

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ
КАЗАНСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ФАТЫХОВА ВАЛЕРИЯ СЕРГЕЕВНА

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА
ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗЫ СУР5164В1 БУРОЙ ВОДОРОСЛИ
*Ectocarpus siliculosus***

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Академик РАН

Александр Николаевич Гречкин

Казань – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Липоксигеназный каскад превращения полиненасыщенных жирных кислот	15
1.2. Общая характеристика цитохромов P450	18
1.3. Цитохромы P450 клана CYP74	25
1.4. Ферменты CYP74 сигнальных ветвей липоксигеназного каскада: алленоксидсинтазы и гидропероксидлиазы	28
1.5. Дивинилэфирсинтазы	32
1.6. Эпоксиспиропирансинтазный путь превращения гидроперекисей жирных кислот	36
1.7. Механизмы каталитического действия ферментов CYP74	43
1.8. Оксипирины бурых водорослей	45
1.9. <i>Ectocarpus siliculosus</i> как модельный объект исследований	48
1.10. Постановка цели исследования	52
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
2.1. Методы биоинформатики	55
2.2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	55
2.3. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле	57
2.4. Молекулярное клонирование	58
2.5. Определение нуклеотидной последовательности ДНК	58
2.6. Характеристика используемых бактериальных векторов	59
2.7. Характеристика используемых бактериальных штаммов	60
2.8. Среды для культивирования бактерий	64
2.9. Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	65
2.10. Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i>	66
2.11. Индукция синтеза рекомбинантных белков	67

2.12. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле	68
2.13. Выделение и очистка рекомбинантного белка	69
2.14. Реактивы и материалы для исследований катализа рекомбинантных ферментов	70
2.15. Получение гидроперекисей жирных кислот	71
2.16. Кинетические исследования рекомбинантных ферментов	72
2.17. Проведение реакций, катализируемых рекомбинантными ферментами, с гидроперекисями жирных кислот	72
2.18. Анализ продуктов реакций, катализируемых рекомбинантными ферментами, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	73
2.18.1. Хроматография на обращенной фазе	73
2.18.2. Хроматография на нормальной фазе	74
2.19. Спектральные исследования	74
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	76
3.1. Биоинформационный анализ предполагаемого CYP74-подобного фермента <i>E. siliculosus</i>	76
3.2. Получение очищенного препарата рекомбинантного фермента CYP5164B1 <i>E. siliculosus</i>	87
3.3. Идентификация рекомбинантного фермента CYP5164B1 <i>E. siliculosus</i> как эпоксиалкогольсинтазы	94
3.4. Механизм каталитического действия эпоксиалкогольсинтазы EsEAS <i>E. siliculosus</i>	103
3.5. Анализ оксилипинового профиля бурых водорослей разных видов	109
3.6. Анализ взаимосвязи структуры и функций цитохромов P450 клана CYP74	114
3.7. Получение рекомбинантных ферментов дикого типа – алленоксидсинтазы LeAOS3 томата и дивинилэфирсинтазы NtDES (CYP74D3) табака	116
3.8. Каталитические свойства мутантных форм EsEAS, LeAOS3 и	122

NtDES

3.9. Значение N-концевой последовательности для каталитического действия EsEAS 130

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 133

ВЫВОДЫ 139

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 141

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АОС – алленоксидсинтаза;

ГПЛ – гидропероксидлиаза;

ДЭС – дивинилэфирсинтаза;

ЭАС – эпоксиалкогольсинтаза;

ЛОГ – липоксигеназа;

ПОГ – пероксигеназа;

АОЦ – алленоксидциклаза;

АФК – активные формы кислорода;

ЛОГ – липоксигеназа, окисляющая полиненасыщенную жирную кислоту по атому углерода в положении 9;

13-ЛОГ – липоксигеназа, окисляющая полиненасыщенную жирную кислоту по атому углерода в положении 13;

ПНЖК – полиненасыщенная жирная кислота;

СРС – субстрат-распознающий сайт;

18:1 – октадеценовая кислота

18:2 – октадекадиеновая (линолевая) кислота;

18:3 – октадекатриеновая (α -линоленовая) кислота;

13-ГПОТ – (9*Z*,11*E*,13*S*,15*Z*)-13-гидроперокси-(9,11,15)-октадекатриеновая кислота;

13-ГПОД – (9*Z*,11*E*,13*S*)-13-гидроперокси-(9,11)-октадекадиеновая кислота;

9-ГПОТ – (9*S*,10*E*,12*Z*,15*Z*)-гидроперокси-(10,12,15)-октадекатриеновая кислота;

9-ГПОД – (9*S*,10*E*,12*Z*)-9-гидроперокси-(10,12)-октадекадиеновая кислота;

9,10-ЭОД – (12*Z*)-9,10-эпокси-(10,12)-октадекадиеновая кислота;

12,13-ЭОД – (9*Z*)-12,13-эпокси-(9,11)-октадекадиеновая кислота;

9,10-ЭОТ – (10*E*,12*Z*)-9,10-эпокси-(10,12,15)-октадекатриеновая кислота;

12,13-ЭОТ – (9*Z*,11*E*,13*S*,15*Z*)-12,13-эпокси-(9,11,15)-октадекатриеновая кислота;

12-ОФДК – (15*Z*)-12-оксофито-10,15-диеновая кислота;

12-ОФЕК – 12-оксо-10-фитоеновая кислота;
10-ОФДК – (15Z)-10-оксо-11,15-фитодиеновая кислота;
10-ОФЕК – 10-оксо-11-фитоеновая кислота;
15-ГПЭПЕ - (5Z,8Z,11Z,13E,15S,17Z)-13-гидроперокси-5,8,11,13,17-эйкозапентаеновая кислота
 α -кетол – оксо-гидрокси-производное жирной кислоты;
эпоксиспирт – эпокси-гидрокси-производное жирной кислоты;
(ω 5Z)-этеролоновая кислота – (9Z,11E,1'Z,3'Z)-12-(1',3'-гексадиенилокси)-9,11-додекадиеновая кислота;
колнелевая кислота – (8E,1'E,3'Z)-9-(1',3'-нонадиенилокси)-8-ноненовая кислота;
колнеленовая кислота – (8E,1'E,3'Z,6'Z)-9-(1',3',6'-нонатриенилокси)-8-ноненовая кислота;
НАД(Ф)Н – никотинамиддинуклеотидфосфат восстановленный;
ФАД – флавинадениндинуклеотид;
ФМН – флавинмононуклеотид;
Трис – трис-(гидроксиметил)-аминометан;
ДСН – додецилсульфат натрия;
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;
ДМСО – диметилсульфоксид;
ФМСФ – фенилметилсульфонилфлуорид;
ПЦР – полимеразная цепная реакция;
дНТФ – смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
ОРС – открытая рамка считывания;
ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид;
Диазометан – N-нитрозотолуол-4-сульфометиламид;
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
ТМС – триметилсилил;
Ме/ТМС – ТМС-производное метилового эфира;
ГХ-МС – газовая хромато-масс-спектрометрия;

ПОЭТЭ – полиоксиэтилен-10-тридецилэфир;
ЯМР – ядерный магнитный резонанс;
COSY, correlation spectroscopy – корреляционная спектроскопия;
HSQC, heteronuclear single quantum coherence spectroscopy – гетероядерная спектроскопия когерентности отдельных квантов;
HMBC, heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy – спектроскопия корреляции множественных гетероядер;
NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy – спектроскопия ядерных эффектов Оверхаузера.

ВВЕДЕНИЕ

Постановка проблемы и ее актуальность. Оксипирины являются физиологически активными соединениями, образуемыми в результате окислительной трансформации полиненасыщенных жирных кислот. У животных оксипирины формируются главным образом в рамках каскада реакций превращения арахидоновой кислоты; они играют важную роль в воспалительных процессах, ответах на инфекции и другие стрессовые факторы, при развитии аллергических реакций, реакций на действие лекарств и ксенобиотиков и др. Растения не имеют многих защитных механизмов, свойственных иммунной системе животных. При этом у растений обнаружены принципиально другие, достаточно сложные и эффективные механизмы защиты, в которых одну из главных ролей также играют оксипирины. Эти биологически активные соединения могут функционировать либо в качестве сигнальных молекул, либо защитных веществ, часто проявляя сочетание тех и других свойств. Поскольку стрессовая устойчивость является важнейшей характеристикой продуктивности растений, изучение биосинтеза растительных оксипиринов и их биологической активности, несомненно, является актуальным.

Разнообразие оксипиринов обеспечивается липоксигеназами и цитохромами P450 семейства CYP74 (Grechkin, 1998; Brash 2009). Семейство CYP74 включает только ферменты растений, разделяемых по каталитической активности на три типа: дегидразы – алленоксидсинтазы (АОС) и дивинилэфирсинтазы (ДЭС), а также изомеразы – гидропероксидлиазы (ГПЛ). К настоящему времени охарактеризовано несколько десятков ГПЛ и АОС, а также несколько ДЭС разных видов растений. Однако разнообразие генов семейства CYP74 в геномах различных организмов предполагает и другие типы катализа. Это предположение основано на разработанной ранее модели механизма катализа, согласно которой общим промежуточным соединением в реакции является эпоксиаллильный радикал. Исходя из этого, среди продуктов липоксигеназного каскада с высокой вероятностью могут быть обнаружены эпокиспирты и их производные – тригидроксикислоты.

Недавно в классификации ферментов CYP74 произошли значительные изменения. Ряд нерастительных цитохромов P450 различных семейств, наряду с растительными ферментами семейства CYP74, были объединены в клан CYP74 на основании данных филогенетического анализа. В состав клана CYP74, помимо АОС, ГПЛ и ДЭС, был включен также фермент, катализирующий новый тип реакции – эпоксиалкогольсинтаза (ЭАС) ланцетника (*Branchiostoma floridae*) (CYP440A1, GenBank: ACD88492.1) (Lee *et al.*, 2008). Этот фермент катализирует превращение гидроперекисей жирных кислот в эпокиспирты.

К настоящему времени складывается предположение о древнем происхождении ферментов CYP74, которое подтверждают пластидная локализация большинства ферментов CYP74, особенности структуры и каталитического действия этих ферментов по сравнению с остальными цитохромами P450, а также данные филогенетических исследований. Дополнительным доказательством является тот факт, что представители клана CYP74 описаны у широкого ряда организмов, в том числе у животных (Lee *et al.*, 2008), растений (Hughes *et al.*, 2009), грибов (Hoffmann *et al.*, 2013), протеобактерий (Lee *et al.*, 2008). В то же время, оксипирины обнаружены у гораздо большего числа организмов (Andreou *et al.*, 2009; Barbosa *et al.*, 2016), в том числе у бурых и красных водорослей (Gerwick, 1994, 1999; Gerwick, Singh, 2002). При этом в ряде случаев структура оксипиринов таких организмов совпадает с таковой зеленых растений, что указывает на возможное сходство ферментов, ответственных за их образование. Исходя из этой гипотезы, эволюция липоксигенного каскада с участием ферментов CYP74 началась до разделения основных ветвей эукариот и протекала линейно в соответствии с общей эволюцией организмов. Бурые водоросли представляют одну из пяти эукариотических линий происхождения, которые имеют независимо развившийся комплекс многоклеточности (остальными четырьмя являются животные, грибы, зеленые растения и красные водоросли). Поэтому предположение о наличии у представителей данной группы организмов ферментов, родственных фермен-

там клана CYP74, соответствует гипотезе линейной эволюции липоксигеназного каскада. В широком смысле, выявление подобных ферментов у бурых водорослей является актуальной задачей с точки зрения изучения эволюции не только клана CYP74, но и липоксигеназного каскада, и суперсемейства цитохромов P450 в целом. Эффективность подобных работ во многом определяется возможностями биоинформационного анализа. К настоящему времени геном одного из представителей бурых водорослей – *Ectocarpus siliculosus*, является полностью расшифрованным, что обусловило выбор этого вида объектом настоящего исследования.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является выявление фермента, близкородственного представителям клана CYP74, у бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* и его сравнительная характеристика с ферментами CYP74 высших растений. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявление фермента *E. siliculosus*, близкородственного представителям клана CYP74; клонирование кодирующей области гена и получение очищенного препарата функционально активного соответствующего рекомбинантного фермента.

2. Характеристика особенностей каталитического действия рекомбинантного фермента *E. siliculosus*. Определение субстратной специфичности и константы каталитической для данного фермента. Расшифровка механизма каталитического действия фермента *E. siliculosus*.

3. Определение положения фермента *E. siliculosus*, близкородственного представителям клана CYP74, в молекулярно-филогенетической модели суперсемейства цитохромов P450.

4. Выявление сайтов, консервативных для фермента *E. siliculosus*, близкородственного представителям клана CYP74, и растительных ферментов CYP74 со сходной субстратной специфичностью.

5. Получение очищенных препаратов мутантных форм по выбранным сайтам фермента *E. siliculosus*, близкородственного представителям клана

CYP74, а также рекомбинантных ферментов CYP74 растений со сходной субстратной специфичностью и их мутантных форм по выбранным сайтам.

6. Характеристика значимости выбранных сайтов для каталитического действия ферментов клана CYP74 на основании результатов сопоставления каталитических свойств фермента *E. siliculosus*, близкородственного представителем клана CYP74, и растительных ферментов CYP74 со сходной субстратной специфичностью со свойствами соответствующих мутантных форм по выбранным сайтам.

Научная новизна работы. В геноме бурой водоросли *E. siliculosus* впервые выявлен ген фермента клана CYP74, ответственного за синтез оксипинов – эпоксиалкогольсинтазы EsEAS, которая была получена и охарактеризована в виде рекомбинантного фермента. Фермент EsEAS катализирует превращение 9-гидроперекиси линолевой кислоты в 9,10-эпокси-11-гидрокси-октадеценую кислоту, в основном, (9*S*,10*S*,11*S*)-эпимер с *транс*-эпоксидным кольцом. Расшифрован механизм каталитического действия фермента EsEAS, включающий следующие стадии: (1) гомолиз гидроперекисной группы; (2) перегруппировка образующегося оксирадикала с образованием эпоксиаллильного радикала; (3) рекомбинация эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется эпокиспирт.

Впервые с помощью сайт-направленного мутагенеза получены мутантные формы дивинилэфирсинтазы NtDES (CYP74D3) табака обыкновенного (*Nicotiana tabacum*) с измененными механизмами каталитического действия. Мутантная форма NtDES V379F катализирует образование продукта алленоксидсинтазной реакции, в то время как продукты дивинилэфирсинтазной и гидропероксидлиазной реакций образуются в следовых количествах. Мутантная форма NtDES V379C катализирует образование продуктов алленоксидсинтазной, гидропероксидлиазной, дивинилэфирсинтазной и эпоксиалкогольсинтазной реакций.

Впервые выявлены продукты эпоксиалкогольсинтазной активности в талломах представителей бурых водорослей: *Saccharina cichorioides*, *Sargassum pallidum*, *Coccophora langsdorfii* и *Pilaella littoralis*.

Научно-практическая значимость работы. Разработаны системы получения и препаративной очистки цитохромов растений, способные найти применение в промышленности. Качественное изменение ферментативного катализа при сайт-направленном мутагенезе представляет потенциальный интерес для практического использования в биоинженерии. Результаты работы могут способствовать разработке алгоритмов направленной модификации белков с целью получения ферментов с заданными свойствами.

Охарактеризован фермент, катализирующий образование оксилипинов, обладающих антимикробными свойствами – эпокиспиртов и тригидроксикислот. Тригидроксикислоты входят в состав триацилглицеридов касторового масла (Lin *et al.*, 2010), которое широко используется в промышленности. Растения, содержащие тригидроксикислоты в больших количествах, используются для лечения воспалительных заболеваний, включая маститы, риниты, синуситы и энтериты. Некоторые тригидроксикислоты ингибируют образование простагландина D2 (Choi *et al.*, 2012), другие проявляют активность, сходную с таковой простагландина E (Wang, Wang, 1996).

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 исследования. Работа проводилась с 2011 по 2016 гг. в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Липоксигеназы и цитохромы семейства CYP74: структура и роль в катализе биосинтеза оксилипинов – эндогенных биорегуляторов растений» (гос. регистрационный

номер: 01200901959). Исследования автора частично поддержаны грантами РФФИ № 12-04-01140-а, № 11-04-01601-а, № 12-04-97059-р_поволжье_а, № 14-04-01532-а, МК-4886.2013.4, МК-6529.2015.4, государственным контрактом № 14.740.11.0797, а также грантом ведущей научной школы НШ-825.2012.4. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

Положения, выносимые на защиту:

1. Фермент CYP5164B1 *Ectocarpus siliculosus* является 9-гидропероксид-специфичной эпоксиалкогольсинтазой, катализирующей превращение (9S)-гидроперекиси линолевой кислоты в 9,10-эпокси-11-гидрокси-октадеценую кислоту, в основном, (9S,10S,11S)-эпимер с транс-эпоксидным кольцом.
2. Механизм каталитического действия фермента EsEAS включает следующие стадии: (1) гомолиз гидроперекисной группы; (2) перегруппировка образующегося оксирадикала с образованием эпоксиаллильного радикала; (3) рекомбинация эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется эпокиспирт.
3. Превращение дивинилэфирсинтазы NtDES (CYP74D3) табака обыкновенного (*Nicotiana tabacum*) в алленоксидсинтазу возможно в результате замены единичного аминокислотного остатка.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на 36-ом конгрессе FEBS «Biochemistry for Tomorrow's Medicine» (Италия, Турин, 2011); на VII Съезде общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, 2011); на 3-ем Международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2011); на конференции Young researchers in life sciences (Франция, Париж, 2012, 2014); на 3-ей Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012); на 18-ой международной конференции «Cytochrome P450: Biochemistry, Biophysics and

Biotechnology» (США, Сиэтл, 2013); на международной конференции по ферментам «International Conference on Enzyme (ICE)» (Китай, Пекин, 2014); на международной конференции по биофизике «International Conference on Biological Physics (ICBP)» (Китай, Пекин, 2014); на годичном собрании общества физиологов растений России «Сигнальные системы растений: от рецепторов до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 2016); на IV Российском симпозиуме с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2016), а также на итоговой конференции Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН (2013).

По результатам работы опубликованы две статьи в отечественном и зарубежном рецензируемых изданиях. Одна статья принята в печать в зарубежное рецензируемое издание.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Липоксигеназный каскад превращения полиненасыщенных жирных кислот

Жирные кислоты являются главными составляющими компонентами липидов, имеющих общее для всех живых клеток строение. В основном, они входят в состав мембран и запасующих липидов. Помимо этого, жирные кислоты и их производные играют роль сигнальных молекул (Xue *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006). Состав и обмен липидов часто меняются на протяжении жизненного цикла клеток (Somerville *et al.*, 2000). Одной из основных реакций метаболизма липидов является окисление полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) (Feussner, Wasternack, 2002). Метаболизм ПНЖК, протекающий при участии липоксигеназ (ЛОГ) (Gardner, 1988; Hamberg, Gardner, 1992) или альфа-диоксигеназ (Hamberg *et al.*, 1999), получил название оксипинового, или липоксигеназного, каскада (Рис. 1).

Для цветковых растений характерны следующие оксипины: гидроперекиси жирных кислот, гидрокси-, оксо-, эпокси- или кето-производные жирных кислот, дивиниловые эфиры, альдегиды и растительные гормоны 12-оксофитодиеновая (ОФДК) и жасмоновая кислоты (Grechkin, 1998). Оксипины являются биологически активными соединениями (Howe, Schilmiller, 2002), в том числе посредниками в осуществлении реакции ответа на повреждение и воздействие патогенов (Leon *et al.*, 2001; Browse, 2005; Schilmiller, Howe, 2005; Wasternack *et al.*, 2006; Wasternack, 2007). Механические или наносимые насекомыми или некротрофными патогенами повреждения приводят к быстрому локальному накоплению в районе повреждения оксипинов, которые участвуют в регуляции защитного ответа с помощью сигнальных молекул (Blee, 2002; Browse 2005).

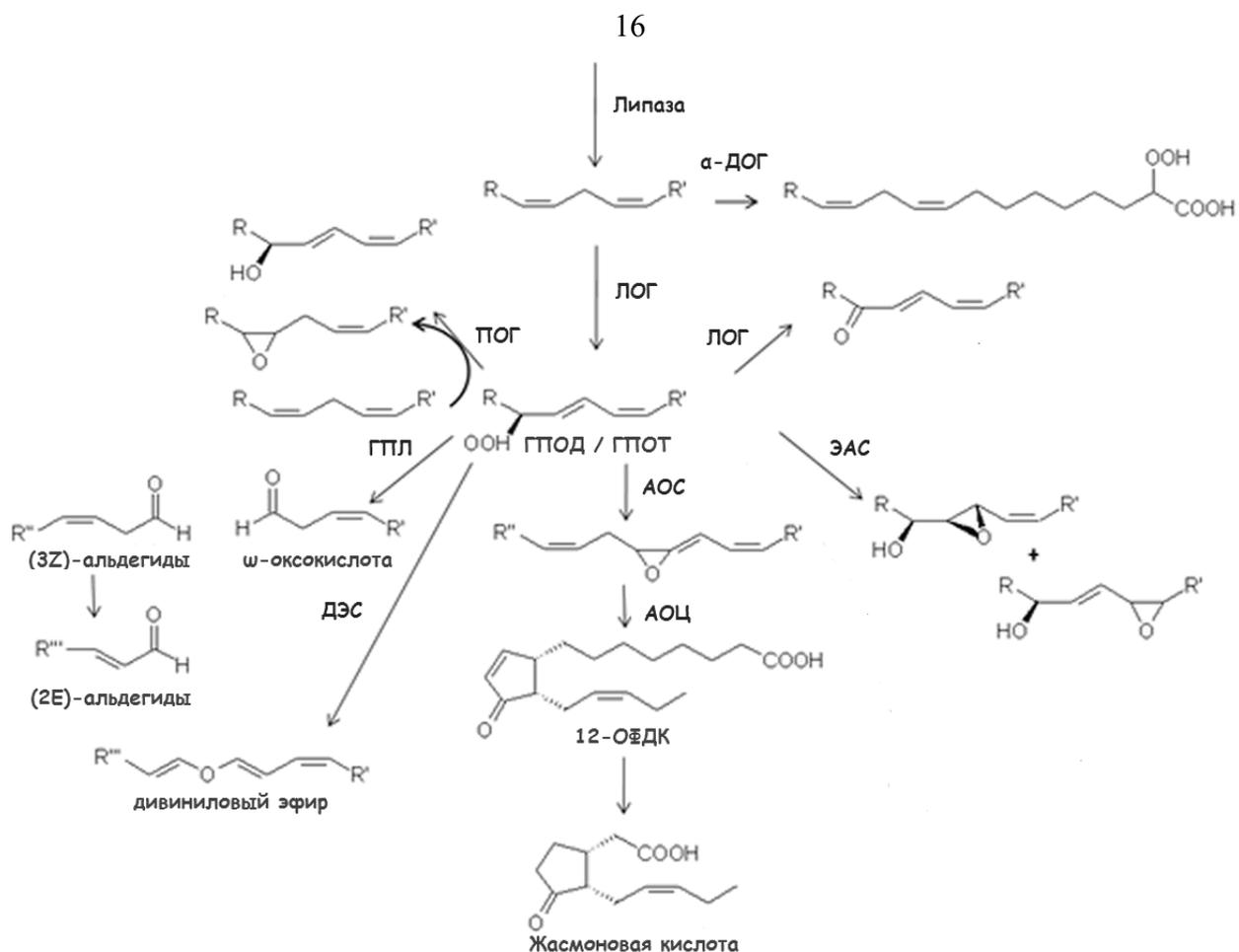


Рис. 1. Липоксигеназный каскад превращения полиненасыщенных жирных кислот.

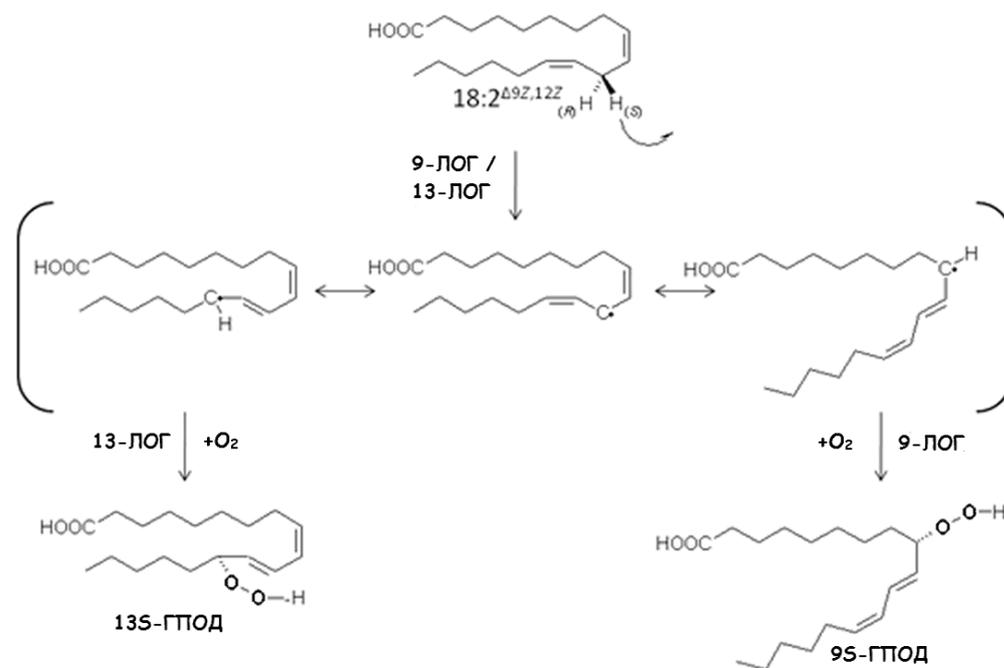


Рис. 2. Механизм регио- и стереоспецифичного образования гидроперексидей линолевой кислоты в ходе липоксигеназной реакции.

Ряд оксипинов представляют собой летучие соединения, которые обеспечивают взаимодействие между растениями и другими обитателями биосферы, в том числе участвуют в коммуникации между отдельными растениями (Farmer, Ryan, 1990). Кроме того, летучие оксипины играют роль в обеспечении фунгицидных свойств растения (Kishimoto *et al.*, 2006) и способны привлекать врагов растительноядных насекомых (Van Poecke *et al.*, 2001; D'Alessandro, Turlings, 2006; Fatouros *et al.*, 2005; Shiojiri *et al.*, 2006). Привлечение хищников с помощью летучих сигнальных оксипинов, выделяемых соседними поврежденными растениями, помогает растению заранее подготовиться к защите (Engelberth *et al.*, 2004). Еще одна функция оксипинов состоит в осуществлении межвидовой коммуникации между растениями и грибами при формировании симбиозов (Schüssler *et al.*, 2001). Участие оксипинов в формировании защитного ответа у растений может осуществляться с помощью сигнальных молекул, индуцирующих экспрессию генов защиты и регулирующих локальную гибель клеток (La Camera *et al.*, 2004).

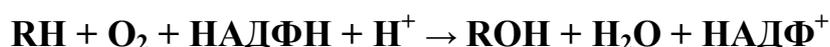
Липоксигеназы представляют собой ферменты, инициирующие образование оксипинов, присоединяя кислород к (1Z,4Z)-пентадиеновой группировке ПНЖК и катализируя тем самым образование гидроперекисей жирных кислот (Feussner, Wasternack, 2002; Brash, 1999; Mosblech *et al.*, 2009; Liavonchanka, Feussner, 2006; Blee, 1998a). Основными субстратами растительных липоксигеназ являются линолевая кислота (18:2(n-6)), α -линоленовая (18:3(n-3)) и гексадекатриеновая (16:3(n-3)) кислоты. ЛОГ классифицируют согласно их позиционной специфичности по отношению к окисляемому субстрату. В случае превращения C18 жирных кислот могут образовываться 9- и 13-гидроперекиси при участии 9- и 13-ЛОГ, соответственно (Рис. 2) (Schneider *et al.*, 2007). Кроме того, гидроперекиси жирных кислот могут образовываться путем спонтанного автоокисления (Mosblech *et al.*, 2009; Müller, 2004).

Гидроперекиси служат первичными продуктами каскада реакций образования оксилипинов. Последующие превращения гидроперекисей у растений катализируются следующими ферментами: пероксигеназами, вицинальдиолсинтазами и цитохромами P450 семейства CYP74, к которым относятся алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ) и дивинилэфирсинтазы (ДЭС) (Hamberg, Hamberg 1996; Grechkin, 1998; Blee, 1998a). Кроме того, гидроперекиси жирных кислот могут разрушаться метаболитами антиоксидантных систем, такими как глутатион или токоферол (Liavonchanka, Feussner, 2006; Maeda, DellaPenna, 2007).

Некоторые оксилипины образуются в ответ на воздействие патогенов и обладают антимикробной активностью (Graner *et al.*, 2003; Prost *et al.*, 2005). Оксилипины обладают ингибирующей рост активностью, однако не оказывают воздействия на жизнеспособность клеток; в некоторых случаях эти соединения способны вызывать гибель спор патогена.

