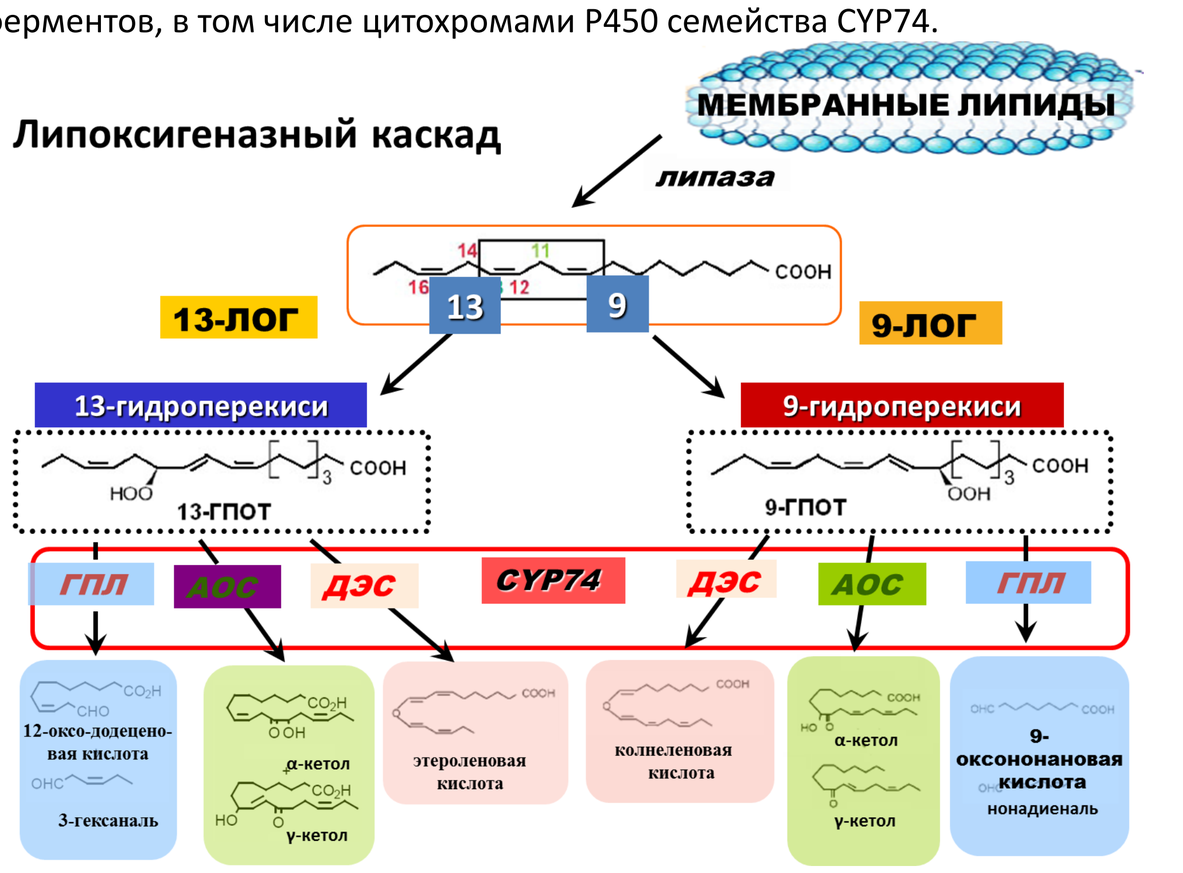
ГИДРОПЕРОКСИДБИЦИКЛАЗЫ – НОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ БИОСИНТЕЗА ОКСИЛИПИНОВ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Я.Ю. Топоркова, Е.О. Смирнова, Н.В. Ланцова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин

Казанский институт биохимии и биофизики - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук", г. Казань,

toporkova@kibb.knc.ru

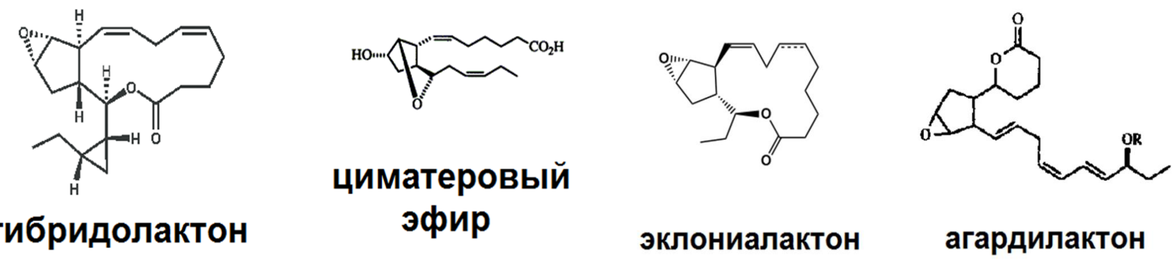
1) Основным источником оксилипинов у растений является липоксигеназный каскад, начинающийся с образования гидроперекисей жирных кислот, метаболизм которых в дальнейшем контролируется рядом ферментов, в том числе цитохромами P450 семейства CYP74.



