

*На правах рукописи*



**СМИРНОВА Елена Олеговна**

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ  
ПОДСЕМЕЙСТВА СУР74М ПЛАУНКА *SELAGINELLA*  
*MOELLENDORFFII***

**03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2020

Работа выполнена в Казанском институте биохимии и биофизики – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»

Научный руководитель

кандидат биологических наук  
**ТОПОРКОВА Яна Юрьевна**

Официальные оппоненты

**САВЧЕНКО Татьяна Викторовна,**  
доктор биологических наук,  
Институт фундаментальных проблем биологии  
Российской академии наук  
– обособленное подразделение  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки  
«Федеральный исследовательский центр  
«Пушкинский научный центр биологических  
исследований Российской академии наук»,  
ведущий научный сотрудник  
с возложением обязанностей и.о. заведующего  
лабораторией фотосинтетического окисления воды

**СОЛОВЧЕНКО Алексей Евгеньевич,**  
доктор биологических наук,  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Московский государственный университет имени  
М.В.Ломоносова», профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

Защита состоится 27 января 2021 года в 14:00 на заседании диссертационного совета  
Д002.211.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376, г.  
Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2.  
Тел. (812)372-54-42, факс (812)372-54-43, [disssovet.d00221102@binran.ru](mailto:disssovet.d00221102@binran.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л.  
Комарова Российской академии наук.

Автореферат разослан «    »                      \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Лянгузова Ирина Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Постановка проблемы и ее актуальность.** Липоксигеназный каскад является источником окисленных производных полиненасыщенных жирных кислот – оксипиринов. Эти многофункциональные соединения широко распространены в организмах, принадлежащих разным таксонам (Grechkin, 1998). У растений ключевыми ферментами липоксигеназного каскада являются липоксигеназы и неклассические ферменты семейства CYP74 суперсемейства P450, к которым относятся три типа ферментов: две дегидразы – алленоксидсинтаза (АОС) и дивинилэфирсинтаза (ДЭС), а также изомеразы – гидропероксидлиаза (ГПЛ). До недавнего времени считалось, что ферменты CYP74 характерны исключительно для цветковых растений. Однако к настоящему времени ферменты, гомологичные представителям семейства CYP74, обнаружены у мхов *Physcomitrella patens* (Stumpe *et al.*, 2006; Bandara *et al.*, 2009; Scholz *et al.*, 2012) и *Marchantia polymorpha* (Stumpe *et al.*, 2008, Ponce de León, 2015), протеобактерии *Methylobacterium nodulans* (Lee *et al.*, 2008), бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* (Toporkova *et al.*, 2017a) и некоторых представителей царства животных, включая оленерогий коралл *Acropora palmata* (Lee *et al.*, 2008), литоральную роющую актинию *Nematostella vectensis* (Toporkova *et al.*, 2017б) и ланцетник *Branchiostoma floridae* (Lee *et al.*, 2008). Степень сходства данных последовательностей не позволяет отнести эти ферменты к семейству CYP74, однако особенности первичной структуры и механизма каталитического действия, а также данные филогенетического анализа позволили объединить эти ферменты и семейство CYP74 в единый клан CYP74 (Nelson, 2013). В клан CYP74, наряду с тремя типами ферментов семейства CYP74, включен также четвертый тип ферментов – эпоксиалкогольсинтаза (ЭАС), которая, также как ГПЛ, является изомеразой (Toporkova *et al.*, 2017а,б).

Наиболее распространенными ферментами CYP74 являются алленоксидсинтазы и гидропероксидлиазы (Grechkin, 2002). У всех изученных к настоящему времени цветковых растений в геномах обнаружены кодирующие их гены. Дивинилэфирсинтазы являются менее распространенными и изученными ферментами. Гены ДЭС выявлены в геномах таксономически отдаленных видов. Данные ферменты принадлежат к различным подсемействам: CYP74B (Gogolev *et al.*, 2012), CYP74D (Stumpe *et al.*, 2001; Fammartino *et al.*, 2007), CYP74H (Itoh, Howe, 2001) и CYP74Q (Gorina *et al.*, 2014).

Наименее изученными ферментами CYP74 являются эпоксиалкогольсинтазы. К настоящему времени описано только три фермента – VfEAS (CYP440A1) *B. floridae* (Lee *et al.*, 2008) EsEAS (CYP5164B1) *E. siliculosus* (Toporkova *et al.*, 2017a) и NvEAS (CYP443D1) *N. vectensis* (Toporkova *et al.*, 2017б). Эти ферменты входят в состав клана CYP74. Однако нельзя исключить, что у растений также могут быть обнаружены эпоксиалкогольсинтазы, входящие в состав семейства CYP74.

Плаунок *Selaginella moellendorffii* Hieron является одним из древнейших сосудистых растений, существующих в настоящее время. Недавно геном этого растения был расшифрован (Banks *et al.*, 2011). В результате аннотирования в нем было обнаружено 10 генов, кодирующих ферменты семейства CYP74. Кроме того, не

исключено наличие нескольких дополнительных изоферментов. Гены семейства CYP74 *S. moellendorffii* кодируют белки, относящиеся к четырем новым подсемействам: CYP74J, CYP74K, CYP74L и CYP74M. Подобное разнообразие генов CYP74 является редким. У цветковых растений такого разнообразия практически не встречается. До сих пор ни один из генов семейства CYP74 *S. moellendorffii* не был клонирован.

Недавно в нашей лаборатории был проанализирован профиль оксипиринов надземной части плаунка родственного вида *S. martensii* (Ogorodnikova *et al.*, 2015). Основными оксипиринами данного растения были разнообразные дивиниловые эфиры и изомеры 12-оксо-10,15-фитодиеновой кислоты. Разнообразие дивиниловых эфиров у данного растения является наибольшим среди всех изученных растений в настоящее время. Не исключено, что семейство CYP74 плаунков (как *S. martensii*, так и *S. moellendorffii*) включает несколько различных дивинилэфирсинтаз, что является исключением, поскольку все изученные к настоящему времени виды растений включают по одной дивинилэфирсинтазе, иногда представленной несколькими изоформами. Наиболее вероятными кандидатами на роль дивинилэфирсинтаз у *S. moellendorffii* являются ферменты подсемейства CYP74M, поскольку первичная структура этих ферментов содержит ряд характерных для данного типа катализа аминокислотных остатков в каталитически важных сайтах.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящего исследования является получение и характеристика структурно-функциональных свойств цитохромов P450 подсемейства CYP74M плаунка *Selaginella moellendorffii*. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Клонирование открытых рамок считывания генов, кодирующих ферменты подсемейства CYP74M плаунка *S. moellendorffii*.
2. Получение очищенных препаратов функционально активных рекомбинантных ферментов подсемейства CYP74M плаунка *S. moellendorffii*.
3. Определение субстратной специфичности ферментов подсемейства CYP74M плаунка *S. moellendorffii*, а также кинетических параметров катализируемых ими реакций.
4. Определение продуктов каталитического действия рекомбинантных ферментов подсемейства CYP74M плаунка *S. moellendorffii*. Расшифровка детальной структуры этих продуктов методом ЯМР.
5. Характеристика биологической активности продуктов каталитического действия ферментов подсемейства CYP74M плаунка *S. moellendorffii*.

**Научная новизна работы.** Впервые были клонированы гены и охарактеризованы соответствующие рекомбинантные ферменты подсемейства CYP74M плаунка *S. moellendorffii*: ферменты CYP74M1 и CYP74M3 являются 13-специфичными дивинилэфирсинтазами (SmDES1 и SmDES2, соответственно), тогда как фермент CYP74M2 – 13-специфичной эпоксиалкогольсинтазой (SmEAS). Это первые охарактеризованные дивинилэфирсинтазы и эпоксиалкогольсинтаза у споровых растений. При этом SmDES1 катализирует образование преимущественно (11Z)-этероле(но)вой кислоты, тогда как SmDES2 – преимущественно этероле(но)вой

кислоты. В обоих случаях минорным продуктом является ( $\omega$ 5Z)-этероле(но)вая кислота. Биосинтез (11Z)-этероле(но)вой кислоты был охарактеризован впервые. Фермент SmEAS катализирует превращение 13-гидроперекиси линолевой кислоты в три эпимерных оксиранил карбинола в соотношении 4:2:1, а именно – (11R,12S,13S), (11R,12R,13S) и (11S,12S,13S) эпимера (9Z)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты.

Впервые продемонстрировано бактерицидное действие ( $\omega$ 5Z)-этероленовой кислоты и бактериостатическое действие (11Z)-этероленовой и этероленовой кислот в отношении фитопатогенных штаммов бактерий *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043, *Xanthomonas campestris ssp. vesicatoria* и *Pseudomonas syringae ssp. tomato*, что свидетельствует о влиянии геометрии единственной двойной связи на биологические свойства дивиниловых эфиров.

**Научно-практическая значимость работы.** Результаты работы вносят вклад в понимание механизмов регуляции метаболических процессов в живых системах в процессе роста и развития, а также в процессе взаимодействия со средой обитания. Были охарактеризованы бактерицидные и бактериостатические свойства нескольких дивиниловых эфиров: этероленовой, (11Z)-этероленовой и ( $\omega$ 5Z)-этероленовой кислот. Охарактеризованы ферменты, катализирующие образование этих дивиниловых эфиров, а также других оксипинов, обладающих, по данным литературы, фунгицидными свойствами – эпокси-гидрокси- (эпоксиспирты) и тригидрокси-производных полиненасыщенных жирных кислот. Разработаны системы получения и препаративной очистки цитохромов растений, способные найти применение в промышленности, поскольку цитохромы P450 имеют важное значение в жизни всех организмов, за исключением облигатных анаэробов. Они могут метаболизировать множество природных и искусственных соединений и оказывать как положительный, так и отрицательный эффект на здоровье организма. При этом цитохромы P450 семейства CYP74 практически не могут быть извлечены из растений, так как они присутствуют в тканях в незначительных количествах. Эти ферменты довольно неустойчивы, легко теряют активность во время очистки. В связи с этим, для любого исследования данных ферментов необходимо получать рекомбинантные белки. Оксипины также довольно неустойчивые соединения. Их синтез химическим путем практически невозможен. Поэтому наилучшим вариантом получения оксипинов является воспроизведение естественной реакции биосинтеза этих соединений.

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в учреждениях медицинского, сельскохозяйственного, биологического и биотехнологического профилей, занимающихся получением рекомбинантных ферментов, исследованием взаимосвязи структуры и функций белков, а также в учебном процессе при чтении курсов лекций по биохимии, физиологии растений и молекулярной биологии в ВУЗах.

**Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование.** Работа проводилась с 2013 по 2019 гг. в соответствии с планом научных исследований КИББ ФИЦ КазНЦ РАН по теме «Развитие геномных и

постгеномных исследований для выяснения молекулярных механизмов функционирования живых систем и создания организмов с заданными свойствами» (гос. регистрационный номер АААА-А18-118022790082-2). Исследования автора частично поддержаны грантами РФФИ № 12-04-01140, № 12-04-97059, № 14-04-01532, МК-4886.2013.4, МК-6529.2015.4, РФФИ 16-14-10286, РФФИ № 18-34-01012 мол\_а. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

**Положения, выносимые на защиту:**

1) Ферменты SmDES1 (CYP74M1) и SmDES2 (CYP74M3) являются первыми охарактеризованными дивинилэфирсинтазами споровых растений. Ферменты SmDES1 и SmDES2 катализируют превращение 13-гидроперекисей линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот в дивиниловые эфиры: SmDES1 – в (11Z)-этеролевою и (11Z)-этероленовую кислоты, SmDES2 – в этеролевою и этероленовую кислоты. В обоих случаях минорным продуктом является ( $\omega$ 5Z)-этероле(но)вая кислота.

2) Фермент SmEAS (CYP74M2) является первой охарактеризованной растительной эпоксиалкогольсинтазой, согласно требованиям номенклатуры входящей в состав семейства CYP74. Фермент SmEAS катализирует превращение 13-гидроперекиси линолевой кислоты в три эпимера оксиранил карбинола(9Z)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты: (11R,12S,13S), (11R,12R,13S) и (11S,12S,13S).

3) В отношении клеток *Xanthomonas campestris ssp. vesicatoria*, *Pseudomonas syringae ssp. tomato* и *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 ( $\omega$ 5Z)-этероленовая кислота обладает бактерицидными свойствами, тогда как этероленовая и (11Z)-этероленовая кислоты – бактериостатическими свойствами.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы доложены на конференции FEBS EMBO 2014 (Франция, Париж, 2014); 18-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых: «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (Пущино, 2014); на Зимней молодежной школе по биофизике и молекулярной биологии «Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова» (Санкт-Петербург, Репино, 2015); на международной конференции по биологии «The 18th Symposium of Biology Students in Europe» (Греция, Александруполис, 2015); на V Съезде биохимиков России (Сочи, 2016); на V международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Крым, Ялта, 2017); на конференции «Липиды XXI века. Первая четверть» (Москва, 2018); на конференции EMBO «New shores in land plant evolution» (Portugal, Lisbon, 2018), а также на итоговой конференции Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Казанского научного центра РАН» (Казань, 2015, 2018).