1.2. Общая характеристика цитохромов P450

Цитохромы P450 являются гем-тиолатными ферментами, катализирующими многие биосинтетические и ксенобиотические реакции, протекающие во всех организмах от бактерий до человека, за исключением облигатных анаэробов (Nelson, 2009). Несмотря на разнообразные функции цитохромов P450, механизм катализа является единым: в присутствии доноров электронов происходит активация молекулярного кислорода, один из атомов которого встраивается в молекулу окисляемого субстрата, а второй восстанавливается до воды (Mansuy 1998; Werck-Reichhart, Feyereisen, 2000; Bernhardt, 2006). Общая схема монооксигеназной реакции имеет следующий вид (Feyereisen, 2012):



У классических представителей суперсемейства P450 связанный с гемом кислород активируется перемещением двух электронов от НАДФН посредством НАДФН-цитохром-P450-редуктазы (Рис. 3). В некоторых случаях

второй электрон более эффективно переносится с помощью альтернативного электронного транспорта с участием НАДН, НАДН-цитохром-b5-редуктазы и цитохрома b5 (De Vetten *et al.*, 1999).

В восстановленном состоянии цитохромы P450 могут связывать моноокись углерода вместо кислорода. Связывание CO препятствует активации O₂, в результате чего происходит ингибирование активности, однако под действием света с максимумом эффективности при 450 нм может происходить реверсия. Название цитохромов P450 отражает характерный максимум спектра оптического поглощения после восстановления дитионитом натрия и обработки моноокисью углерода при длине волны 450 нм (максимум Сорета) (Omura, 1964).

Реакции, катализируемые цитохромами P450, очень разнообразны: гидроксילирование, деалкилирование, дегидратация, десатурация, димеризация, расщепление связи C-C, расширение кольца, изомеризация, декарбоксилирование, восстановление и т.д. Природные субстраты растительных ферментов P450 включают предшественников мембранных стеролов и структурных полимеров, таких как лигнин, кутин, суберин, спорополленин. Цитохромы P450 также способствуют поддержанию гомеостаза фитогормонов и сигнальных молекул, контролирующих их биосинтез (гиббереллины, ауксин, брассиностероиды, цитокины, стриголактоны, жасмонаты) и катаболизм (гиббереллины, брассиностероиды, абсцизовая кислота).

Они участвуют в биосинтезе пигментов, летучих соединений, антиоксидантов, аллелохимикатов и защитных соединений, включая фенолы и их конъюгаты, флавоноиды, кумарины, лигнаны, глюкозинолаты, цианогенные гликозиды, бензоксаиноны, изопреноиды, алкалоиды (Schuler, Werck-Reichhart, 2003; Morant *et al.*, 2003; Mizutani, Ota, 2010). Кроме того, цитохромы P450 участвуют в превращении и детоксикации ксенобиотиков, таких как пестициды (Werck-Reichhart *et al.*, 2000; Morant *et al.*, 2003; Powles, Yu, 2010).

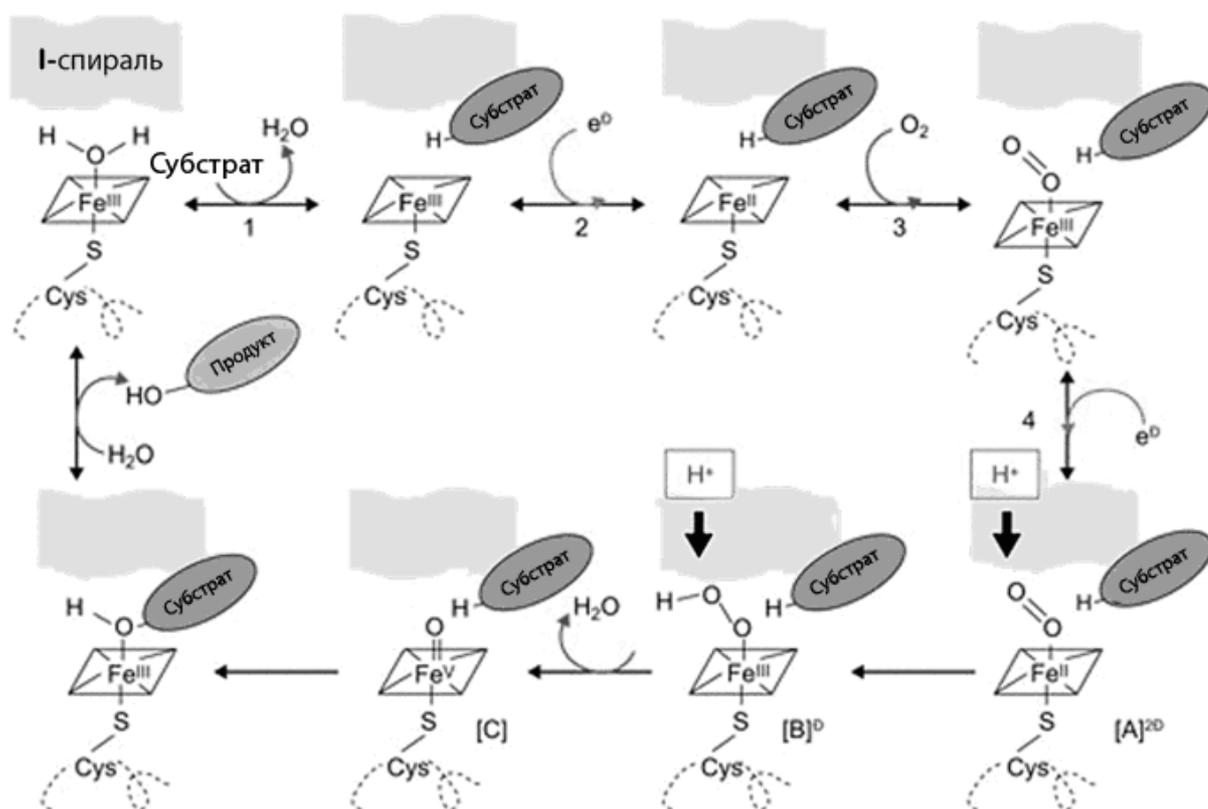


Рис. 3. Механизм каталитического действия цитохромов P450. Наиболее распространенной каталитической реакцией является гидроксирование (включение O) с использованием реактивного и электрофильного промежуточного соединения $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ (форма [C], нижний ряд). Гидропероксо-форма фермента (форма [B]⁻, нижний ряд) также является электрофильным окислителем, катализирующим включение OH^+ группы. Нуклеофильную атаку катализируют [A]²⁻ и [B]⁻-формы фермента; восстановление, изомеризацию или дегидратацию катализируют бескислородные формы фермента. Таким образом, экстраординарное разнообразие реакций, катализируемых цитохромами P450, можно объяснить разнообразием апопротеинов и внутренней реактивностью субстратов (Werck-Reichhart, Feyereisen 2000).

Общая номенклатура генов цитохромов P450 различных организмов основана на филогении и идентичности аминокислотных последовательностей (Nelson, 2006). Согласно представлению комитета по номенклатуре цитохромов P450 присваиваются названия в хронологическом порядке. Цитохромов P450 растений соответственно присвоены названия от CYP71A1 до CYP99XY, и далее – от CYP701A1 и выше.

Идентичность последовательностей внутри суперсемейства P450 может быть относительно невысокой. Так, гомология последовательностей всех цитохромов P450 резуховидки Таля составляет менее 20 %. Это является следствием малого числа абсолютно консервативных аминокислотных остатков (Feuereisen, 2011), каковыми являются цистеин в гем-связывающем кармане и ERR-триада (Podust *et al.*, 2001). Остальные домены последовательности P450 имеют сходные мотивы, но не обладают строгой консервативностью (Kelly *et al.*, 2009). Степень идентичности последовательностей цитохромов P450 растений с таковыми животных или микроорганизмов составляет менее 30 %; исключение составляет семейство CYP51, к которому относятся стерол-деметилазы растений и животных, имеющие 30-40 % идентичности (Nelson, 1999).

Внутри отдельных семейств степень идентичности аминокислотной последовательности составляет не менее 40 %, подсемейств – не менее 55 %. Однако общая номенклатура цитохромов P450 имеет свои исключения, особенно у растений, у которых часто происходят дубликации генов. В этом случае классификация семейств зачастую основана на филогении и генной организации. Однако суперсемейство P450 включает ферменты с сильно различающимися последовательностями, установление истинных эволюционных взаимоотношений которых является непростой задачей. Для проверки достоверности филогенетических деревьев, основанных на множественных выравниваниях аминокислотных последовательностей, могут быть использованы сопоставления высоко консервативных доменов, а также данные о расположении интронов. В ходе эволюции происходит потеря и приобретение

интронов; их положение и направление могут быть использованы в качестве диагностических признаков для поиска филогенетического предшественника на основе анализа аминокислотных последовательностей (Long *et al.*, 1995; Stoltzfus *et al.*, 1997).

Несмотря на невысокую степень идентичности аминокислотных последовательностей, для цитохромов P450 свойственна общая топология пространственной структуры белковой молекулы в комплексе с гемом, одним из лигандов которого является цистеиновая тиолатная группа, что обеспечивает сходство спектральных свойств (Graham, Peterson, 1999; Werck-Reichhart, Feyereisen, 2000).

Большинство переменных областей молекулы представлено гибкими субстрат-распознающими сайтами (CPC), которые позволяют цитохромам P450 быть универсальными биологическими катализаторами (Hannemann *et al.*, 2007). Наиболее консервативным является участок, формирующий кор вокруг гема, и состоящий из четырехспиральной (D, E, I и L) петли, спиралей J и K, двух β -складок и витка, называемого «отклонением» (Werck-Reichhart, Feyereisen, 2000). Компоненты кора включают следующие участки: богатая пролином мембранная петля (PPXP), I-спираль с кислород-связывающим доменом (AGxD/ET), ERR-триада и гем-связывающая петля (Werck-Reichhart *et al.*, 2000).

На N-концах цитохромов P450 различных организмов присутствует последовательность **PPGPxPxPxxGN**, которая несет большую функциональную нагрузку, помогая правильно сворачиваться молекулам белка. Было показано, что наиболее важными в этом мотиве являются первые три аминокислотных остатка **PPG** (Kemper, 2004). На расстоянии около 20 аминокислотных остатков после мотива **PPGP** располагается трипептид **KYG** (или **RYG**), характерный для ферментов семейств CYP51, CYP7, CYP8 и CYP19, а также CYP110 цианобактерий рода *Anabaena*, в настоящее время считающихся эволюционно наиболее древними (Nelson, 2004).

Гем-связывающая петля расположена на проксимальной поверхности гема непосредственно перед L-спиралью; данная петля содержит наиболее характерную для цитохромов P450 консенсусную последовательность (PxxGxRxCxG), в которой цистеин является аксиальным лигандом для гема (Werck-Reichhart, Feyereisen, 2000).

I-спираль находится в составе субстрат-связывающего кармана над гемом и включает консенсусную последовательность (AGxD/ET), участвующую в связывании и активации кислорода; для катализа монооксигеназной реакции абсолютно необходим консервативный остаток треонина (Poulos *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 2000).

ERR-триада, в случае белков растений и насекомых чаще всего начинающаяся с последовательности ETLR, локализована в K-спирали и необходима для стабилизации общей структуры (Bak *et al.*, 2011). Предполагается, что стабилизация происходит за счет «солевого мостика» (Blee, 2002). Второй остаток аргинина (ERR) расположен после K'-спирали в «изгибе», имеющем у растений мотив PxxFxF(E/D)RF (Bak *et al.*, 2011).

В структуре цитохромов P450 обычно присутствует пять β -складчатых структур и семнадцать α -спиралей; структуру можно разделить на два домена, один из которых состоит преимущественно из β -складчатых структур (домен β , который связывается с мембранами), тогда как второй – из α -спиралей (домен α) (Graham, Peterson, 1999) (Рис. 4). Проксимальная поверхность белка участвует в узнавании редокс-партнера и переносе электронов к активному центру; протоны поступают в активный центр с дистальной стороны.

Бактериальные цитохромы P450 являются растворимыми белками, но все описанные растительные ферменты связаны с мембранами; обычно они заякорены на цитоплазматической поверхности эндоплазматического ретикула посредством короткого гидрофобного участка на N-конце и гидрофобной петли (Williams *et al.*, 2000).

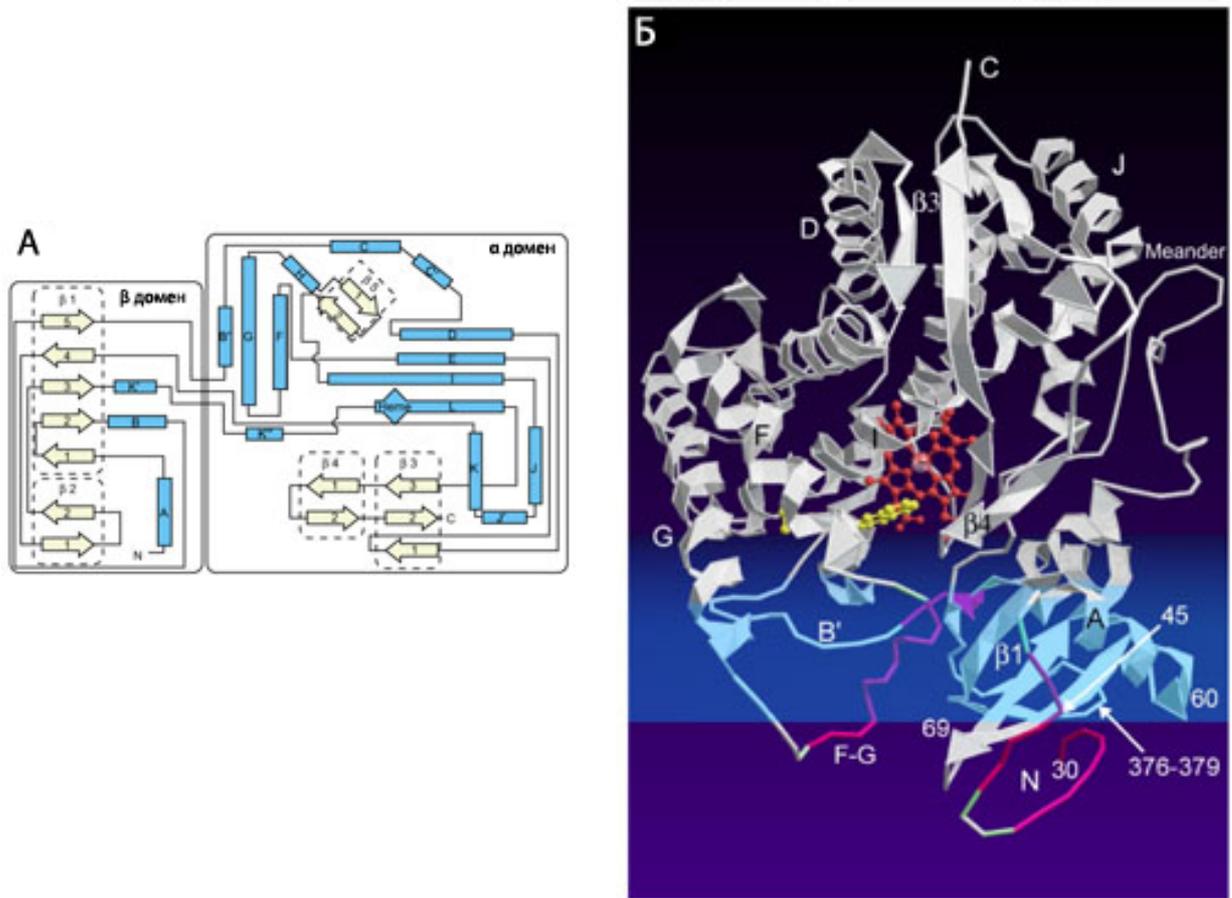


Рис. 4. Вторичная и третичная структуры цитохромов P450. (А) Диаграмма топологии вторичной структуры, показывающая группирование вторичных структурных элементов типичного цитохрома P450 (CYP102) (Graham, Peterson, 1999). Синие блоки – α -спирали; стрелки, объединенные пунктиром – β -складчатые структуры; линии – витки и петли. Размеры элементов не пропорциональны длине в аминокислотной последовательности. (Б) Ленточное представление дистальной поверхности третичной структуры цитохрома CYP2C5, показывающее его предположительную ассоциацию с мембраной эндоплазматического ретикулума (отмечено фиолетовым цветом) (Williams *et al.*, 2000). α -Спирали и β -складчатые структуры отмечены как в (А), гем выделен оранжевым цветом, субстрат – желтым. Домен α находится наверху слева, домен β – внизу справа. Эпитопы, не доступные для связывания с антителами при связывании белка с ЭПР, показаны красным цветом (указаны номера в аминокислотной последовательности). Гем-связывающая петля видна за гемовым протопорфирином (Werck-Reichhart, Feyereisen 2000).

Анализ последовательностей растительных цитохромов P450 зачастую выявляет сигнальные пептиды, которые транспортируют ферменты к пластидам (Schuler *et al.*, 2006).

Цитохромы P450 растений первоначально классифицировали на две большие группы: ферменты А-типа и не А-типа (Durst, Nelson, 1995; Paquette *et al.*, 2000). Большинство цитохромов P450, участвующих в биосинтезе вторичных метаболитов, входят в состав группы А-типа. В состав группы не А-типа входят разнообразные ферменты, которые в свою очередь делят на несколько отдельных подгрупп; некоторые ферменты, участвующие в метаболизме гормонов или липидов, иногда более сходны с нерастительными цитохромами P450, чем с растительными (Paquette *et al.*, 2000). Расшифровка большого количества геномов растений разных видов, включая потомков бессосудистых растений, привело к изменению принципа деления ферментов на А-тип и не А-тип (Nelson *et al.*, 2004).

1.3. Цитохромы P450 клана CYP74

Алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы и дивинилэфирсинтазы образуют отдельный монофилетический таксон в составе суперсемейства P450 – клан CYP74 (Nelson, 2006). В состав семейства CYP74 входят алленоксидсинтазы, гидропероксидлиазы, дивинилэфирсинтазы наземных растений. Ферменты CYP74 животных, прокариот и зеленых водорослей входят в состав клана (Рис. 5), но не семейства CYP74. Кроме того, в состав клана CYP74 включен единственный на данный момент фермент с отличающейся каталитической активностью – эпоксиалкогольсинтаза VfEAS ланцетника (*B. floridae*). В отличие от других цитохромов P450, для обеспечения каталитической активности ферментам CYP74 не нужен молекулярный кислород и окислительно-восстановительные потенциалы; ферменты CYP74 используют гидроперекиси жирных кислот и в качестве субстрата, и в качестве донора кислорода (Stumpe, Feussner, 2006; Lee *et al.*, 2008; Matsui, 2006; Noordermeer *et al.*, 2001).

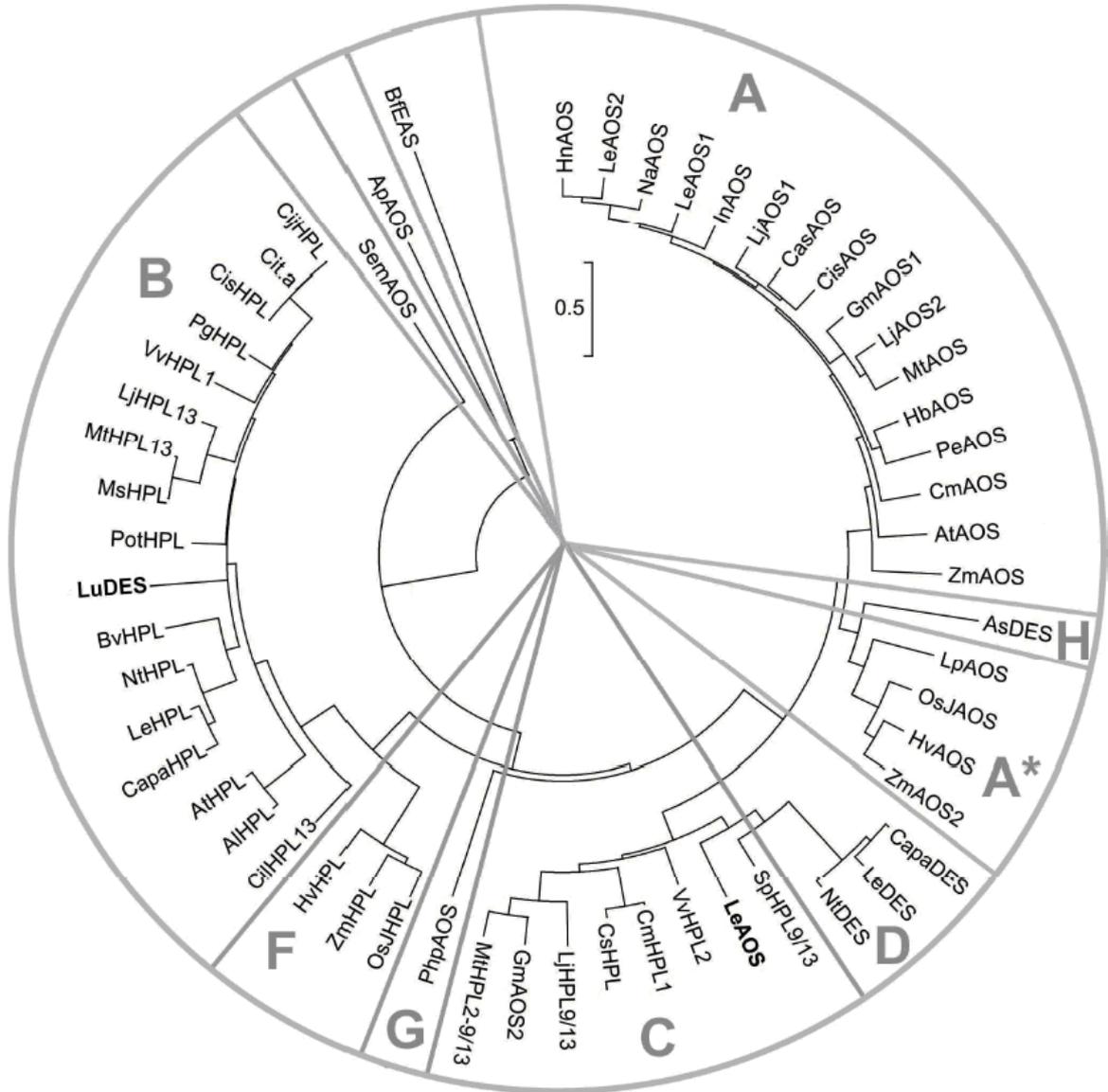


Рис. 5. Филогенетическое дерево ферментов CYP74, построенное методом «присоединения соседей». Предполагаемые подсемейства обозначены символами, предложенными Д. Нельсоном для соответствующих групп (<http://drnelson.uthsc.edu>) (Гоголев, неопубликованные данные).

Поэтому «кислород-связывающий и активизирующий домен» у ферментов CYP74 заменен так называемым «центральным доменом I-спирали» (домен IHCD) (Toporkova *et al.*, 2008).

Ферменты CYP74 проявляют удивительную каталитическую пластичность (Wasternack, Feussner, 2008). Об этом говорит наличие многофункциональных ферментов в составе клана CYP74. Так, алленоксидсинтаза LeAOS3 (CYP74C3) томата (*Lycopersicon esculentum*) катализирует не только образование окиси аллена, но также ее циклизацию и гидролиз (Grechkin *et al.*, 2008).

Согласно полученной модели из всех растительных ферментов члены подсемейств CYP74F и CYP74G наиболее близки к ферментам CYP74 животных, протеобактерий и зеленых водорослей, что согласуется с общими представлениями об эволюции живых существ (Гоголев, неопубликованные данные).

Разделение на филогенетическом древе двух основных типов ферментов CYP74 – ГПЛ и АОС – указывает на то, что эта дивергенция произошла на ранних этапах эволюции семейства. В пользу такого вывода также свидетельствует тот факт, что оба типа ферментов представлены у филогенетически отдаленных организмов. Разделение на 9- и 13-гидропероксид-специфичные ферменты также закономерно отражает эволюцию семейства. Две удаленные терминальные монофилетические группы – ГПЛ (подсемейства CYP74B, CYP74B*, CYP74E) и АОС (подсемейство CYP74A) включают ферменты, обладающие исключительно 13-гидропероксид-специфичностью. В то же время, ферменты эволюционно более молодой группы CYP74C/CYP74D/CYP74A* обладают 9-гидропероксид-специфичной или дуалистичной активностью. До настоящего времени 9-гидропероксид-специфичные ферменты CYP74 обнаружены только у растений отдела покрытосеменных.

1.4. Ферменты СYP74 сигнальных ветвей липоксигеназного каскада: алленоксидсинтазы и гидропероксидлиазы

Алленоксидсинтазы, ранее в литературе называемые гидропероксид-изомеразами или гидропероксид-дегидразами (Gardner, 1991; Hamberg, Gardner, 1992), катализируют превращение гидроперекисей жирных кислот в нестабильные окиси аллена. 13-Гидропероксид-специфичные алленоксидсинтазы являются ключевыми ферментами в пути биосинтеза жасмоновой кислоты и ее производных (Рис. 6). Недавно пространственные структуры алленоксидсинтаз PaAOS гваяюлы (*Parthenium argentatum*) и AtAOS резуховидки Таля были расшифрованы, что обеспечило понимание реакционных механизмов этих ферментов (Lee *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). В результате были получены данные о структуре активного сайта, который контролирует реакционную способность эпоксиаллильного радикала, который, как было показано в экспериментах по сайт-направленному мутагенезу, является общим промежуточным продуктом АОС и ГПЛ (Тороркова *et al.*, 2008). Замена остатка ароматической аминокислоты – фенилаланина, участвующего в стабилизации эпоксиаллильного радикала у AtAOS, на остаток неполярной аминокислоты – лейцина – привела к частичному превращению АОС в ГПЛ (Lee *et al.*, 2008). Алленоксидсинтаза LeAOS3 томата путем единичных замен аминокислотных остатков в четырех разных сайтах домена IHCD и ERR-триады также была преобразована в ГПЛ – частично либо полностью (Тороркова *et al.*, 2008).

Гидропероксидлиазы катализируют превращение гидроперекисей жирных кислот в полуацетали, которые в свою очередь спонтанно диссоциируют на альдегиды и нестабильные енольные формы соответствующих ω-оксокислот (Рис. 7).

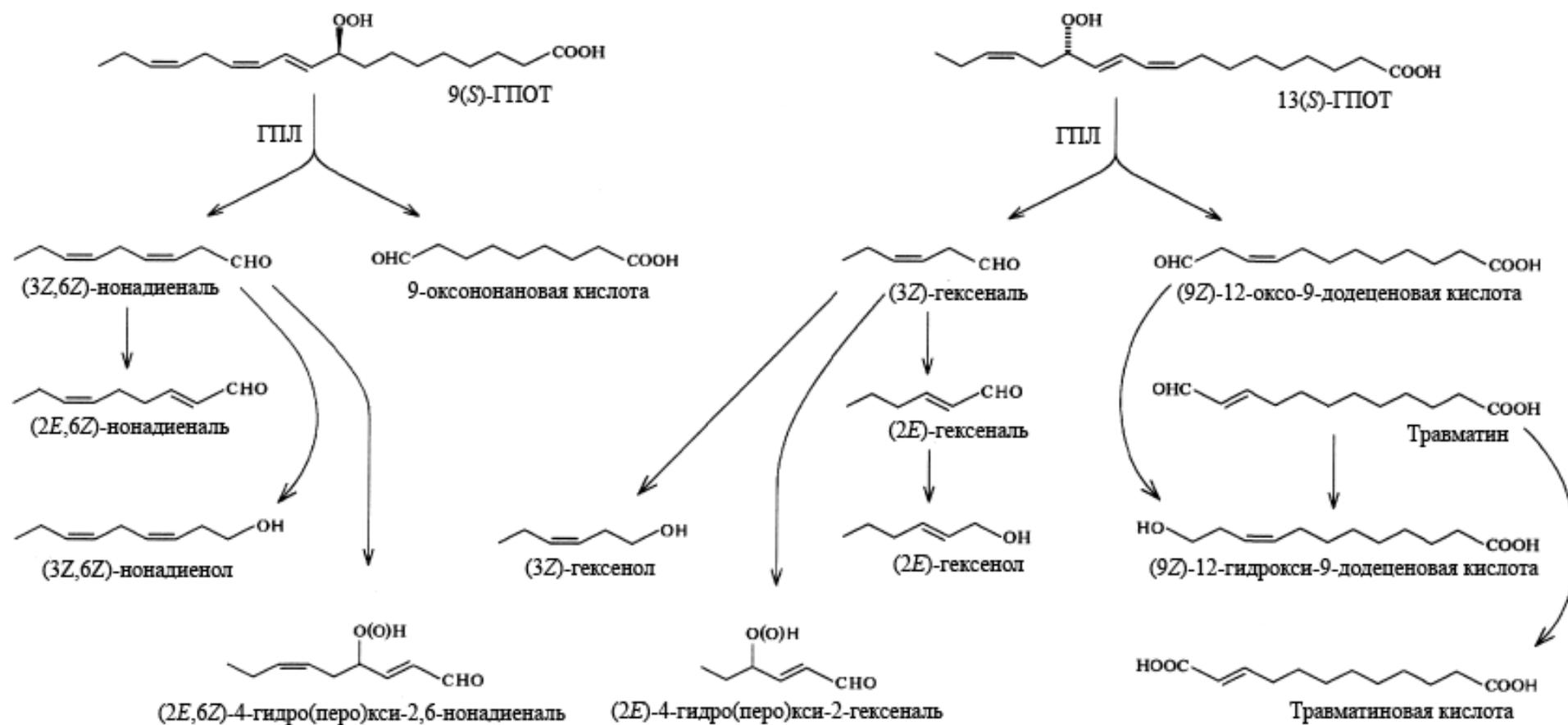


Рис. 7. Метаболизм (9S)-ГПОТ и (13S)-ГПОТ в ходе гидропероксидлиазного пути.

