментов других, нежели CYP74, семейств клана CYP74. Однако подобные данные необходимы для понимания процесса эволюции внутри клана CYP74 за пределами семейства CYP74. В данной статье описаны результаты сайт-направленного мутагенеза ЭАС NvEAS (CYP443D1) *N. vectensis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Линолевая кислота и метанол для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) были получены от Sigma-Aldrich (США); боргидрид натрия, силилирующие реагенты, N-нитрозотолуол-4-сульфометиламид (диазометан) и изопропанол – от Fluka (Buchs, Швейцария). (9S,10E,12Z)-9-Гидроперокси-10,12-октадекадиеновую (9-ГПОД) кислоту получали в результате инкубации линолевой кислоты с рекомбинантной липоксигеназой ZmLOX3 (GeneBank: AAG61118.1) кукурузы (*Zea mays*) [18] в 100 мМ Na-фосфатном буфере (рН 6,0) при 0 °С при постоянном кислородном барботаже. Экстрагированную гидроперекись (в виде свободной кислоты) дважды очищали методом ВЭЖХ на нормальной фазе на двух последовательно соединенных колонках Kromasil Si (7 мкм, 4,0×250 мм, Elscico, Россия) в изократическом режиме (скорость потока 0,4 мл/мин), используя смесь гексана, изопропанола и уксусной кислоты (98,1:1,8:0,1 по объему). Гидроперекись была хроматографически чистой и как минимум на 98% оптически чистой, как было определено с помощью хирально-фазовой ВЭЖХ.

Методы биоинформатики. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, анализ нуклеотидных последовательностей, а также конструирование праймеров проводили с помощью программы Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen, США). Молекулярно-филогенетический анализ проведен методом минимальной эволюции (Minimum Evolution method) [19]. Устойчивость полученного филогенетического дерева оценивали методом бутстрепа, используя 1000 бутстреп-реplik [20]. Эволюционные расстояния были вычислены с использованием метода *p*-расстояний [21] и выражены в единицах числа различий аминокислот на сайт.

Алгоритм Neighbor-joining [22] был использован для генерации исходного древа. Анализ включал 58 аминокислотных последовательностей. Филогенетический анализ проведен с использованием MEGA7 [23]. Наложение компьютерных моделей проводили с помощью программы UCSF Chimera (RBVI, США) [24].

Сайт-направленный мутагенез гена NvEAS. Модификацию первичной структуры фермента NvEAS проводили, используя метод сайт-направленного мутагенеза, разработанного для генов, клонированных на плазмидных векторах [16, 25]. Для синтеза мутантных плазмид проводили ПЦР с использованием Q5@High-Fidelity 2X Master Mix (NEB, Великобритания) и праймеров GACGGTCACGTGGCTTCCATGTTCTCGAAC и GTTCGAGAACATGGAAGCCACGTGACCGTC. Анализ результатов сайт-направленного мутагенеза проводили с помощью генетического анализатора Нанофор 5 (Синтол, Россия).

Получение рекомбинантного фермента NvEAS дикого типа и его мутантной формы NvEAS P93G. Для наработки рекомбинантного фермента NvEAS использовали вектор pET-23a EK/LIC системы pET (Novagen, США), реципиентом которого служили клетки штамма *Escherichia coli* BL21 CodonPlus RIL (Novagen, США). Клетки бактериального продуцента засеивали в 2 мл среды LB:M9 (1:1, по объему), содержащей 500 мг/л ампициллина и 35 мг/л хлорамфеникола. Культуру клеток выращивали в шейкере-инкубаторе в течение 14 часов при 37 °С, после чего суспендировали в 1 л свежей среды LB:M9 с теми же антибиотиками. Культуру клеток продуцента выращивали при интенсивной аэрации (250 об/мин) и умеренной температуре (32 °С) до достижения оптической плотности OD600 интервала 0,6 – 0,8. Клеточную суспензию быстро охлаждали до 20 °С на ледяной бане, немедленно добавляли индуктор изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид в конечной концентрации 0,1 мМ и предшественник гема – δ-аминолевулиновую кислоту – из расчета 50 мг/л. Индуцированные таким образом клетки инкубировали в течение 14 часов при умеренной аэрации (180 об/мин) и пониженной температуре (20 °С), после чего собирали центрифугированием (8000 об/мин, 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. Нарработку белка, а также степень очистки оценивали по результатам Ds-Na-ПААГ-электрофореза в системе PowerPac

Universal MiniProtean (Bio-Rad, США). Гели окрашивали Coomassie R250. Концентрацию фермента измеряли по содержанию гема [26].