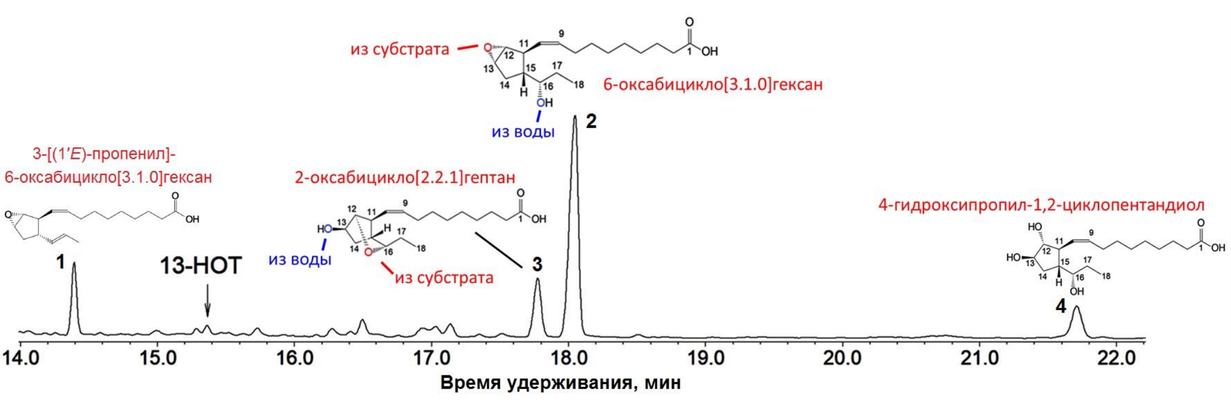
2) В последнее время ферменты, сходные с представителями семейства CYP74, а также оксилипины, сходные по структуре с продуктами каталитического действия ферментов CYP74, выявляются у таксономически отдаленных организмов – протеобактерий, животных, бурых и красных водорослей.

Выявленные ферменты по требованиям номенклатуры нельзя отнести к семейству CYP74, поэтому было введено понятие **клана CYP74**, объединяющее ферменты семейства CYP74, а также других семейств, проявляющие **сходство с этими ферментами по структурным особенностям, механизму каталитического действия, а также по результатам филогенетических исследований**.

3) Оксилипины включают, среди прочего, различные биологически активные циклопентановые производные жирных кислот, в том числе простагландины и другие простаноиды у млекопитающих, а также жасмонаты и родственные соединения в растениях. В то же время, существуют циклопентановые производные жирных кислот, механизм биосинтеза которых остается неизвестным. Это, например, оксилипины красных и бурых водорослей. Практически каждый тип этих соединений характерен для определенного рода водорослей и называется по названию водоросли – эгрегиалактоны, циматеролы и т.п.