Альдегиды и спирты, образующиеся из 13-гидроперекисей линолевой и α -линоленовой кислот, образуют группу С-6 летучих соединений, к которым относятся (2*E*)-гексеналь, (2*E*)-гексенол, (3*Z*)-гексеналь, гексаналь и гексанол (Matsui, 2006).

Таким образом, благодаря активности ГПЛ уменьшается пул гидроперекисей жирных кислот, доступных для альтернативного пути образования жасмонатов. С-6 летучие вещества играют роль в сигналинге растений при осуществлении защитных реакций (Howe, Jander, 2008).

13-Гидропероксид-специфичные АОС и ГПЛ локализованы в хлоропластах листьев (Stumpe, Feussner, 2006). 13-ГПЛ локализованы в наружных мембранах, тогда как 13-АОС – во внутренних мембранах мезофилла хлоропластов томата (Froehlich *et al.*, 2001). 9-Гидропероксид-специфичные ферменты, как правило, локализуются в нефотосинтезирующих органеллах (Matsui *et al.*, 1991; Riley *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1999; Mita *et al.*, 2005).

9- И 9,13-гидропероксид-специфичные алленоксидсинтазы и гидропероксидлиазы и продукты их каталитического действия гораздо менее изучены, чем соответствующие составляющие 13-липоксигеназного пути. 9-Алленоксидсинтазная активность была обнаружена в семенах кукурузы (*Zea mays*) (Gardner, 1975), корнях томата (*L. esculentum*) (Caldelari, Farmer, 1998), луковицах тюльпана (*Tulipa gesneriana*) (Grechkin *et al.*, 2000) и столонах, корнях и развивающиеся клубнях картофеля (*Solanum tuberosum*) (Hamberg, 2000). Продуктами функционирования 9-алленоксидсинтазной ветви липоксигеназного каскада являются (12*Z*)-9-гидрокси-10-оксо-12-октадекадиеновую кислоту (α -кетол), (11*E*)-10-оксо-13-гидрокси-11-октадекадиеновую кислоту (γ -кетол), а также циклопентенон – 10-оксо-11-фитоеновая кислота. При этом как минимум одна 9-гидропероксидспецифичная алленоксидсинтаза – LeAOS3 томата – является мультифункциональным ферментом, который катализирует три превращения (9*S*)-ГПОД: синтез окиси аллена – (12*Z*)-9,10-эпокси-10,12-октадекадиеновой кислоты – и два последующих конкурирующих превращения окиси аллена, а

именно – гидролиз и циклизацию. Гидролиз является стереоспецифическим, в отличие от циклизации. Конечным продуктом катализа LeAOS3 являются (9*R*)- α -кетол и рацемическая *цис*-10-оксо-фитоеновая кислота (Grechkin *et al.*, 2008). 9-Гидропероксидлиазная активность была выявлена в семенах миндаля (Feussner, Wasternack, 2002), тканях груши, дыни и огурца (Matsui *et al.*, 2000; Tijet *et al.*, 2001; Kim, Grosch, 1981).

1.5. Дивинилэфирсинтазы

Дивинилэфирсинтазы катализируют превращение гидроперекисей жирных кислот в дивиниловые эфиры (Рис. 8), значение которых в эндогенной регуляции различных процессов не так хорошо изучено, как роль продуктов алленоксидсинтазной и гидропероксидлиазной ветвей.

Впервые дивиниловые эфиры – (8*E*,1'*E*,3'*Z*)-9-(1',3'-нонадиенилокси)-8-ноненовая (колнелевая) и (8*E*,1'*E*,3'*Z*,6'*Z*)-9-(1',3',6'-нонатриенилокси)-8-ноненовая (колнеленовая) кислоты – были открыты Галлиардом с коллегами при экспериментах *in vitro* с клубнями картофеля (Galliard, Phillips, 1972, 1973; Galliard *et al.*, 1974; Galliard, Mathew, 1975; Galliard, Chan, 1980). Долгое время дивиниловые эфиры не обнаруживали у других видов растений и животных, в связи с чем эти соединения рассматривались в качестве уникального компонента клубней картофеля. Однако позднее из таллома бурой водоросли *L. sinclairii* были выделены три дивиниловых эфира – (1'*Z*,3'*Z*,6*Z*,9*Z*,11*E*)-12-(1',3'-гексадиенилокси)-6,9,11-додекатриеновая, (1'*Z*,3'*Z*,9*Z*,11*E*)-12-(1',3'-гексадиенилокси)-9,11-додекадиеновая и (1'*Z*,3'*Z*,5*Z*,8*Z*,11*Z*,13*E*)-14-(1',3'-гексадиенилокси)-5,8,11,13-тетрадекатетраеновая кислоты (Proteau, Gerwick, 1993). Еще один дивиниловый эфир – (1'*Z*,3'*Z*,6'*Z*,5*Z*,7*E*)-8-(1',3',6'-додекатриенил-1'-окси)-5,7-октадиеновая кислота – был обнаружен у красной водоросли *Polyneura latissima* (Jiang, Gerwick, 1997). Биосинтез дивиниловых эфиров у морских водорослей до сих пор не изучен.

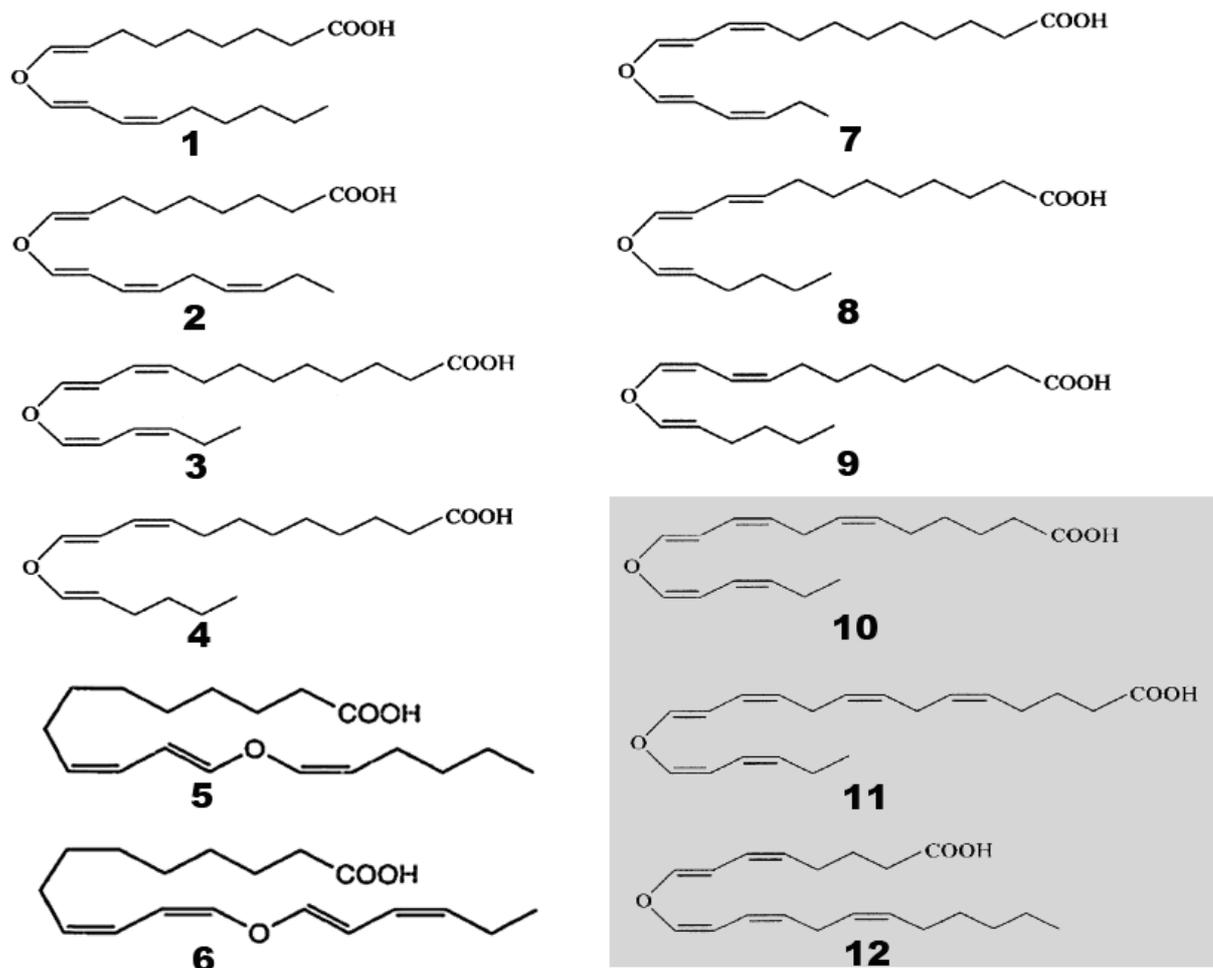


Рис. 8. Дивиниловые эфиры, обнаруженные у различных видов растений: колнелевая кислота (1), колнеленовая кислота (2), (ω 5Z)-этероленовая кислота (3), этеролева кислота (4), (ω 5Z)-этеролева кислота (5), (11Z)-этероленовая кислота (6), этероленовая кислота (7), all-*транс*-этеролева кислота (8), (11Z)-этеролева кислота (9). Соединения, обнаруженные у водорослей, выделены серым цветом: 10, 11 были обнаружены только у бурой водоросли *L. sinclairii*, соединение 12 – только у *Polyneura latissima*.

(9Z,11E,1'E)-12-(1'-Гексенилокси)-9,11-додекадиеновая (этеролевая) и (9Z,11E,1'E,3'Z)-12-(1',3'-гексаденилокси)-9,11-додекадиеновая (этероленовая) кислоты были впервые обнаружены в экспериментах, проведенных с гомогенатами головок чеснока *in vitro*. Наибольшее разнообразие изомеров дивиниловых эфиров было обнаружено в тканях плаунка *Selaginella martensii* (Ogorodnikova *et al.*, 2015).

К настоящему времени клонировано девять генов дивинилэфирсинтаз; соответствующие рекомбинантные белки охарактеризованы. Описаны 9-гидропероксид-специфичные дивинилэфирсинтазы растений четырех видов семейства пасленовые (*Solanaceae*): LeDES томата (Itoh, Howe, 2001), картофеля StDES (Stumpe *et al.*, 2001), NtDES табака (Fammartino *et al.*, 2007) и CaDES перца (Gullner, 2010), 9/13-гидропероксид-специфичный фермент AsDES чеснока (*Allium sativum*) (Grechkin, Hamberg, 1996), а также 13-гидропероксид-специфичные дивинилэфирсинтазы LuDES льна-долгунца (*Linum usitatissimum*) (Gogolev *et al.*, 2012), RaDES лютика едкого (*Ranunculus acris*) (Gorina *et al.*, 2014), SmDES1 и SmDES2 плаунка *S. moellendorffii*. Последовательности 9-гидропероксид-специфичных дивинилэфирсинтаз растений семейства пасленовых на 90 % идентичны друг другу. Поскольку долгое время эти ферменты оставались единственными описанными дивинилэфирсинтазами, изначально их выделили в отдельное подсемейство CYP74D на основании каталитической активности, несмотря на степень идентичности аминокислотных последовательностей с представителями подсемейства CYP74C более 55 %; то есть формально подсемейства CYP74C и CYP74D следовало бы объединить. Высказывалось предположение, что все вновь описываемые дивинилэфирсинтазы будут также попадать в подсемейство CYP74D. Однако охарактеризованные позднее дивинилэфирсинтазы AsDES, LuDES, RaDES, SmDES1 и SmDES2 опровергли это предположение. Дивинилэфирсинтазы AsDES чеснока и RaDES лютика едкого являются единственными представителями подсемейств CYP74H и CYP74Q, соответственно, удаленных от подсемейства CYP74D, куда относятся ДЭС растений семейств-

ва пасленовые. LuDES является беспрецедентным представителем подсемейства CYP74B; все ранее описанные ферменты данного подсемейства являются 13-специфичными гидропероксидлиазами. SmDES1 и SmDES2 входят в состав подсемейства CYP74M. Кроме того, 13-специфичные RaDES, LuDES, SmDES1 и SmDES2 локализованы в зеленых частях растений, тогда как 9-специфичные ДЭС растений семейства пасленовые и 9/13-специфичная AsDES – в подземных частях: например, StDES и AsDES локализованы в микросомальных фракциях (Hamberg, Fahlstadius, 1990; Grechkin, Hamberg, 1996). Объединенные, эти данные позволяют предположить полифилетическое происхождение дивинилэфирсинтаз на более поздних этапах эволюции, нежели алленоксидсинтазы или гидропероксидлиазы.

Происхождение кислорода в эфирной группе является важным вопросом, связанным с механизмом каталитического действия дивинилэфирсинтаз. При изучении биосинтеза колнелевой кислоты из [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]-9-ГПОД было обнаружено большое количество встроенного ^{18}O из [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]-9-ГПОД в эфирной группировке колнелевой кислоты (Crombie *et al.*, 1987, 1991). Аналогичным методом было выявлено, что в реакции биосинтеза этеролевой кислоты из [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]-(13*S*)-ГПОД в присутствии гомогената головок чеснока включение ^{18}O в эфирную группировку этеролевой кислоты было полным (Grechkin *et al.*, 1997). Эти результаты показывают, что кислород эфирной группы дивиниловых эфиров происходит из гидроперекисной группировки субстрата.

9-Дивинилэфирсинтазный путь индуцируется у растений семейства пасленовых при воздействии микробных патогенов, в том числе оомицетов. В листьях картофеля, зараженных клетками патогенного гриба *Phytophthora infestans*, и в листьях табака, зараженных вирусом табачной мозаики (*Phytophthora parasitica var. nicotianae*), наблюдается индукция экспрессии генов дивинилэфирсинтаз и накопление колнелевой и колнеленовой кислот (Fam-martino *et al.*, 2007; Eschen-Lippold *et al.*, 2007; Prost *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 1999). Эти дивиниловые эфиры ингибируют прорастание спор *P. parasitica* и

рост мицелия *P. infestans in vitro*, и, кроме того, обладают общей антимикробной активностью, функционируя на ранних стадиях взаимодействия с патогеном (Weber *et al.*, 1999; Prost *et al.*, 2005).

В то время как реакции, катализируемые ГПЛ и АОС, распространены повсеместно в царстве растений, дивинилэфирсинтазные реакции описаны лишь у отдельных видов растений. Помимо перечисленных дивинилэфирсинтаз, образование дивиниловых эфиров описано для трех видов бурых водорослей (Proteau, Gerwick, 1993), а также двух видов растений рода лютик (*Ranunculus lingua* и *Ranunculus peltatus*) (Grechkin, Hamberg, 1996; Hamberg, 2004, 2002) и красной водоросли *P. latissima* (Grechkin, 2002). Соответствующие дивинилэфирсинтазы остаются совершенно неизученными. Они могут оказаться либо ортологами описанных ферментов CYP74, либо представителями других (возможно, новых) подсемейств CYP74.

1.6. Эпоксиспиртсинтазный путь превращения гидроперекисей жирных кислот

Альтернативный путь метаболизма гидроперекисей осуществляется эпоксиспиртсинтазами, катализирующими перемещение внутримолекулярного кислорода гидроперекиси жирной кислоты, в результате чего образуется эпоксигидрокси-производное (эпоксиспирт) или/и эпоксид жирной кислоты (Hamberg, 1999). Помимо эпоксиспиртсинтазы, сходную реакцию катализирует еще один фермент – пероксигеназа, однако, несмотря на то, что этот фермент имеет в своем составе гемовое железо, пероксигеназа не относится к подсемейству CYP74 (Blee, 1998b). Продукты эпоксиспиртсинтазной реакции по региоспецифичности могут быть идентичны продуктам пероксигеназной реакции, но будут отличаться по стереохимическим показателям (Göbel *et al.*, 2001). Эпоксиспирты, содержащие двойные связи, являются общими метаболитами каскадов превращения полиненасыщенных жирных кислот у животных и растений (Gardner, 1980). Эпоксиспирты в дальнейшем

могут гидролизироваться с образованием тригидрокси-кислот при участии эпоксидгидролаз, либо спонтанно.

Включение эпоксиалкогольсинтаз в состав семейства CYP74 обсуждается на протяжении нескольких лет. Несмотря на то, что эпоксиалкогольсинтазная активность описана у наземных растений (Göbel *et al.*, 2001; 2002; Hamberg, 1999), ни один растительный фермент не был изучен *in vitro*. К настоящему времени клонирован единственный ген эпоксиалкогольсинтазы BfEAS (CYP440A1) ланцетника (*B. floridae*) и охарактеризован соответствующий рекомбинантный фермент (Lee *et al.*, 2008). По гомологии аминокислотной последовательности он входит в состав клана CYP74. В то же время, эпокиспирты обнаружены раньше, чем многие другие оксипирины. Первое сообщение о содержании 9-гидрокси-(10*E*,12,13*Z*)-эпокси-октадеценовой и (9,10*Z*)-эпокси-(11*E*,13)-гидрокси-октадеценовой кислот (эпоксигидрокси-производных линолевой кислоты) и 9,12,13-тригидрокси-(10*E*)-октадеценовой и 9,10,13-тригидрокси-(11*E*)-октадеценовой кислот (тригидрокси-производных линолевой кислоты) в зернах пшеницы было опубликовано в 1970 г. Грэйвлендом (Graveland, 1970).

Биосинтез эпокиспиртов у растений был впервые продемонстрирован в бесклеточных системах (Croteau, Kolattukudy, 1975). 18-Гидроксиолеиновая кислота при инкубации с препаратом шпината превращается в 18-гидрокси-*цис*-9,10-эпокси-октадекановую кислоту. Однако необходимость для осуществления реакции НАДФН и молекулярного кислорода и тот факт, что реакция ингибировалась монооксидом углерода, говорят о том, что фермент, катализирующий данную реакцию, является цитохромом P450, но не представителем семейства CYP74. Более того, для протекания реакции требуется присутствие АТФ и коэнзима А, что позволяет предположить, что в действительности субстратом является 18-гидроксиолеил-коэнзим А.

Впервые образование эпокиспиртов и тригидрокси-кислот в листьях наземного растений, а именно – картофеля, объяснил специфической эпоксиалкогольсинтазной активностью Хамберг (Hamberg, 1999). С использованием го-

могената листьев картофеля была показана ферментативная изомеризация (9*S*)-ГПОД, приводящая к образованию α,β -эпоксиспирта – (10*S*,11*S*)-эпоксиспирта – (9*S*)-гидрокси-(12*Z*)-октадеценовой кислоты и γ,δ -эпоксиспирта – (12*R*,13*S*)-эпоксиспирта – (9*S*)-гидрокси-(10*E*)-октадеценовой кислоты (Рис. 9) (Hamberg, 1999). Впоследствии потенциальная эпоксиалкогольсинтазная активность была описана у некоторых других организмов: патоген риса (*Magnaporthe salvinii*) (Wennman, Oliw, 2013) (Рис. 10), свекла обыкновенная (Hamberg, Olsson, 2011) и др. Эпоксиспирты выявлены также у диатомовых водорослей. Например, 7-гидрокси-8,9-эпоксиспирт-эйкозатетраеновая кислота (7,8-ГЭЭТЕ) в случае *Chaetoceros socialis* и 13-гидрокси-14,15-эпоксиспирт-эйкозатетраеновая кислота (13,14-ГЭЭТЕ) в случае *Skeletonema marinoi* (Fontana *et al.*, 2007), как предполагается, образуются из гидроперекисей при участии алленоксидсинтаз. Однако указанные ферменты до сих пор не охарактеризованы *in vitro*.

Фермент пероксигеназа также катализирует формирование эпоксиспиртов из гидроперекисей жирных кислот (Hamberg, Hamberg, 1990); этот фермент участвует в биосинтезе (12*R*,13*S*)-эпоксиспирта – (9*S*)-гидрокси-(10*E*)-октадеценовой кислоты в препаратах семян овса (Hamberg, Hamberg, 1996; Piazza *et al.*, 1999). Пероксигеназная активность не была выявлена в препаратах листьев картофеля, поэтому в данном случае образование эпоксиспиртов предполагало присутствие специфической эпоксиалкогольсинтазной активности (Hamberg, 1999).

При участии фермента эпоксид-гидролазы – растворимого в воде белка с молекулярной массой 47 кДа (Hamberg, Hamberg, 1996), происходит регио- и стереоспецифичный гидролиз (12*R*,13*S*)-эпоксиспирта – (9*S*)-гидрокси-(10*E*)-октадеценовой кислоты в (9*S*,12*S*,13*S*)-тригидрокси-(10*E*)-октадеценовую кислоту (Hamberg, 1999).

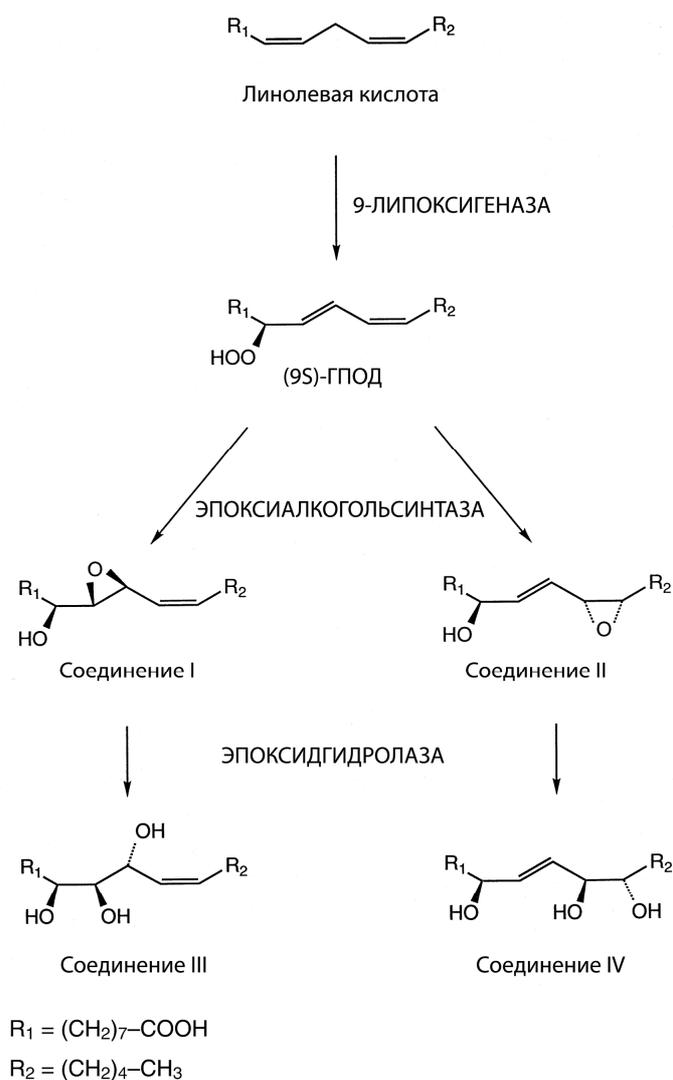


Рис. 9. Схема образования эпоксигидрокси- и тригидрокси-производных жирных кислот из линолевой кислоты (Hamberg, 1999).

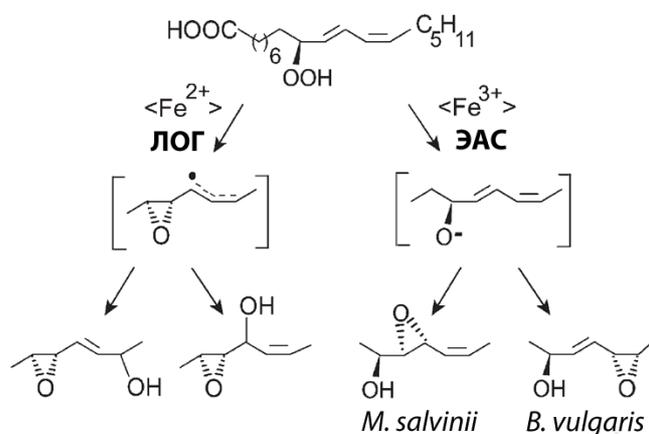


Рис. 10. Гипотетическая схема формирования эпоксиспиртов из 9-ГПОД. Предполагается, что эпоксиспирты могут образовываться при участии некоторых ЛОГ и ЭАС (Jin *et al.*, 2012).

Эпоксидгидролазная реакция в листьях картофеля заключается в том, что вода стереоспецифически атакует аллильный эпоксид по углероду C11 в α,β - или C12 в γ,δ -эпоксиспиртах с последующим раскрытием эпоксидного кольца по S_N^2 -механизму (Hamberg, 1999). Тригидрокси-кислоты широко распространены в природе и синтезируются в клетках различных организмов, принадлежащих разным таксонам: растений, грибов, животных, микроорганизмов.

Одними из первых тригидрокси-кислоты выявлены у животных. 8,11,12-Тригидрокси-эйкозатриеновая кислота выявлена в тромбоцитах млекопитающих (Falardeau *et al.*, 1976; Jones *et al.*, 1978; Bryant, Bailey, 1979), а также в гомогенатах из легких крысы (Pace-Asciak *et al.*, 1982).

Исследование растений риса показало, что (9*S*,12*S*,13*S*)-тригидрокси-(10*E*)-октадеценовая и 11,12,13-тригидрокси-(9*Z*,15*Z*)-октадекадиеновая кислоты продуцируются в растениях, больных пирикулярриозом и ингибируют рост грибка, вызывающего это заболевание (*Pyricularia oryzae*) (Kato *et al.*, 1985; Suemune *et al.*, 1988; Gosse-Kobo *et al.*, 1989; Ohta *et al.*, 1990). Тригидрокси-кислоты участвуют в формировании защитного ответа растений против возбудителя настоящей мучнистой росы (Cowley, Walters, 2005), а также ингибируют развитие патогенных грибов (Walters *et al.*, 2006). 9,12,13-Тригидрокси-(10*E*)-октадеценовая кислота также была выделена в качестве фунгицидного соединения из клубней таро (*Colocasia esculenta*), инфицированного грибом – возбудителем черной корневой гнили (*Ceratocystis fimbriata*) (Masui *et al.*, 1989). Позже, (9*S*,12*S*,13*S*)-тригидрокси-10-октадеценовая кислота была выделена из клубней *Pinellia ternata* и получила тривиальное название – пинеллевая кислота (Nagai *et al.*, 2002). Биосинтез пинеллевой кислоты начинается с окисления линолевой кислоты при участии липоксигеназы с образованием (9*S*)-гидроперекиси, которая в дальнейшем превращается в эпоксиспирт – (12*R*,13*S*)-эпокси-(9*S*)-гидрокси-(10*E*)-октадеценовую кислоту. Пинеллевая кислота образуется из эпоксиспирта при участии эпоксидгидролазной активности, которая катализирует раскрытие

эпоксида в положении С12 (Hamberg, Hamberg, 1996). 13-Гидроперекись линолевой кислоты также может являться предшественником 9,12,13-тригидрокси-октадеценовой кислоты (Gardner *et al.*, 1984). Пинеллевая кислота и другие тригидрокси-октадеценовые кислоты продуцируются в растениях при повреждении и инфицировании патогенными грибами (Kato *et al.*, 1985, 1991; Walters *et al.*, 2006; Masui *et al.*, 1989). Помимо защитных свойств, тригидрокси-кислоты являются компонентами растительных полимеров кутина и суберина (Espelie *et al.*, 1979; Graça, Pereira, 2000).