Условия проведения и анализ продуктов реакций фермента NvEAS дикого типа и его мутантной формы NvEAS P93G. Рекombинантные ферменты (10 мкг) инкубировали с 9-ГПОД в течение 15 мин при 4 °С в 10 мл 100 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7,0), после чего pH смеси снижали до 6,0 и продукты экстрагировали смесью гексана с этилацетатом (1:1, по объему), метилировали диазометаном и силилировали смесью пиридин : гексаметилдисилазан:триметилхлорсилана (1:1:1, по объему) в течение 30 минут при 23 °С. Затем силилирующие реагенты удаляли в вакууме. Сухой остаток растворяли в 100 мкл гексана и подвергали анализу методом ГХ-МС в виде метиловых эфиров ТМС-производных (Me/TМС) с помощью масс-спектрометра QP2020A, соединенного с газовым хроматографом GC-17A (Shimadzu, Япония). В некоторых случаях продукты восстанавливали NaBH_4 , после чего метилировали и триметилсилилировали. Продукты (с/без восстановления NaBH_4)

анализировали в виде Me/TМС методом ГХ-МС путем полного спектрального сканирования ионов в диапазоне отношений массы к заряду от 50 до 650, как описано ранее [27]. 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 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/сек. Полное сканирование или мониторинг селективных ионов проводили, используя электронную ионизацию (70 eV) [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор сайта для замены. Одним из каталитически важных участков является сайт “F/L toggle” в СРС-1 [17]. В этом сайте у АОС и ЭАС содержится остаток фенилаланина, тогда как у ДЭС и ГПЛ – остаток лейцина. Этот сайт локализуется