**Публикации по результатам работы.** По результатам работы опубликованы две статьи в зарубежных и одна статья в отечественном рецензируемых изданиях.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 158 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения,

выводов, списка литературы. В работе представлено 9 таблиц, 33 рисунка. Список литературы включает 245 источников, из которых 237 – иностранных.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

Приведенный в работе обзор литературных данных свидетельствует о том, что ферменты CYP74 играют центральную роль в липоксигеназном каскаде растений. Они контролируют превращение (дегидратацию и изомеризацию) гидроперекисей жирных кислот в ряд оксипинов, включающих в себя биоактивные соединения, такие как жасмонаты, дивиниловые эфиры, альдегиды, эпокси спирты и др. К настоящему времени опубликовано большое число работ, посвященных изучению механизмов каталитического действия, локализации в клетке, пространственных структур, а также определению значения отдельных структурных компонентов (доменов) в формировании определенного типа катализа. Ряд работ посвящен изучению физиологического значения продуктов каталитического действия этих ферментов и динамики экспрессии генов семейства CYP74 в различных условиях. Однако основная часть работ посвящена изучению АОС и ГПЛ ветвей липоксигеназного каскада, в то время как ДЭС и ЭАС ветви остаются малоизученными.

Семейство CYP74 традиционно считалось характерным для представителей царства цветковых растений. Однако если АОС и ГПЛ найдены у разных представителей этого царства, то ДЭС выявлены только у некоторых филогенетически отдаленных видов растений. Мы предположили, что семейство CYP74 *S. moellendorffii* включает несколько различных дивинилэфирсинтаз, поскольку в тканях этого растения содержатся несколько разных дивиниловых эфиров. Это является исключением, поскольку все изученные к настоящему времени виды растений включают по одной дивинилэфирсинтазе, которые иногда могут быть представлены несколькими изоформами. Наиболее вероятными кандидатами на роль дивинилэфирсинтаз у *S. moellendorffii* являются ферменты подсемейства CYP74M, поскольку первичная структура этих ферментов содержит ряд характерных для данного типа катализа аминокислотных остатков в каталитически важных сайтах.

Эпоксиалкогольсинтазы являются наименее изученными ферментами из всех ферментов CYP74. К настоящему времени описано три эпоксиалкогольсинтазы: VfEAS (CYP440A1) ланцетника (Lee *et al.*, 2008), EsEAS (CYP5164B1) бурой водоросли *E. siliculosus* (Toporkova *et al.*, 2017a) и NvEAS (CYP443D1) актинии *N. vectensis* (Toporkova *et al.*, 2017b). Исходя из структурных, механистических и филогенетических особенностей, эти ферменты относятся к клану CYP74, но, согласно требованиям номенклатуры, не к семейству CYP74. До сих пор не было описано ни одной растительной эпоксиалкогольсинтазы, несмотря на то, что эта ветвь липоксигеназного каскада описана у растений давно (Kato *et al.*, 1993).

Кроме того, открытым остается вопрос о происхождении ферментов CYP74. Данные, полученные в последние годы свидетельствуют о гораздо более древнем происхождении ферментов CYP74, чем это предполагалось ранее. Особенности структуры ферментов CYP74 и механизм их каталитического действия подтверждают

данный факт. Ферменты клана CYP74 выявлены у широкого ряда организмов из разных таксонов, в том числе у морских животных (Lee *et al.*, 2008), растений (Hughes *et al.*, 2009), протеобактерий (Lee *et al.*, 2008), водорослей. Эти данные позволили выдвинуть гипотезу о существенной роли событий горизонтального переноса генов в эволюционной истории клана CYP74 (Nelson, Werck-Reichhart, 2011; Nelson *et al.*, 2013). Так как плаунок *S. moellendorffii* является одним из древнейших сосудистых растений, живущих в настоящее время, и переходной формой от мхов к папоротникам, то исследование ферментов CYP74 этого растения может пролить свет на вопрос происхождения этого семейства и развитие липоксигеназной сигнальной системы в целом.

## Глава 2. Материалы и методы исследования

**2.1. Методы биоинформатики.** Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей представителей клана CYP74 проводили с использованием баз данных National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) и Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Сопоставление нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с базами данных проводили с использованием программы BLAST. Анализ нуклеотидных последовательностей, множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, конструирование олигонуклеотидных праймеров проводили с помощью программы Vector NTI Advance 9 (Invitrogen, США). Праймеры синтезировали в ЗАО «Евроген» (Россия). Филогенетические деревья конструировали с помощью программы MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) методом «Neighbor-Joining». Древо визуализировали с помощью программного обеспечения iTOL v4. Interactive Tree Of Life, режим отображения – Circular.

**2.2. Молекулярно-биологические методы.** Растения плауника *Selaginella moellendorffii* Hieron были предоставлены Университетом Пердью (Уэст-Лафейетт, США). Зеленые части растений *S. moellendorffii* собирали, замораживали и гомогенизировали, растирая в фарфоровой ступке в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с помощью коммерческого набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США). После выделения препарат подвергали обработке ДНКазой (Qiagen, США). Качество выделенной РНК оценивали по спектрам электрофоретического разделения в агарозном геле после окрашивания бромистым этидием. Концентрацию РНК определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США). Для постановки реакции обратной транскрипции и получения двуцепочечной кДНК (дц-кДНК) использовали коммерческий набор MINT (Евроген, Москва). Для амплификации открытых рамок считывания (ОРС) генов, кодирующих ферменты CYP74M1, CYP74M2 и CYP74M3, а также проверки наличия вставки целевых генов был использован метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Zoller, Smith, 1982). Матрицей для ПЦР служили плазмидные ДНК, выделенные из клеток бактериальных штаммов с использованием коммерческого набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия). ПЦР проводили в амплификаторе DNAEngine (Bio-Rad, США). Анализ ДНК проводили после ее электрофоретического разделения в агарозных гелях с помощью

системы Gel-Doc и пакета программ Quantity One (Bio-Rad, США). Нуклеотидные последовательности определяли и проверяли с помощью ДНК-анализатора ga3130 (Applied Biosystems, США).

**2.3. Получение рекомбинантных ферментов.** В работе использовали векторы системы pET (Novagen, США): pET-32 Ek/LIC и pET-40b, реципиентами которых служили клетки штаммов *E. coli* NovaBlue, BL21(DE3)pLysS и Rosetta-gami(DE3)pLysS В (Novagen, США). Культуры клеток *E. coli* выращивали в питательных средах M9 (Маниатис и др., 1984), SOC и Luria-Bertani (Гловер, 1988). Компетентные клетки *E. coli* для трансформации плазмидами получали с использованием ДМСО (Inoue *et al*, 1990). Нарработку целевого белка индуцировали добавлением в среду 0,5 мМ изопропил- $\beta$ -тиогалактозида; кроме того, в среду добавляли 50 мг/л  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты – предшественник гема. Клеточные лизаты получали путем механического разрушения с помощью системы French Press Cell Disrupter (Thermo Scientific, США). Очистку рекомбинантных белков проводили металлоаффинной хроматографией на колонках Bio-Scale Mini Profinity IMAC в хроматографической системе BioLogic LP (Bio-Rad, США). Целевые белки элюировали Na-фосфатным буфером (pH 7,0), содержащим 30 мМ гистидина. Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле по Лэмбли (Остерман, 1981) в системе PowerPac Universal MiniProtean (Bio-Rad, США). Гели окрашивали Coomassie R250. Ферментативную активность очищенных препаратов целевых ферментов определяли по снижению оптического поглощения субстрата при 234 нм, измеряемого с помощью спектрофотометра РВ 2201 В (Солар, Беларусь).

**2.4. Получение субстратов для исследования каталитического действия целевых ферментов.** 9-Гидроперекиси линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот получали инкубацией соответствующих кислот с рекомбинантной липоксигеназой ZmLOX3 кукурузы. 13-Гидроперекиси линолевой, [1- $^{14}$ C]-линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот получали инкубацией соответствующих кислот с соевой липоксигеназой V типа. Гидроперекиси 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, используя смесь гексана, изопропанола и уксусной кислоты (98.1:1.8:0.1 по объему).

**2.5. Условия проведения и анализ продуктов реакций, катализируемых целевыми ферментами.** Гидроперекись (100 мкг) инкубировали с ферментом 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). Схема подготовки образцов к анализу газовой хромато-масс-спектрометрией была следующей: перерастворение в 1,5 мл метанола; восстановление NaBH<sub>4</sub> в течение 30 мин; метилирование диазометаном; перерастворение в метаноле и гидрирование над PtO<sub>2</sub>; силилирование смесью пиридин/гексаметилдисилазан/триметилхлорсилана (1:1:1 по объему) в течение 30 минут при 23 °С. Готовые продукты растворяли в гексане и подвергали анализу методом ГХ-МС в виде метиловых эфиров ТМС-производных (Me/ТМС) с помощью масс-спектрометра

QP5050A, соединенного с газовым хроматографом GC-17A (Shimadzu, Япония). Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР, 2D-COSY, HSQC, HMBC и NOESY записывали с помощью ЯМР-спектрометра Bruker Avance III 600 (600 MHz, [ $^2\text{H}_6$ ]бензен, 296 K).

## 2.6. Характеристика антибактериальной активности дивиниловых эфиров.

Антибактериальную активность дивиниловых эфиров в отношении фитопатогенных бактерий *Xanthomonas campestris ssp. vesicatoria*, *Pseudomonas syringae ssp. tomato* и *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 определяли методом серийных разведений в жидких средах. Штаммы фитопатогенных бактерий были предоставлены группой В.Ю. Горшкова лаборатории молекулярной биологии КИББ ФИЦ КазНЦ РАН. Бактерии выращивали в среде LB при 28°C и умеренной аэрации (200 об/мин). Культуру клеток, находящуюся на поздней логарифмической фазе роста ( $D_{600} = 1,9$ ;  $2-3 \times 10^9$  клеток/мл) осаждали центрифугированием и ресуспендировали в свежей среде LB с начальной плотностью  $1,0 \times 10^6 \pm 4,5 \times 10^5$  клеток/мл. В клеточные суспензии добавляли растворы дивиниловых эфиров в этаноле до концентрации 0,5; 0,25 и 0,125 мМ и проводили культивирование бактерий при 28°C. Численность жизнеспособных клеток в суспензиях оценивали по титру колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) через 24 и 48 ч культивирования. Контролем служил рост бактерий на среде LB без добавления дивиниловых эфиров, но в присутствии аналогичной концентрации этанола (0,5%), а также рост бактерий на среде LB без дополнительных воздействий. Статистический анализ данных проводили с применением стандартных математических методов (расчет среднеквадратического отклонения, сравнение средних по критерию Стьюдента) в программе Microsoft Excel-2007. Критерий вероятности  $P < 0,05$  принимали достаточным для достоверной разницы опытной и контрольной групп данных.

## Глава 3. Результаты и обсуждение

**3.1. Биоинформационный анализ ферментов СУР74М плаунка *S. moellendorffii*.** Объектами настоящей работы были выбраны ферменты подсемейства СУР74М, поскольку как минимум у двух ферментов этого подсемейства (ферменты СУР74М1 и СУР74М3) особенности первичной структуры каталитически важных доменов позволяют предположить их принадлежность к дивинилэфирсинтазам (Рис. 1). При этом анализ с помощью программы BLAST показал, что последовательности исследуемых ферментов наиболее сходны (около 40% при покрытии более 90%) с 13-специфичными АОС, такими как PrAOS1 (GenBank: CAC86919).

Все представители семейства СУР74 имеют несколько каталитически важных доменов, последовательности которых являются консервативными для ферментов, проявляющих определенный тип каталитической активности. Одним из таких участков является так называемый сайт «F/L toggle», который располагается внутри СРС-1. В этом сайте у всех АОС и ЭАС находится остаток фенилаланина, тогда как у ГПЛ и ДЭС – остаток лейцина. Замена фенилаланина на лейцин (и наоборот) в данном сайте у разных ферментов СУР74 влечет за собой изменение в механизме каталитического действия (Lee *et al.*, 2008; Toporkova *et al.*, 2018). У ферментов СУР74М1 и СУР74М3 в данном сайте находится остаток лейцина, тогда как у фермента СУР74М2 – остаток фенилаланина (Рис. 1).