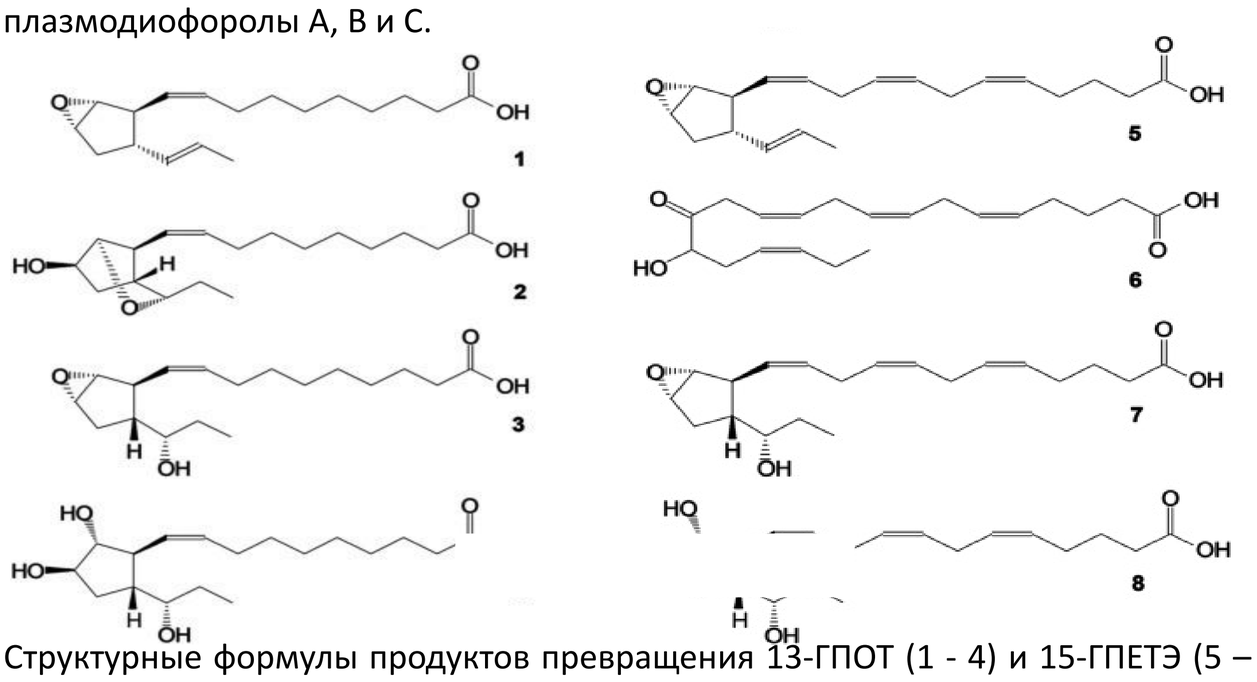
4) В геноме бурой водоросли *E. siliculosus* экспрессируются два гена, кодирующие P450, филогенетически родственные ферментам биосинтеза оксилипина клана CYP74. кДНК одного из этих генов (CYP5164A3) была экспрессирована в *E. coli*. Хроматограмма (полный ионный ток) продуктов (Me/TMC) инкубации рекомбинантного белка CYP5461A3 бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* с 13-гидроперекисью альфа-линоленовой кислоты.



Предпочтительным субстратом для рекомбинантного фермента CYP5164A3 была 13-гидроперекись α-линоленовой кислоты (13-ГПОТ). Она была преобразована в новые **гетеробициклические оксилипины - эктокарпин A (1),** а также **плазмодиофоролы A, B и C (2, 3, 4)**. Таким образом, фермент **CYP5164A3** является **гидропероксидбиклазой EsHPB.**

5) Фермент **CYP5164A3** (**EsHPB**) проявляет активность в отношении 13-ГПОТ и гидроперекиси эйкозапентаеновой кислоты (15-ГПЭПЕ). Основными продуктами каталтического действия данного фермента являются гетеробициклические оксилипины. Превращение 15-ГПЕПЭ с помощью CYP5164A3 приводит к образованию аналогичных продуктов.

Аналогичный фермент обнаружен у возбудителя килы капусты *Plasmodiophora brassicae* – **PbHPB**, продуктами каталитического действия которого являются плазмодиофоролы A, B и C.