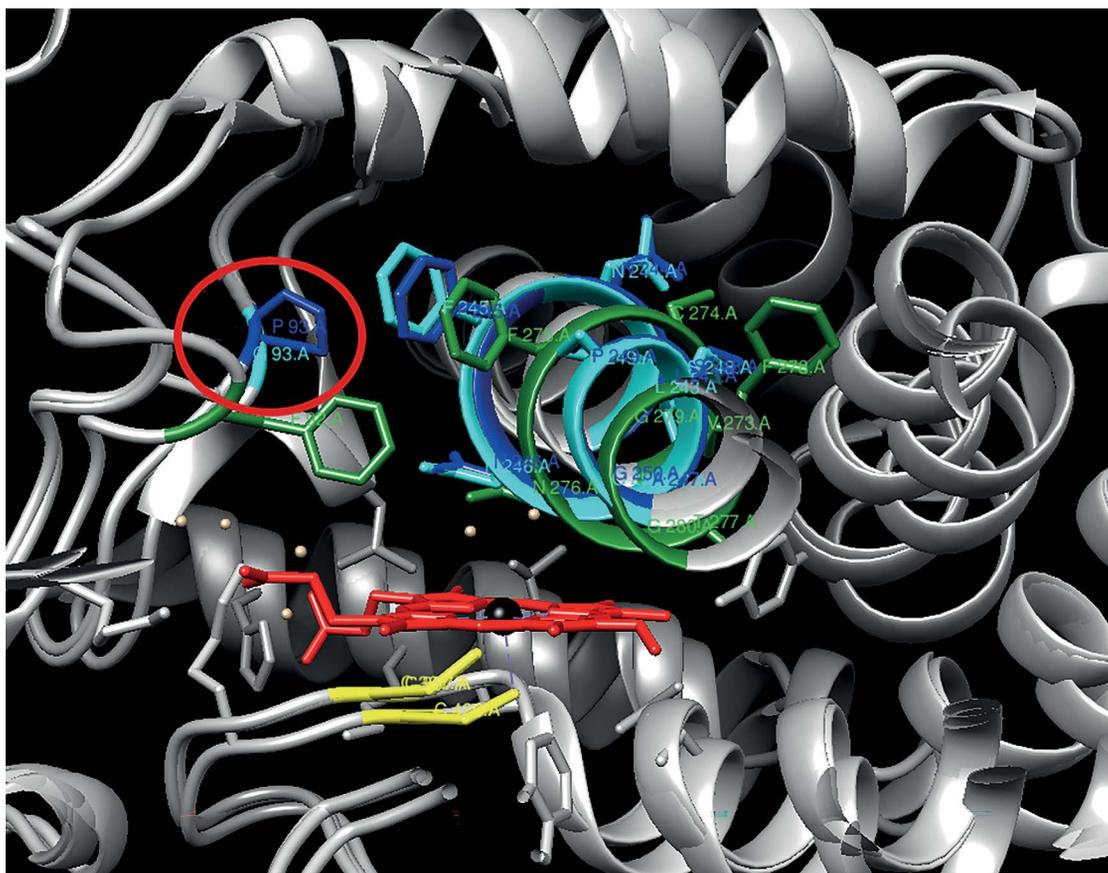


Рис. 2. Результат наложения смоделированных *in silico* третичных структур NvEAS дикого типа (синий цвет) и его мутантной формы NvEAS P93G (голубой цвет) относительно установленной с помощью рентгеноструктурного анализа структуры РаАОС (зеленый цвет). Сайт, выбранный для замены, обведен красным кругом; желтым цветом показаны остатки цистеина (гемовый лиганд) белковых молекул.

на дистальной поверхности гемового железа. Было показано, что остаток фенилаланина в этом сайте в последовательностях АОС контролирует реакционную способность эпоксиаллильного радикала и его катиона при реакции с ароматической л-системой [11]. Однако в результате наложения компьютерных моделей NvEAS и алленоксидсинтазы PaAOS гваялы *Parthenium argentatum* A. Gray, 1859 (Asteraceae) обнаружено, что сайт F/L toggle у PaAOS совпадает по расположению с сайтом Pro93 у NvEAS (рис. 2).

Поскольку ранее замены в сайте F/L toggle приводили к изменениям в катализе у ферментов семейства СУР74, мы предположили, что замена в сайте, соответствующем F/L toggle, у СУР74-подобного фермента NvEAS (СУР443D1) также приведет к изменениям в катализе. Остаток пролина в этом сайте уменьшает полость субстрат-связывающего кармана. Замена P93G увеличивает эту полость, что, как мы предполагаем, может позволить иное расположение субстрата, чем внутри фермента дикого типа.

Анализ продуктов реакции NvEAS дикого типа. Превращение 9-ГПОД при участии NvEAS дикого типа приводило к образованию единственного продукта **1** (рис. 3а). Масс-спектр продукта **1** (Me/TMC) содержал M^+ при m/z 398 (0,4%), $[M - Me]^+$ при m/z 383 (1,5%), $[M - C1/C8]^+$ при m/z 241 (4%), $[M - C1/C9]^+$ при m/z 212 (2%)

и $[M - C1/C10]^+$ при m/z 199 (100%) и соответствовал таковому оксиранил карбинола (эпоксиспирта, продукта ЭАС) – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой кислоты (Me/TMC). Характерный основной фрагмент при m/z 199 свидетельствовал о присутствии оксиранил карбинольной группировки с оксираном при C9,C10 и вторичной спиртовой группировки (TMC) при C11 [12].

Анализ продуктов реакции мутантной формы NvEAS P93G. В результате инкубации 9-ГПОД с мутантной формой NvEAS P93G основным продуктом реакции оставалось соединение **1**. Однако при этом образовывались дополнительные продукты **2** и **3** (рис. 3б). Масс-спектр восстановленного $NaBH_4$ продукта **2** (Me/TMC) содержал $[M - Me]^+$ при m/z 245 (21%), $[M - MeO]^+$ при m/z 229 (3%), $[245 - MeOH]^+$ при m/z 213 (100%), m/z 138 (8%), m/z 107 (12%), $[CH = O - SiMe_3]^+$ при m/z 103 (30%), m/z 89 (35%), m/z 75 (50%), $[SiMe_3]^+$ при m/z 73 (65%) и m/z 69 (51%) – и точно соответствовал спектру 9-гидроксинонановой кислоты (Me/TMC) [28], что свидетельствовало о ферментативном образовании 9-оксононановой кислоты – продукта спонтанного распада полуцетала – первичного продукта 9-ГПЛ реакции. Образование 9-оксононановой кислоты подтверждено также анализом продуктов (Me/TMC) без предварительного восстановления $NaBH_4$.