CYP74M1	(85)	AKVDKRD	TLIGSYMPDLA	(257)	TKYGLDREEALHNLVFS	FGINTRLGLLKMFPPI	FFFIARAG
CYP74M3	(94)	SKVDKSD	TLGPIYIPNLA	(270)	KKYGLDREETVHQILIL	ILGINARLGLHKMIPALI	YYLGLLG
RaDES	(96)	DKVDKERGL	LGTFFMPDLD	(271)	EKLGMRDEAVHNLIMCL	FFNGSTGFRVFPYIMFK	WIGLAG
AsDES	(89)	SKVSKVNSL	TGNYPALS	(256)	EEIGLSREEAIHHLIFT	WAINAYLGI RTCLMRL	FKWIVASG
CaDES	(87)	TLIDKTD	TLGGTFKPGKE	(262)	EKLGIKREEAVHNMFL	LVGINMFAGLNAFFPHL	IRFVGEAG
LeDES	(87)	SLIDKTD	TLGGTFKPGKE	(262)	EKLGIKREEAVQNILFL	LVGINMFAGLNAFFPHL	IRFVGEAG
StDES	(87)	SLIDKTD	TLGGTFKPGKE	(262)	EKLGIKREEAVQNILFL	LVGINMFAGLNAFFPHL	IRFVGEAG
NtDES	(88)	SLIDKTD	TLGGTFKPGKE	(263)	EKLGIKREEAVHNLFL	LVGINMFAGLNAFFPHL	IRFVGEAG
LuDES	(94)	EIADKKD	TLGGDFMPSVG	(269)	TEYGLTEEEAIHNLFL	VLA FNSEFGFTLFI	PKLLTRLLSDS
CaHPL	(97)	EIVEKANV	LVGDFMPSV	(271)	TDFQLTEQEAIHNLFL	FILGFNAFGGFTIFL	PTLLGNLGDEK
NaHPL	(113)	EIVEKANV	LVGDFMPSVK	(287)	SEFGLTEQEAIHNLFL	FILGFNAFGGFSIFL	PTLLGNLGDEK
NtHPL	(114)	EIVEKANV	LVGDFMPSVQ	(288)	SEFGLTEQEAIHNLFL	FILGFNAFGGFSIFL	PTLLGNLGDEK
MtHPL	(89)	AKVEKRD	VLDGTFMPSTD	(265)	EKMGIKREEACHNLV	FTLGFNAFGGLTNQ	FPILIKWVGLAG
CmHPL	(88)	AKVEKRN	ILDGTYPMSLS	(263)	EKQGIKREEACHNLV	FLAGFNAYGGMKVLF	PPTLLKWWGTAG
PdHPL	(91)	TKVLRRD	VLDGTYPMSTA	(267)	GKFGLSREEACHNLV	FVAGFNAYGGMKLLF	FPALIKWVASGG
LeAOS3	(100)	SQVDKENY	FEGETFMSSPS	(276)	EKLGVKRDEACHNFV	FLAGFNAYGGKLVFF	PSLIKWIGTSG
AtAOS	(129)	DKVEKDL	FTGTYPMPSTE	(301)	DRLGISREEATHNLL	FATCFNTFNGMKILF	PNMVKRIGRAG
GmAOS	(135)	SKVDKRD	VFTGTTFMPSTQ	(307)	ERLGITRDEACHNLL	FATCFNSFGGMKLF	FPNVLKWI GRAG
LuAOS	(147)	SKVEKDL	FTGTYPMPSTE	(319)	EQSGISRDEACHNIL	FAVCFNSWGGFKILF	PSLMKWIGRAG
NaAOS	(132)	SKVEKDL	FTGTTFMPSTE	(304)	GNFGISRDEACHNLL	FATCFNSFGGMKIF	FPNMLKW IARAG
PpAOS2	(85)	NKCEKRD	FLGTYPDLS	(260)	VALGIKRDDAIANLL	FLLGFNAYGGFNFF	FPQLTGHIAQCG
PaAOS	(84)	SKVEKDL	FTGTYPMPSTK	(256)	EKLGVPKDEAVHNL	FAVCFNTFNGVKIL	FPNTLKWIGLAG
CYP74M2	(87)	SKVDKSD	TFGTAMPSTA	(260)	SKYGLDREEAVHQLV	FCFGVNARVGLMKKI	PVMVYYIAKMG
NvEAS	(70)	NKVEKEE	FGSFRFNKDL	(226)	EKFGISHEEAVLEIL	WMLNFNASPGTGA	MRSAAARLSIMS
BfEAS	(52)	LFKKEEF	CGVAEVRDRF	(204)	HAYGLGEAETTAQL	LLPVFFNGVAGIRAN	LVSSFARLDTIS

Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей каталитически важных доменов, а именно – «F/L toggle» (слева) и ГСД (справа) ферментов CYP74M1, CYP74M2, CYP74M3 и других ферментов CYP74, включая АОС, ГПЛ, ДЭС и ЭАС из разных подсемейств. Домен ГСД и «F-L toggle» выделены серым цветом. Остаток глицина непосредственно после домена ГСД, консервативный для всех АОС и ГПЛ, но замененный на другой аминокислотный остаток у ДЭС, выделен розовым цветом.

Другим каталитически важным доменом является гидропероксид-связывающий домен (ГСД) в центре I-спирали, который соответствует "кислород-связывающему и активирующему домену" монооксигеназ. Во втором положении этого домена у ферментов CYP74M1 и CYP74M3 содержится остаток глицина, так же как в последовательностях ДЭС представителей семейства Solanaceae (подсемейство CYP74D), всех известных ГПЛ, а также АОС мхов и подсемейства CYP74C. В третьем положении домена ГСД практически все дивинилэфирсинтазы содержат остаток изолейцина. Исключением являются дивинилэфирсинтазы LuDES льна-долгунца и RaDES лютика едкого, у которых в данном сайте находится остаток фенилаланина. Наличие остатка фенилаланина в данной позиции является консервативным почти для всех ГПЛ и АОС. Ферменты CYP74M1 и CYP74M3 в третьей позиции ГСД содержат остаток изолейцина (Pe276 и Pe289). В шестом сайте домена ГСД почти у всех представителей семейства CYP74 находится остаток ароматической аминокислоты (тирозина или фенилаланина). У исследуемых ферментов в этом сайте находится остаток аргинина. У всех АОС и ГПЛ непосредственно после домена ГСД находятся два консервативных остатка глицина. Замена первого остатка глицина является характерной особенностью для всех ДЭС. Было показано, что этот сайт имеет большое значение для каталитического действия ДЭС (Toporkova *et al.*, 2013). У ферментов CYP74M1 и CYP74M3 в данном

положении находится остаток лейцина, так же как у дивинилэфирсинтазы AsDES чеснока. Таким образом, структурные особенности указывают на вероятность принадлежности ферментов СУР74М1 и СУР74М3 к дивинилэфирсинтазам.

У фермента СУР74М2 структура домена ГСД отличается (Рис. 1). В первом сайте этого домена, так же как у фермента СУР74М1, находится остаток фенилаланина (Phe277). В третьем положении этого домена находится остаток валина, что является нетипичным для ферментов СУР74. В шестом сайте домена ГСД фермент СУР74М2, так же как и ферменты СУР74М1 и СУР74М3, содержит остаток аргинина. Первый остаток глицина непосредственно после домена ГСД у фермента СУР74М2 также заменен другим аминокислотным остатком, однако в отличие от ферментов СУР74М1 и СУР74М3, фермент СУР74М2 в данном сайте содержит остаток валина. Таким образом, по последовательности домена ГСД фермента СУР74М2 невозможно предположить тип каталитической активности этого фермента. В целом, полученные данные позволили предположить, что ферменты подсемейства СУР74М *S. moellendorffii* не являются алленоксидсинтазами или гидропероксидлиазами.

### 3.2. Получение очищенных препаратов рекомбинантных белков СУР74М1, СУР74М2 и СУР74М3.

Описанная выше методика позволила достигнуть необходимого качества очистки полученных белковых препаратов, чтобы использовать их в детальных исследованиях каталитических свойств ферментов СУР74М1, СУР74М2 и СУР74М3 (Рис. 2).

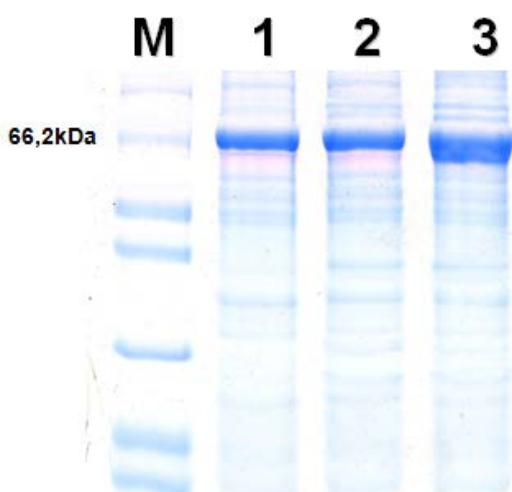


Рис. 2. Электрофореграмма очищенных рекомбинантных ферментов СУР74М1 (1), СУР74М2 (2) и СУР74М3(3). М – маркер Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker 26610 (Thermo Fisher Scientific, США).

### 3.3. Исследование субстратной специфичности и кинетических параметров реакций, катализируемых рекомбинантными ферментами СУР74М1, СУР74М2 и СУР74М3.

Данные кинетики свидетельствуют, что предпочтительными субстратами для ферментов СУР74М1, СУР74М2 и СУР74М3 являются 13-гидроперекиси линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот (Таблица 1).

Исходя из значений константы Михаэлиса ( $K_M$ ), можно заключить, что сродство фермента СУР74М1 к 13-ГПОТ выше, чем к 13-ГПОД. В то же время, константа каталитическая ( $k_{cat}$ ) реакции превращения 13-ГПОД при участии фермента СУР74М1 выше, чем  $k_{cat}$  реакции превращения 13-ГПОТ. Соотношение  $k_{cat}/K_M$  свидетельствует о том, что 13-ГПОТ является предпочтительным субстратом для фермента СУР74М1. В отличие от этого, фермент СУР74М3 имеет большее сродство к 13-ГПОД, чем к 13-ГПОТ. При этом  $k_{cat}$  реакции превращения 13-ГПОД при участии фермента СУР74М3 ниже, чем  $k_{cat}$  реакции превращения 13-ГПОТ. Примерно равные соотношения  $k_{cat}/K_M$

свидетельствуют о том, что оба субстрата являются одинаково предпочтительными для фермента СУР74М3.

Субстратные предпочтения рекомбинантного фермента СУР74М2 аналогичны предпочтениям других ферментов подсемейства СУР74М. Кроме того, данный фермент был также активен в отношении 9-ГПОД, однако данный субстрат был менее предпочтительным, чем 13-гидроперекиси. Из значений  $K_M$  видно, что сродство рекомбинантного белка к 13-ГПОТ намного выше, чем к 13-ГПОД и 9-ГПОД. В то же время,  $k_{cat}$  реакции превращения 13-ГПОД при участии фермента СУР74М2 выше, чем  $k_{cat}$  реакции превращения 13-ГПОТ. В целом, соотношение  $k_{cat}/K_M$  свидетельствует о том, что 13-ГПОТ является предпочтительным субстратом для фермента СУР74М2. В отношении 9-ГПОТ ферменты подсемейства СУР74М не проявляли активности.

Таблица 1. Кинетические параметры и субстратная специфичность рекомбинантных ферментов СУР74М1, СУР74М2 и СУР74М3.

Субстрат	Фермент	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (μM)	$k_{cat}/K_M$ (μM <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )	Специфичность, %
13-ГПОТ	СУР74М1	185,3 ± 4,2	11,4 ± 1,9	16,2	100
	СУР74М2	75,42 ± 7,5	17,33 ± 1,7	4,35	100
	СУР74М3	266,7 ± 7,1	89,3 ± 5,0	2,99	100
13-ГПОД	СУР74М1	261,1 ± 5,3	70,3 ± 7,6	3,71	22,9
	СУР74М2	131,90 ± 13,1	57,78 ± 5,8	2,28	52,48
	СУР74М3	193,5 ± 3,6	72,3 ± 3,2	2,68	89,63
9-ГПОТ	СУР74М1	не выявлено	не выявлено	0	0
	СУР74М2	не выявлено	не выявлено	0	0
	СУР74М3	не выявлено	не выявлено	0	0
9-ГПОД	СУР74М1	не выявлено	не выявлено	0	0
	СУР74М2	22,91 ± 2,3	164,02 ± 8,2	0,14	3,21
	СУР74М3	не выявлено	не выявлено	0	0

**3.4. Идентификация продуктов каталитического действия рекомбинантных ферментов СУР74М1 и СУР74М3.** Для определения структуры продукты инкубаций гидроперекисей с рекомбинантными ферментами модифицировали и подвергали анализу методами ВЭЖХ и ГХ-МС в виде Me или Me/TMS. Инкубация фермента СУР74М1 с 13-ГПОД приводила к образованию основного продукта **1** (Рис. 3А), масс-спектр которого содержал M<sup>+</sup> при  $m/z$  308 (15%), [M – MeO]<sup>+</sup> при  $m/z$  277 (2%), [M – Me(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> при  $m/z$  251 (2%),  $m/z$  177 (9%), [M – (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>COOMe]<sup>+</sup> при  $m/z$  165 (15%),  $m/z$  159 (13%),  $m/z$  135 (21%),  $m/z$  95 (41%),  $m/z$  81 (73%) и  $m/z$  67 (100%). Время выхода этого соединения 19,80 мин соответствовало таковому (11Z)-этеролевой кислоты (Me). Масс-спектр соединения **1** совпадал со спектрами других изомеров этеролевой кислоты (Me). Поэтому для дальнейшей идентификации структуру соединения **1** исследовали методом ЯМР. Спектральные параметры, в частности, значения констант спин-спинового взаимодействия  $J_{11,12} = 6,3$  Гц и  $J_{1,2} =$

12,2 Гц однозначно подтвердили *цис*- и *транс*-конфигурации соответственно соответствующих двойных связей и общую структуру (9*Z*,11*Z*)-12-[(1'*E*)-гексенилокси]-9,11-додекадиеновой кислоты, то есть (11*Z*)-этеролеовой кислоты (Me) для соединения **1**.