У микроорганизмов также происходит синтез тригидрокси-кислот. 8,9,13-Тригидрокси-докозаеновая кислота является компонентом внеклеточных липидов дрожжей (Stodola *et al.*, 1965). Микробная культура штамма *Clavibacter sp.* ALA2, выделенного из сухого грунта, обнаруживала способность к превращению линолевой кислоты в 12,13,17-тригидрокси-(9Z)-октадеценовую кислоту (Ноч, 1996). При выращивании клеток штамма *Pseudomonas* 42A2 в жидкой среде, содержащей линолевою кислоту, в супернатанте накапливаются 9-гидрокси-10,12-октадекадиеновая, 13-гидрокси-9,11-октадекадиеновая, 7,10-дигидрокси-(8E)-октадеценовая, 9,10,13-тригидрокси-11-октадеценовая и 9,12,13-тригидрокси-10-октадеценовая кислоты. Клетки штамма *Pseudomonas aeruginosa* PR3 превращают линолевою кислоту с образованием 16 изомеров тригидрокси-додеценовой кислоты, рицинолевою кислоту – в 7,10,12-тригидрокси-(8E)-октадеценовую кислоту (Кюо *et al.*, 1998). Некоторые штаммы *Bacillus megaterium* превращают линолевою кислоту в 12,13,17-тригидрокси-(9Z)-октадеценовую кислоту и 12,13,16-тригидрокси-(9Z)-октадеценовую кислоту (Ноч, 2005).

Тригидрокси-кислоты могут образовываться из эпокиспиртов, образующихся как спонтанно, так и при участии различных ферментов, помимо пероксигеназ, эпоксиалкогольсинтаз и эпоксигеназ. Например, 15-специфичная липоксигеназа оомицета *Saprolegnia parasitica* (Hamberg, 1986), использующая в качестве субстрата арахидоновую кислоту (Herman, Hamberg, 1987), является бифункциональным ферментом: ее дополнительная ак-

тивность является эпоксиалкогольсинтазной, в результате которой происходит превращение промежуточного продукта 15-гидроперекиси эйкозатриеновой кислоты в два эпокиспирта: (11*S*,12*R*)-эпокси-(15*S*)-гидроперокси-(5*Z*,8*Z*,13*E*)-эйкозатри-еновую и (13*R*,14*R*)-эпокси-(15*S*)-гидроперокси-(5*Z*,8*Z*,11*Z*)-эйкозатриеновую кислоты (Andreou *et al.*, 2009). Мутантная форма липоксигеназы MnLOX G316A патогена пшеницы *Gaeumannomyces graminis*, которая в каталитическом центре содержит не железо, а марганец (Su, Oliw, 1998), также обладает способностью изомеризовать 13-гидроперекиси в эпокиспирты и кето-производные; при этом оба атома кислорода гидроперекиси сохраняются в эпокиспиртах (Cristea, Oliw, 2006). Кроме того, тригидрокси-додеценовые кислоты могут образовываться из 9- и 13-гидроперекисей линолевой кислоты спонтанно через алкоксильный радикал. В случае штамма *P. aeruginosa* PR3 синтез тригидрокси-кислот может происходить путем автоокисления линолевой кислоты (Kim *et al.*, 2000). Наличие различных путей, в которых окончательными продуктами биосинтеза являются тригидрокси-кислоты, свидетельствует о принципиальной значимости этих соединений для разных организмов.

Выявлена значимость тригидрокси-кислот для медицины. 9,12,13-Тригидрокси-(10*Z*,15*Z*)-октадекадиеновая и пинеллевая кислоты (Nagai *et al.*, 2004) ингибируют образование простагландина D2 (Choi *et al.*, 2012). В то же время, 9,10,13-тригидрокси-*транс*-11-октадеценовая кислота проявляет активность, сходную с таковой простагландина E (Wang, Wang, 1996).

Механизм антимикробного и фунгицидного действия тригидрокси-производных жирных кислот остается неясным. Существует предположение, что ингибирование роста скорее является следствием химических или физических свойств оксипинов, нежели результатом взаимодействия со специфическими клеточными мишенями (Prost *et al.*, 2005).

1.7. Механизмы каталитического действия ферментов СУР74

Механизм каталитического действия ГПЛ долгое время оставался не ясным. Гарднер и Платтнер (Gardner, Plattner, 1984) предлагали следующую модель каталитического действия ГПЛ: расщепление цепи 13-ГПОД на гексаналь и (9Z)-12-оксо-9-додеценую кислоту. При использовании [$^{18}\text{O}_2$]13-ГПОД было показано, что только С12 альдегид включал ^{18}O , что предполагало реакцию по типу Хока, включающую эпоксиаллильный катион, который улавливался водой (Gardner, Plattner, 1984). Согласно этому результату, Хатанака с соавторами (Hatanaka *et al.*, 1986), использовавший ГПЛ чайных листьев и [$^{18}\text{O}_2$]13-гидроперекись линолеилового спирта в качестве субстрата, наблюдал встраивание ^{18}O только в С12 фрагмент, но не в С6 гексаналь. Последующая идентификация ГПЛ как цитохрома Р450 (Noordermeer *et al.*, 2001; Grechkin, 2002; Matsui *et al.*, 1996; Tijet *et al.*, 2000) предполагала механизм, начинающийся с гомолитического разрезания связи О-О; тем не менее, следующий этап предположительно был гетеролитическим и включал встраивание кислорода из воды с образованием С6 альдегида (Noordermeer *et al.*, 2000, 2001). В 2004 году Гречкин с соавторами доказал, что полуацеталь ((9Z,11E,3'Z)-12-(1'-гидрокси-3'-гексенилокси)-9,11-додекадиеновая кислота), ранее считавшийся промежуточным продуктом, связанным с ферментом (Hatanaka *et al.*, 1986, Noordermeer *et al.*, 2000; Hatanaka, 1993), является настоящим продуктом ГПЛ реакции (Рис. 11А) (Grechkin, Hamberg, 2004). Альдегиды продуцировались вследствие высокой химической нестабильности полуацетала, период полужизни которого составляет около 20 секунд при 0 °С. При этом оба атома кислорода молекулы полуацетала имеют происхождение из гидроперекисной группы субстрата, но не из воды (Рис. 11А).

Еще ранее Гречкиным было высказано предположение, что каталитические механизмы всех ферментов СУР74 имеют одинаковый начальный этап и различаются конечными этапами.

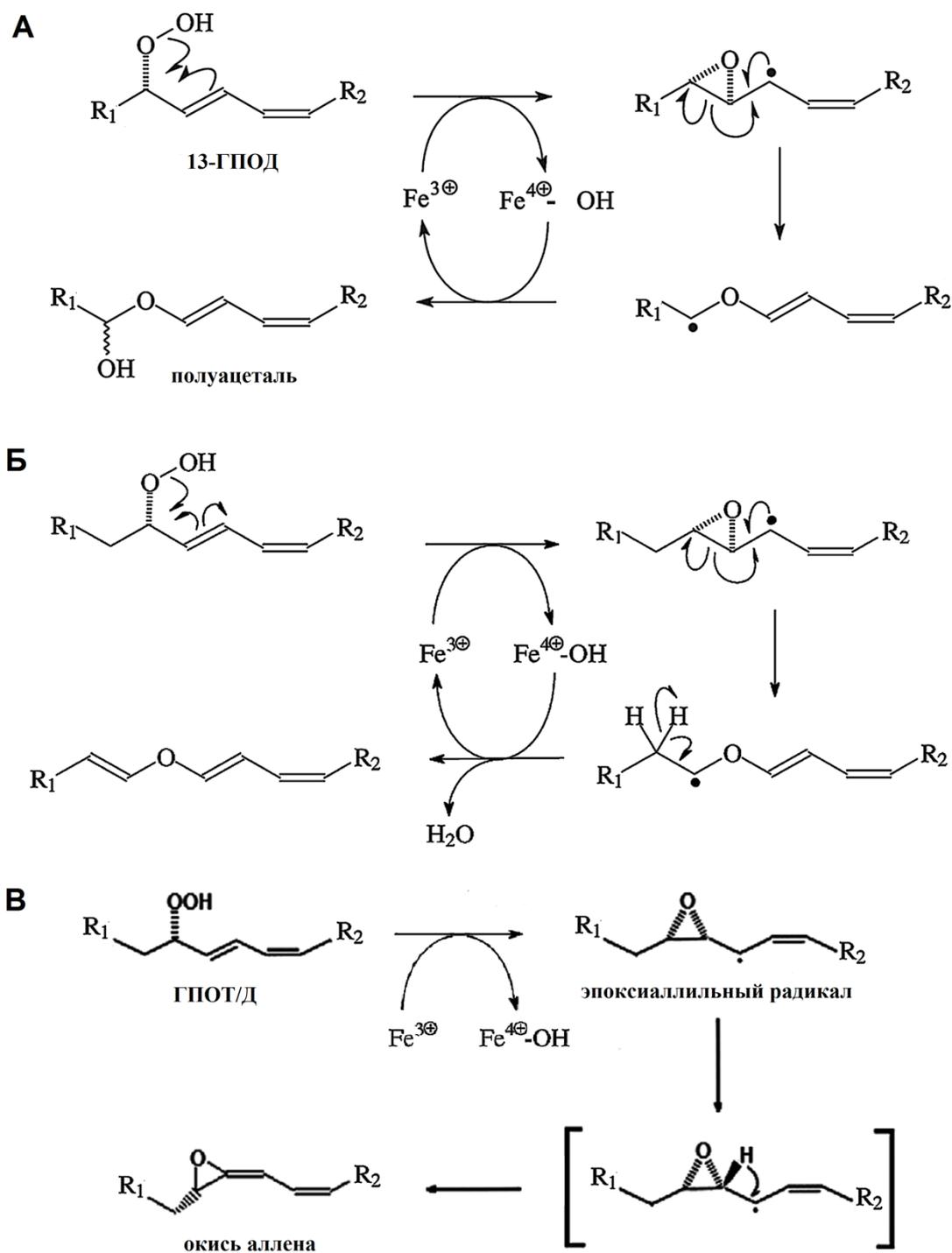


Рис. 11. Предполагаемые механизмы реакций, катализируемых ГПЛ (А, Grechkin, Hamberg, 2004), ДЭС (Б, Grechkin, 2002) и АОС (В, Toporkova *et al.*, 2008). Для **13-ГПОД/Т**: $\text{R}_1 = -(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ или $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$, соответственно, и $\text{R}_2 = -(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$. Для **9-ГПОД/Т**: $\text{R}_1 = -(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$; $\text{R}_2 = -(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$, соответственно.

В 2002 году он предложил модель гомолитического механизма ДЭС реакции (Рис. 11Б), впоследствии получившего подтверждение (Grechkin, 2002).

Споры о механизме каталитического действия АОС велись в течение долгого времени. В 2008 году начавшиеся работы по сайт-направленному мутагенезу (Toporkova *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008) подтвердили предположение о сходстве механизмов каталитического действия ферментов СУР74. Первой стадией реакции, катализируемой АОС, ГПЛ и ДЭС, является гомолиз гидроперокси-группы с образованием эпоксиаллильного радикала. На второй стадии реакции, катализируемой АОС, эпоксиаллильный радикал теряет протон с образованием окиси аллена. Однако в 2009 году Браш предложил другую модель механизма каталитического действия АОС, где промежуточным продуктом является эпоксиаллильный карбокатион (Brash, 2009). Таким образом, окончательного согласия по поводу механизма АОС реакции до сих пор не достигнуто.

1.8. Оксипирины бурых водорослей

К настоящему времени оксипирины обнаружены у организмов, принадлежащих разным таксонам, включая растения, животные, грибы, бактерии, а также красные и бурые водоросли. Например, гидроксикислоты, дивиниловые эфиры и альдегиды обнаружены у разных видов рода *Laminaria* (Proteau, Gerwick, 1993; Voonprab *et al.*, 2003a). У бурых водорослей ряд оксипиринов являются предшественниками синтеза феромонов, играющих важную роль в обеспечении хемотаксиса между мужскими и женскими гаметами (Pohnert, Boland, 2002). У некоторых видов, включая *E. siliculosus* и *Sphacelaria rigidula*, для синтеза C11-феромонов используются арахидоновая и эйкозапентаеновая кислоты. Оксипирины также участвуют в формировании ответа на стрессовое воздействие; так, у *Laminaria digitata* наблюдается накопление ряда оксипиринов, которые предположительно запускают защитные механизмы таким же образом, как и жасмонаты (Ritter *et al.*, 2008).

В качестве субстратов для синтеза оксилипинов у бурых водорослей, как правило, используются С18 (линолевая, линоленовая и стеарионовая) и С20 (арахионовая) полиненасыщенные жирные кислоты, которые служат субстратами для липоксигеназ, различающихся по региоспецифичности. Бурые водоросли содержат как (9*S*)- и (13*S*)-липоксигеназы, что объединяет их с наземными растениями, так и (12*S*)- и (15*S*)-липоксигеназы, которые у наземных растений отсутствуют. (12*S*)-, (13*S*)- и (15*S*)-липоксигеназная активность выявлены в талломах бурой водоросли *Laminaria angustata* (Boonprab *et al.*, 2003а, б). У родственного вида *L. digitata* анализ жирных кислот спорофитов выявил 13- и 15-липоксигеназную активности (Küpper *et al.*, 2009). 13-Липоксигеназная активность также была обнаружена у бурой водоросли *Eisenia bicyclis*, у которой было обнаружено девять новых оксилипинов – продуктов превращения 13-гидроперокси-октадекатриеновой кислоты (Kousaka *et al.*, 2003). Показано, что большинство С6 альдегидов образуются у бурых водорослей в ходе преобразования С18 ПНЖК, небольшое количество образуется из С20 ПНЖК при участии гидропероксидлиазной активности (Boonprab *et al.*, 2003а). Кроме того, у бурых водорослей обнаружена группа карбоциклических оксилипинов, таких как эклониалактоны, эгрегиахлориды, эйзенияхлориды, циматерэфиры, простагландины, гидроксипроизводные жирных кислот и эпоксиды.

Эклониалактоны представляют собой трициклические и бициклические соединения, которые были выявлены у *Eisenia stolonifera* (Kurata *et al.*, 1989) и *E. bicyclis* (Kousaka *et al.*, 2003). Кроме того, этими же исследователями был описан ряд новых производных эклониалактона, которые содержат хлорид или иодид – эйзенияхлориды и эйзенияиодиды, соответственно. Эгрегиолактоны – циклические оксилипины другого класса – были изначально обнаружены у *Egregia menziesii* (Todd *et al.*, 1994), затем у *E. bicyclis* (Kousaka *et al.*, 2003). Из таллома *Cymathere triplicata* был выделен еще один класс оксилипинов, содержащих половину бициклического эфира (Proteau, Gerwick, 1992) и получивших название циматерэфиры; два новых оксилипина этого класса

были обнаружены у *E. bicyclis* (Kousaka *et al.*, 2003). Биогенез всех этих метаболитов предполагает, что первой реакцией биосинтеза их является образование 13-гидроперекиси (Рис. 12).

Кроме того, бурые водоросли являются источником простагландинов: например, у *L. digitata* обнаружены простагландины E1, D1, 15-кето-простагландин F2a и др. (Ritter *et al.*, 2008). У этой бурой водоросли также обнаружены 18-гидрокси-17-оксо-эйкозатетраеновая и 12,13-эпокси-октадеценовая кислоты; образование последнего соединения происходит, вероятно, в следствие эпоксигеназной активности (Ritter *et al.*, 2008).

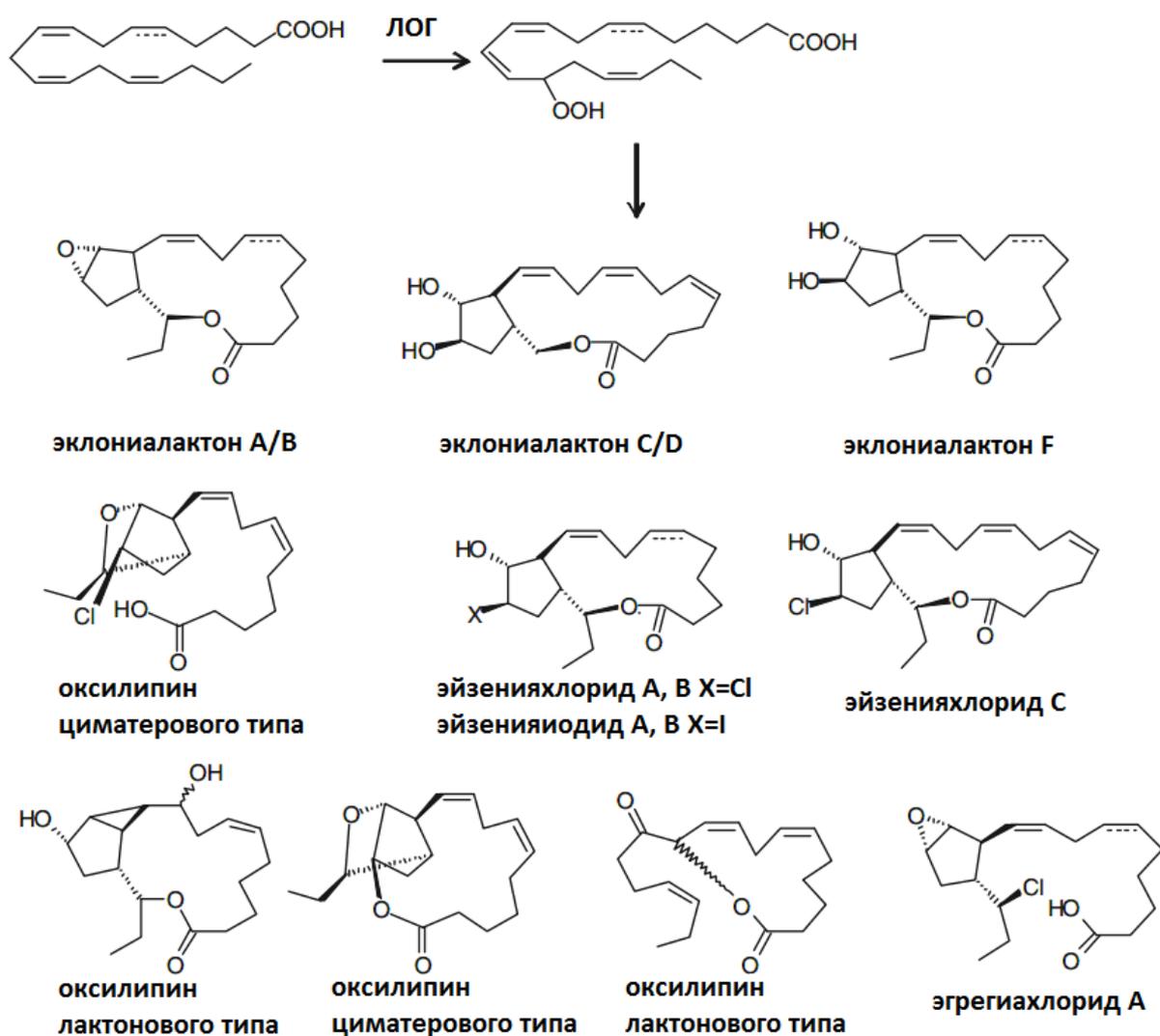


Рис. 12. Оксипипины бурой водоросли *E. bicyclis* (Kousaka *et al.*, 2003).

1.9. *Ectocarpus siliculosus* как модельный объект исследований

Исследования в области биологии бурых водорослей стимулируются их глобальной экономической и экологической значимостью (Draisma *et al.*, 2003). Бурые водоросли также являются интересными с точки зрения эволюции, так как они представляют одну из пяти эукариотических линий происхождения, которые имеют независимо развившийся комплекс многоклеточности (остальными четырьмя являются животные, грибы, зеленые растения и красные водоросли). К тому же чередование гаметофитного и спорофитного поколений, которое включает последующее развитие двух независимых организмов с комплексом многоклеточности, представляет новую ситуацию в сравнении с жизненными циклами модельных организмов из других групп, таких как зеленые растения и животные, у которых поколение гаметофита обычно сильно редуцировано или отсутствует.

Следовательно, бурые водоросли являются прекрасной моделью для изучения генетических основ смены поколений. Бурые водоросли также демонстрируют некоторые выдающиеся характеристики в определенные периоды развития клеток; цитокинез, например, имеющий особенности, характерные как для животных (центросомы), так и для зеленых растений (Nagasato, Motomura, 2002). Существует множество интересных особенностей строения бурых водорослей из-за их физиологической удаленности от других более интенсивно изученных групп.

Большую пользу в изучении животных и высших растений в последние годы принесло развитие модельных организмов, таких как *Drosophila melanogaster*, *Caenorabditis elegans* и *Arabidopsis thaliana*, которые сочетают наличие полностью секвенированного генома с мощными инструментами для генетики, такими как мутагенез, генетическая трансформация, РНК-интерференция и др. (Dawis, 2004). Однако за пределами царств животных и зеленых растений, количество подходящих моделей сильно ограничено. Поэтому крайне актуальной является необходимость изучения в филогенетиче-

ски отдаленных группах схожих моделей, которые могут быть использованы для получения ответов на вопросы о происхождении этих линий.

С эволюционной точки зрения водоросли являются гетерогенной группой и включают в себя организмы с несколькими различными линиями происхождения. Бурые водоросли являются частью группы организмов, которые относятся к типу Гетероконтофитовые, которые также включают диатомовые водоросли и оомицеты и значительно отличаются в развитии от зеленых и красных водорослей (Baldauf, 2003). Бурые водоросли порядков Ламинариевые и Фукусовые интенсивно изучались в прошлом, но как модель они плохо адаптированы для геномных и генетических исследований из-за большого размера их геномов (700 и 1100 млн.п.н., соответственно), а также в связи с тем, что их жизненный цикл крайне сложно воспроизвести в лабораторных условиях. Для решения этой проблемы был проведен анализ видов бурых водорослей (Peters *et al.*, 2004a), который привел к выбору нитчатой водоросли *E. siliculosus* (Рис. 13).

Первые работы по изучению *E. siliculosus* велись еще в 19 веке. Исследования начались с изучения жизненного цикла этого организма. Далее работа сосредоточилась на изучении феромонов, которые продуцирует женский гаметофит для привлечения мужских гамет, и характеристики гигантского ДНК вируса EsV-1, который встраивается в ядерный геном водорослей в ходе заражения.

Выбор *E. siliculosus* в качестве модельного объекта был основан на ряде характеристик, таких как маленький размер, а также тот факт, что жизненный цикл может быть осуществлен с использованием чашек Петри в лабораторных условиях (Müller *et al.*, 1998). Жизненный цикл этой водоросли относительно короткий (3-4 месяца) и может быть завершен в лабораторных условиях в довольно простых условиях культивирования. Кроме того, для них характерны высокая фертильность и быстрый рост, легкое генетическое скрещивание (Peters *et al.*, 2004b) и небольшой размер генома.



Рис. 13. Бурая водоросль *Ectocarpus siliculosus*.

Существует ряд генетических инструментов, разработанных специально для этого организма, среди которых полностью секвенированный геном, генетические карты и методология. Некоторые приемы классической и молекулярной генетики были специально оптимизированы для *E. siliculosus*, к ним относятся протоколы трансформации и РНК-интерференции. Путем УФ облучения были получены и отобраны мутанты с облегченным осуществлением гаплоидной фазы жизненного цикла. Штаммы могут поддерживаться долговременно в условиях низких температур.

У бурых водорослей наружное оплодотворение, включающее слияние гамет, которые выбрасываются в окружающую водную среду. Эта особенность широко используется для изучения многих аспектов раннего развития, таких как слияние гамет при оплодотворении, образование полярности, вовлечение клеточной стенки в сигналинг на ранних стадиях развития, инициация первого клеточного цикла, связь между клеточным циклом и процессами развития и другие аспекты развития (Berger *et al.*, 1994; Bouget *et al.*, 1998; Corellou *et al.*, 2000, 2001; Brownlee *et al.*, 2001).

Феромоны бурых водорослей представляют собой C-11 углеводородные производные жирных кислот (Pohnert, Boland, 2002). В женских гаметах *E. siliculosus* арахидоновая кислота является предшественником эктокарпена (Stratmann *et al.*, 1993), вследствие чего накапливаются фосфолипиды, богатые арахидоновой и эйкозапентаеновой кислотами. Первую стадию образования феромонов, вероятно, катализируют липоксигеназы; в ходе исследований женских гамет *E. siliculosus* было обнаружено несколько липоксигеназ.

Скалистый берег является местом обитания для многих бурых водорослей, таким образом, эти организмы находятся в постоянных стрессовых условиях, и являются субъектом биотической агрессии со стороны травоядных животных и патогенов, а также абиотической агрессии, включая колебания температур, погружение, облучение светом и механические повреждения. В результате бурые водоросли представляют собой новую модельную систему для изучения ответов на воздействие биотических и абиотических стрессоров, включая врожденный иммунитет (Potin *et al.*, 2002), вирусные инфекции (Müller *et al.*, 1998; Delaroque *et al.*, 2001), неизвестные патосистемы (Körper *et al.*, 2001; Maier *et al.*, 2000) и осмотический стресс (Coelho *et al.*, 2002).

У *E. siliculosus* в условиях медного стресса наблюдается накопление C18 циклических оксипинов, таких как 12-ОФДК, PPA1, PPA2, сходных по структуре таковым у наземных растений, а также ряд C20 циклических простагландинов, таких как PGA2 и PGJ2 (Ritter *et al.*, 2014). Однако, несмотря на наличие предполагаемых ферментов алленоксидсинтазы и алленоксидциклазы, участвующих в пути биосинтеза жасмоновой кислоты, ген жасмонаткарбоксилметилтрансферазы в геноме *E. siliculosus* отсутствует. Это свидетельствует о том, что либо жасмонаты у бурых водорослей выполняют иную функцию, нежели у высших растений, либо сходную функцию, но с использованием других регуляторных систем (Ritter *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2015). В пользу этого также говорит тот факт, что в геноме *E. siliculosus* нет гомологов растительных рецепторов жасмоновой кислоты, а также нет ком-

понентов комплекса регуляции транскрипции MYC, JAZ, NINJA, COI1 (Cock *et al.*, 2010; Kazan, Manners, 2008).

У бурой водоросли *L. digitata* в ответ на краткосрочное воздействие большой концентрации меди запускается синтез 12-ОФДК и простагландинов, сопровождающийся изменениями в экспрессии некоторых генов (Ritter *et al.*, 2008). Метилжасмонат был обнаружен в экспериментах, проведенных авторами, но его содержание не претерпевало значительных изменений при тестируемых условиях. В других работах было показано, что экзогенная обработка метилжасмонатом активировала защитные механизмы у некоторых бурых водорослей (Arnold *et al.*, 2001; de Franco *et al.*, 2009; Küpper *et al.*, 2009).

1.10. Постановка цели исследования

Приведенный выше обзор данных литературы свидетельствует о том, что ферменты CYP74 играют центральную роль в липоксигеназном пути растений. Ферменты CYP74 контролируют превращение (дегидратацию и изомеризацию) гидроперекисей жирных кислот в ряд оксипинов, включающий в себя биоактивные соединения, такие как жасмонаты, дивиниловые эфиры, альдегиды 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 каталитической активности. Много работ посвящено изучению физиологического значения продуктов каталитического действия этих ферментов и динамики экспрессии генов семейства CYP74 в различных условиях. Кроме того, ряд работ посвящен происхождению и классификации этих ферментов, поскольку в последнее время ферменты CYP74 обнаружены у организмов, принадлежащих другим таксонам. Поскольку семейство CYP74 включает только растительные ферменты, их отнесли к другим семействам, однако вместе с семейством CYP74 объединили в клан CYP74.

Данные, полученные в последнее время в ряде проведенных филогенетических исследований, позволяют сделать вывод о гораздо более древнем происхождении ферментов CYP74, чем это предполагалось ранее. Это подтверждается рядом фактов, в том числе пластидной локализацией большинства ферментов CYP74, особенностями их структуры и каталитического действия по сравнению с остальными цитохромами P450 и др. Дополнительным доказательством является распространенность ферментов клана CYP74 у широкого ряда организмов, в том числе у морских животных (Lee *et al.*, 2008), растений (Hughes *et al.*, 2009), протеобактерий (Lee *et al.*, 2008). В связи с этим, была выдвинута гипотеза о существенной роли событий горизонтального переноса генов в эволюционной истории клана CYP74 (Nelson, Werck-Reichhart, 2011; Nelson *et al.*, 2013).

Предположение о преимущественном распространении ферментов CYP74 и соответствующего липоксигеназного каскада у высших растений основано на недостаточной изученности широкого круга организмов. Типичные продукты каталитического действия ферментов CYP74, например, дивиниловые эфиры, были обнаружены у некоторых организмов, у которых CYP74-родственные гены и ферменты до сих пор не выявлены. Например, морские водоросли обладают большим разнообразием оксипинов (Gerwick *et al.*, 1999; Gerwick, Singh, 2002; Andreou *et al.*, 2009; Barbosa *et al.*, 2016). Так, у бурой водоросли *L. sinclairii* и красной водоросли *P. latissima* выявлены дивиниловые эфиры. Идентичные или аналогичные оксипины хорошо известны как продукты реакции, катализируемой дивинилэфирсинтазами (семейство CYP74), широко распространенными у высших растений. Ферменты, ответственные за синтез дивиниловых эфиров у водорослей, до сих пор не выявлены. Участие CYP74-подобных ферментов в биосинтезе оксипинов у водорослей кажется весьма вероятным. Единственный представитель клана CYP74 водорослей – алленоксидсинтаза KfAOS зеленой водоросли *Klebsormidium flaccidum* – обнаружен только в 2015 году (Koeduka *et al.*, 2015).