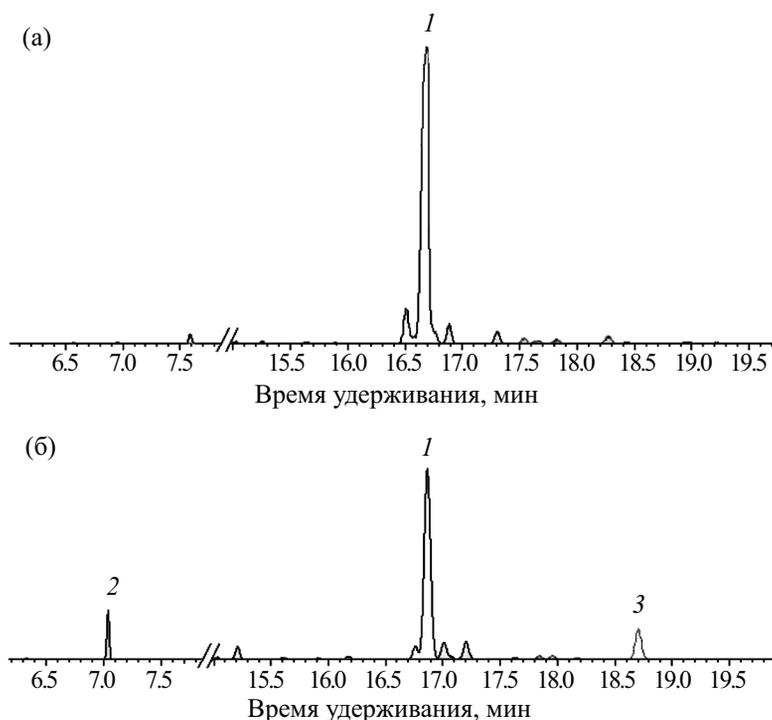


Рис. 3. Хроматограммы разделения продуктов (Me/TMC после восстановления с помощью $NaBH_4$) инкубации 9-ГПОД с NvEAS дикого типа (а) и мутантной формой NvEAS P93G (б). **1**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; **2**, 9-гидроксинонановая кислота; **3**, 9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценовая кислота.

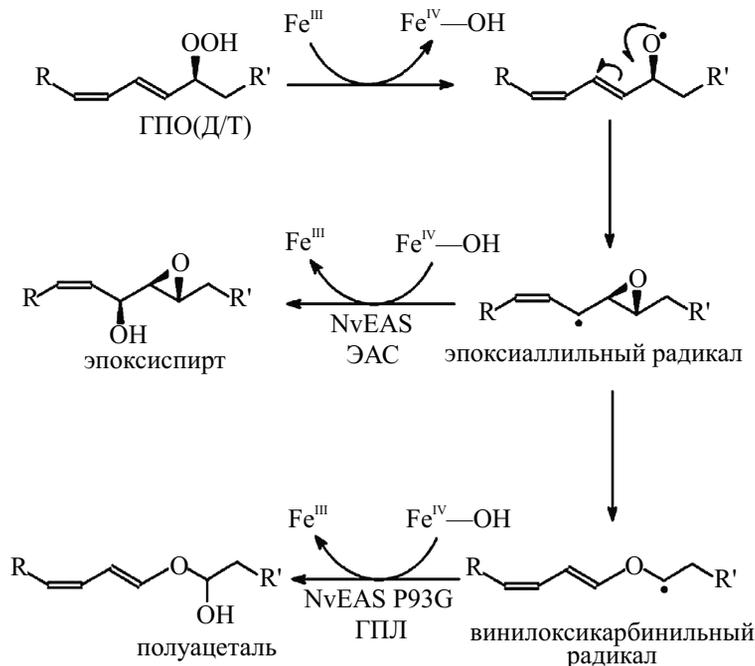


Рис. 4. Схема переключения механизмов каталитического действия ГПЛ и ЭАС.