Кроме соединения **1** в результате инкубации фермента СУР74М1 с 13-ГПОД в небольших количествах образовывались соединения **3** и **5**. Масс-спектр продукта **3** ( $M^+$  при  $m/z$  308) практически совпадал с таковым соединения **1**. Время выхода продукта **3** 19,56 мин соответствовало таковому этеролеовой кислоты (Me). Данные ЯМР для продукта **3** выявили наличие трех двойных связей с конфигурацией (9*Z*,11*E*,1'*E*) с эфирным мостиком между C12 и C1'. Полученные результаты позволили идентифицировать соединение **3** как этеролеовую кислоту, (9*Z*,11*E*)-12-[(1'*E*)-гексенилокси]-9,11-додекадиеновую кислоту (Me). Масс-спектр соединения **5** содержал  $M^+$  при  $m/z$  308 (14%), [ $M^+ - OCH_3$ ] при  $m/z$  277 (1%), [ $M^+ - (CH_2)_3-CH_3$ ] при  $m/z$  251 (4%), [ $M^+ - (CH_2)_6- COOCH_3$ ] при  $m/z$  165 (16%), 159 (18%), 135 (33%), 81 (78%), 67 (89%), и 55 (100%). Данный масс-спектр соответствовал таковому ( $\omega$ 5*Z*)-этеролеовой кислоты (Hamberg *et al.*, 1998; Chechetkin *et al.*, 2008).

Анализ методом ВЭЖХ продуктов (Me) инкубации СУР74М3 с 13-ГПОД

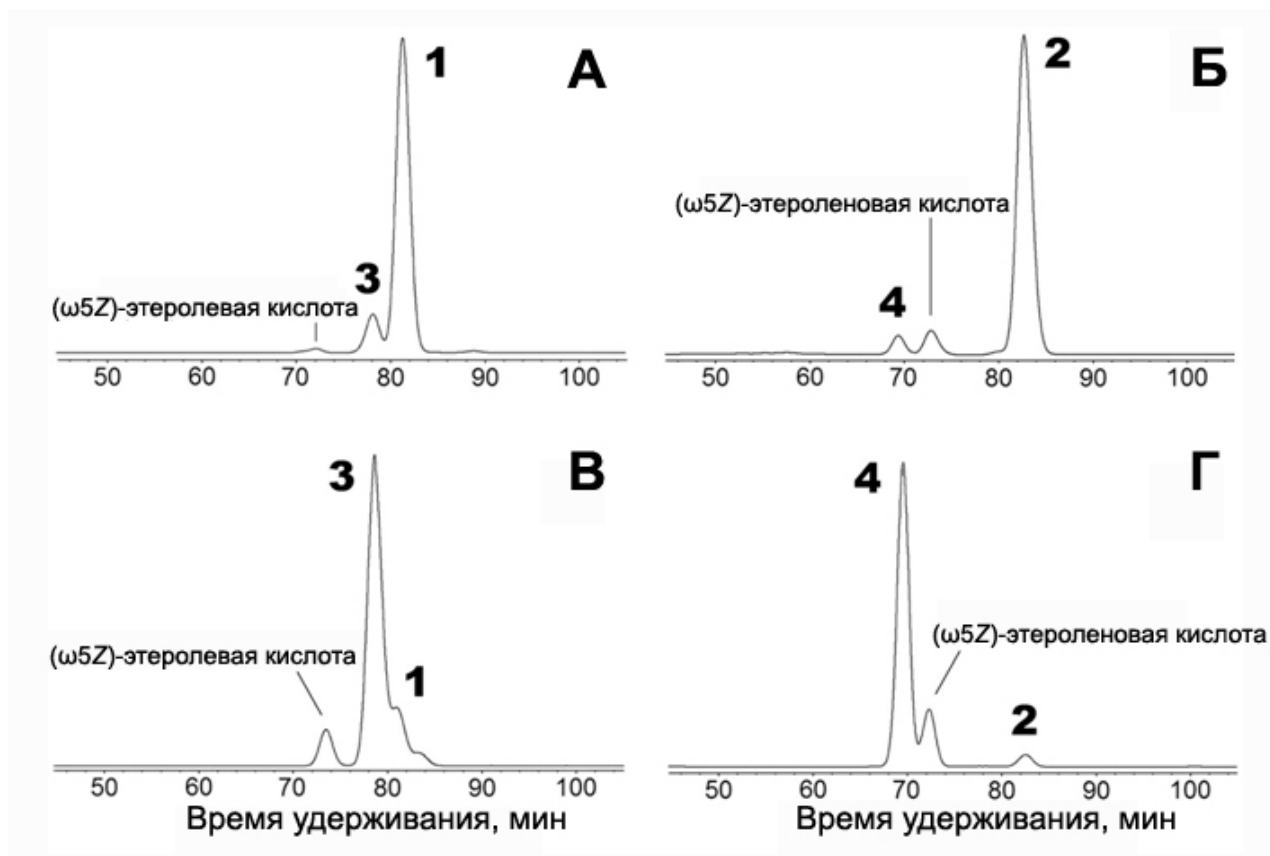


Рис. 3. Результат разделения методом ВЭЖХ на нормальной фазе продуктов (Me) превращения 13-ГПОД (А и В) и 13-ГПОТ (Б и Г) при участии ферментов СУР74М1 (А и Б) и СУР74М3 (В и Г). Инкубации гидроперекисей с ферментами проводили при рН 7,5, 23°C, в течение 15 мин. Продукты экстрагировали и метилировали диазометаном. Полученные метиловые эфиры разделяли и очищали методом ВЭЖХ на нормальной фазе при ультрафиолетовой детекции с помощью детектора с диодной матрицей. Представлены хроматограммы при длинах волн 250 нм (А и В) и 267 нм (Б и Г).

выявил преобладающий пик **3** (Рис. 3В). Дополнительными минорными продуктами превращения 13-ГПОД при участии фермента СУР74М3 были соединения **1** и **5**.

В результате инкубации фермента СУР74М1 с 13-ГПОТ образовывался основной продукт **2** (Рис. 3Б), масс-спектр которого содержал  $M^+$  при  $m/z$  306 (32%),  $[M - Et]^+$  при  $m/z$  277 (2%),  $[M - MeO]^+$  при  $m/z$  275 (3%),  $[277 - MeOH]^+$  при  $m/z$  245 (3%),  $[M - (CH_2)_7COOMe]^+$  при  $m/z$  149 (26%),  $m/z$  131 (35%),  $m/z$  95 (49%),  $m/z$  81 (100%). Время выхода этого соединения 20,22 мин и масс-спектр соответствовали таковым (11Z)-этеролоеновой кислоты (Me). Значения констант спин-спинового взаимодействия  $J_{11,12} = 6,2$  Гц и  $J_{1,2} = 12,0$  Гц соединения **2** были почти такими же, как в случае соединения **1**, что позволило предположить *цис*- и *транс*-конфигурации соответствующих двойных связей. Три двойных связи соединения **2** и **1** имели одинаковую конфигурацию (9Z,11Z,1E). Единственное различие было в дополнительной двойной связи (3Z) у соединения **2** ( $J_{3,4} = 10,8$  Гц). Данные ЯМР полностью подтвердили структуру (11Z)-этеролоеновой кислоты, (9Z,11Z)-12-[(1'E,3'Z)-гексаденилокси]-9,11-додекадиеновой кислоты (Me). Минорными продуктами данной реакции являлись соединения **4** и **6**. Масс-спектр продукта **4** практически совпадал с таковым (11Z)-этеролоеновой кислоты (соединение **2**); время выхода 20,05 мин соответствовало таковому этеролоеновой и ( $\omega$ 5Z)-этеролоеновой кислот, которые коэлюируют в данных условиях на колонке с 5% фенила и 95% метилполисилоксана. Данные ЯМР выявили наличие четырех двойных связей с конфигурациями (9Z,11E,1'E,3'Z). Полученные данные позволили идентифицировать соединение **4** как этеролоеновую кислоту, (9Z,11E)-12-[(1'E,3'Z)-гексаденилокси]-9,11-додекадиеновую кислоту. Масс-спектр соединения **6** содержал  $M^+$  при  $m/z$  306 (15%),  $[M^+ - C_2H_5]$  при  $m/z$  277 (2%),  $[M^+ - OCH_3]$  при  $m/z$  275 (2%),  $[M^+ - (CH_2)_6COOCH_3]$  при  $m/z$  163 (9%), 149 (27.88%), 131 (38%), 107 (36.42%), 81 (100%), и (83%), что указывает на структуру ( $\omega$ 5Z)-этеролоеновой кислоты (Hamberg *et al.*, 1998; Chechetkin *et al.*, 2008).

В результате анализа методом ВЭЖХ продуктов инкубации фермента СУР74М3 с 13-ГПОТ был выявлен основной продукт **4** (Рис. 3Г). Помимо этого соединения, в реакции образовывалось около 20% соединения **6**, а также минорное количество (11Z)-этеролоеновой кислоты.

На рисунке 4 представлены полные структуры всех соединений, синтезируемых в результате инкубации ферментов СУР74М1 и СУР74М3 с 13-гидроперекисями линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот. Таким образом, ферменты СУР74М1 и СУР74М3 являются 13-специфичными дивинилэфирсинтазами. Данным ферментам были присвоены следующие названия: SmDES1 (СУР74М1) и SmDES2 (СУР74М3).

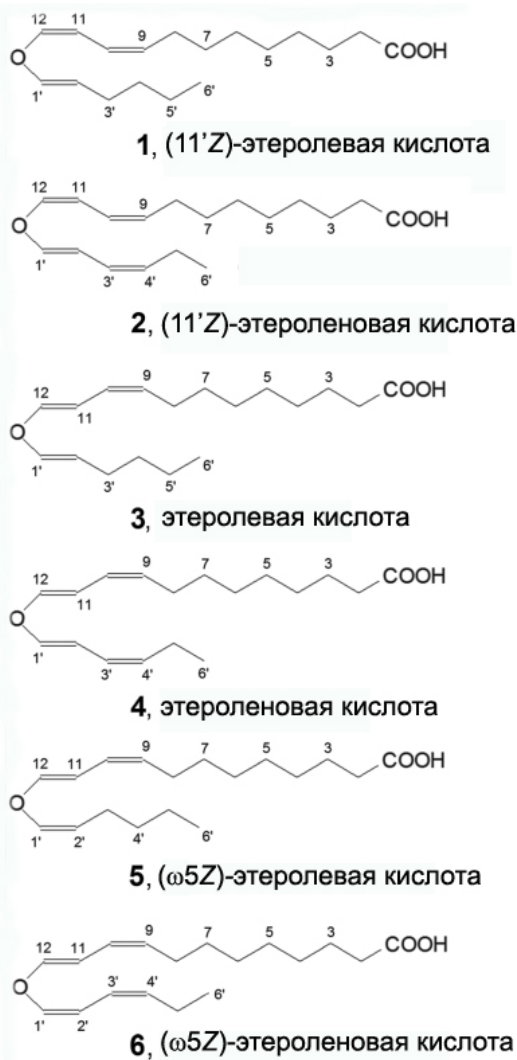
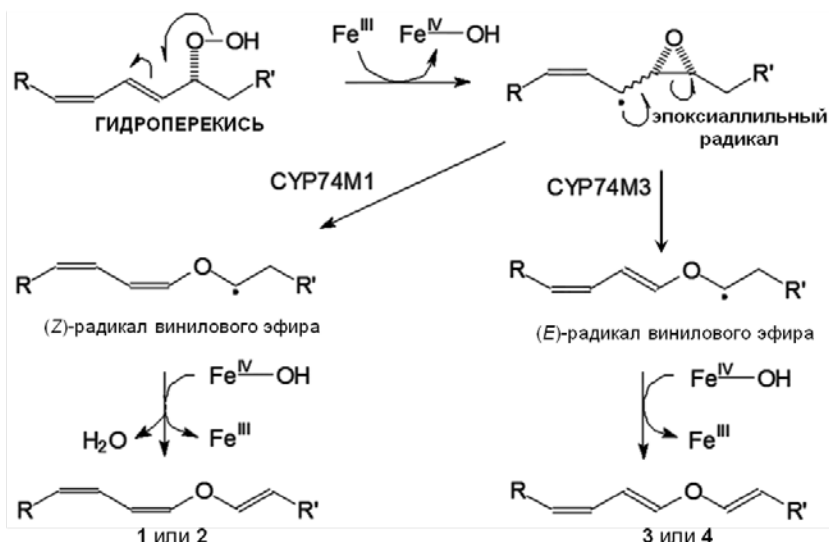


Рис. 4. Структурные формулы продуктов каталитического действия ферментов СУР74М1 и СУР74М3. **1**, (11Z)-этеролевая кислота; **2**, (11Z)-этероленовая кислота; **3**, этеролевая кислота; **4**, этероленовая кислота; **5**, ( $\omega$ 5Z)-этеролевая кислота; **6**, ( $\omega$ 5Z)-этероленовая кислота.