Необычный ген *CYP5164B1*, гомологичный генам семейства CYP74, был обнаружен нами в результате аннотирования генома бурой водоросли *E. siliculosus* (Ectocarpaceae, Phaeophyceae) (Cock *et al.*, 2010). Данная работа посвящена клонированию гена *CYP5164B1*, получению рекомбинантного фермента, определению его каталитических свойств и расшифровке механизма катализируемой им реакции, а также выяснению положения данного фермента в суперсемействе P450. Отдельная часть работы посвящена изучению влияния единичных аминокислотных остатков на формирование типа каталитической активности у фермента CYP5164B1 методом сайт-направленного мутагенеза и сравнение с таковым у растительных ферментов CYP74, для чего провели дополнительные эксперименты по получению очищенных препаратов высоко активных растительных ферментов CYP74 дикого типа, обладающих сходной с ферментом CYP5164B1 субстратной специфичностью, и несинонимичными заменами в гипотетических каталитически важных сайтах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Методы биоинформатики

Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей представителей клана CYP74 проводили, используя базы данных National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) и Online Resource for Community Annotation of Eukaryotes (ORCAE; <http://bioinformatics.psb.ugent.be/orcae/>). Сравнение нуклеотидных и транслированных аминокислотных последовательностей с базой данных NCBI проводили с помощью программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей цитохромов CYP74 для определения их гомологии, анализ нуклеотидных последовательностей, а также конструирование праймеров, проводили с помощью программ Vector NTI Advance 9 (Invitrogen, США) и ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Олигонуклеотидные праймеры и последовательность, кодирующую фермент CYP5164B1, синтезировали в ЗАО «Евроген» (Москва). Построение и визуализацию неукорененных филогенетических деревьев осуществляли с использованием программ ClustalW2 – Phylogeny и TreeView (Thompson *et al.*, 1997), соответственно.

2.2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР использовали для проверки наличия вставки целевого гена, амплификации открытой рамки считывания (ОРС) гена *NtDES*, а также для модификации первичной структуры рекомбинантных белков методом сайт-направленного мутагенеза, разработанного для генов, клонированных на плазмидных векторах (Zoller, Smith, 1982; Toporkova *et al.*, 2008). В качестве матриц для ПЦР использовали плазмидные ДНК, выделенные из клеток бактериальных

штаммов с помощью коммерческого набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия).

Для проверки наличия вставки целевого гена проводили ПЦР в реакционной смеси, в состав которой входили буфер для Таq-полимеразы (Синтол, Москва), 0.2 мМ смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ), 20 нг ДНК-матрицы, 0.1 мкМ прямого и обратного олигонуклеотидного праймеров. Таq-полимеразу (Синтол, Москва) добавляли в реакционную смесь непосредственно перед реакцией в концентрации, рекомендуемой производителем. Конечный объем реакционной смеси составлял 10 мкл. Режим реакции контролировали с помощью амплификатора DNAEngine (Bio-Rad, США). Использовали следующие параметры реакции: первоначальная денатурация ДНК при 95 °С в течение 5 мин; далее 24 цикла в следующем режиме: денатурация ДНК при 95 °С в течение 30 с, отжиг праймеров при 61 °С в течение 15 с, синтез новой цепи ДНК при 72 °С в течение 1 мин.

Для амплификации ОРС гена *NtDES*, а также сайт-направленного мутагенеза целевых генов клана CYP74, проводили ПЦР в реакционной смеси, в состав которой входили реакционный буфер для высокоточной полимеразы Q5 (New England Biolabs, Великобритания), 50 нг плазмидной ДНК-матрицы, 0.6 мкМ прямого и обратного олигонуклеотидного праймеров, 0.5 мМ смеси дНТФ. ДНК-полимеразу Q5 добавляли в реакционную смесь непосредственно перед реакцией в концентрации, рекомендуемой производителем. Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Режим реакции контролировали с помощью амплификатора DNAEngine (Bio-Rad, США). Использовали следующие параметры реакции: первоначальная денатурация ДНК при 98 °С в течение 1 мин, далее 34 цикла в следующем режиме: денатурация ДНК при 98 °С в течение 15 с, отжиг праймеров при 55 °С в течение 30 с, синтез новой цепи ДНК при 68 °С в течение 2.5 мин. В последнем цикле время реакции синтеза новой цепи ДНК продлевали до 10 мин. Для того чтобы избавиться от исходной плазмидной ДНК, не содержащей мутации, реакционную смесь обрабатывали рест-

риктазой *DpnI* (New England Biolabs, Великобритания). Этот фермент гидролизует ДНК по специфичным сайтам только при условии их метилирования. Исходная плазмидная ДНК является метилированной, так как она нарабатывается в клетках *E. coli*, обладающих соответствующими ДНК-метилазами. При синтезе ДНК *in vitro* с помощью ПЦР метилированной является только матрица. Благодаря этому вновь синтезированная ДНК, содержащая праймеры с желаемыми модификациями, не подвергается гидролизу. Для обработки *DpnI* к реакционной смеси добавляли буфер CutSmart (New England Biolabs, Великобритания), рестриктазу *DpnI* в концентрации, рекомендуемой производителем, и инкубировали при 37 °С в течение нескольких часов. Для проверки эффективности рестрикции проводили контрольную реакцию с исходной плазмидной ДНК, выделенной из клеток *E. coli*. Анализ продуктов полимеразной цепной реакции и эффективности рестрикции проводили с помощью электрофоретического разделения фрагментов ДНК в агарозном геле (Раздел 2.3).

2.3. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле (Маниатис и др., 1984)

Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот проводили в агарозных гелях в горизонтальных блоках при напряженности электрического поля 5-10 В/см. В качестве электролита использовали трис-ацетатный буфер (40 мМ трис-ацетат, рН 8.0; 0.02 М ацетат натрия, 0.002 М динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА)). О ходе электрофореза судили по миграции красителя бромфенолового синего (Serva, ФРГ), добавленного в пробы перед их нанесением в лунки геля. ДНК регистрировали с помощью установки видео-документации гелей Gel-Doc (Bio-Rad, США) по флуоресценции образца в ультрафиолетовом свете после экспозиции геля в растворе бромистого этидия (10 мкг/мл). О размере ДНК судили, сопоставляя ее с маркерами длин 1 kb DNA Ladder (Евроген, Россия), GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder и DNA Ladder Mix

(Fermentas, Канада). Выделение ДНК из агарозного геля проводили с помощью коммерческого набора для очистки ДНК Cleanup Standard (Евроген, Москва) по рекомендованному производителем протоколу. Полученную ДНК хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4. Молекулярное клонирование

Для экспрессии гена дивинилэфирсинтазы NtDES табака в клетках *E. coli* проводили переклонирование ОРС в бактериальный плазмидный вектор pET-32 Ek/LIC (Рис. 14, Novagen, США), используя метод безлигазного клонирования. Для этого ОРС гена *NtDES* амплифицировали в ПЦР (Раздел 2.2), используя праймеры, в которые включили последовательности, комплементарные одноцепочечным концам вектора pET-32 Ek/LIC. Для получения комплементарных одноцепочечных концов ампликонов проводили их обработку T4 ДНК-полимеразой (Invitrogen, США). В состав реакционной смеси входили буфер для T4 ДНК-полимеразы (Invitrogen, США), 100 мМ ДТТ, 25 мМ дАТФ, 0.2 пкМ очищенного продукта ПЦР. T4 ДНК-полимеразу добавляли в реакционную смесь непосредственно перед реакцией в концентрации, рекомендуемой производителем. Конечный объем реакционной смеси составлял 10 мкл. Полученную смесь инкубировали при $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин, после чего фермент инактивировали нагреванием до $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин. Обработанный продукт ПЦР (0.02 пкМ) смешивали с 50 нг вектора pET-32 Ek/LIC и инкубировали в течение 5 мин при $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем к реакционной смеси добавляли ЭДТА в концентрации 25 мМ и инкубировали в течение дополнительных 5 мин при $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Полученный препарат использовали для трансформации компетентных клеток (Раздел 2.10) *E. coli* штамма NovaBlue (Раздел 2.7).

2.5. Определение нуклеотидной последовательности ДНК

Для проверки первичной структуры клонированных или измененных в результате сайт-направленного мутагенеза рекомбинантных генов проводили определение их последовательностей с помощью автоматического капиллярного ДНК-анализатора ga3130 (Applied Biosystems, США). Первым этапом этой процедуры является проведение модифицированной реакции Сенгера. В состав реакционной смеси проводимых реакций входили специализированный буфер (Nimagen, Голландия), 150 нг плазмидной ДНК в качестве матрицы, 0.5 мкМ праймера (прямого или обратного), 1 мкл смеси BrightDye v. 3.1 (Nimagen, Голландия). Конечный объем реакционной смеси составлял 10 мкл. Режим реакции (25 циклов) контролировали с помощью амплификатора DNAEngine (Bio-Rad, США). Использовали следующие параметры реакции: денатурация ДНК при 96 °С в течение 10 с, отжиг праймера при 55 °С в течение 5 с, синтез цепи ДНК при 60 °С в течение 4 мин. В первом цикле время денатурации увеличивали до 1 мин.

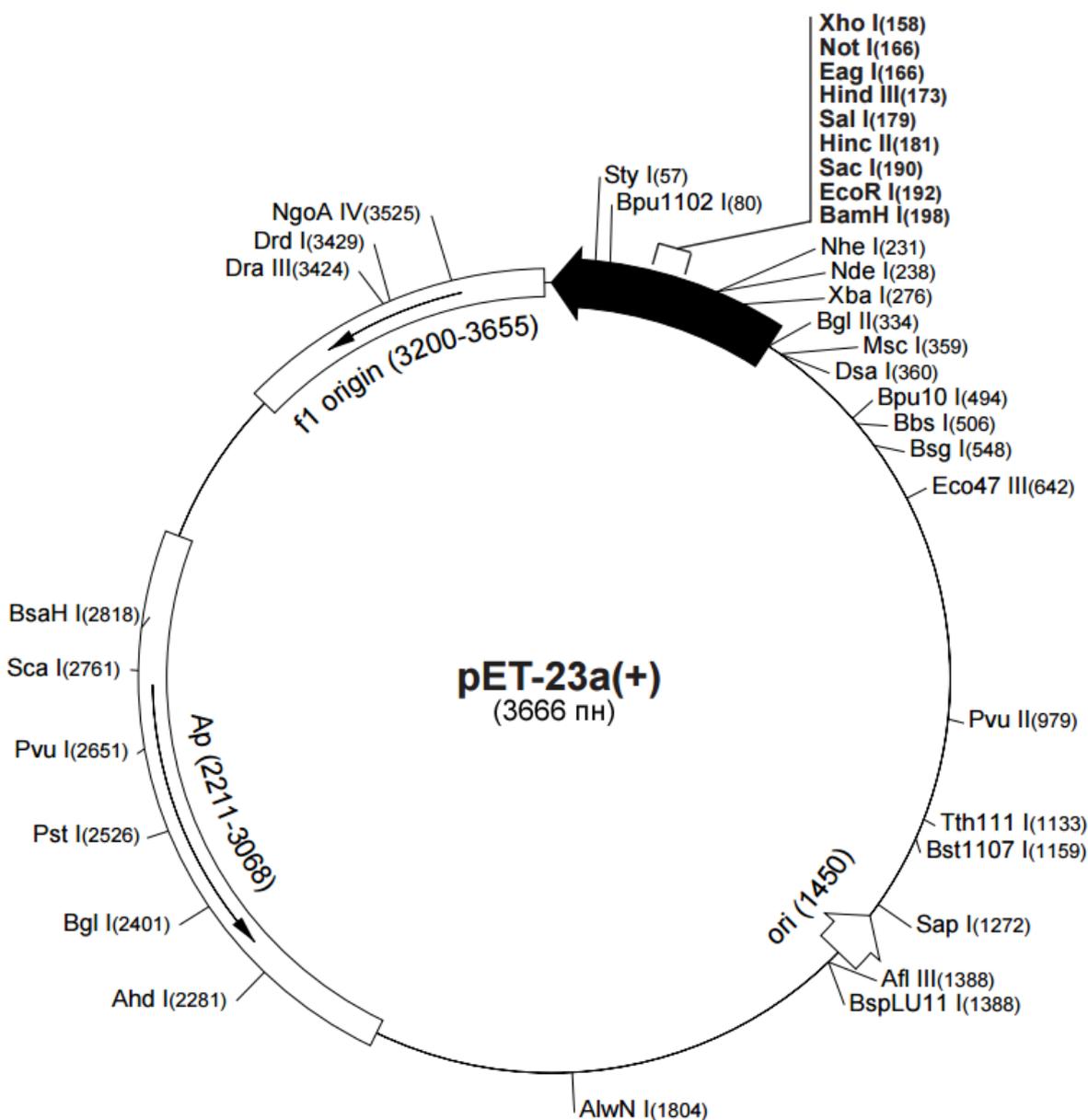
После проведения реакции Сенгера конденсат осаждали, и в реакционную смесь добавляли 0.1 объема ацетата натрия (3 М), 3 объема 96 % этилового спирта (-15 °С), тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. ДНК осаждали центрифугированием (13500 об/мин, 4 °С, 30 мин) и промывали 70 % этиловым спиртом. Осадок ДНК тщательно сушили, после чего растворяли в 10 мкл буфера для нанесения проб, содержащего формамид (Applied Biosystems, США). Полученные в реакции Сенгера флуоресцентно меченные одноцепочечные фрагменты ДНК анализировали с помощью ДНК-анализатора в соответствии с рекомендуемыми производителем алгоритмами. Анализ секвенированных последовательностей проводили с использованием программы Sequencing Analysis 5.3.1. (Applied Biosystems, США).

2.6. Характеристика используемых бактериальных векторов

В работе были использованы векторы системы рЕТ (Novagen, США): рЕТ-32 Ek/LIC (Рис. 14) и рЕТ-23а (Рис. 15). Конструкция вектора рЕТ-32 Ek/LIC включает в себя следующие компоненты: T7-промотор, сайт мультиклонирования, содержащий несколько уникальных сайтов рестрикции, последовательности Trx•Tag, His•Tag, S•Tag, T7-терминатор, точку начала репликации из вектора рBR322, последовательность, кодирующую ген устойчивости к ампициллину, точку начала репликации фага f1 и последовательность гена *lacI*. Область клонирования кодирующей цепи транскрибируется с помощью T7 РНК-полимеразы с T7-промотора. Концевые последовательности, присоединяемые к целевому белку, используются для следующих целей: S•Tag – для очистки с помощью аффинной хроматографии, His•Tag – для очистки с помощью нативной или денатурирующей металлоаффинной хроматографии или моноклональных антител; Trx•Tag способствует увеличению гидрофильности белка и образованию дисульфидных связей. Конструкция вектора рЕТ-23а имеет сходное, но более простое строение. В нем отсутствуют последовательности Trx•Tag и S•Tag, *lac*-оператора; при этом конструкция вектора включает дополнительно последовательность T7•Tag для очистки с помощью моноклональных антител.

2.7. Характеристика используемых бактериальных штаммов

Для клонирования всех рекомбинантных генов использовали неэкспрессирующий штамм *E. coli* NovaBlue (Novagen, США), имеющий генотип *endA1 hsdR17 (r_{KI}²⁻ m_{KI}²⁺) supE44 thi⁻¹ recA1 gyrA96 relA1 lacF' [proA⁺ B⁺ lacIqZ ΔM15 :: Tn10(Tc^R)*], являющийся производным штамма *E. coli* K-12. Этот штамм подходит для первоначального клонирования целевой плазмиды благодаря высокой эффективности трансформации.



<u>Bgl II</u>	T7 помотор	<u>Xba I</u>	<u>rbs</u>
AGATCTCGATCCCGCAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA			
<u>Nde I</u> <u>Nhe I</u>	T7•Tag	pET-23 α <u>BamH I</u> <u>EcoR I</u> <u>Sac I</u>	<u>Hinc II</u> <u>Sal I</u> <u>Hind III</u> <u>Eag I</u> <u>Not I</u> <u>Xho I</u> His•Tag
TATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGGCCGCACCTCGAGCACCACCACCACCCTGA MetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGlyArgGlySerGluPheGluLeuArgArgGlnAlaCysGlyArgThrArgAlaProProProProLeu			
pET-23d <u>Nco I</u>	pET-23b	...GGTCGGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGGCCGCACCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA ...GlyArgAspProAsnSerSerSerValAspLysLeuAlaAlaAlaLeuGluHisHisHisHisHisHisEnd	
...TACCATGGCTAGC... MetAlaSer...	pET-23c,d	...GGTCGGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGGCCGCACCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA ...GlyArgIleArgIleArgAlaProSerThrSerLeuArgProHisSerSerThrThrThrThrThrThrGlu	
<u>Bpu1102 I</u>			
T7 терминатор			
GATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGCTTGTAGGGGTTTTTG			

Рис. 15. Схема вектора pET-23a (Novagen, США).

Штамм содержит мутацию гена *rec⁻*, которая нарушает общую рекомбинацию и ингибирует формирование плазмидных мультимеров, и мутацию гена *endA⁻*, которая ингибирует специфическую эндонуклеазу I, улучшая тем самым выход и качество плазмиды.

Для экспрессии рекомбинантных генов *LeAOS3* и *CYP5164B1* использовали бактериальный штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen, США) со следующим генотипом: *F- ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3)pLysS (Cam^R)*. Для экспрессии рекомбинантного гена *NtDES* бактериальный штамм *E. coli* Rosetta-gami(DE3)pLysS B (Novagen, США) со следующим генотипом: *F ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm lacY1(DE3) pLysS RARE, lacY (Cm^RTc^RKm^R)*. Оба штамма являются лизогенными по фагу λ-DE3 и содержат копию гена T7 РНК-полимеразы под контролем *lacUV5*-промотора в хромосоме, что делает эти штаммы подходящими для экспрессии генов с T7- или T7lac-промоторов. Оба штамма содержат плазмиду pLysS, которая несет ген T7 лизоцима – естественного ингибитора T7 РНК-полимеразы, что до определенного момента предотвращает экспрессию генов, кодирующих целевые белки. Это имеет большое значение в случае, если данные белки влияют на рост и жизнеспособность клеток. Присутствие плазмиды pLysS имеет дополнительное преимущество. После накопления целевого белка простое замораживание и оттаивание приводит к тому, что синтезированный в клетке T7 лизоцим эффективно разрушает клетки, что значительно облегчает приготовление клеточных экстрактов. У описанных экспрессирующих штаммов снижена активность *lon*-протеазы и отсутствует *ompT*-протеаза на наружной мембране, что снижает степень деградации целевых белков во время очистки (Grodberg *et al.*, 1988). Таким образом, целевые белки остаются в этих штаммах более стабильными.

Rosetta-gami(DE3)pLysS B является производным штамма *E. coli* BL21(DE3). Этот штамм позволяет экспрессировать гены, содержащие кодоны, тРНК для которых в клетках *E. coli* являются редкими, а именно – аргинина

AGA, AGG и CGA, глицина GGA, изолейцина AUA, лейцина CUA и пролина CCC. Эти гены расположены на плазмиде pLysS и считываются со своих собственных промоторов. Штамм также содержит мутацию в гене *lac*-пермеазы (*lacY*), что позволяет получать одинаковый уровень экспрессии целевого гена во всех клетках при одновременном введении ИПТГ в культуру, производительность которой зависит от концентрации индуктора. Регулируя уровень ИПТГ, можно регулировать уровень экспрессии. Низкий уровень экспрессии может повысить растворимость и каталитическую активность целевых ферментов. Кроме того, у этого штамма содержатся мутации в генах глутатион-редуктазы (*gor*) и тиоредоксин-редуктазы (*trxB*), что улучшает формирование дисульфидных мостиков в цитоплазме (Aslund *et al.*, 1999; Prinz *et al.*, 1997). Для длительного хранения штаммов *E. coli* использовали замораживание клеток в 10 %-ом глицерине в жидком азоте с последующим содержанием при -70°C . Для непосредственной работы использовали культуры в состоянии медленного анаэробного роста в столбиках агаризованной среды LB (Раздел 2.10).

2.8. Среды для культивирования бактерий

Культуры клеток *E. coli* выращивали в следующих средах:

1. SOC (Маниатис и др., 1984): 2 % пептона, 0.5 % дрожжевого экстракта, 10 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄ и 20 мМ глюкозы (Гловер, 1988).

Для приготовления среды SOC пептон, дрожжевой экстракт, NaCl и KCl растворяли в воде и стерилизовали автоклавированием в течение 30-40 мин. Перед использованием в среду SOC добавляли предварительно стерилизованные фильтрованием через нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0.22 мкм растворы MgCl₂ (0.1 мМ), MgSO₄ (2 мМ) и глюкозы (20 мМ) (БиоХимФарм, Россия). pH раствора составлял 6.8-7.0.

2. Luria-Bertani (Гловер, 1988): 1 % пептона, 0.5 % дрожжевого экс-

тракта, 1 % NaCl. pH доводили до 7.5 с помощью NaOH.

3. М9 (Маниатис и др., 1984): 0.6 % Na_2HPO_4 , 0.3 % KH_2PO_4 , 0.05 % NaCl, 0.1 % NH_4Cl . С помощью NaOH pH доводили до 7.4, стерилизовали автоклавированием и добавляли предварительно стерилизованные фильтрованием через нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0.22 мкм растворы MgSO_4 (2 мМ), CaCl_2 (0.1 мМ).

Агаризованные питательные среды содержали 1.5 % бактоагара.

2.9. Приготовление компетентных клеток *E. coli*

Методику получения компетентных клеток *E. coli* разработали на основе описанных ранее (Гловер, 1988; Inoue *et al.*, 1990). С помощью стерильной вольфрамовой петли отбирали колонии трансформантов *E. coli*, выращенные в чашке Петри с агаризованной средой LB (Раздел 2.8), содержащей антибиотика, устойчивость к которым проявляют клетки данного штамма, суспендировали их в 1 мл среды LB, содержащей те же антибиотика, и выращивали при 250 об/мин, 37 °С до достижения клетками стационарной фазы роста. Культурой инокулировали свежую среду LB, содержащую те же антибиотика, в соотношении 1:100 (об/об) и инкубировали при 180 об/мин, 37 °С до достижения культурой значения оптической плотности $\text{OD}_{600} = 0.5$, что соответствовало титру $4\text{--}7 \times 10^7$ жизнеспособных клеток/мл. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра Lambda25 (Perkin-Elmer, США). После этого культуру переносили в стерильные центрифужные пробирки и охлаждали на ледяной бане. Клетки осаждали центрифугированием (8000 об/мин, 5 мин, 4 °С) в центрифуге Z36НК (Hermle, Германия) и суспендировали в 1/3 исходного объема буфера ТВ (10 мМ PIPES, 15 мМ CaCl_2 , 250 мМ KCl, 55 мМ MnCl_2), стерилизованного фильтрованием через нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0.22 мкм. Клетки инкубировали на ледяной бане в течение 15 мин и осаждали центрифугированием, как описано выше. Осадок суспендировали в 1/12.5 исходного объ-

ема буфера ТВ, содержащего дополнительно 7 % диметилсульфоксида (ДМСО), стерилизованного фильтрованием через нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0.22 мкм, и инкубировали на ледяной бане в течение 15 мин, после чего использовали для трансформации.

2.10. Трансформация компетентных клеток *E. coli*

(Маниатис и др., 1984)

Полученные компетентные клетки *E. coli* использовали для трансформации рекомбинантными плазмидами, содержащими целевые вставки. Для первоначального клонирования использовали клетки штамма *E. coli* NovaBlue (Раздел 2.7). Плазмидную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора Plasmid Miniprep (Евроген, Москва) согласно протоколу производителя. В качестве отрицательного контроля использовали одну трансформацию, проведенную без добавления плазмидной ДНК. После добавления к клеткам плазмиды (1 нг на 50 мкл клеток) их инкубировали на ледяной бане в течение 15 мин, после чего нагревали до 42 °С ровно на 30 секунд и сразу переносили на ледяную баню. К каждой трансформации добавляли 5 объемов среды SOC (Раздел 2.8) комнатной температуры, после чего инкубировали клетки при 37 °С в течение 1 ч. Отбор трансформантов, содержащих целевую плазмиду, несущую дополнительно ген устойчивости к ампициллину, проводили посевом в чашки Петри с агаризованной средой LB (Раздел 2.8), содержащей данный антибиотик. Кроме того, добавляли специфические антибиотики для поддержания признаков реципиента. Инкубацию проводили в течение нескольких часов при 37 °С. Отбирали отдельные колонии трансформантов и суспендировали их в 10 мл среды LB. Инкубировали культуры при 37 °С с умеренной аэрацией до достижения клетками стационарной фазы роста. Полученную культуру использовали для создания музея (Раздел 2.7). Для проверки качества плазмидную ДНК выделяли из культуры клеток и анализировали по результатам электрофоретического разделения в

агарозном геле и окраски бромистым этидием (Раздел 2.3). Наличие целевой вставки в плазмиде определяли по результатам ПЦР (Раздел 2.2) со специфичными праймерами. Для проверки первичной структуры клонированных или измененных в результате сайт-направленного мутагенеза рекомбинантных генов проводили определение их последовательностей с помощью автоматического капиллярного ДНК-анализатора ga3130 (Applied Biosystems, США) (Раздел 2.5).

2.11. Индукция синтеза рекомбинантных белков

Эта процедура была составлена нами на основе нескольких общепринятых протоколов. Была разработана следующая методика. Культуру клеток *E. coli* (5-10 мл) выращивали в среде LB (Раздел 2.8), содержащей 500 мг/л ампициллина, 35 мг/л хлорамфеникола, 12.5 мг/л тетрациклина и 50 мг/л канамицина, при 32 °С и умеренной аэрации (180 об/мин) до стационарной фазы роста. Оптимальные концентрации используемых антибиотиков были подобраны нами в отдельных экспериментах. После этого культурой инокулировали 25 мл свежей среды LB из расчета 1:50 (об/об), содержащей те же антибиотики, и выращивали при интенсивной аэрации (250 об/мин, 32 °С) до достижения культурой значения оптической плотности OD_{600} 2.0-2.5. Культурой инокулировали свежую среду LB, разведенную 1 объемом среды M9 (Раздел 2.8) из расчета 1:40 (об/об), и выращивали при 42 °С и интенсивной аэрации (250 об/мин) до достижения культурой значения оптической плотности OD_{600} 0.8-1.0, после чего клеточную суспензию быстро охлаждали до 20 °С на ледяной бане. Выращивание культуры при 42 °С приводит к накоплению в клетках шаперонов и шапероноподобных белков, которые впоследствии улучшают фолдинг целевого белка. К охлажденной культуре немедленно добавляли индуктор синтеза белков – ИПТГ из расчета 115 мг/л – и предшественник гема – δ -аминолевулиновую кислоту – из расчета 50 мг/л. Кроме того, вносили дополнительное количество ампициллина из расчета 100 мг/л для компенсации его разрушения β -лактамазой бакте-

рий в процессе роста культуры. Индуцированные таким образом клетки инкубировали в течение 8-14 часов при умеренной аэрации (180 об/мин) и пониженной температуре (20 °С). При этом анализировали эффективность наработки целевого белка в культуре. Для этого перед индукцией и перед сбором клеток после индукции отбирали по 1 мл культуры. Клетки осаждали центрифугированием и использовали непосредственно для приготовления образцов для электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле (Раздел 2.12).

2.12. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле (Остерман, 1981)

Электрофоретическое разделение белков проводили в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН) по Лэмли (Остерман, 1981) с использованием системы PowerPac Universal MiniProtean (Bio-Rad, США). К белковым образцам добавляли Sample Buffer (2.5 % ДСН, 2.5 мМ β-меркаптоэтанола, 12.5 % глицерина, 0.005 % красителя бромфенолового синего). Образцы выдерживали при 100 °С в течение 5 мин, охлаждали и наносили на полиакриламидный гель (18 % акриламида, 0.5 % метилен-бисакриламида, 0.375 М трис-НСl (рН 8.9) – разделяющий гель; 3 % акриламида, 0.08 % метилен-бисакриламида, 0.125 М трис-НСl (рН 6.8) – концентрирующий гель; оба геля содержали 0.1 % персульфата аммония, 0.05 % ТЕМЕД, 0.1 % ДСН). На границе между концентрирующим и разделяющим гелями происходило концентрирование образцов. В разделяющем геле происходило разделение образцов по молекулярным массам и зарядам. Разделение проводили при напряженности электрического поля 10 В/см в трис-глициновом буфере (25 мМ трис, 192 мМ глицина, 0.02 % ДСН, рН 8.3) до выхода красителя бромфенолового синего из геля. Размеры белков определяли по сравнению с маркером молекулярного веса Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Fischer Scientific, США). Белки визуализировали окрашиванием в растворе, содержащем 0.2 % Coomassie R-250, 45.4 % C₂H₅ОН, 45.4 %

CH₃COOH, после чего избавлялись от избыточного красителя, выдерживая гель в отмывающем растворе (10 % C₂H₅OH, 10 % CH₃COOH).