Масс-спектр продукта **3** (Me/TMC) содержал M^+ при m/z 398 (1,5%), $[M^+ - \text{Me}]$ при m/z 383 (0,6%), $[M^+ - \text{MeO}]$ при m/z 367 (1%), $[M^+ - \text{Me}(\text{CH}_2)_4]$ при m/z 327 (12%), $[M^+ - \text{TMSOH}]$ при m/z 308 (1%), $[327 - \text{TMSOH}]^+$ при m/z 237 (37%), $[M^+ - \text{C}_{10}/\text{C}_{18}]$ при m/z 185 (28%), $[M^+ - \text{C}_{1}/\text{C}_{12}]$ при m/z 173 (23%), m/z 125 (23%), m/z 97 (14%), m/z 75 (52%) и $[\text{SiMe}_3]^+$ при m/z 73 (100%) и соответствовал таковому оксиранил винил карбинола (эпоксиалкоголю, продукту ЭАС) – 9,10-эпокси-13-гидрокси-11-октадеценной кислоты (Me/TMC). Фрагменты при m/z 185 и 173 указывали на присутствие оксирана при C9, C10 и вторичной спиртовой группировки (TMC) при C13 [12].

Таким образом, нами впервые выполнено частичное превращение ЭАС в ГПЛ, а именно – высокоспецифичная ЭАС NvEAS в результате замены единичного остатка приобрела дополнительно активность ГПЛ. Проявление двойной активности у фермента CYP74 не является необычным, поскольку даже ферменты дикого типа могут проявлять двойную и даже тройную активности [9]. Механизмы каталитического действия ЭАС и ГПЛ являются сходными (рис. 4). Оба фермента являются изомеразы. Две начальные стадии катализа являются общими для обоих ферментов: (1) перекисная группировка подвергается гомолитическому расщеплению с образованием алкоксиального радикала, который (2) перегруппируется в эпоксиаллильный радикал. В ЭАС реакции

эпоксиаллильный радикал подвергается рекомбинации с гидроксильным радикалом с образованием эпоксиалкоголя, тогда как в ГПЛ реакции сначала происходит гомолитическое раскрытие оксирана в эпоксиаллильном радикале с образованием винилоксикарбинового радикала, который затем также подвергается рекомбинации с гидроксильным радикалом с образованием полуацетала, первичного продукта ГПЛ (синоним: полуацетальсинтаза [29]). В случае мутантной формы NvEAS P93G, по-видимому, увеличение полости субстрат-связывающего кармана благоприятствует перегруппировке эпоксиаллильного радикала с раскрытием C-C-связи оксиранового кольца и рекомбинации образующегося при этом винилоксикарбинового радикала с гидроксильным радикалом, что приводит к образованию полуацетала, продукта ГПЛ [28, 29].

Ранее в результате экспериментов по сайт-направленному мутагенезу было сделано предположение об эволюции реакций, катализируемых ферментами CYP74. Эволюция реакций, по-видимому, шла по пути ЭАС – ГПЛ – АОС – ДЭС. С точки зрения молекулярной эволюции эпоксиалкогольсинтазная реакция, вероятно, является базовой. При этом мы предполагаем, что остальные реакции являются результатом видоизменения этой базовой реакции в результате влияния боковых групп аминокислотных остатков, появляющихся в результате точечных мутаций. Результаты сайт-направленного мутагенеза

ДЭС в АОС, ГПЛ и ЭАС, а также АОС в ГПЛ и ЭАС [17] – это моделирование обратного процесса – реверсий. А в результате, например, нескольких одновременных замен нам удалось смоделировать эволюцию гидропероксидлиазной реакции до алленоксидсинтазной [17]. В результате настоящей работы удалось смоделировать эволюцию эпоксиалкогольсинтазной реакции до гидропероксидлиазной, что также подтверждает эту гипотезу.