Рис. 5. Схема механизма реакции превращения 13-ГПОД и 13-ГПОТ в основные продукты при участии SmDES1 (СУР74М1) и SmDES2 (СУР74М3). R = HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-. R' = n-бутил (в случае 13-ГПОД); R' = (1Z)-бутенил (в случае 13-ГПОТ). **1**, (11Z)-этеролевая кислота; **2**, (11Z)-этероленовая кислота; **3**,

Дивинилэфирсинтазы, также как и алленоксидсинтазы, являются дегидратазами. Эпоксиаллильный радикал (Рис. 5) является общим промежуточным продуктом превращения гидроперекисей жирных кислот при участии ферментов СУР74 (Brash, 2009; Lee *et al.*, 2008; Grechkin, 2002).

**3.5. Идентификация продуктов каталитического действия рекомбинантного фермента СУР74М2.** Для определения продуктов инкубации гидроперекисей с рекомбинантным ферментом СУР74М2 их анализировали методами ГХ-МС в виде Me/TМС и ЯМР в виде Me эфиров. Структурные формулы представлены на рисунке 6. Для фермента СУР74М2 предпочтительным субстратом является 13-ГПОД (таблица 1). Основными продуктами превращения 13-ГПОД были соединения **7**, **8** и **9**, синтезируемые в соотношении 4:2:1 (Рис. 7А). Их масс-спектры были почти одинаковыми и содержали M<sup>+</sup> при *m/z* 398 (0,4%); [M – Me]<sup>+</sup> при *m/z* 383 (0,3%); [M – MeОН]<sup>+</sup> при *m/z* 367 (0,1%); [M – n-пентил]<sup>+</sup> при *m/z* 327 (4%); [M – C<sub>12</sub>/C<sub>18</sub>]<sup>+</sup> при *m/z* 285 (77%); *m/z* 163 (16%); [ТМС]<sup>+</sup> при *m/z* 73 (100%) (Рис. 7Б). Данные спектры совпадали с таковыми (9Z)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты (Me/TМС) (Hamberg, 1987). Масс-спектр минорного продукта **10** со значительно более поздним временем выхода содержал M<sup>+</sup> при *m/z* 398 (0,5%); [M – Me]<sup>+</sup> при *m/z* 383 (0,4%); [M – MeОН]<sup>+</sup> при *m/z* 367 (0,1%); [M – C<sub>1</sub>/C<sub>8</sub>]<sup>+</sup> при *m/z*



241 (14%);  $[M - C_1/C_{12} + TMC]^+$  при  $m/z$  173 (8%);  $CH_2=O^+-TMC$  при  $m/z$  103 (38%);  $[M - C_1/C_{12} - H]^+$  при  $m/z$  99 (26%);  $[TMC]^+$  при  $m/z$  73 (100%) (Рис. 7В) и соответствовал таковому (10*E*)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовой кислоты (Me/TMC) (Hamberg, 1996). Для дальнейшей идентификации структуры продуктов инкубации рекомбинантного фермента СУР74М2 с 13-ГПОД использовали метод ЯМР. Данные ЯМР для соединения **7** подтвердили структуру оксиранил карбинола, исходя из метиновых сигналов от вторичной спиртовой группировки (4,25 ppm, ddd, H11, 1H). Этот химический сдвиг согласуется с *трео*-конфигурацией. Химические сдвиги H9-H13 также подтвердили *трео*-конфигурацию оксиранил карбинола. Значение констант спин-спинового взаимодействия  $J_{12,13} = 2,2$  Гц указывает на *транс* распределение протонов оксирана. В целом, данные позволили установить конфигурацию (11*R*,12*S*,13*S*) для соединения **7** с сохранением исходной *S*-конфигурации у C13. Таким образом, соединение **7** было идентифицировано как (9*Z*,11*R*,12*S*,13*S*)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота. У эпоксидных протонов соединения **8** была идентифицирована *цис*-конфигурация; это видно из значения их констант спин-спинового взаимодействия  $J_{12,13} = 4,0$  Гц. Спектральные параметры продукта **8** отличаются от таковых ранее описанных *трео* оксиранил карбинолов некоторых животных, содержащих *цис*-оксиран (Lee *et al.*, 2008; Торгокова *et al.*, 20176). Сигнал H11 сдвинут вверх на 0,1 ppm по сравнению с *трео*-изомерами (Jin *et al.*, 2012). Кроме того, протоны H9 и H10, также как и протон H13 оксирана, слегка сдвинуты вверх, в то время как протон H12 сдвинут вниз. Эти различия свидетельствуют о том, что соединение **8** представляет собой продукт с *эритро-цис* конфигурацией. Насколько нам известно, существует только один пример оксиранил карбинола с *эритро-цис* конфигурацией – это эпокси спирт (8*R*,9*S*,10*S*,11*Z*,14*Z*)-8,9-эпокси-10-гидрокси-11,14-эйкозадиеновая кислота (Jin *et al.*, 2012). Его данные <sup>1</sup>H-ЯМР (Jin *et al.*, 2012) (химические сдвиги H8, H9, H10 и соответствующие значения констант спин-спинового взаимодействия), в целом,

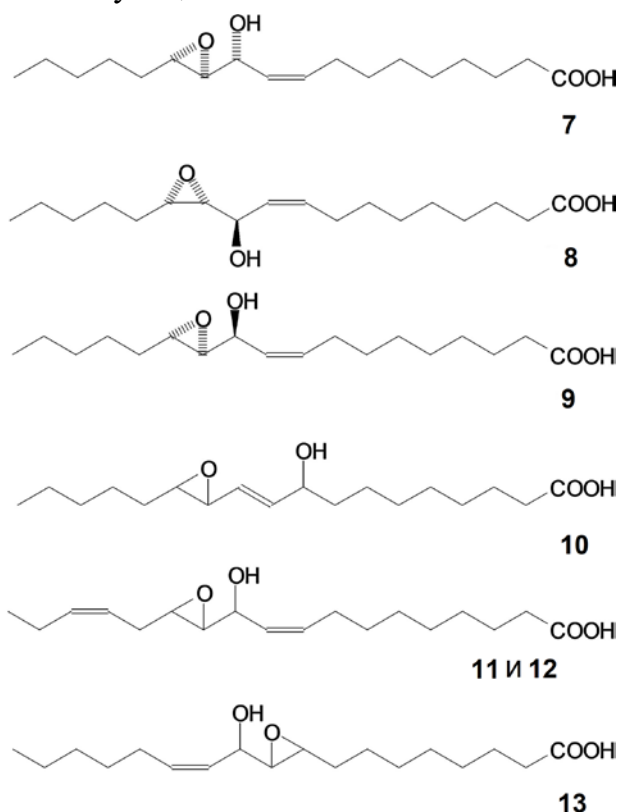


Рис. 6. Структурные формулы продуктов каталитического действия фермента СУР74М2:

**7**, (9*Z*,11*R*,12*S*,13*S*)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота;

**8**, (9*Z*,11*R*,12*R*,13*S*)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота;

**9**, (9*Z*,11*S*,12*S*,13*S*)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовая кислота;

**10**, (10*E*)-9-гидрокси-12,13-эпокси-10-октадеценовая кислота;

**11** и **12**, C11 и C12 эпимеры представленной 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновой кислоты;

**13**, 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота.

соответствуют таковым соединения **8**, что подтвердило его *эритро-цис* конфигурацию. Таким образом, полученные данные позволили идентифицировать соединение **8** как *эритро-цис* оксиранил карбинол – (9*Z*,11*R*,12*R*,13*S*)-11-гидрокси-12,13-эпоксид-9-октадеценую кислоту.

Соединение **9** содержит *транс*-оксиран ( $J_{12,13} = 2,2$  Гц). Спектр соответствует таковому *эритро-транс* оксиранил карбинола – продукта каталитического действия эпоксиалкогольсинтазы EsEAS (CYP5164B1) бурой водоросли *E. siliculosus* (Торжоква *et al.*, 2017a). Таким образом, полученные данные позволили идентифицировать соединение **9** как *эритро-транс* оксиранил карбинол – (9*Z*,11*S*,12*S*,13*S*)-11-гидрокси-12,13-эпоксид-9-октадеценую кислоту – 11-эпимер продукта **7**.

Кроме соединений **7-9**, было обнаружено еще несколько более полярных продуктов. Это стереоизомеры (10*E*)-9-гидрокси-12,13-эпоксид-10-октадеценую

кислоты (**10**), имеющие *транс*- или *цис*-дизамещенный оксиран ( $J_{12,13} = 2,1$  или 4,2 Гц, соответственно) и (*S*) или (*R*)-конфигурации у C9, соответственно.

Превращение 13-ГПОТ при участии рекомбинантного фермента CYP74M2 приводило к образованию аналогичных продуктов **11** и **12** (Рис. 8А). Масс-спектры всех упомянутых продуктов: **7-9**, **11** и **12** имеют большой пик при  $m/z$  285, что указывает на присутствие 11-гидрокси-12,13-эпоксид фрагмента (Рис. 6В). Таким образом, соединения **11** и **12** представляют собой два стереоизомера 11-гидрокси-12,13-эпоксид-9,15-октадекадиеновой кислоты (Me/TMS).

Утилизация 9-ГПОД была менее эффективной

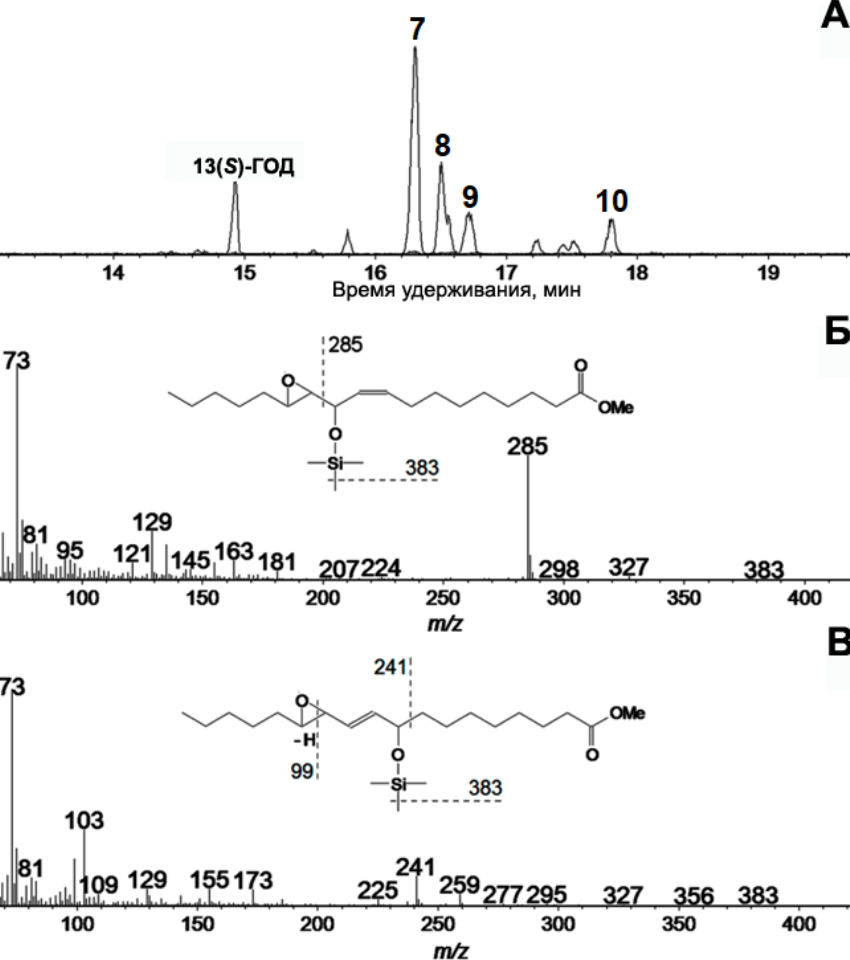


Рис. 7. Данные ГХ-МС анализа продуктов (Me/TMS) инкубации рекомбинантного фермента CYP74M2 с 13-ГПОД. Хроматограмма (общий ионный ток)  $\text{NaBH}_4$ -восстановленных продуктов (Me/TMS) (А). **7-9** – изомеры (9*Z*)-11-гидрокси-12,13-эпоксид-9-октадеценую кислоту (Me/TMS); **10** - (10*E*)-9-гидрокси-12,13-эпоксид-10-октадеценую кислоту (Me/TMS). Масс-спектр и схема фрагментации соединения **7** (Me/TMS) (Б). Масс-спектр и схема фрагментации соединения **10** (Me/TMS) (В).

(Рис. 7Б). Тем не менее, образовывался продукт с хорошо заметным пиком при  $m/z$

199, масс-спектр которого соответствовал таковому 9,10-эпоксид-11-гидрокси-12-октадеценной кислоты (Me/TMC) (Торогкова *et al.*, 2017a). В отличие от 13-гидроперекисей превращение 9-ГПОД было менее специфичным. Как видно из хроматограммы (Рис. 7Б), минорными продуктами реакции были  $\alpha$ -кетол (АОС продукт, выявляемый в виде смеси вицинальных диастереоизомерных диолов с *эритро* и *трео* конфигурацией после восстановления с помощью  $\text{NaBH}_4$ ) и 9-оксононановой кислоты (ГПЛ продукт, выявляемый как 9-гидроксинонановая кислота после восстановления с помощью  $\text{NaBH}_4$ ).