2.13. Выделение и очистка рекомбинантных белков

Очистку рекомбинантных белков проводили методом металлоаффинной хроматографии на колонках Bio-Scale Mini Profinity IMAC 5 мл в хроматографической системе BioLogic LP (Bio-Rad, США) по следующей схеме. Клетки осаждали центрифугированием (8000 об/мин, 4 °C, 5 мин). Осадок суспендировали в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7.0), содержащем 100 мМ NaCl и 0.3 % полиоксиэтилен-10-тридецилэфира (ПОЭТЭ), из расчета 5 мл на 1 г клеток и механически разрушали с помощью системы French Press Cell Disrupter (Thermo Scientific, США). К осветленному центрифугированием (18000 об/мин, 60 мин, 4 °C) лизату добавляли 200 мМ NaCl и наносили на колонку Bio-Scale Mini Profinity IMAC 5 мл (Bio-Rad, США), уравновешенную 10 объемами 50 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7.0), содержащего 300 мМ NaCl и 0.3 % ПОЭТЭ, после чего промывали этим же буфером до достижения устойчивого минимума оптической плотности раствора при 280 нм. Для того чтобы снять белок с колонки в щадящих условиях, его вытесняли из комплексов с ионами никеля раствором гистидина. Предварительную промывку колонки проводили 10 объемами 50 мМ Na-фосфатного буфера, (pH 7.0), содержащего 100 мМ NaCl и 3 мМ гистидина, для освобождения от неспецифически связанных белков. Целевой белок элюировали из сорбента 10 объемами того же буфера, содержащего 30 мМ гистидина и 0.3 % ПОЭТЭ. Полученную фракцию элюата концентрировали, пропуская через центрифужный фильтр Vivaspın20 50 кДа (Sartorius, Германия).

Качество очистки в полученных нами препаратах определяли методом электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле (Раздел 2.12). Концентрацию белка в элюате измеряли по флуоресценции со специфическими красителями на флуориметре Qubit (Invitrogene, США) по прилагаемой

инструкции. Поскольку фермент после металлоаффинной хроматографии содержал примеси других белков, для кинетических исследований точную концентрацию цитохрома определяли по концентрации гема в полученной фракции элюата (Schenkman, Jansson, 2006). Для этого 1 мкл элюата, содержащего не менее 3 нмоль/мл белка, разводили в 2 мл раствора, содержащего 0.2 М NaOH и 20 % пиридина. У полученного раствора прописывали базовую линию при поглощении от 600 до 500 нм на спектрофотометре Lambda 25 (Perkin-Elmer, США), после чего к нему добавляли несколько мг дитионита натрия и прописывали спектр поглощения от 600 до 500 нм. Вычисляли разницу в измерениях поглощения при длинах волн 557 нм и 575 нм ($\Delta A_{557-575}$). Для расчета концентрации гема использовали закон Бира:

$$A = \varepsilon * c * L,$$

где ε – коэффициент экстинкции ($\varepsilon_{557-575}$), равный для гема $32.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, c – концентрация гема и L – длина пути световых волн в кювете. Концентрацию цитохрома вычисляли из расчета, что один миллиграмм фермента связывает от 17 до 20 нмоль гема.

2.14. Реактивы и материалы для исследований катализа рекомбинантных ферментов

В исследованиях использовали следующие реактивы. Линолевая, α -линоленовая и эйкозапентаеновая кислоты, соевая липоксигеназа V типа, а также метанол для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) были получены от Sigma-Aldrich (США); $[1-^{14}\text{C}]$ -линолевая кислота (2.072 МВq/мкмоль) – от Perkin Elmer (США); боргидрид натрия и силилирующие реагенты – от Fluka (Buchs, Швейцария). Цвиттерионный буфер трис-(гидроксиметил)-аминометан (трис) был получен от Calbiochem (США), N-нитрозотолуол-4-сульфометиламид (диазометан) и изопропанол – от Fluka (Buchs, Швейцария); $[^{18}\text{O}]$ вода (95 % ^{18}O) и газообразный $^{18}\text{O}_2$ (88 % ^{18}O) – от

ЗАО «Неогаз» (Россия); [$^2\text{H}_6$]бензен (99.5 % ^2H) – от ФГУП РНЦ "Прикладная химия" (Россия).

2.15. Получение гидроперекисей жирных кислот

(9*S*,10*E*,12*Z*)-9-Гидроперокси-10,12-октадекадиеновую (9-ГПОД) и (9*S*,10*E*,12*Z*,15*Z*)-9-гидроперокси-10,12,15-октадекатриеновую (9-ГПОТ) кислоты, а также [$1\text{-}^{14}\text{C}$]9-ГПОД (57.6 kBq/мкмоль) получали в результате инкубации линолевой кислоты с рекомбинантной 9-специфичной липоксигеназой ZmLOX3 (GeneBank: AAG61118.1) кукурузы (*Z. mays*) в 100 mM Na-фосфатном буфере (pH 6.0) при 0 °C при постоянном кислородном барботаже. (9*Z*,11*E*,13*S*)-Гидроперокси-9,11-октадекадиеновую (13-ГПОД), (9*Z*,11*E*,13*S*,15*Z*)-гидроперокси-9,11,15-октадекатриеновую (13-ГПОТ) и (5*Z*,8*Z*,11*Z*,13*E*,15*S*,17*Z*)-13-гидроперокси-5,8,11,13,17-эйкозапентаеновую (15-ГПЭПЕ) кислоты получали в результате инкубации линолевой, α -линоленовой и эйкозапентаеновой кислот, соответственно, с соевой липоксигеназой V типа при 23 °C. Соевую липоксигеназу растворяли в насыщенном кислородом 50 mM трис-HCl буфере, pH 9.0, куда вносили растворенную в 96 % этиловом спирте жирную кислоту (концентрация этилового спирта в реакционной смеси не превышала 0.1 %). Инкубации проводили в течение 20 мин и непрерывном кислородном барботаже и останавливали внесением ледяной уксусной кислоты до установления pH реакционной смеси 4.0-5.0. Продукты реакции экстрагировали смесью этилацетата и гексана (1:1 по объему). Растворители испаряли под струей азота, жирные кислоты растворяли в метаноле. Гидроперекиси дважды очищали от побочных продуктов ферментативной реакции и от остатка непрореагировавшей кислоты при помощи ВЭЖХ на нормальной фазе на двух последовательно соединенных колонках Kromasil Si (7 мкм, 4.0×250 мм, ElsiCo, Россия) в изократическом режиме, используя смесь гексана, изопропанола и уксусной кислоты (98.1:1.8:0.1 по объему). Скорость потока составляла 0.4 мл/мин. Гидроперекиси после упа-

ривания растворителя перерастворяли в 96 % этиловом спирте и хранили при – 20 °С. Меченую [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД получали в результате инкубации в атмосфере, содержащей $^{18}\text{O}_2$ в идентичных условиях.

2.16. Кинетические исследования рекомбинантных ферментов

Ферментативную активность очищенных рекомбинантных ферментов определяли по снижению оптической плотности в минуту при 234 нм. Измерения проводили с использованием спектрофотометра Lambda25 (Perkin-Elmer, США). Концентрация субстрата составляла 40 мкмоль. Анализ проводили при 25 °С в 100 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7.0). Для расчета скорости реакций использовали первоначальные линейные участки кинетических кривых. Коэффициент молярной экстинкции для 9- и 13-гидроперекисей жирных кислот при 234 нм составляет $25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Для каждого варианта проводили не менее пяти измерений.

2.17. Проведение реакций, катализируемых рекомбинантными ферментами, с гидроперекисями жирных кислот

Процедуру подготовки образцов для анализа методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) проводили по протоколу, описанному ранее (Grechkin *et al.*, 2006). Гидроперекись (100 мкг) инкубировали 15 мин при 4 °С в 10 мл 100 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7.0) в присутствии 25 мкг очищенного рекомбинантного фермента. Перед инкубацией смесь тщательно перемешивали на вортексе Heidolph Reax Top (Heidolph, Германия). После инкубации pH смеси снижали до 6.0, после чего экстрагировали смесью гексана с этилацетатом (1:1 по объему) при комнатной температуре (три раза, равным объемом). Затем растворитель выпаривали в вакуумном испарителе, а продукты реакции растворяли в 1.5 мл метанола и восстанавливали, выдерживая в течение 30 мин в присутствии NaBH_4 . Затем проводили метилирование продуктов диазометаном, выпари-

вание (для удаления диазометана), перерастворение в метаноле и гидрирование над платиновым катализатором. После удаления катализатора продукты снова высушивали и силилировали смесью пиридина, гексаметилдисилазана и триметилхлорсилана (1:1:1 по объему) в течение 30 минут при 23 °С. После упаривания силилирующей смеси готовые продукты растворяли в гексане и подвергали анализу методом ГХ-МС в виде метиловых эфиров ТМС-производных (Me/ТМС), как описано ранее (Grechkin *et al.*, 2006). В некоторых случаях пропускали стадии восстановления и гидрирования. Для микропрепаративного выделения продуктов рекомбинантный фермент (25 мкг) инкубировали с 18.5 kBq [^{14}C]9-ГПОД (5.78 kBq/ μmol) в аналогичных условиях. Продукты экстрагировали и метилировали диазометаном. Полученные метиловые эфиры разделяли и очищали методом ВЭЖХ на обращенной и нормальной фазах. Инкубацию рекомбинантного фермента с [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД либо с немеченой 9-ГПОД в $^{18}\text{O}_2$ атмосфере или [^{18}O]воде (1 мл) проводили по той же схеме. Продукты (Me/ТМС) анализировали методом ГХ-МС (селективным сканированием ионов, SIM).

2.18. Анализ продуктов реакций, катализируемых рекомбинантными ферментами, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Для ВЭЖХ использовали градиентную хроматографическую систему производства Gilson (Франция) с использованием различных колонок.

2.18.1. Хроматография на обращенной фазе

Во всех экспериментах в качестве первого этапа разделения окисленных жирных кислот использовали хроматографию на колонках с обращенной фазой. После высушивания экстрактов в потоке азота жирные кислоты перерастворяли в метаноле и анализировали на колонке Nucleosil 5 ODS (250×4.6 мм) (Macherey-Nagel, Германия) с обращенной фазой. Раствор окисленных жирных ки-

слот (10-50 мкл) вводили в колонку, предварительно уравновешенную смесью метанола и воды (76:24 по объему). Для элюирования использовали линейный градиент смеси метанола и воды от 76:24 до 94:4 (по объему) за 55 мин, затем элюировали в течение 25 мин в изократическом режиме. Скорость потока составляла 0.4 мл/мин (система А). Необходимые для дальнейшего анализа фракции собирали на выходе из колонки, растворитель высушивали в струе азота. Сухой остаток перерастворяли в ацетоне или гексане для дальнейшей очистки на колонке с нормально фазой.

2.18.2. Хроматография на нормальной фазе

Для очистки на нормальной фазе использовали колонку Macherey-Nagel EC 250/4.6 Nucleodur 100-3 SiOH и смесь гексана и изопропанола двух концентраций: 98.2:1.8 (по объему). Ультрафиолетовое детектирование (190-370 нм) проводили с помощью диодно-матричного детектора Shimadzu SPD-M20A. Радиоактивность детектировали с помощью ВЭЖХ-радиомонитора модели 171 (Beckman Instruments, Fullerton, США) с твердой стинциляционной ячейкой (125 мкм). Анализ проводили в изократическом режиме. Скорость потока растворителей составляла 0.4 мл/мин. Разделенные продукты перерастворяли в [²H₆]бенzene и подвергали анализу методом ЯМР.

2.19. Спектральные исследования

Ультрафиолетовые спектры продуктов сканировали и записывали с помощью спектрофотометра Varian Cary 50 либо диодно-матричного детектора SPD-M20A (Shimadzu, Япония). Продукты инкубаций (с или без предварительного гидрирования и восстановления) анализировали в виде Me/TMC методом ГХ-МС путем полного спектрального сканирования ионов в диапазоне отношений массы к заряду от 50 до 650. Анализ ГХ-МС проводили с помощью масс-спектрометра QP5050A (Shimadzu, Япония), соединенного с газовым хромато-

графом GC-17A (Shimadzu, Япония). Исследуемый образец в режиме деления вводили в кварцевую колонку MDN-5S (5 % фенил- и 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) (Grechkin *et al.*, 2006). Спектры ^1H -ЯМР, 2D-COSY, HSQC, HMBC и NOESY записывали с помощью ЯМР-спектрометра Bruker Avance III 600 (600 MHz, $[\text{}^2\text{H}_3]$ ацетонитрил, 296 K).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Биоинформационный анализ предполагаемого CYP74-подобного фермента *E. siliculosus*

К настоящему времени в талломах некоторых представителей бурых водорослей выявлено множество различных оксипинов, некоторые из которых имеют строение, сходное с оксипинами наземных растений. Так, у бурой водоросли *L. sinclairii* был обнаружен дивиниловый эфир – (ω 5Z)-этероленовая кислота (Proteau, Gerwick, 1993), которая была выявлена в листьях льна-долгунца (Chechetkin *et al.*, 2008), лютика едкого (Hamberg, 1998) и плаунка *S. martensii* (Ogorodnikova *et al.*, 2015). Эти данные позволяют предположить, что ферменты биосинтеза оксипинов у бурых водорослей могут быть родственными таковым наземных растений. Однако до сих пор у бурых водорослей не обнаружено ни одного представителя CYP74 или родственных ферментов. В значительной мере задачу по поиску этих ферментов у бурых водорослей затрудняло отсутствие геномных данных. Однако в 2010 году была опубликована работа по расшифровке генома первого представителя этой группы организмов – бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* (Cock *et al.*, 2010). Геном *E. siliculosus* содержит 214 миллионов пар оснований. В геноме аннотировано 16256 генов, имеющих сложные экзон-интронные структуры и длинные 3'-нетранслируемые области.

Поиск ферментов, гомологичных алленоксидсинтазе ZmAOS1 (CYP74A19, GenBank: ACG28578.1) кукурузы обыкновенной (*Zea mays*), с помощью программы BLAST (NCBI) выявил три последовательности в геноме *E. siliculosus* со следующими идентификационными номерами: CBN74955.1 (псевдоген, 900 п.н.), CBN75517.1 (1113 п.н.) и CBN74956.1 (858 п.н.). Последовательность CBN75517.1, депонированная в базе данных NCBI, кодирует C-концевую область предполагаемого белка, получившего номенклатурный ин-

декс CYP5164B1. Данный белок обладает 33 % сходства с последовательностью ZmAOS1 при покрытии 29 %. Открытая рамка считывания (1434 п.н.), кодирующая белок CYP5164B1 размером 477 аминокислотных остатка (Рис. 16), депонирована в базе данных мРНК Ectsi_mRNA_LATEST ORCAE под идентификационным номером Esi_0111_0095. Экспрессируемые концевые последовательности (EST – expressed sequence tag), соответствующие гену *CYP5164B1*, были выявлены в ходе транскрипционного анализа в различных стрессовых условиях (Dittami *et al.*, 2009). Они депонированы в базе данных NCBI под идентификационными номерами FP272245, FP278707 и FP286043.

Сопоставление последовательности CYP5164B1 с цитохромами P450 свидетельствует о родстве этого белка и ферментов клана CYP74. Последовательность CYP5164B1 обладает наибольшим сходством (22 % при покрытии 87 %) с представителями клана CYP74 метиловых бактерий: гидропероксидазой MnHPL *Methylobacterium nodulans* (GenBank: ACH43051) и ферментом MspCYP74 *Methylobacterium* sp. (GenBank: WP_018263767).

Для анализа консервативных доменов фермента CYP5164B1 проводили сопоставление его аминокислотной последовательности со следующими охарактеризованными ферментами: **семейство CYP74** – Pa, *Parthenium argentatum*; PaAOS, Q40778; Ca, *Capsicum annuum*; CaHPL, AAK27266; Lu, *Linum usitatissimum*; LuDES, ADP03054; Le, *L. esculentum*; LeAOS3, NP_001234833; Mt, *Medicago truncatula*; MtHPL, CAC86897; Nt, *Nicotiana tabacum*; NtDES, AAL40900; Ra, *Ranunculus acris*; RaDES, AJU57209; **клан CYP74** – Msp, *Methylobacterium* sp. 4-46; MspCYP74, WP_018263767; Mn, *M. nodulans*; MnHPL, ACH43051; **монооксигеназы** – Hs, *Homo sapiens*; HsCYP11A1, NP_000772; HsCYP19A1, NP_000094 (Рис. 17).

PaAOS	(1)	-----MDPSSKPLLEE--E-SS-YGIFFOQIKDRLEVFYGTGRDEYERSRMQKYQSTVFRANMPE-----GPEVSSNPKVIIVL
CaHPL	(1)	----MIPIMSSAPLSTATPISLVPVKI--E-SS-YGIFLLGLWDRLDY--NWFQKLPDFSRKVEKYNSTVFRNTVPEFC-----FPFLGVNPNVAVI
LuDES	(1)	-----MAHSPPIPPSAAAVPPLRTI--E-SS-YGWVVGFIADRLNY--FWFRPEPKTRKRMKVKYKPVVFRNTVPEFT-----FFFLAGVNPVNMVVI
LeAOS3	(1)	MANTKDSYHIITMDTKESSIPSLPMKEL--E-SS-YGVVFFGAIKDRYDF-HYNQGADEFERSRMKYDSTVFRNTVPEF-----GPEANRNSKVIVLV
MtHPL	(1)	-----MASSKQEQSSTNKELPLKQI--E-SS-YGLFFIGFIPDRHDY--FYNQQRDRKFESTRIQKYNSTIIFRNTMPE-----GPIISSNPRVIALI
NtDES	(1)	-----MSSFLVSSNNLEEE--E-SS-YGFIISAIKDRYDY--FYKQEDVWEHSKAEKYNSTVVKINMAPE-----GPTSDNDYKLVAFI
RaDES	(1)	----MRGIFTTFFNSTMEPATQLPLREI--E-SS-YGIFFFGAIKDRRLYNYGIDGFFKAKIAEHNSTVFRNTVPEFC-----GPIIASDSKCVLVI
CYP5164B1	(1)	-----MTDNAELLEEQGDHAWFSLQVLEAG--KWSSTPGTYFKEMKKE--NGG-----AF-----IYKAHPGLKVVITTT
MspCYP74	(1)	-----MQV--E-SS-YGFPFLIKTIFDTVDF--LVVSWEFERARRRRHGSTVFRVNLKFK-----E-----TVAVI
MnHPL	(505)	LEDVVRNRADLDGRRANFTFGAPPEADP--E-SS-YGFPGLRKFDTVDF--LEVSWERERARRRTHLGRSTVFKVNLQF-----E-----TVVVI
HsCYP11A1	(3)	AKGLPPRSVLVKGCQTFLSAPREGLRRLVETEGAGISTRSRRPFNEIPSPGDNWLNLYHFWRMETGTHKVLHLLVFNQFKYQIYREKLGIVESVVI
HsCYP19A1	(1)	-----MVLEMLNP IHNITTSVPEAMPAATMVLVLLTGLFLLVWNNEGTSVSSIPGGYCMIGPLISHRGFRWMMGIGSAACNYNRYVGEFMRW
PaAOS	(73)	DAKSEPIILFDVSK--VEKKDLFTG-TYMFSTK---LTGGYRVLSYLDP--SEERHAQLKNLLFFMKNSSNRVIEQIETT---YTE-LEEGLAEALA-KN
CaHPL	(86)	DVKSEFAHFDMEI--VEKANVLVQ-DFMESV---YIGDMRVCAYLDT--SEKHTQIKNESDILIKRSTKVVETLVK---E-DLGLTFESDLS-K
LuDES	(89)	DCKSYAHLFDTEI--ADKQTLTG-DFMESVG--FNGDLRMCAYQVY-LEPKHAQIKKFMALIKRGTKVVETLVK---E-DEMWTLETDISK-
LeAOS3	(83)	DAVSYPIILFDNSQ--VDKENYFEG-TFMSSTP---ENGAYKVCGLG--SDPKHTLRLGLFTSTLRLHKDFPIPTITS---ITS-MTTLEKLESK-
MtHPL	(71)	DAASEPIILFDNKK--VEKLVNLDG-TFMSSTK---FTGGYRVLCYLDI--FENHALIKGFIYNTLLRKTDFIPLKPII---LSD-GNEILEDGLSSKS
NtDES	(77)	DANSEVYMFNDSL--IDKTLTGG-TFKKGE---YGGYRVFAVVDI--SDENHAALKNYIITSFAKHNLFIPLERNS---VSDHLQNLKQVSDQ-
RaDES	(85)	DAKSEPIVLYETDK--VDKERGLG-TFMDLDD---FYGGYVPLAYQDI--SNEFHNQKAFFINIIGSHHKFKVLEKFG---ISE-LDLSGSEIAAK-
CYP5164B1	(63)	DHAEGKWFENQPDV--E-LDRQKQRFGELKCKEYILKGLP-E-LVNAMEKHEGARDYIIVAVRERLELAATDTLEHATANFYKD-LWANMGBYTTVY
MspCYP74	(57)	DQTGIGALFG---E-ADLIQDYFGWAVPPLPLVGVVPSIFG---SGEADGPKRLYRLRLARRAERLEAVFAET---EAEVAARWRAA-
MnHPL	(585)	DQQGIGALFA---E-PDLIQDYFGRAVPPRPLVGSVTSIFE---SGEADGPKRLYRLRLDVAATLQVFAET---GQYAAARWTR-
HsCYP11A1	(103)	DPEVDALLKSEGNPERFLIPWVAYHQYQRIRQIVGLKKSAAWKKDRVALNQEVMAFEATKNFLLDLDAVSRIVSVLHRRKKKAGSGNYSGLDSDLL
HsCYP19A1	(89)	ISGEETLIIKSSSMFHIMKHNHYSRFGSKLGLQCIGMEKGIIFNNNPELWKTTRPFFMKALSGPGLVRMVTVCAS-----L---KTHLDRLEEV
PaAOS	(160)	GKAANFDVGEQAAPFLCE-A-YFNSNREETKLGTSAPTLISSWVLFNLIA-E---TLDL-GLPWFQLEPIILHTRLEAFIISTYNYKYDYQSVATPMV
CaHPL	(172)	SKSASLLPALQKFLFNFLSLTFLGADPSPAPEIANSFAYLDAWLAIDLA-E---TVSI-GVLQPLEEIVFHSFSYFYFVRGGYKLIKFKVSEAKEV
LuDES	(170)	GSATLESPQHCLLKLKLLKSYVGDVSETAPDLAKSFTIINTAFALQVR-E---TIANVLIQPLEIFV-HSEFYPSFLARPGNNLAN-EIKTQGHV
LeAOS3	(176)	GTSYFNPIGDNLSFELFR--FCEGKNIDTSSVGNPSPKIVDKWVFLQIA-PLI-SLGLKFPVNFLLDVLHFTPLVYLKVRDHQKLYNAYNSMKDIL
MtHPL	(169)	GKADFNMSVSVASFNFMK--FCDDKNSETILGDQSPKMFDTLLFLQIA-PLA-TLGGPKIFNYLEDILLRVVPEACTRSSHVKLYEAFSTATATML
NtDES	(165)	GKSDFNALLPNMTFGFIER--LLCDQTNESDTVLGAQSPHELRKWLFPOLI-E---SLSARKLPSFIEDLLIFNELIPGLVKSDNYKLVDAESKNAGSML
RaDES	(172)	KSADNTLNKNITFDYIER--E-AFDTNPTDTKLGSSDEGIANFNFYQVA-EIAPSIGIKYIPHFIEDLII-HTRLEFAIVKSDYKIKTEVIYDVGKTHL
CYP5164B1	(157)	DLFLQSSYAFVLEWIFMGEEGQPLPFYKDFLTVN--PADLSVLGLVEDTE---VANLVSMVAQAQVAGGVSEBEKASIEVLELARSSKMPPSTK---
MspCYP74	(137)	PGFSEADGEDLVATFVCGVIGAALEDADIRVYVN-----HIFTQRLTAVTQWLPWNSYARSRLAYGRLAAVRGADPPE
MnHPL	(665)	PRFAWADEFEDFAATFVFRWILGTEADPADVRVYVG-----NIFTQRLTAVTQWLPWNSYARSRAVFRILDVVRRAPDFPR
HsCYP11A1	(203)	FRFAEESTINVFGERQGM--LEEUVNEAQRFDIDAIYQMFHTSPVMLNLPDLDLFRFRTKTWKDHAVAADVISKADIYTNQVWEIQRQKGSVHVDYR
HsCYP19A1	(180)	NESGYVDVITLIRRVMLDTSNTLFLRILESAIVVKIQGYFDWAQALIKEDIFPKISWLYKKYKESVYKDLDAIEVLEIAEKRRRISTBEKLECMDFGA
		123456
PaAOS	(253)	-E-QAEKLVGPKDEAVHN-ILFA--VCFNTEGSEV-KILFENTLKWIG-LAGENLHTQAEETIG--AIKSYGDGNVTLEATEQMPITKSVVYBSRIEPE
CaHPL	(267)	TR-AQTD-FQLTECEAIAHN-LLFI--LGNFAGGF-TIFLPLNLGNLGEKNAEMQEKLRKEVRE--KVTNGENLSR-ESEVKEMELVQSFVYBSLRISPE
LuDES	(264)	VQLGVTHY-GLTEEEAIAHN-LLFV--LAFNSEEGFTL-FIEKILTR--LSDSTIQEKLRVBAQ--NGGTELTFSTF---KQMLIQCIFVYELRIEPE
LeAOS3	(273)	-D--EAEKLVKRDCAEACHN-FVEL--AGNSYGGI-KVFFESLKWIG-TSGSLHARLVKEIRT--AVKEAGGVTL-S-AIDKMLPVKSVVYELRMEPE
MtHPL	(266)	-N--EAEKAGLRSEALHN-IITF--AGFNAYGSL-KNQFPIIFWIG-SSGEELHKEIANEIRT--VVKQEGGVTIQ--SLEKMLPVKSVVYELRMEPE
NtDES	(260)	-D--EAEKLGIKREAEVHN-ILFL--VGINMAEGL-NAFFIHLIRFVG-EAGPTLHARAKIIRT--AIKEEGGAVTL-SAINKMSLVESEIYVETLRREPE
RaDES	(268)	-D--EAEKLGMRDEAVHN-LIMC--LFFNGSTGF-RVYFYMFMFVIG-LAGESLHKRTADEVRS--VVAESGDGTIALAALEKMSLVKSVVYEFARIQEPE
CYP5164B1	(250)	----MLESGSLPTQMDMK-FMEF--SCEQSSSALAK-NMEYCVGSL--AAN--PDFIA-ELRAELD-QEILTISKVSDA-KRFLPDLDFHWEILRIEPE
MspCYP74	(214)	IAEMAAEGLPDPPEVVAKQ-LTEL--IGMNSLGL-----QNLKSL--VGEFALHPAQEEVRR-----EAAQAAGRGATVFLDRVIRELRIEPE
MnHPL	(742)	IAEMAAEGLHDREALAKQ-LATL--VGMNSLGL-----QNLKSL--VGEFSLHPAQEALRQ---EDLRQETGLPAGRPATPILDRVIRELRIEPE
HsCYP11A1	(301)	ILYRLGLGSKMSFEDIKAN-VTEMLAGVDTTS-----MTLQWHLIEMARNLKQVDMRAEVLVA---ARHQAGDMATMLQVLPILKASIKYELRRIEPE
HsCYP19A1	(280)	TELLIAEKRLDLTRNVNQCILEMIIAEPDTMS-----VSLFMMFLIARKNPVEEAIIKTIQT--VIGE-----RDIKDDIQLKLVNFIYBSMRVQPE
		♦ ♦ ♦
PaAOS	(349)	PVEFQYGAKSNTFTI-E-SHDATSEVKKGEMLFQYQFATKDKPVED-RPEEYVDFRVFGD--GEALLKYVWVSNQPELESITVEKNKOCAGKGFVLLITRI
CaHPL	(364)	PVFSQYARARKDFMI--SSHDSVYEIKKGELLCGYQLVMKDKPVED-EPEKMLERFTKEKGLLNYLWFSN-SFQGRFTESNKKCAAKDAVTLTASL
LuDES	(357)	PVFTQPARARKDFTL--SSSEASYKVKKGLLCCGYQLVMRDTTID--DPESEKDFRLGEGGALLNYLWFSN-GPEEGSASHNKKOCAGKGLVTVTGS
LeAOS3	(367)	PVEFTQVARKNIIT--TNHESSELIKKDELIFQYQLATKDKSVK-NAEAFNDFRVFG--GEKLLKYVWVSNQPELESITVEKNKOCAGKGLVHLLGRL
MtHPL	(360)	AVPYQYAKAREDLIV-KSHDAAEFIKKGMIFQYQFATKDKPVED-DPEVVAKRVFGE--GKLLKYVWVSNQPELESITVEKNKOCAGKGLVHLLGRL
NtDES	(355)	PVEIQYGAKAKFMV-QSHDASYMKKGFQVLYGQEMASDKIHD-KEDDFIDREFMGE--GVKMLKHLVWVSNQPELESITVEKNKOCAGKGLVHLLGRL
RaDES	(364)	PVTNQCGRACKLIV-QSHDSEIKKGGLIYQYQLFATNDEKIFG-SFQEFVDFRVGEEAQKLLPYVWVSNQPELESITVEKNKOCAGKGLVHLLGRL
CYP5164B1	(333)	APQFFKTRQMBLVPTSSGARVQVRKGMCLCHHELIIHIDEAVHGADATEEKKRFINPGLKDDVFAYAFPKPSEPGRVGMPWCGAHTVGVLDGIL
MspCYP74	(301)	PVFFVFGRRTRRVL--DTESGSFAIRRGELVMGVIFAQNDAHVH-RPRRFDPRFLDP--ATG-GRPLIIPRGLTAAVARDTRCPKDAAFATARI
MnHPL	(834)	PVSVFQRAIRDRSL--DSESGRERIRKGLVMGVIFAQNDEHVHP-RADVFDPDFADP--RTGARPLIIPRGLHALVAQRDTRCPKDAAFATARI
HsCYP11A1	(396)	ISVTLQRYLVNPLVL--RDYMIPAITLVQVAIALGALREPTFFDP--ENEDTAVLSKDKNIITYFNILGFGWG-----VRQCLRRRIAEIEMTI
HsCYP19A1	(375)	VMDLVMRKLEDDVI----DCYPVKKSNTIILNIGRMHLEFFPK--ENEETLENKAKN---VPYRYFPQPEFGF-----PRCGAKGYIAMVMMKA
PaAOS	(445)	FVILELRRYDSFEILGESPGLAAVLTFLKRAI-----
CaHPL	(461)	IVAYIQKYDSVVSFSSGSL-----TSVKKAC-----
LuDES	(454)	FVAHLRRYDSISCGSTI-----KAVEKAK-----
LeAOS3	(463)	LWVEFMRYDTFEVFKGLLLGSKVTFKSLTKATS-----
MtHPL	(456)	LLVEFLRYDTFENETKNAFAGAAVITSLTKASSV-----
NtDES	(451)	MLVEFLRYDTFTVEITPLFRAPNVAIKTLTKAT-----
RaDES	(462)	IVAEFLRYDTYTIIEGSE-----VTITSLKKA-----
CYP5164B1	(433)	KVYFGR-WVQEAEWMEKPEPIIDVVEYLGVGVPDGLGFAKVTPRK-----
MspCYP74	(396)	FCTALLRDHAWSLAAPAWDRHRFSLNVAAAPGPLTVERFVRKEETG-----
MnHPL	(929)	FCTALVRDIAWTLTRPVWERRRFSLNVAAPGPLTVERFVRKEETG-----
HsCYP11A1	(481)	FLINMLENERVEIQHLSVDGTFNLIILMPEKPISTFTWFPNQEAATQQ-----
HsCYP19A1	(456)	LLVTLRLRHFVKTQGGQCVESIGKIHDLSLHPDETKNMLEMILTPRNRDLRLEH

Рис. 17. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей фермента CYP5164B1 с ферментами семейства и клана CYP74, а также монооксигеназами P450: цифрами 1-6 пронумерован домен ИНСД, символы ♦, ◇ и ● отмечены ERR-триада, PPV-домен и гем-связывающий остаток цистеина.