ИСТОЧНИК В ФИНАНСИРОВАНИЯ

Эксперименты по сайт-направленному мутагенезу NvEAS и изучению каталитических свойств проводили при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 23-14-00350). Биоинформационные и филогенетические исследования проводили при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра “КазНЦ РАН”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И ВСТАНДАРТОВ

В данной статье не содержится никаких исследований с участием людей или животных, проведенных кем-либо из авторов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Blee, E.* Phytooxylipins and plant defense reactions // *Prog. Lipid Res.* 1998. Vol. 37. P. 33–72.
2. *Savchenko, T.V., Zastrijnaja, O.M., and Klimov, V.V.* Oxylipins and plant abiotic stress resistance // *Biochemistry.* 2014. Vol. 79. P. 362–375.
3. *Howe, G.A. and Schilmiller, A.L.* Oxylipin metabolism in response to stress // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002. Vol. 5. P. 230–236.
4. *Deboever, E., Deleu, M., Mongrand, S., Lins, L., and Fauconnier, M.-L.* Plant-pathogen interactions: underestimated roles of phyto-oxylipins // *Trends Plant Sci.* 2020. Vol. 25. P. 22–34.
5. *Wasternack, C. and Feussner, I.* The oxylipin pathways: biochemistry and function // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2018. Vol. 69. P. 363–386.
6. *Liavonchanka, A. and Feussner, I.* Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis // *J. Plant Physiol.* 2006. Vol. 163. P. 348–357.
7. *Feussner, I. and Wasternack, C.* The lipoxygenase pathway // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002. Vol. 53. P. 275–297. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248>
8. *Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R.* Cytochromes P450: a success story // *Genome Biol.* 2000. Vol. 6. P. 1–7.
9. *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.* Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis // *Biochim. Biophys. Acta.* 2018. Vol. 1863(4). P. 369–378.
10. *Nelson, D.R.* Cytochrome P450 nomenclature, 2004 // *Methods Mol. Biol.* 2006. Vol. 320. P. 1–10.
11. *Lee D.S., Nioche P., Hamberg M., and Raman C.S.* Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes // *Nature.* 2008. Vol. 455. P. 363–370.
12. *Toporkova, Y.Y., Fatykhova, V.S., Gogolev, Y.V., Khairutdinov, B.I., Mukhtarova, L.S., and Grechkin, A.N.* Epoxyalcohol synthase of *Ectocarpus siliculosus*. First CYP74-related enzyme of oxylipin biosynthesis in brown algae // *Biochim. Biophys. Acta.* 2017. Vol. 1862. P. 167–175.
13. *Toporkova, Y.Y., Gorina, S.S., Mukhitova, F.K., Hamberg, M., Ilyina, T.M., Mukhtarova, L.S., and Grechkin, A.N.* Identification of CYP443D1 (CYP74 clan) of *Nematostella vectensis* as a first cnidarian epoxyalcohol synthase and insights into its catalytic mechanism // *Biochim. Biophys. Acta.* 2017. Vol. 1862(10). P. 1099–1109.
14. *Горина, С.С., Топоркова, Я.Ю., Мухтарова, Л.Ш., Гречкин, А.Н.* Цитохром CYP443C1 (клан CYP74) актинии *Nematostella vectensis* – первый фермент Metazoa, проявляющий двойную активность гидропероксидлиазы/ эпоксиалкогольсинтазы // Доклады Академии наук. 2019. Т. 486(3). С. 384–388.
15. *Gotoh, O.* Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. P. 83–90.
16. *Toporkova, Y.Y., Gogolev, Y.V., Mukhtarova, L.S., and Grechkin, A.N.* Determinants governing the CYP74 catalysis: conversion of allene oxide synthase into hydroperoxide lyase by site-directed mutagenesis // *FEBS Lett.* 2008. Vol. 582(23-24). P. 3423–3428.
17. *Toporkova, Y.Y., Smirnova, E.O., and Gorina, S.S.* Epoxyalcohol synthase branch of lipoxygenase Cascade // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2024. Vol. 46. P. 821–841.
18. *Wilson, R.A., Gardner, H.W., and Keller, N.P.* Cultivar-dependent expression of a maize lipoxygenase responsive to seed infesting fungi // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2001. Vol. 14. P. 980–987.