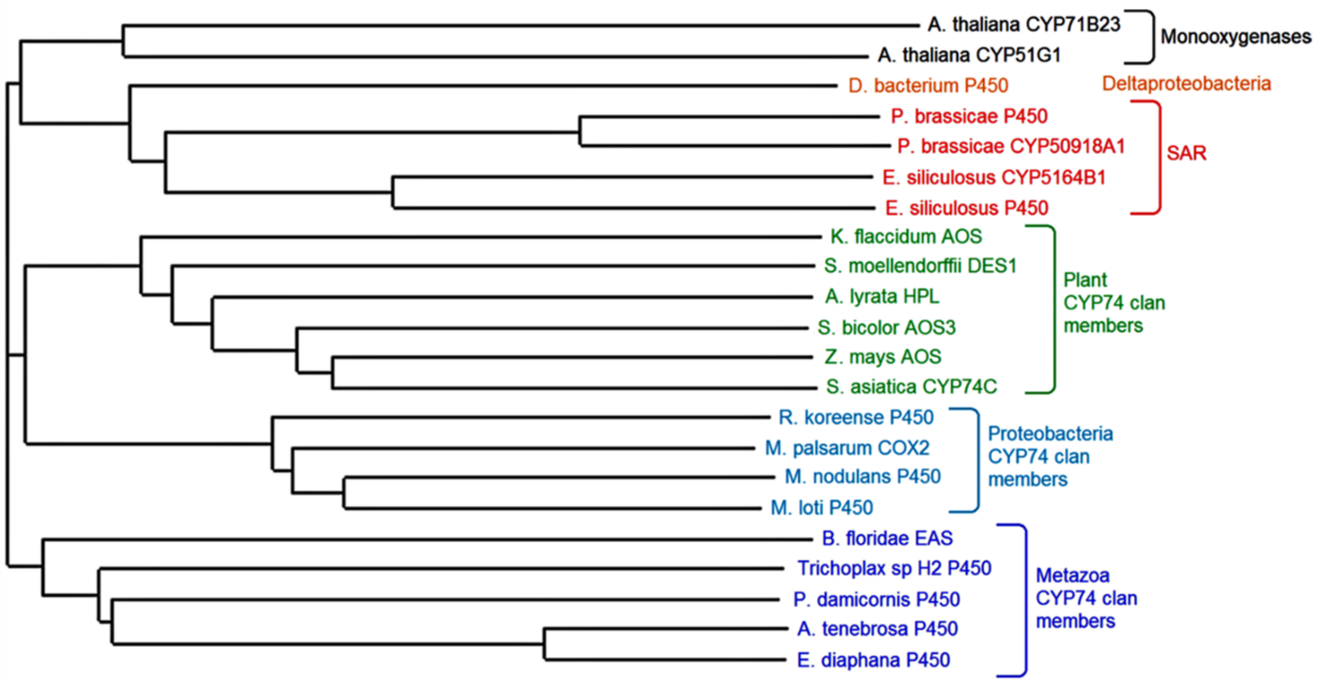


Структурные формулы продуктов превращения 13-ГПОТ (1 - 4) и 15-ГПЕТЭ (5 – 8) ферментом EsHPB *E. siliculosus*. **1**, эктокарпин A. **2**, плазмодиофорол B. **3**, плазмодиофорол A. **4**, плазмодиофорол. **5**, эктокарпин B. **6**, *α*-кетол. **7**, эктокарпин C. **8**, эктокарпин D.

6) Частичное множественное выравнивание (область I-спирали, CPC-4) белков CYP5164A3 и CYP5164B1 *E. siliculosus*, родственных P450 дельтапротеобактерий (бактерия *Myxococcales* и бактерия *Deltaproteobacteria*) и церкозойных *P.brassica*, а также клана CYP74 P450 альфапротеобактерии *M. palsarum*, двух ферментов CYP74 *A. thaliana* и две выбранные монооксигеназы *A. thaliana*.

```
                                                  123456
E. siliculosus HPB CYP5164A3                NTKD-LERSFMFTTNFQSAGAIAKGMMPVVA   321
E. siliculosus EAS CYP5164B1                PTQD-MDKMFMFFSGFQSSSALAKNMEYCVG   286
M. bacterium P450 MCA9657191.1              DGDE-LLHQLVFLCAFNIGGGISRFATPGLL   274
D. bacterium P450 GDX81301.1                PEAD-VAAHLMFAAAFNSTGGTFTTLYPAMA   277
P. brassicae P450 CEP00277.1                TTDD-LDRWLQFLIQFNGIAGIGLPLASAIA   361
P. brassicae CYP50918A1 CEO97746.1          TTAD-LDLWLQFLVQFNGVAGIGLTLASAIA   358
M. palsarum P450 SFK29734.1                 TDEEAVARQLMFLVGMNAFLGTQNILKSIVG   275
AtHPL CYP74B1 OAP00833.1                    TRDE-AIQNLLFVLGFNAYGGFSVFLPSLIG   319
AtAOS CYP74A AED94842.1                     SREE-ATHNLLFATCFNTWGGMKILFPNMVK   335
A. thaliana CYP76C1 OAP07350.1              SDIEHLL-LDMFTAGTDTSSST---LEWAMT   321
A. thaliana CYP71B16 OAP05872.1             DHIKGFL-TNIIIAGIDTGALT---MIWAMT   318
                                                  .       :   :          :
```

7) Ферменты CYP5164 бурых водорослей, а также ферменты плазмодиофоры относятся к другой большой группе P450, на что указывают как механистические, так и филогенетические особенности. Члены клана CYP74 альфа-протеобактерий, растений и метазоа выстраиваются на древе как отдельная большая ветвь



Клонирование генов и получение рекомбинантных белков проводили при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр Российской академии наук". Работы по изучению каталитической активности рекомбинантных ферментов были выполнены при финансовой поддержке гранта РНФ 20-14-00338.