Таким образом, фермент СУР74М2 был идентифицирован как эпоксиалкогольсинтаза. Данному ферменту было присвоено тривиальное название SmEAS (СУР74М2). Фермент SmEAS (СУР74М2) – первая истинная ЭАС, входящая согласно критериям номенклатуры в состав семейства СУР74 и первая ЭАС, обнаруженная у растений.

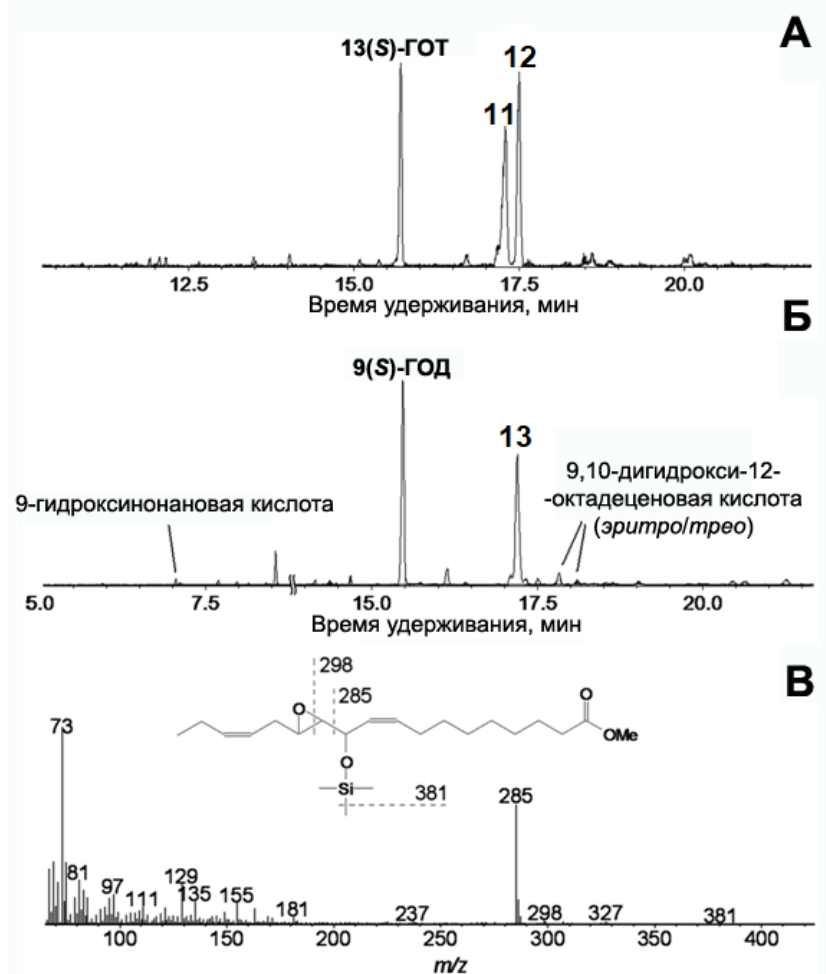


Рис. 8. Данные ГХ-МС анализа  $\text{NaBH}_4$ -восстановленных продуктов (Me/TMC) инкубации рекомбинантного фермента СУР74М2 с 13-ГПОТ и 9-ГПОД. (А) Хроматограмма (общий ионный ток) продуктов (Me/TMC) инкубации 13-ГПОТ с ферментом СУР74М2. **11-12** – изомеры 11-гидрокси-12,13-эпокси-9,15-октадекадиеновой кислоты (Me/TMC). (Б) Хроматограмма (общий ионный ток) продуктов (Me/TMC) инкубации 9-ГПОД с ферментом СУР74М2. **13** – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценная кислота (Me/TMC). (В) Масс-спектр и схема фрагментации соединения **11** (Me/TMC).

Эпоксисинтазы являются изомерами, и механизм их каталитического действия включает следующие стадии: 1) гомолиз гидроперокси-группы; 2) перегруппировка оксирадикала в эпоксиалльный радикал; 3) рекомбинация эпоксиалльного радикала с гидроксильным радикалом, что приводит к образованию эпоксиалла (Рис. 9).

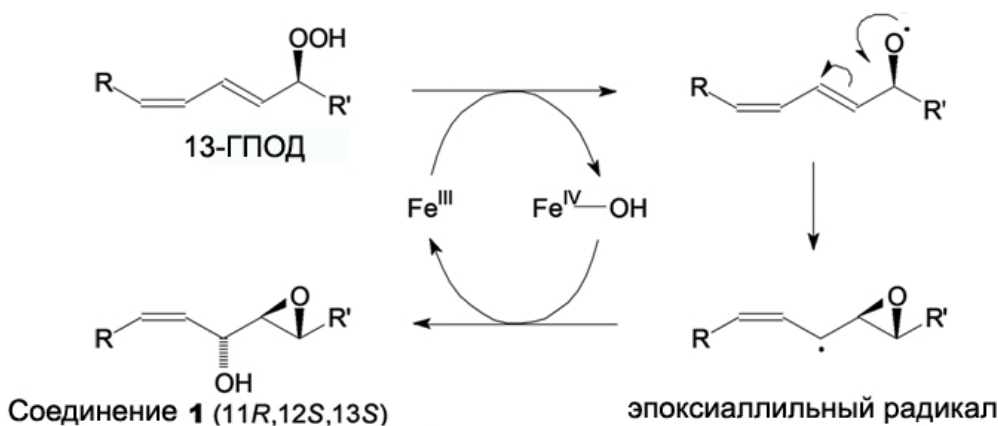


Рис. 9. Схема механизма каталитического действия SmEAS (CYP74M2). R – (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO<sub>2</sub>Me; R' – CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>Me.

**3.6. Исследование биологической активности продуктов каталитического действия ферментов SmDES1 и SmDES2.** Ранее было показано, что некоторые дивиниловые эфиры обладают антимикробными и фунгицидными свойствами (Fammartino *et al.*, 2010). Некоторые из них повышают устойчивость картофеля к заражению патогенными грибами (Stumpe *et al.*, 2001). Также имеются данные о том, что накопление дивиниловых эфиров в растениях табака происходит при их инфицировании вирусом табачной мозаики (Gullner *et al.*, 2010).

Поскольку ранее было описано (Prost *et al.*, 2005), что некоторые дивиниловые эфиры, например, колнелевая, колнеленовая и (ω5Z)-этероленовая кислоты, негативно влияют на скорость роста ряда бактерий, грибов и оомицетов, мы предположили, что разные изомеры могут проявлять разную ростингибирующую активность в отношении разных видов бактерий. В связи с этим, одной из задач было определить антибактериальную активность этероленовой, (11Z)-этероленовой и (ω5Z)-этероленовой кислот против грамотрицательных фитопатогенных бактерий *Xanthomonas campestris ssp. vesicatoria*, *Pseudomonas syringae ssp. tomato* и *P. atrosepticum* SCRI1043. Эти изомеры различаются геометрией единственной двойной связи (*цис*- или *транс*-) (Рис. 4). Значение такого разнообразия изомеров этероленовой кислоты для *S. moellendorffii* до сих пор не имеет объяснения.

Дивиниловые эфиры получали инкубацией 13-ГПОТ с ферментами SmDES1 и SmDES2. Метилловые эфиры продуктов инкубации 13-ГПОТ с дивинилэфирсинтазами плаунка разделяли с помощью ВЭЖХ на нормальной фазе. Антибактериальную активность дивиниловых эфиров против фитопатогенных бактерий определяли методом серийных разведений в жидких средах.

Для *P. atrosepticum* мы определили минимальную ингибирующую и минимальную бактерицидную концентрации исследуемых оксипинов (таблица 2) и для дальнейшей работы выбрали концентрацию, равную 0,5 мМ (500 нмоль/мл); в такой концентрации были выявлены оксипины в инфицированных растительных тканях (Hamberg *et al.*, 2003). При этой концентрации исследуемые оксипины оказывали дифференцированное антимикробное действие на патогенные бактерии.

Таблица 2. Минимальная ингибирующая (МИК) и минимальная бактерицидная (МБК) концентрации оксипинов для *P. atrosepticum* SCRI1043.

Оксипины	МИК, мМ	МБК, мМ
Этероленовая кислота	0,5	1,0
(11Z)-этероленовая кислота	>1,0	>1,0
( $\omega$ 5Z)-этероленовая кислота	0,25	0,5

Этероленовая кислота ингибировала рост *Ps. syringae* и *P. atrosepticum*, но не влияла на *X. campestris* (Рис. 10А). (11Z)-Этероленовая кислота оказывала бактериостатическое действие на *Ps. syringae*, но не влияла на *P. atrosepticum* и *X. campestris* (Рис. 10Б). ( $\omega$ 5Z)-Этероленовая кислота оказывала выраженный бактерицидный эффект на все микроорганизмы: число жизнеспособных клеток *P. atrosepticum* необратимо снижалось до неопределяемых значений через 24 ч культивирования; количество жизнеспособных клеток *X. campestris* и *Ps. syringae* снижалось на 2 порядка в первые сутки (Рис. 10В); через 48 ч культивирования эти бактерии полностью теряли способность к образованию колоний. При концентрациях 0,25 мМ и ниже этот изомер не оказывал никакого влияния на *P. atrosepticum* и *X. campestris*, однако при концентрациях 0,25 и 0,125 мМ проявлял бактериостатические свойства в отношении *Ps. syringae* (Рис. 10В). Этероленовая и (11Z)-этероленовая кислоты при использовании в концентрации 0,25 мМ оказывали бактериостатический эффект на *Ps. syringae*, хотя и меньший, чем в концентрации 0,5 мМ (Рис. 10А, Б).

Таким образом, исследуемые соединения оказывали дифференциальное влияние на патогены разной трофности. Ростингибирующие свойства целевых соединений в наибольшей степени проявлялись в отношении биотрофных псевдомонад. Некротрофные пектобактерии оказались восприимчивыми только к максимальным из проверенных концентрациям дивиниловых эфиров, а гембиотрофные кантомонады оказались устойчивыми практически ко всем исследуемым соединениям, за исключением ( $\omega$ 5Z)-этероленовой кислоты, используемой в максимальной концентрации. В целом, полученные результаты подтверждают, что дивиниловые эфиры участвуют в защитном ответе растений против фитопатогенов.

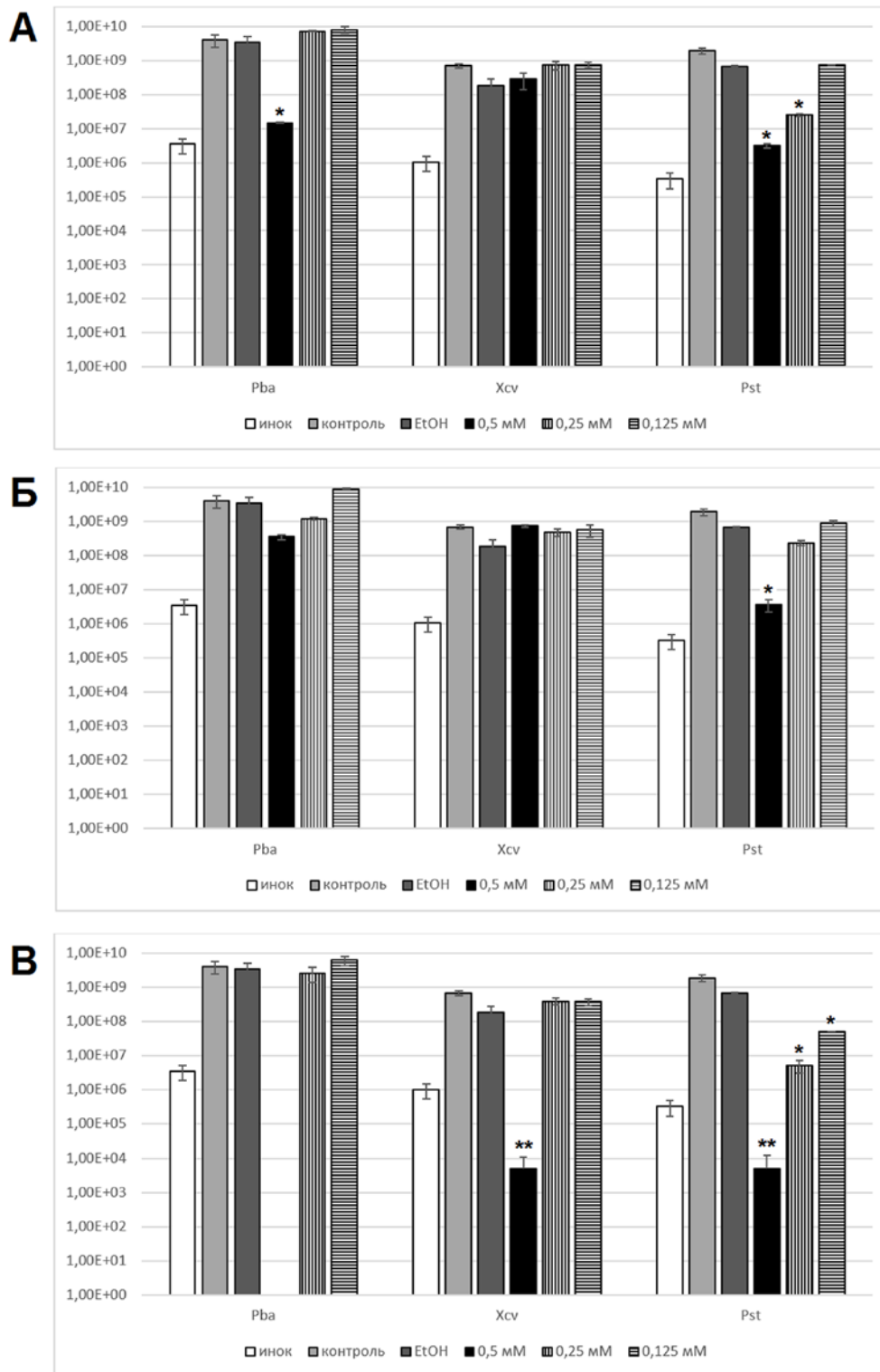


Рис. 10. Титр КОЕ/мл в культурах *P. atrosepticum* (Pba), *X. campestris* (Xcv), *Ps. syringae* (Pst), культивируемых в течение 24 ч в отсутствии (контроль) и в присутствии 0,5% этанола (EtOH), а также 0,5, 0,25 и 0,125 мМ этероленовой (А), (11Z)-этероленовой (Б) и (ω5Z)-этероленовой (В) кислот. (Инюк) – титр инокуляции бактерий.  $M \pm SD$ ,  $n$  (число опытов) = 5; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  при сравнении с группой “EtOH”.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружение ферментов CYP74 у самых древних наземных растений – мхов и плаунов – представляет интерес в связи с вопросом о происхождении соответствующих генов у покрытосеменных растений. Так, ранее было установлено, что в геноме мха *P. patens* присутствуют гены двух различных алленоксидсинтаз