19. *Rzhetsky, A. and Nei, M.* A simple method for estimating and testing minimum evolution trees // *Mol. Biol. EVol.* 1992. Vol. 9. P. 945–967.
20. *Nei, M. and Kumar, S.* *Molecular Evolution and Phylogenetics*, New York: Oxford University Press, 2000.
21. *Saitou, N. and Nei, M.* The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic Trees // *Mol. Biol. EVol.* 1987. Vol. 4. P. 406–425.
22. *Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K.* MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. EVol.* 2016. Vol. 33. P. 1870–1874.
23. *Felsenstein, J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution.* 1985. Vol. 39. P. 783–791.
24. *Meng, E.C., Goddard, T.D., Pettersen, E.F., Couch, G.S., Pearson, Z.J., Morris, J.H., and Ferrin, T.E.* UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis // *Protein Sci.* 2023. 32(11):e4792.
25. *Zoller, M.J. and Smith, M.* 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.* 1982. Vol. 10(20). P. 6487–6500.
26. *Schenkman, J.B. and Jansson, I.* Spectral analyses of cytochromes P450, Cytochrome P450 protocols. Humana Press, Totowa, NJ. 2006. P. 11–18.
27. *Grechkin, A.N., Bruhlmann, F., Mukhtarova, L.S., Gogolev, Y.V., and Hamberg, M.* Hydroperoxide lyases (CYP74C and CYP74B) catalyze the homolytic isomerization of fatty acid hydroperoxides into hemiacetals // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. Vol. 1761. P. 1419–1428.
28. *Mukhtarova, L.S., Mukhitova, F.K., Gogolev, Y.V., and Grechkin, A.N.* Hydroperoxide lyase cascade in pea seedlings: non-volatile oxylipins and their age and stress dependent alterations // *Phytochemistry.* 2011. Vol. 72. P. 356–364.
29. *Mukhtarova, L.S., Bruhlmann, F., Hamberg, M., Khairutdinov, B.I., and Grechkin, A.N.* Plant hydroperoxide-cleaving enzymes (CYP74 family) function as hemiacetal synthases: Structural proof of hemiacetals by NMR spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta.* 2018. Vol. 1863. P. 1316–1322.

ALTERATION OF THE CATALYTIC PROPERTIES OF THE EPOXYALCOHOL SYNTHASE CYP443D1 (NVEAS) OF THE STARLET SEA ANEMONE *NEMATOSTELLA VECTENSIS* AS A RESULT OF A SINGLE AMINO ACID SUBSTITUTION

**S. S. Gorina, N. V. Lantsova, Y. Y. Toporkova*,
Academician of the RAS A. N. Grechkin**

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center
“Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, Kazan, Russian Federation*

**e-mail: kibmail@kibb.knc.ru*

Cytochromes of the P450 superfamily are widespread in nature; they were found in all studied aerobic organisms. Although the degree of similarity between cytochromes P450 of different families is low, all enzymes of this superfamily have similar tertiary structures. In addition, all cytochromes P450, including enzymes of the CYP74 clan, contain substrate recognition sites in their sequences, which form the catalytic center. Initially, CYP74 enzymes were discovered in plants, where they are widespread and play an important role in the lipoyxygenase cascade. Later, CYP74-like enzymes of other families were identified in different taxa, including animals. Based on the results of phylogenetic studies, structures, and catalytic mechanisms, they were combined along with the CYP74 family into the CYP74 clan. One of the CYP74 clan enzymes is the epoxyalcohol synthase NvEAS (CYP443D1) of the starlet sea anemone *Nematostella vectensis*. A mutant form of NvEAS with a P93G substitution, that acquired additional hydroperoxide lyase activity, was obtained by site-directed mutagenesis. Before this work, only the results of site-directed mutagenesis of enzymes of the CYP74 family, but not of the CYP74 clan, were described. Moreover, in this work, the transformation of epoxyalcohol synthase into hydroperoxide lyase is described for the first time. These results confirm the previously stated assumption about the evolution of CYP74 enzymes, namely the epoxyalcohol synthase – hydroperoxide lyase – allene oxide synthase – divinyl ether synthase pathway.

Keywords: lipoyxygenase cascade, cytochromes P450, CYP74 clan, epoxyalcohol synthase, hydroperoxide lyase, site-directed mutagenesis, *Nematostella vectensis*