В последовательности фермента CYP5164B1 есть ряд особенностей, отличающих ферменты CYP74 от классических монооксигеназ P450 – в первую очередь, вставка из 9 аминокислотных остатков в гем-связывающем домене (Brash, 2009). Как показано на рисунке 17, у фермента CYP5164B1, также как у представителей клана CYP74, эта вставка находится перед остатком цистеина в гем-связывающей петле, тогда как у ферментов CYP11A1 и CYP19A1 человека она отсутствует. У фермента CYP5164B1 этой вставке соответствует последовательность SEPGRVGGM (в положении 409-417).

Вторая особенность, отличающая ферменты CYP74 от монооксигеназ P450, относится к I-спирали. Было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей фермента CYP5164B1 с классическими цитохромами P450 грибов и насекомых (Рис. 18А), а также с ферментами CYP74 высших растений, которые обладают с ним максимальной степенью сходства (Рис. 18Б). Одним из каталитически важных доменов у монооксигеназ является кислород-связывающий домен, который имеет типичный мотив A/G-G-X-D/E-T/S-T/S (Рис. 18А). Вследствие особенностей каталитического действия ферментов CYP74, в их последовательностях данный домен доменом IHCD (Рис. 18Б), который непосредственно участвует в катализе (Toporkova *et al.*, 2008;2013). В последовательности фермента CYP5164B1 вместо остатка глутаминовой или аспарагиновой кислот, консервативных для монооксигеназ, содержится остаток глутамина (Q272) (Рис. 18А). У всех ферментов CYP74 в данном сайте находится синонимичный остаток аспарагина, например, N321 у AtAOS (Рис. 18Б). Этот консервативный остаток аспарагина участвует в начальной стадии каталитического действия ферментов CYP74 – гомолитическом расщеплении связи O-O гидроперекиси жирной кислоты (Lee *et al.*, 2008). Вероятно, у фермента CYP5164B1 остаток глутамина играет аналогичную роль.



Рис. 18. Множественное выравнивание фермента CYP5164B1 и других цитохромов P450. **А** – выравнивание ферментов CYP5164B1, CYP5164A2 *E. siliculosus* и монооксигеназ грибов и насекомых. **Б** – выравнивание фермента CYP5164B1 и членов семейства CYP74 высших растений, которые обладают с ним максимальной степенью сходства. Кислород-связывающий домен и домен HCD выделены серым цветом. Консервативным аминокислотным остаткам монооксигеназ – аспарагиновой кислоте (D) и глутаминовой кислоте (E) – соответствует остаток глутамина (Q) в последовательности фермента CYP5164B1 и остаток аспарагина (N) в последовательностях ферментов CYP74. На рисунке эти аминокислотные остатки выделены полужирным шрифтом. Предварительный анализ был выполнен с использованием инструментов NCBI BLAST с последовательностью фермента CYP5164B1 в качестве референсной. Затем по результатам предварительного анализа было проведено множественное выравнивание выбранных последовательностей с помощью программы Clustal Omega.

Кроме того, у фермента CYP5164B1 отсутствуют аминокислотные остатки, характерные для кислород-связывающего домена монооксигеназ. Центральная область I-спирали фермента CYP5164B1 обладает сходством с доменом IHCD ферментов CYP74. Во втором положении этого домена у фермента CYP5164B1 находится остаток глицина, характерный для большинства ферментов CYP74, кроме алленоксидсинтаз подсемейства CYP74A, а также дивинилэфирсинтаз LuDES льна-долгунца, AsDES чеснока и RaDES лютика. В третьем положении у фермента CYP5164B1, также как практически у всех ферментов CYP74, за исключением дивинилэфирсинтаз растений семейства *Solanaceae* и AsDES, находится остаток фенилаланина. В пятом положении у фермента CYP5164B1 находится остаток серина, консервативный для алленоксидсинтаз подсемейств CYP74A и CYP74C, а также для LuDES. В шестом положении практически у всех ферментов CYP74 находится остаток ароматической аминокислоты: у фермента CYP5164B1, также как у RaDES, в данном положении находится остаток серина. Непосредственно после домена IHCD практически у всех ферментов CYP74 находятся два остатка глицина: у дивинилэфирсинтаз первый остаток глицина заменен остатком другой аминокислоты. У фермента CYP5164B1 заменены оба остатка глицина: первый заменен на остаток серина (синонимичная замена наблюдается у RaDES, у которой в данном положении находится треонин); второй остаток глицина заменен на синонимичный, но больший по размеру остаток аланина.

Последовательность ERR-триады – домена, консервативного для всех цитохромов P450, включая представителей CYP74, у фермента CYP5164B1 является характерной для ферментов CYP74. В то же время, в PPV-домене выявлено нехарактерное для большинства ферментов CYP74 смещение второго остатка пролина в третье положение (Рис. 17). Таким образом, анализ первичной структуры фермента CYP5164B1 не позволяет однозначно предсказать тип катализируемой им реакции.

С помощью программы Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) было проведено множественное выравнивание фермента CYP5164B1 с цитохромами P450 *A. thaliana*, обладающими с ним наибольшим сходством аминокислотных последовательностей, для определения положения фермента CYP5164B1 относительно цитохромов P450, включая ферменты CYP74. Кроме того, с помощью этой программы провели множественное выравнивание фермента CYP5164B1 с представителями клана CYP74 (Таблица 1), охарактеризованными биохимически, для определения положения фермента CYP5164B1 в клане. С помощью программы ClustalW2–Phylogeny (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) построили соответствующие филогенетические деревья. Результаты визуализировали с помощью программы TreeView (Рис. 19, 20). Проведенный анализ показал, что фермент CYP5164B1 образует отдельную ветвь на филогенетическом древе вместе с ферментами CYP74A1 и CYP74B1 (Рис. 19).

На филогенетическом древе клана CYP74 фермент CYP5164B1 находится на одной ветви с ферментами CYP74 метиловых бактерий и животных. Алленоксидсинтаза KfAOS зеленой водоросли *K. flaccidum* (Koeduka *et al.*, 2015) находится между указанной ветвью и ферментами семейства CYP74 наземных растений. Анализ программой BLAST (NCBI) выявил наибольшее сходство фермента CYP5164B1 с ферментами подсемейств CYP74F (например, XP_002451776 *Sorghum bicolor*) и CYP74B (например, XP_002870238 *Arabidopsis lyrata*) наземных растений (Рис. 19).

Таким образом, анализ первичной структуры фермента CYP5164B1 позволяет предположить, что белок CYP5164B1 является неклассическим цитохромом P450, однако не позволяет предсказать тип катализируемой им реакции. В то же время, данные филогенетического анализа указывают на принадлежность фермента CYP5164B1 к клану CYP74. Однако для однозначного отнесения данного фермента к клану CYP74 необходимо провести его биохимическую характеристику.

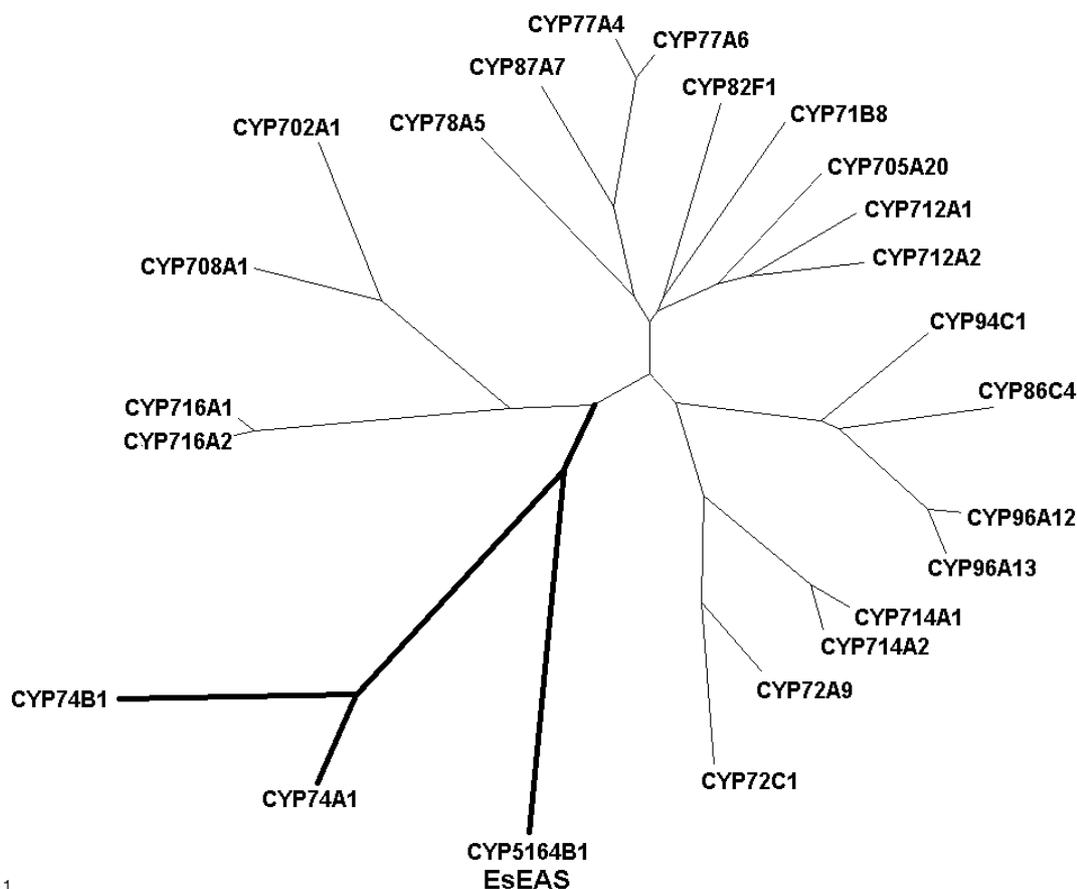


Рис. 19. Неукорененное филогенетическое древо фермента CYP5164B1 и избранных последовательностей цитохромов P450 *A. thaliana*, обладающих максимальным сходством аминокислотных последовательностей с ферментом CYP5164B1. Цитохромы P450 *A. thaliana*: CYP74A1, GI:15239032; CYP74B1, GI:15233810; CYP87A7, GI:15217798; CYP716A2, GI:1001822545; CYP96A12, GI:15235108; CYP77A4, GI:15238249; CYP94C1, GI:15226228; CYP712A1, GI:15227911; CYP71B8, GI:13878369; CYP72A9, GI:15231897; CYP72C1, GI:15220009; CYP77A6, GI:15228331; CYP96A13, GI:15242564; CYP714A1, GI:18420859; CYP708A1, GI:334183365; CYP705A20, GI:15231050; CYP716A1, GI:15239304; CYP712A2, GI:22326638; CYP78A5, GI:15222937; CYP82F1, GI:15224686; CYP86C4, GI:15222187; CYP714A2, GI:15238644; CYP702A1, GI:15218776.

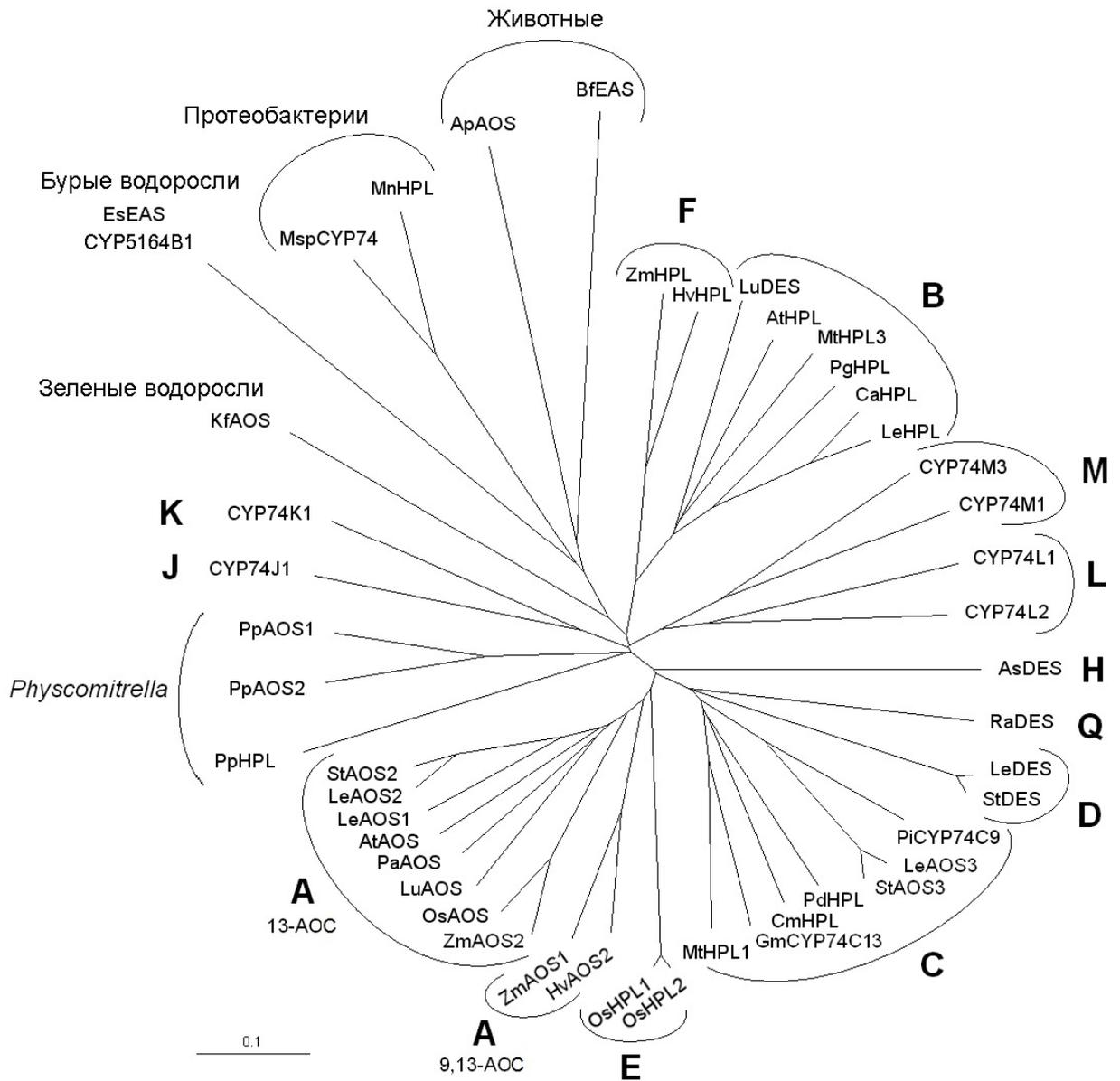


Рис. 20. Филогенетическое древо ферментов клана CYP74. Подсемейства CYP74 обозначены A, B, C, D, E, F, H, M, Q. Другие группы клана CYP74 не определены и не имеют обозначений. Древо было построено на основе полных аминокислотных последовательностей охарактеризованных на данный момент членов клана CYP74, перечисленных в таблице 1. Предварительный анализ проводили относительно последовательности фермента MspCYP74 (GI:170743950) мезофильной бактерии *Methylobacterium sp.* 4-46 с использованием программы NCBI BLAST.

Таблица 1. Последовательности, на основе которых построено филогенетическое древо клана CYP74 (Рис. 20).

Таксон	Вид (краткое обозначение)	Фермент	Идентификационный номер
Покрытосемянные	<i>Allium sativum</i> (As)	AsDES	GI:83414021
	<i>A. thaliana</i> (At)	AtAOS	GI:15239032
		AtHPL	GI:3822403
		CaHPL	GI:1272340
	<i>Capsicum annuum</i> (Ca)	CaHPL	GI:1272340
	<i>Cucumis melo</i> (Cm)	CmHPL	GI:14134199
	<i>Glycine max</i> (Gm)	GmCYP74C13	GI:381389719
	<i>Hevea brasiliensis</i> (Hb)	HbAOS	GI:84028363
	<i>Hordeum vulgare</i> (Hv)	HvAOS	GI:7452981
	<i>L. esculentum</i> (Le)	LeAOS1	GI:7581989
		LeAOS2	GI:7677376
		LeAOS3	GI:25991603
		LeHPL	GI:7677378
		LeDES	GI:11991245
	<i>L. usitatissimum</i> (Lu)	LuAOS	GI:1352186
		LuDES	GI:310687282
	<i>Medicago sativa</i> (Ms)	MsHPL	GI:5830465
	<i>Medicago truncatula</i> (Mt)	MtHPL1	GI:33504430
		MtHPL3	GI:63081244
	<i>Oryza sativa</i> (Os)	OsAOS	GI:115455571
		OsHPL1	GI:115445057
		OsHPL2	GI:125538638
	<i>Parthenium argentatum</i> (Pa)	PaAOS	GI:218511958
	<i>R. acris</i> (Ra)	RaDES	GI:768564485
	<i>Prunus dulcis</i> (Pd)	PdHPL	GI:33300600
	<i>Psidium guajava</i> (Pg)	PgHPL	GI:13183137
	<i>Petunia inflata</i> (Pi)	PiCYP74C9	GI:85720841
	<i>Solanum tuberosum</i> (St)	StAOS2	GI:86769479
		StAOS3	GI:56605358
		StDES	GI:12667099
	<i>Z. mays</i> (Zm)	ZmAOS	GI:223947589
ZmHPL		GI:162462890	
<i>Picea sitchensis</i> (Ps)	PsAOS	GI:148905898	
Плауновидные	<i>S. moellendorffii</i> (Sm)	CYP74M1	GI:9660714
		CYP74M3	GI:302761180
		CYP74L1	GI:9645914
		CYP74L2	GI:9651730
Мхи	<i>Physcomitrella patens</i> (Pp)	PpAOS1	GI:22217985
		PpAOS2	GI:168014176
		PpHPL	GI:76057841
Бурые водоросли	<i>E. siliculosus</i> (Es)	EsEAS	GI:299115150
Протеобактерии	<i>Methylobacterium</i> sp. 4–46 (Msp)	MspCYP74	GI:170743950
	<i>M. nodulans</i> (Mn)	MnHPL	GI:220926268
Животные	<i>B. floridae</i> (Bf)	BfEAS	GI:189312561
	<i>A. palmata</i> (Ap)	ApAOS	GI:187948710

3.2 Получение очищенного препарата рекомбинантного фермента

CYP5164B1 E. siliculosus

В геноме *E. siliculosus* ген фермента CYP5164B1 находится в локусе 487,736 – 501,540. Кодированная последовательность гена разделена на десять экзонов восемью короткими интронами и одним интроном длиной 7396 п.н. (Рис. 21).

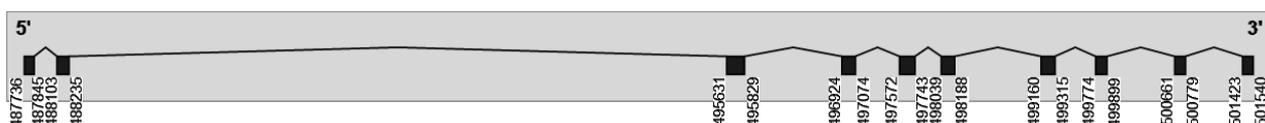


Рис. 21. Экзон-интронная структура гена *CYP5164B1*.

Последовательность открытой рамки считывания, кодирующей фермент CYP5164B1, опубликованную в базе данных ORCAE, адаптировали для получения рекомбинантного фермента в клетках *Escherichia coli*. Последовательность была искусственно синтезирована в ЗАО Евrogen (Москва) и клонирована в векторе pET-23a (Novagen, США) для получения рекомбинантного белка с последовательностью из шести гистидиновых остатков на С-конце, что позволяет проводить очистку рекомбинантного фермента методом металлоаффинной хроматографии.

Для структурного и функционального анализа ферментов требуется значительное количество высокоочищенного белка. Эта задача решается благодаря разработке технологии рекомбинантных ДНК и различных систем экспрессии, среди которых бактериальные системы являются наиболее удобными и менее затратными, обеспечивая достаточно высокий выход рекомбинантного белка. При этом они не являются подходящими для получения абсолютно всех эукариотических белков, что связано с отсутствием в клетках бактерий соответствующих механизмов, обеспечивающих посттрансляционную модификацию и корректный фолдинг белков. Применение современных векторных систем и

специализированных штаммов, подбор условий экспрессии, выделения, очистки и хранения рекомбинантных ферментов позволяет во многом преодолеть эти трудности. Для ферментов СУР74 бактериальная система экспрессии является подходящей; об этом свидетельствует значительное количество публикаций разных авторов (Matsui *et al.*, 2000; Froehlich *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2008; Gogolev *et al.*, 2012).

Первым этапом получения бактериального продуцента является выбор исходного штамма, подготовка компетентных клеток (Раздел 2.9) и их трансформация (Раздел 2.10). В ходе данной работы использовали штаммы *E. coli* NovaBlue и BL21(DE3)pLysS (Раздел 2.7).

Штамм NovaBlue использовали для первоначального клонирования целевого гена, так как он характеризуется высокой частотой трансформации. Этот штамм также адаптирован для наработки и выделения плазмидной ДНК и создания музейных культур. Для получения компетентных клеток использовали культуру *E. coli* со значением титра КОЕ= $4-7 \times 10^7$, что соответствует $OD_{600}=0.5$; на этой фазе роста клетки *E. coli* обладают наибольшей компетентностью (Гловер, 1988). Полученные компетентные клетки трансформировали плазмидой на основе вектора рЕТ-23а, содержащей последовательность, кодирующую фермент СУР5164В1. Из полученных трансформантов выделяли плазмидную ДНК с помощью коммерческого набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия). Концентрацию плазмидной ДНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop 1000 (Thermoscientific, США). Наличие вставки кодирующей части целевого гена проверяли с помощью ПЦР (Раздел 2.2) с ген-специфичными праймерами EsF и EsR (Табл. 2), и последующего электрофоретического разделения в агарозном геле (Рис. 22).

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры для проверки наличия вставки кодирующей части целевого гена.

Название	Последовательность 5' – 3'	T _m , °C
EsF	ATGACCGATAACGCGGAAATTCTG	60.1
EsR	CTTGCGGGGTGTGACCTTGG	59.8

Олигонуклеотиды синтезировали в ЗАО «Евроген» (Москва).

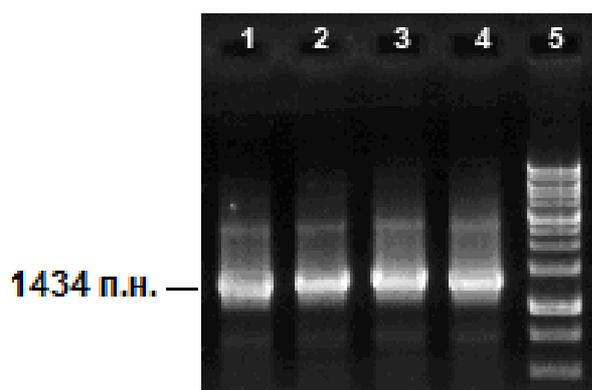


Рис. 22. Электрофореграмма продуктов амплификации, полученных с помощью ПЦР плазмидной ДНК, выделенной из нескольких клонов штамма *E. coli* NovaBlue (1, 2, 3, 4), трансформированного рекомбинантной плазмидой, содержащей последовательность, кодирующую фермент СУР5164В1, 5 – маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder (Евроген, Россия).

Плазмидную ДНК, выделенную из культуры клеток штамма *E. coli* NovaBlue, использовали для трансформации экспрессирующего штамма *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Раздел 2.7). Этот штамм характеризуется высоким уровнем наработки рекомбинантных белков, которая начинается только после добавления индуктора ИПТГ. Это достигается благодаря наличию дополнительной плазмиды pLysS, несущей ген, кодирующий T7 лизоцим, который до добавления ИПТГ ингибирует T7 РНК-полимеразу и, соответственно, экспрессию гена, кодирующего целевой белок.

Для наработки рекомбинантного фермента мы разработали оригинальную методику, составленную на основе нескольких протоколов, с учетом свойств используемого экспрессирующего штамма *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Раздел 2.7). Оптимальная точка индукции приходится на начало логарифмической фазы роста, что соответствует значению оптической плотности 0.6-0.8 (при длине волны 600 нм). В результате нескольких экспериментов по оптимизации условий выращивания культуры бактериального продуцента и индукции наработки рекомбинантного белка разработали следующий протокол. Культуру клеток *E. coli* (5-10 мл) выращивали в среде LB (Раздел 2.8), содержащей 500 мг/л ампицилина и 35 мг/л хлорамфеникола, при 32 °С и умеренной аэрации (180 об/мин) до стационарной фазы роста, после чего культурой инокулировали 25 мл свежей среды LB, содержащей те же антибиотики, и выращивали при интенсивной аэрации (250 об/мин, 32 °С) до достижения культурой значения оптической плотности OD_{600} 2.0-2.5. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра Lambda25 (Perkin-Elmer, США). Культурой инокулировали свежую среду LB, разведенную 1 объемом среды M9 (Раздел 2.8) и содержащую те же антибиотики, и выращивали при 42 °С и интенсивной аэрации (250 об/мин) до достижения значения OD_{600} 0.6-0.8, после чего клеточную суспензию быстро охлаждали до 20 °С на ледяной бане. Выращивание культуры при 42 °С приводит к накоплению в клетках шаперонов и шапероно-подобных белков, ко-

торые впоследствии улучшают фолдинг целевого белка. К охлажденной культуре немедленно добавляли индуктор синтеза белков – ИПТГ из расчета 115 мг/л – и предшественник гема – δ -аминолевулиновую кислоту – из расчета 100 мг/л. Кроме того, вносили дополнительное количество ампициллина из расчета 100 мг/л для компенсации его разрушения β -лактамазой бактерий в процессе роста культуры. Индуцированные таким образом клетки инкубировали в течение 8-14 часов при умеренной аэрации (180 об/мин) и пониженной температуре (20 °С), после чего собирали центрифугированием (8000 об/мин, 5 мин, 4 °С).