(Bandara *et al.*, 2009; Scholz *et al.*, 2012) и одной гидропероксидлиазы (Stumpe *et al.*, 2006), в геноме мха *M. polymorpha* присутствуют гены двух алленоксидсинтаз, при этом нет гидропероксидлиаз (Koeduka *et al.*, 2015). Эти белки являются членами семейства CYP74, обладая 40-50% идентичности последовательности с многочисленными ферментами CYP74 покрытосеменных и голосеменных.

В результате проделанной работы впервые были охарактеризованы *in vitro* представители семейства CYP74 у плаунков. Ферменты CYP74M1 и CYP74M3 являются первыми дивинилэфирсинтазами, а фермент CYP74M2 – первой эпоксиалкогольсинтазой, обнаруженными у споровых растений. Более того, фермент CYP74M2 является первой истинной растительной эпоксиалкогольсинтазой, согласно критериям номенклатуры относящейся к семейству CYP74.

Предпочтительными субстратами исследуемых ферментов являются 13-гидроперекиси линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот. Соотношение продуктов реакций, катализируемых ферментами CYP74M1 и CYP74M3, отличается от таковых других 13-специфичных ДЭС. В случае фермента CYP74M3 основными продуктами были этероленовая и этеролеваая кислоты. Основными продуктами реакции фермента CYP74M1 были (11Z)-изомеры этероленовой и этеролеваой кислот. В 2005 году Хамбергом был описан биосинтез (11Z)-этеролеваой кислоты в растениях *Ranunculus lingua*, однако тогда не был описан и охарактеризован фермент, катализирующий данную реакцию (Hamberg, 2005). Таким образом, фермент CYP74M1 является первой охарактеризованной ДЭС, которая катализирует превращение 13-гидроперекисей линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот в (11Z)-изомеры этеролеваой и этероленовой кислот соответственно.

Кроме того, в результате выполненной работы был расшифрован механизм каталитического действия эпоксиалкогольсинтазы SmEAS (CYP74M2), а также описаны детальные структуры образуемых продуктов (в том числе одного не описанного ранее продукта – (9Z,11R,12R,13S)-11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислоты), что позволило дополнить общую схему механизма каталитического действия ферментов семейства CYP74 (Рис. 32). На первом этапе идет гомолиз гидроперокси-группы с образованием алкоксильного радикала, который в результате внутримолекулярной перегруппировки преобразуется в эпоксиаллильный радикал. Данный радикал является точкой переключения между всеми четырьмя ветвями липоксигеназного каскада. В случае АОС, эпоксиаллильный радикал, теряя водород, преобразуется в нестабильную окись аллена. В случае ЭАС к эпоксиаллильному радикалу присоединяется гидроксильный радикал, и образуется эпокиспирт. При этом продукты каталитического действия фермента SmEAS – эпокиспирты – содержат *транс*-дизамещенное эпоксидное кольцо, что является основным отличием данного фермента от животных ЭАС клана CYP74.

В случае ГПЛ и ДЭС, расщепление С-С связи в оксиране приводит к образованию винилоксикарбинильного радикала, который является точкой переключения между двумя этими реакциями. В случае ДЭС происходит преобразование винилоксикарбинильного радикала в *цис*- или *транс*-изоформы винилового эфира, который, теряя водород, преобразуется в дивиниловый эфир. В

случае ГПЛ винилоксикарбинильный радикал рекомбинирует с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется полуацеталь, который распадается на альдегид и оксокислоту.

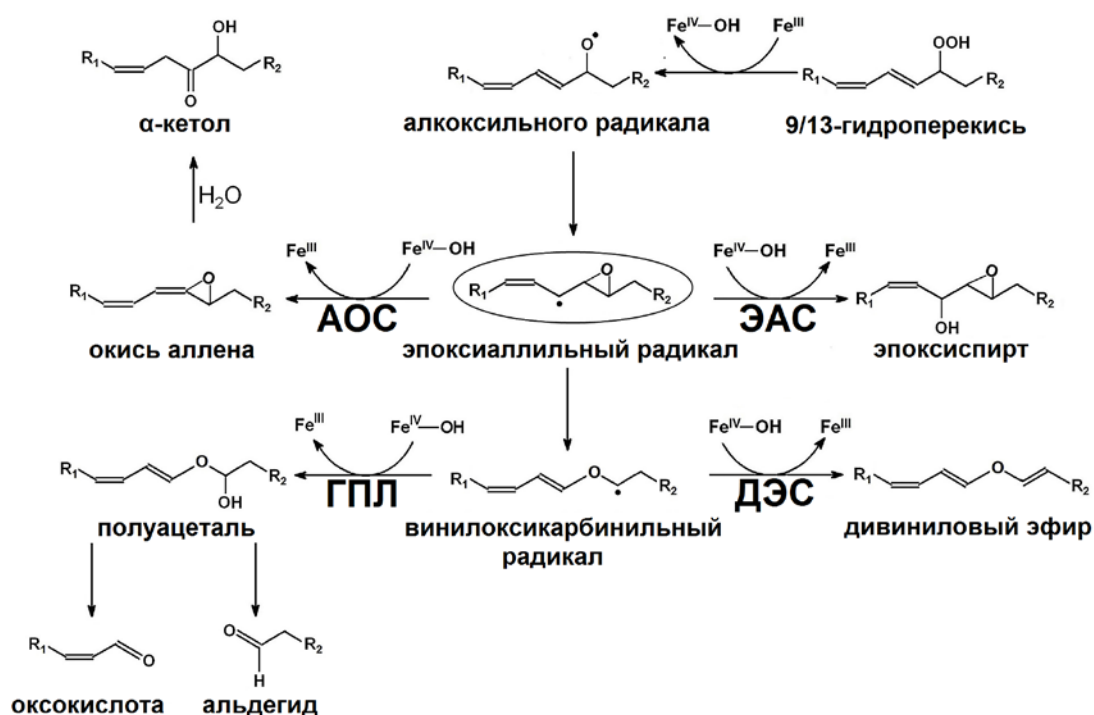


Рис.11. Общая схема механизма каталитического действия ферментов СУР74 (Тороркова *et al.*, 2020).

Гены дивинилэфирсинтаз удивительно разнообразны. Первые гены, кодирующие дивинилэфирсинтазы, были обнаружены в ходе экспериментов с клубнями картофеля (Galliard *et al.*, 1972). В дальнейшем ДЭС растений нескольких видов пасленовых (табак, томат и перец) были охарактеризованы биохимически и идентифицированы как члены подсемейства СУР74D (Itoh *et al.*, 2001; Stumpe *et al.*, 2001; Fammartino *et al.*, 2007). Эти ферменты являются 9-специфичными. Позднее дивинилэфирсинтазы были обнаружены в корнях ландыша (Ogorodnikova *et al.*, 2008), в луковичах чеснока (Grechkin *et al.*, 1995), у некоторых представителей Спаржевых (Ogorodnikova *et al.*, 2013), в листьях льна-долгунца (Gogolev *et al.*, 2012) и у некоторых видов лютиков (Hamberg *et al.*, 1998; Hamberg *et al.*, 2002; Hamberg *et al.*, 2004). Кроме того, дивиниловые эфиры обнаружены в талломах некоторых представителей бурых (Proteau, Gerwick, 1993) и красных (Jiang, Gerwick, 1997) водорослей. Такое разнообразие может свидетельствовать о полифилетическом происхождении дивинилэфирсинтаз.

С филогенетической точки зрения ферменты СУР74М1, СУР74М2 и СУР74М3, несомненно, входят в состав семейства СУР74. По отношению к ферментам СУР74 многочисленных видов высших растений ферменты СУР74М1, СУР74М2 и СУР74М3 обладают 43-45%, 42-44% и 40-43% сходством соответственно. Они относительно одинаково удалены от различных подсемейств СУР74 покрытосеменных растений. Следует отметить, что ферменты подсемейства СУР74М проявляют большее сходство с АОС, чем с ДЭС цветковых растений. С АОС мхов все три фермента имеют 40 –

44% процентов идентичности последовательностей. С АОС *A.thaliana* (CYP74A1) ферменты CYP74M2 и CYP74M3 имеют около 41% идентичности, а фермент CYP74M1 – 39%. С 13-специфичной ДЭС льна (CYP74B16) ферменты CYP74M1, CYP74M2, CYP74M3 имеют 37, 34 и 39% идентичности соответственно. Кроме того, фермент CYP74M3 проявляет 40-42% сходство с ферментами подсемейства CYP74C, проявляющими двойную ГПЛ/ЭАС активность.

Представители подсемейств CYP74L, CYP74J, CYP74K и CYP74M, обнаруженные у *S. moellendorffii*, образуют отдельные ветви на филогенетическом древе клана CYP74 (Рис. 12). Эти ветви находятся в непосредственной близости от представителей семейства CYP74 *P. patens* и *M. polymorpha* (Рис. 12).

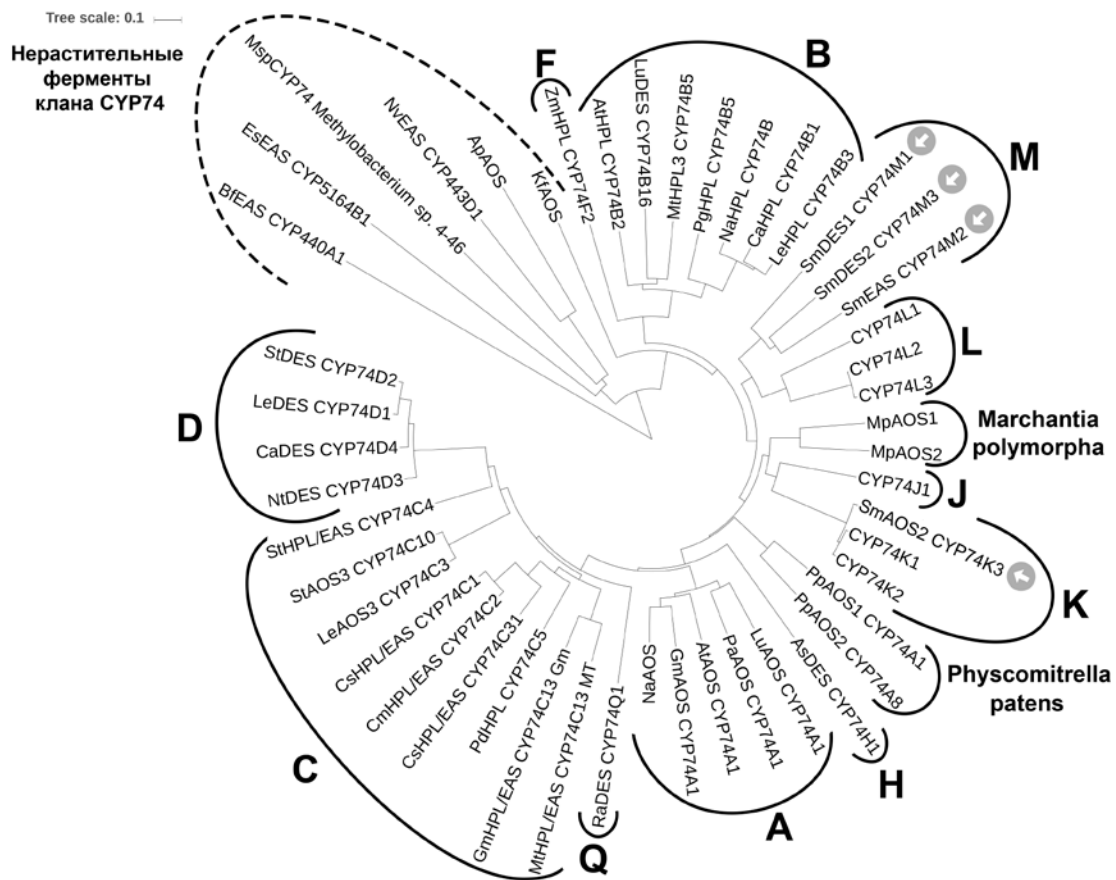


Рис. 12. Филогенетическое древо клана CYP74. Классифицированные подсемейства CYP74 обведены и обозначены соответствующей буквой. Ферменты CYP74 плаунка *S. moellendorffii*: SmDES1, CYP74M1; SmDES2, CYP74M3; SmEAS, CYP74M2 отмечены стрелками.

Ферменты подсемейства CYP74M были выбраны в качестве объектов настоящей работы из-за последовательности домена ГСД, не позволяющей однозначно предсказать их каталитическую активность. Исследуемые ферменты содержат замену в позиции, следующей за доменом ГСД; важность этого сайта для каталитического действия дивинилэфирсинтаз была подтверждена экспериментами по сайт-направленному мутагенезу. Замена валина в данном сайте у дивинилэфирсинтазы льна на, характерный для АОС и ГПЛ, глицин приводила к смене каталитической

активности у фермента льна на алленоксидсинтазную (Toporkova *et al.*, 2013). Еще один дополнительный сайт «F/L toggle», непосредственно участвующий в каталитическом действии ферментов CYP74, находится в CPC-1 в N-концевой области ферментов CYP74 (Gorina *et al.*, 2016). Все АОС в этом сайте содержат остаток фенилаланина, в то время как ГПЛ и ДЭС – остаток лейцина. Среди ферментов семейства CYP74 *S. moellendorffii* только дивинилэфирсинтазы SmDES1 и SmDES2 содержат остаток лейцина в сайте «F/L toggle», тогда как у остальных ферментов CYP74 *S. moellendorffii* в этом сайте находится остаток фенилаланина, что указывает на возможное отсутствие гидропероксидлиаз у *S. moellendorffii*.

В 2017 году были описаны первая алленоксидсинтаза плаунка *S. moellendorffii* (SmAOS2, CYP74K3), а также алленоксидциклаза (SmAOC1), редуктаза 3 12-ОФДК и JAR1. Данные ферменты участвуют в биосинтезе жасмоновой кислоты и имеют характеристики, аналогичные подобным ферментам семенных растений (Pratiwi *et al.*, 2017). Обнаружение и характеристика ферментов SmDES1, SmDES2, SmEAS, наряду с SmAOS2, свидетельствуют о наличии сложного липоксигеназного каскада у плаунка *S. moellendorffii*.

Гены семейства CYP74 самых древних наземных растений – мхов и плаунов – до недавнего времени имели не вполне ясное происхождение. Все секвенированные к настоящему времени геномы наземных растений, в том числе *P. patens*, *M. polymorpha* и *S. moellendorffii*, содержат гены семейства CYP74. В то же время, до недавнего времени не было найдено ни одного гена семейства CYP74 у представителей зеленых водорослей. Отсутствие данных о наличии генов семейства CYP74 у зеленых водорослей подтверждало гипотезу о появлении генов CYP74 в наземных растениях в результате горизонтального переноса из морских животных посредством протеобактерий (Nelson *et al.*, 2013). Однако в 2015 году был обнаружен представитель семейства CYP74 у зеленой водоросли (Charophyta) – алленоксидсинтаза KfAOS *K. flaccidum* (Koeduka *et al.*, 2015). На филогенетическом древе KfAOS находится между ферментами CYP74 протеобактерий и наземных растений (Рис. 12). В целом, обнаружение ферментов CYP74 у зеленых водорослей, печеночников, мхов и плаунов демонстрирует древнее происхождение и развитие липоксигеназного каскада.

К настоящему времени не так много известно о функциях дивиниловых эфиров. Известно, что взаимодействие с фитопатогенами вызывает экспрессию генов ДЭС. В данной работе было показано, что ( $\omega$ 5Z)-этероленовая, (11Z)-этероленовая и этероленовая кислоты негативно воздействуют на некоторые фитопатогенные микроорганизмы. Предполагается, что наличие ферментов, которые участвуют в синтезе биологически активных оксипинов у древнейших сосудистых растений, помогло им распространиться и сохраниться до настоящего времени.

Около 450 миллионов лет назад Эмбриофиты (наземные растения) вышли на сушу и разделились на разные ветви. Ключевым фактором экспансии данных растений являлась эволюция корневой и сосудистых систем, что способствовало утилизации новых питательных субстратов. Плауновидные – переходная форма между мхами и более высокоорганизованными растениями, поэтому они являются

модельными объектами для изучения становления настоящих корней, сосудов и вторичных метаболитов, необходимых для формирования клеточных стенок. В 2020 году были представлены данные масштабного транскриптомного анализа *S. moellendorffii* (Ferrari *et al.* 2020). Полученный атлас экспрессии запечатлел профили транскрипции генов во всех основных органах, тканях и типах клеток во время суточных циклов, был показан эволюционный путь биосинтеза некоторых вторичных метаболитов клеточных стенок. Данные исследования в совокупности с результатами представленной работы могут пролить свет на эволюцию растений, в частности на развитие их защитных механизмов и сигнальных систем.

## ВЫВОДЫ

1. Клонированы кодирующие области генов *CYP74M1*, *CYP74M2* и *CYP74M3* плаунка *S. moellendorffii* и получены очищенные препараты функционально активных соответствующих рекомбинантных ферментов.
2. Установлено, что предпочтительными субстратами рекомбинантных ферментов *CYP74M1*, *CYP74M2* и *CYP74M3* являются 13-гидроперекиси линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот.
3. Установлено, что рекомбинантные ферменты *CYP74M1* и *CYP74M3* являются 13-специфичными дивинилэфирсинтазами. Фермент *CYP74M3* катализирует превращение 13-гидроперекисей жирных кислот, в основном, в этеролевую и этеролоновую кислоты, фермент *CYP74M1* – в соответствующие (11Z)-изомеры. В обеих реакциях минорными продуктами являются соответствующие ( $\omega$ 5Z)-изомеры. Новым ферментам присвоены тривиальные названия SmDES1 (*CYP74M1*) и SmDES (*CYP74M3*).
4. Установлено, что рекомбинантный фермент *CYP74M2* является 13-специфичной эпоксиалкогольсинтазой. Фермент *CYP74M2* катализирует превращение 13-гидроперекисей жирных кислот, в основном, в три эпимера оксиранил карбинолов в соотношении 4:2:1, а именно – (11R,12S,13S), (11R,12R,13S) и (11S,12S,13S) эпимеры. Новому ферменту присвоено тривиальное название SmEAS.
5. Установлено, что ( $\omega$ 5Z)-этеролоновая кислота обладает бактерицидными свойствами в отношении клеток фитопатогенных бактерий *Xanthomonas campestris* ssp. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* ssp. *tomato*, *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043; этеролоновая и (11Z)-этеролоновая кислоты – бактериостатическими свойствами.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Oxylin biosynthesis in spikemoss *Selaginella moellendorffii*: Molecular cloning and identification of divinyl ether synthases CYP74M1 and CYP74M3 / S.S. Gorina, Y.Y. Toporkova, L.S. Mukhtarova **Е.О. Smirnova**, I.R. Chechetkin, B.I. Khairutdinov, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // *BBA– Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2016. – V. 1861. – P. 301–309.
2. Detection of the first higher plant epoxyalcohol synthase: Molecular cloning and characterisation of the CYP74M2 enzyme of spikemoss *Selaginella moellendorffii* / Y.Y. Toporkova, **Е.О. Smirnova**, S.S. Gorina, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin // *Phytochemistry*. – 2018. – V. 156. – С. 73–82.
3. Антимикробная активность геометрических изомеров этеролоеновой кислоты – продуктов липоксигеназного каскада растений / Я.Ю. Топоркова, Е.К. Бессолицына; **Е.О.Смирнова**, С.С. Горина, О.Е. Петрова, Л.Ш.Мухтарова, А.Н. Гречкин // Доклады академии наук – 2018. – V.480. – С. 139-142.

### Работы, опубликованные в материалах научных мероприятий

1. **Смирнова Е.О.** Первичная характеристика семейства CYP74 плаунка *Selaginella moellendorffii* / Е.О. Смирнова, С.С. Горина, Л.Ш. Мухтарова, Я.Ю. Топоркова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сборник тезисов «Биология – наука XXI века» - Пушино, Россия, 2014. - С.160.
2. **Smirnova Е.О.** Primary characteristics of cytochromes P450 of the CYP74 family of *Selaginella moellendorffii* / Е. О. Smirnova, S.S. Gorina, Y.Y. Toporkova, L.S. Mukhtarova, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // The Abstract Book of the FEBS EMBO 2014 Conference. – Paris, France, 2014. – P. 331.
3. **Смирнова Е.О.** Характеристика ферментов подсемейства CYP74M плаунка *Selaginella moellendorffii* / Е.О. Смирнова, С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова, О.Е. Петрова, Л.Ш. Мухтарова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии. – Санкт-Петербург, Россия, 2015.
4. **Смирнова Е.О.** Особенности функционирования липоксигеназного каскада растений при взаимодействии с фитопатогенными энтеробактериями / Е.О. Смирнова, А.Ф. Сафина, С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова, О.Е. Петрова // Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых "Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий". – Петрозаводск, Россия, 2015. - С 495.
5. **Smirnova Е.О.** The first cytochromes P450 of the CYP74 family of Lycopodiophyta plants – divinyl ethers synthases of *Selaginella moellendorffii* / Е.О Smirnova, Y.Y Toporkova, S.S Gorina L.S Mukhtarova, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // Abstracts of SymBioSE 2015 – Symposium of Biology Students in Europe. – Alexandroupoli, Greece, 2015. - P. 67.
6. **Смирнова Е.О.** Изменение экспрессии генов ферментов CYP74 растений в ответ на инфицирование фитопатогенными энтеробактериями / Е.О. Смирнова, С.С.

Горина, О.Е. Петрова, Я.Ю. Топоркова. // Сборник тезисов 4-го Российского симпозиума с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» - Казань, Россия, 2016. – С.135-136.

7. **Смирнова Е.О.** Представители CYP74 споровых растений / Е.О. Смирнова, Я.Ю. Топоркова, С.С. Горина, Л.Ш. Мухтарова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин. // Научные труды V съезд физиологов СНГ – 2016. – Сочи, Россия, 2016. - Т.1. – С.217.

8. **Смирнова Е.О.** Воздействие дивиниловых эфиров и эпокиспиртов – продуктов липоксигеназного каскада – на фитопатогены / Е.О. Смирнова, С.С.Горина, О.Е.Петрова, Я.Ю.Топоркова, Л.Ш.Мухтарова, А.Н Гречкин // Сборник материалов докладов Годичное собрание Общества физиологов растений России Научная конференция и школа молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты». – Крым, Судак, Россия, 2017. – С. 307.

9. **Смирнова Е.О.** Биологическая активность некоторых дивиниловых эфиров / Е.О. Смирнова, С.С. Горина, О.Е. Петрова, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин // Сборник материалов конференции Актуальная биотехнология. – Крым, Ялта, Россия, 2017. – С. 72.

10. **Смирнова Е.О.** Фермент CYP74M2 – первая растительная эпоксиалкогольсинтаза / Е.О. Смирнова, С.С. Горина, Б.И. Хайрутдинов, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин // Научные труды Объединённый научный форум Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» VIII российский симпозиум «Белки и Пептиды». – Москва, Россия, 2017. – С. 125.

11. **Смирнова Е.О.** Антибактериальная функция некоторых дивиниловых эфиров плаунка *Selaginella moellendorffii* / Е.О. Смирнова, Я.Ю., Топоркова, С.С. Горина, О.Е. Петрова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин // Липиды XXI века. Первая четверть: Конференция к 100-летию со дня рождения Льва Давидовича Бергельсона, основателя науки о липидах в России. Сборник тезисов докладов. – Москва, Россия, 2018 – С.64-65.

12. **Smirnova E.O.** The first cytochromes P450 of the CYP74 family of Lycopodiophyta plant - *Selaginella moellendorffii* / E.O Smirnova, Y.Y Toporkova, S.S Gorina L.S Mukhtarova, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // EMBO Workshop New shores in land plant evolution 20 – 23 June 2018. –Lisbon, Portugal, 2018. – P. 150.

13. **Смирнова Е.О.** Антибактериальная активность этероленовой кислоты и ее геометрических изомеров – продуктов липоксигеназного каскада растений. / Е.О. Смирнова, Я.Ю., Топоркова, С.С. Горина, О.Е. Петрова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды Сборник материалов (в двух частях) Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (Иркутск, 10–15 июля 2018 г.) – Иркутск, Россия, 2018. – Часть 1 - С.716-719.

14. **Смирнова Е.О.** Ферменты подсемейств CYP74M и CYP74L плаунка *Selaginella moellendorffii* Hieron / Е.О. Смирнова, С.С. Горина, Л.Ш. Мухтарова, Я.Ю. Топоркова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин // Сборник тезисов «Биология – наука XXI века» - Пушино, Россия, 2019. - С.379.