В связи с тем, что многие представители семейства СУР74 *in vivo* заякориваются в мембранах органелл клеток, мы предположили, что в клетках *E. coli* эти ферменты также могут проявлять мембранотропные свойства. Для разрушения ассоциации СУР5164В1 с фрагментами мембран бактерий и предотвращения его агрегации в растворах во всех процедурах выделения и очистки белка предусматривалось использование различных детергентов. Были испытаны различные концентрации Тритона Х-100 (0.3-1 %), ПОЭТЭ (0.3-1 %) и 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат (ХАПС) (0.1-1 %). Наилучшие результаты были достигнуты при использовании ПОЭТЭ в концентрации 0.3 %. Применение ПОЭТЭ позволило получить активность препарата, в два раза превышающую полученную в результате использования ХАПС. Использование Тритона Х-100 оказалось безрезультатным.

Созданная нами генетическая конструкция предусматривает включение в С-концевой последовательности рекомбинантного белка гексагистидинового фрагмента, обладающего сродством к двухвалентным катионам. Использование хроматографических сорбентов, содержащих хелатированные или ковалентно присоединенные ионы металлов (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}), облегчает выделение таких белков из бактериальных лизатов. Ранее неоднократно было показано, что полигистидиновые «хвосты» не влияют на ферментативную активность большинства рекомбинантных белков (Hengen, 1995; Bornhorst, Falke, 2000). Таким обра-

зом, для очистки рекомбинантного фермента СУР5164В1 использовали метод металлоаффинной хроматографии (Раздел 2.13). Собранные центрифугированием клетки суспендировали в 50 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7.0), содержащем 100 мМ NaCl и 0.3 % ПОЭТЭ, из расчета 5 мл на 1 г клеток и механически разрушали с помощью системы French Press Cell Disrupter (Thermo Scientific, США). К осветленному с помощью центрифугирования (18000 об/мин, 60 мин, 4 °С) лизату добавляли 200 мМ NaCl и наносили на колонку Bio-Scale Mini Profinity IMAC 5 мл (Bio-Rad, США), уравновешенную 10 объемами 50 мМ Na-фосфатного буфера (рН 7.0), содержащего 300 мМ NaCl и 0.3 % ПОЭТЭ, после чего промывали этим же буфером до достижения устойчивого минимума оптической плотности раствора при 280 нм. Для того чтобы снять белок с колонки в щадящих условиях, его вытесняли из комплексов с ионами никеля раствором гистидина. Предварительную промывку колонки проводили 10 объемами 50 мМ Na-фосфатного буфера, (рН 7.0), содержащего 100 мМ NaCl и 3 мМ гистидина, для освобождения от неспецифически связанных белков. Целевой белок элюировали из сорбента 10 объемами того же буфера, содержащего 30 мМ гистидина и 0.3 % ПОЭТЭ. Элюат концентрировали, пропуская через центрифужный фильтр Vivaspin20 50 кДа (Sartorius stedim biotech, Германия), который помимо концентрирования служит для удаления белков с молекулярной массой ниже 50 кДа. Это позволило дополнительно очистить целевой белок, который со всеми вспомогательными последовательностями имеет молекулярную массу 54.024 кДа (Рис. 23). Достигнутое нами качество очистки позволило использовать полученные препараты в детальном исследовании каталитических свойств фермента СУР5164В1.

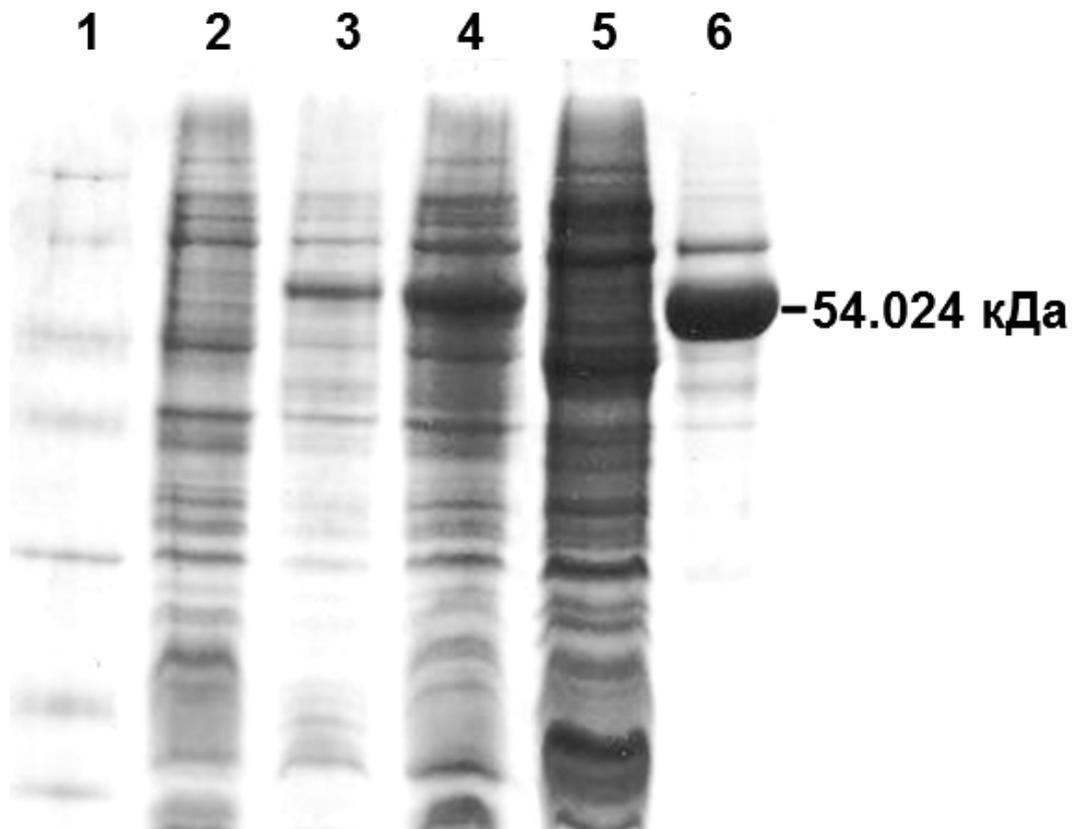


Рис. 23. Электрофореграмма выделения и очистки целевого фермента CYP5164B1 из лизатов бактерий: **1** – маркер молекулярного веса SDS-PAGE Standarts Low Range (Bio-Rad, США); **2** – тотальный белок клеток штамма BL21(DE3)pLysS до индукции с помощью ИПТГ; **3** – тотальный белок клеток штамма BL21(DE3)pLysS через 14 часов после добавления ИПТГ; **4** – лизат клеток штамма BL21(DE3)pLysS, содержащих рекомбинантный фермент CYP5164B1; **5** – фракция несвязавшихся с металлоаффинным сорбентом белков; **6** – очищенный концентрированный препарат рекомбинантного фермента CYP5164B1.

3.3. Идентификация рекомбинантного фермента CYP5164B1

E. siliculosus как эпоксиалкогольсинтазы

На первом этапе подбирали оптимальные условия проведения реакции. В результате установили, что рекомбинантный белок CYP5164B1 *E. siliculosus* проявляет максимальную каталитическую активность при 25 °С в Na-фосфатном буфере (100 мМ), pH 7.0. В качестве модельных субстратов для характеристики каталитических свойств фермента CYP5164B1 использовали 9- и 13-гидроперекиси линолевой и α -линоленовой кислот, а также 15-гидроперекись эйкозапентаеновой кислоты.

В буфер, содержащий 40 мкмоль субстрата, вносили 25 мкг очищенного препарата фермента и измеряли скорость снижения поглощения реакционной смеси в минуту при 234 нм с помощью спектрофотометра Lambda25 (Perkin-Elmer, США). Концентрацию фермента измеряли по содержанию гема (Schenkman, Jansson, 2006). Для расчета скорости реакций использовали первоначальные линейные участки кинетических кривых. Получили следующие результаты. Рекомбинантный фермент CYP5164B1 не проявляет никакой активности в отношении 13-ГПОТ, 9-ГПОТ и 15-ГПЭТЕ (Рис. 24), однако эффективно утилизирует 9- и 13-гидроперекиси линолевой кислоты, поэтому для определения типа каталитической активности использовали эти субстраты. Вычисленное значение константы каталитической (k_{cat}) превращения (9*S*)-ГПОД в восемь раз выше, чем соответствующее значение k_{cat} превращения (13*S*)-ГПОД – 149 сек⁻¹ и 18.1 сек⁻¹, соответственно.

Для определения продуктов реакций 9- или 13-гидроперекись линолевой кислоты (100 мкг) инкубировали в течение 15 мин при 25 °С в 10 мл Na-фосфатного буфера (100 мМ, pH 7.0) в присутствии фермента CYP5164B1. Продукты инкубаций модифицировали – переводили в ТМС-производные метиловых эфиров (Me/ТМС) – и подвергали анализу методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС).

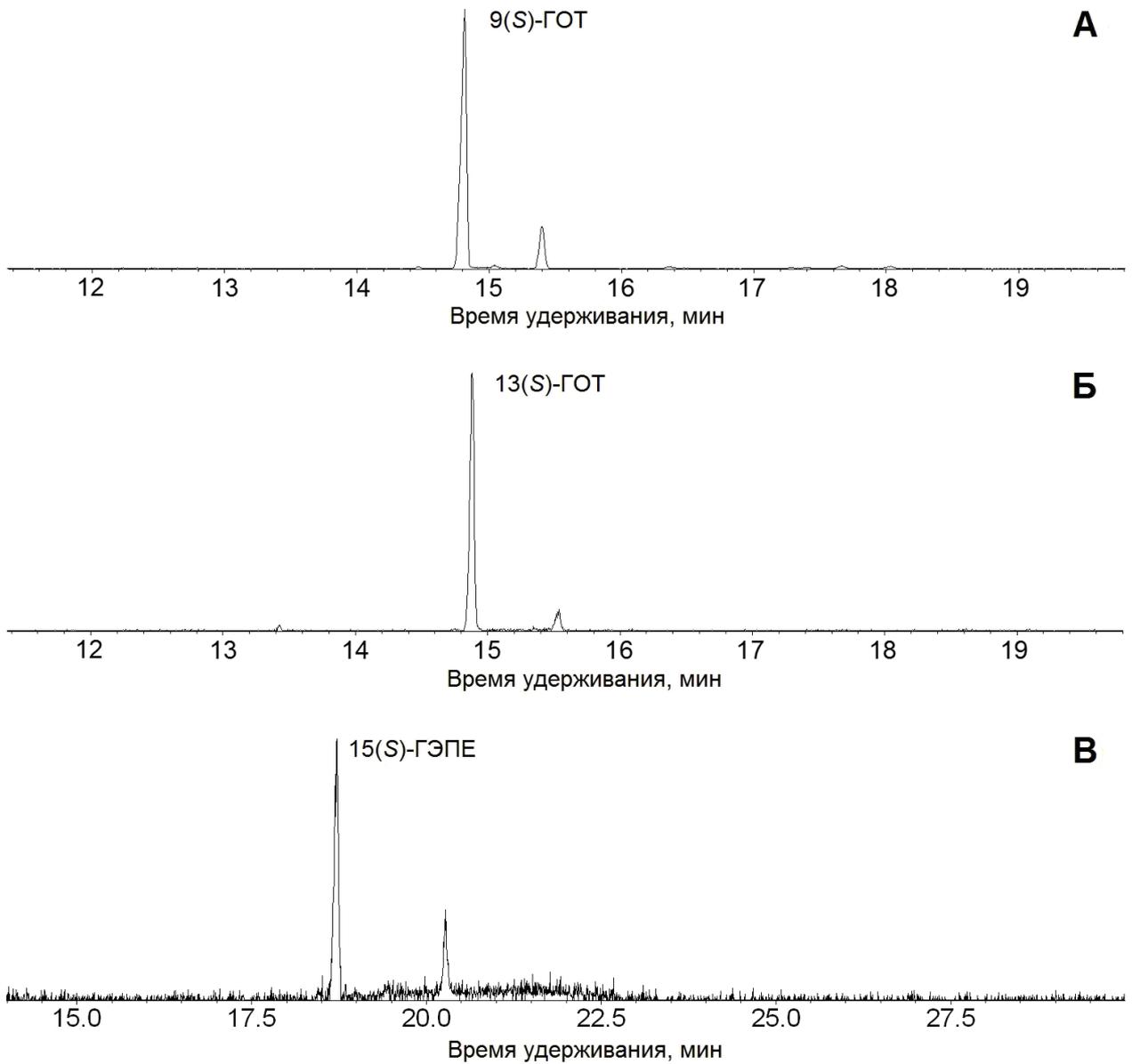


Рис. 24. Результат ГХ-МС анализа продуктов (Me/TMS) инкубации очищенного фермента CYP5164B1 с 9-ГПОТ (А), 13-ГПОТ (Б) и 15-ГПЭПЕ (В); хроматограммы полного ионного тока. Были обнаружены только соответствующие гидроксикислоты; продуктов превращения гидроперекисей обнаружено не было.

Реакционную смесь экстрагировали смесью гексана с этилацетатом (1:1 по объему) при комнатной температуре. Затем растворитель выпаривали в вакуумном испарителе, а продукты реакций растворяли в 1.5 мл метанола и восстанавливали, выдерживая в течение 30 минут в присутствии NaBH_4 . Затем проводили метилирование продуктов диазометаном, выпаривание (для удаления диазометана), перерастворение в метаноле и восстановление водородом над платиновым катализатором. После удаления катализатора продукты снова высушивали и триметилсилилировали смесью пиридина, гексаметилдисилазана и триметилхлорсилана (1:1:1 по объему) в течение 30 минут при 23 °С. После упаривания силилирующей смеси готовые продукты экстрагировали гексаном.

Инкубации рекомбинантного фермента СУР5164В1 с 9-ГПОД приводили к образованию основного продукта **1** (Рис. 25). Электронный масс-спектр продукта **1** (Me/ТМС) содержит M^+ при m/z 398 (0.1 %); $[\text{M} - \text{Me}]^+$ при m/z 383 (0.7 %); $[\text{M} - \text{C1/C8}]^+$ при m/z 241 (3.6 %); $[\text{M} - \text{C1/C9}]^+$ при m/z 212 (3.7 %); $[\text{M} - \text{C1/C10}]^+$ при m/z 199 (97 %). Большой пик при m/z 199 в спектре указывает на присутствие оксиранил-карбинольной группы с оксираном при C9/C10 и боковым спиртом (ТМС) при C11. Каталитическое гидрирование продукта **1** над PtO_2 с последующими метилированием и триметилсилилированием приводят к образованию соединения, масс-спектр которого содержит $[\text{M} - \text{Me}]^+$ при m/z 385 (3.4 %); $[\text{M} - \text{C1/C7}]^+$ при m/z 257 (21.2 %); $[\text{M} - \text{C1/C9}]^+$ при m/z 215 (20.4 %); $[\text{M} - \text{C1/C10}]^+$ при m/z 201 (50.3 %); $[\text{ТМС}]^+$ при m/z 73 (100 %), что свидетельствует, что это соединение имеет структуру 9,10-эпокси-11-гидрокси-октадекановой кислоты (Me/ТМС). Таким образом, данные масс-спектра подтверждают, что соединение **1** является 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценевой кислотой. В качестве контрольных реакций проводили инкубацию 9-ГПОД с кипяченым препаратом фермента СУР5164В1 и растворимой фракцией белков клеток *E. coli*, содержащих вектор рЕТ-23а без целевой вставки (Рис. 26). В контрольных экспериментах 9-ГПОД осталась непревращенной.

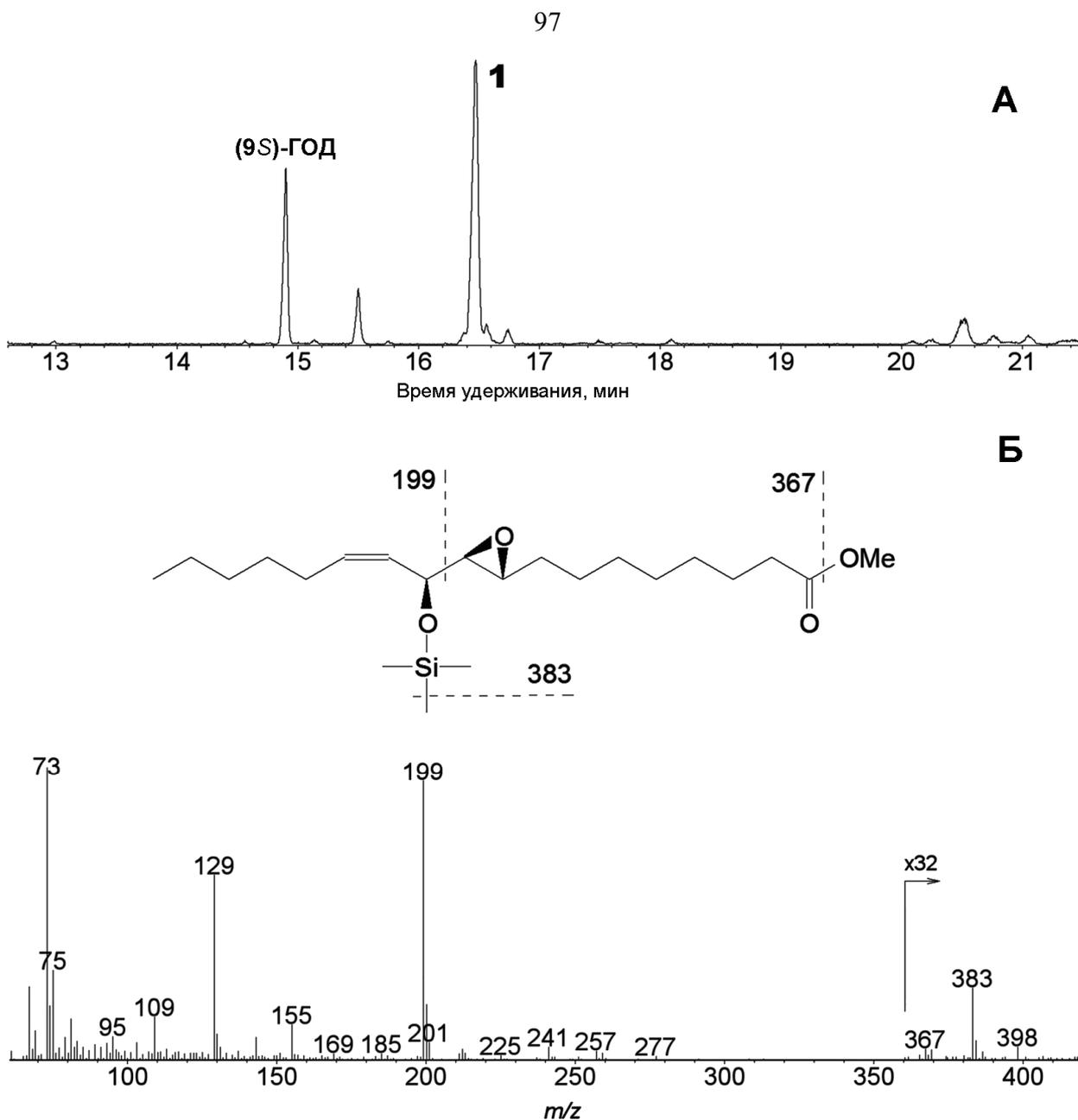


Рис. 25. Результат ГХ-МС анализа продуктов (Me/TMC) инкубации рекомбинантного фермента СУР5164В1 с 9-ГПОД. (А) ГХ-МС хроматограмма по полному ионному току продуктов инкубации (Me/TMC). (Б) Масс-спектр и схема фрагментации продукта **1** (Me/TMC). Условия инкубации, экстракции и анализа описаны в разделе 2.17.

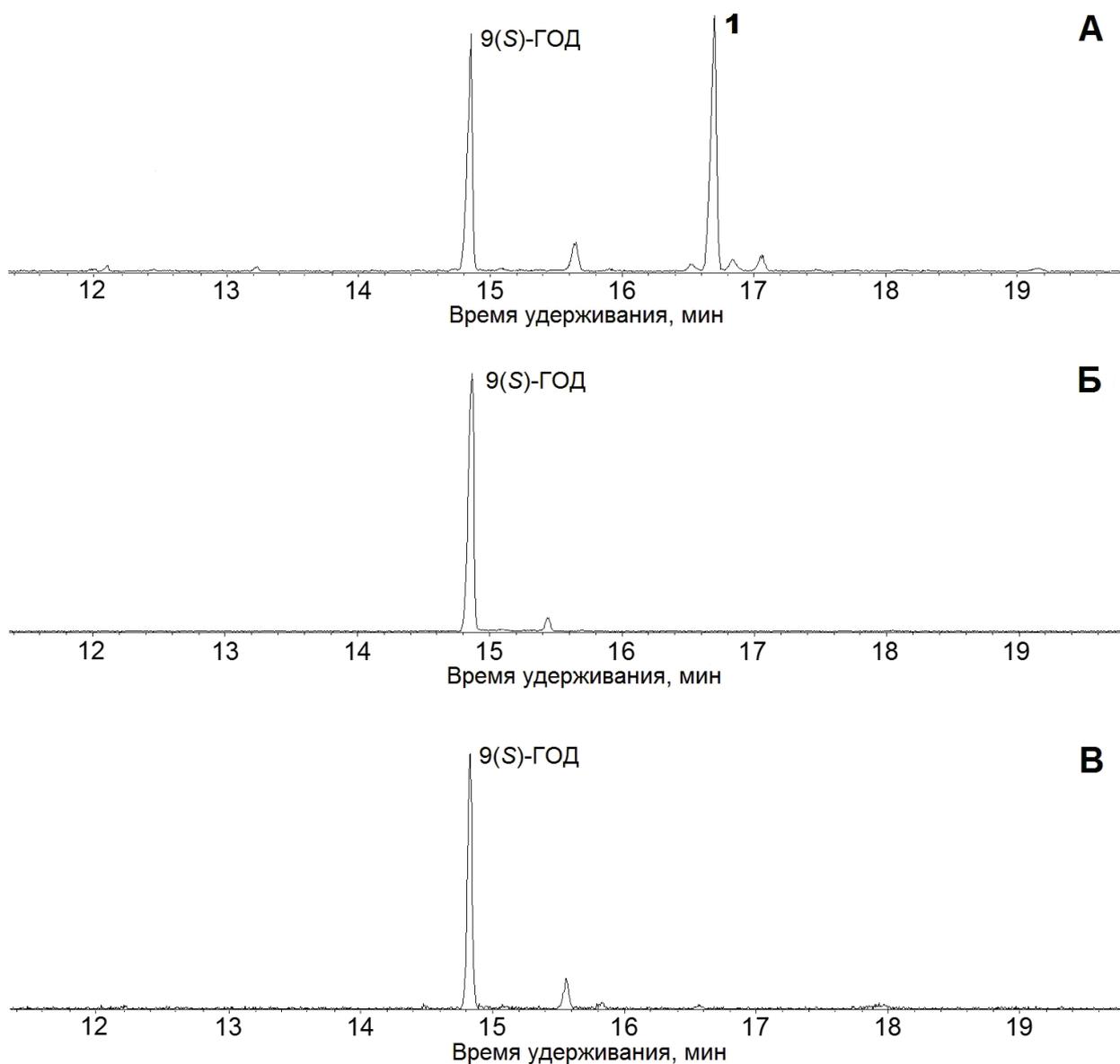


Рис. 26. Результат ГХ-МС анализа продуктов (Me/TМС) инкубаций 9-ГПОД с функционально активным ферментом СУР5164В1 (А), кипяченным ферментом СУР5164В1 (Б) и растворимой фракцией белков клеток *E. coli*, содержащих вектор рЕТ-23а без целевой вставки (В); хроматограммы полных ионных токов. Пик 1 – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота. В контрольных экспериментах (Б и В) 9-ГПОД осталась непревращенной. Были обнаружены только соответствующие гидроксикислоты, но не продукты превращения 9-ГПОД.

Для подробного изучения структуры соединения **1** (Me эфира) фермент СУР5164В1 инкубировали с $[1-^{14}\text{C}]9\text{-ГПОД}$ и основной продукт очищали методом радио-ВЭЖХ на нормальной фазе, который выявил, что соединение **1** состоит из двух эпимеров **1a** и **1b** в соотношении 4:1. Оба эпимера собирали по отдельности, затем анализировали методом ЯМР. Данные ЯМР-анализа соединений **1a** и **1b** представлены в таблицах 3 и 4, соответственно.

Оба продукта имеют одну *цис*-двойную связь ($J_{12,13} = 11.0$ Гц) и *транс*-эпоксидное кольцо ($J_{9,10} = 2.3$ и 2.2 Гц, соответственно). Таким образом, спектр подтверждает наличие оксиранил-карбинольной группы в структуре соединений **1a** и **1b**. Химический сдвиг H11 в двух спектрах различается: 4.52 ppm (**1a**) и 4.25 ppm (**1b**). Эта разница свидетельствует о том, что H11 в соединении **1a** демаскируется из-за пространственной близости к кислороду эпоксида.

Основные эффекты Оверхаузера, выявляемые в спектрах NOESY, проиллюстрированы на рисунке 27. Спектр NOESY продукта **1a** содержит большой кросс-пик между H11 и H10, в то время как корреляция между H11 и H9 не обнаружена. В отличие от этого, в спектре NOESY для соединения **1b** выявлена сильная корреляция ядерного эффекта Оверхаузера между H11 и H9, тогда как кросс-пик между H11 и H10 был относительно небольшим. Результаты спектров NOESY однозначно указывают на то, что эпокиспирты **1a** и **1b** имеют *эритро* (9*S*,10*S*,11*S*) и *трео* (9*S*,10*S*,11*R*) конфигурацию (Рис. 27), соответственно.

Инкубация фермента СУР5164В1 с 13-ГПОД приводила к образованию основного продукта **2**, а также трех дополнительных продуктов, имеющих незначительно большее время удерживания, чем соединение **2** (Рис. 28А). Электронный масс-спектр продукта **2** (Рис. 28Б) содержит M^+ при m/z 398 (0.1 %); $[\text{M} - \text{Me}]^+$ при m/z 383 (2.2 %); $[\text{M} - n\text{-пентил}]^+$ при m/z 327 (3.0 %); $[\text{M} - \text{C12/C18}]^+$ при m/z 285 (89.2 %); $[\text{TMC}]^+$ при m/z 73 (100 %). Профили фрагментации (Рис. 28Б, вставка) подтверждают, что соединение **2** является 11-гидрокси-12,13-эпокси-9-октадеценовой кислотой (Me/TMC).

Таблица. 3 ^1H -ЯМР данные (^1H -ЯМР, 2D-COSY, HSQC, HMBC) для соединения **1a** (Me эфир). 600 МГц, [$^2\text{H}_6$]бензол, 303 К.

Номер положения	^{13}C химический сдвиг (ppm); функциональная группа	^1H химический сдвиг (ppm); множественность; константа взаимодействия (Гц)	Корреляция множественных связей гетероядер
1	173.37 ; <u>COOMe</u>		<u>COOMe</u> , H2
2	34.22; CH ₂	2.11; t; 7.5 (H3)	H3, <u>COOMe</u>
3	25.35; CH ₂	1.53; m; 7.5 (H2)	H2, H4
4	29.48; CH ₂	1.14; m	H3
5	29.48 ; CH ₂	1.07-1.31; m	
6	29.47-29.85 ; CH ₂	1.07-1.31; m	
7	29.83 ; CH ₂	1.20-1.31; m	H8a, H8b
8a	31.97; CH ₂	1.43; m	H7, H9
8b	31.97; CH ₂	1.35; m	H7, H9
9	54.87; CH	2.92; ddd; 6.3 (H8a); 5.7 (H8b); 2.3 (H10)	H8a, H8b, H10
10	60.47; CH	2.70; dd; 3.3 (H11); 2.3 (H9)	H9, H11
11	65.91; CH	4.52 ddd (dt-like); 8.0 (H12); 3.3 (H10); 2.7 (OH)	H10, H12, OH
12	128.35; CH	5.47; ddt (AM); 11.0 (H13); 8.0 (H11); 1.4 (H14)	H11, H13
13	133.60; CH	5.51; ddt (AM); 11.0 (H12); 7.3 (H14); 1.0 (H11)	H12, H14
14	28.45; CH ₂	1.98; m	H13, H15
15	26.36; CH ₂	1.27; m	H14, H16
16	31.82; CH ₂	1.17-1.31; m	H15
17	23.05; CH ₂	1.23; m	H18
18	14.29; CH ₃	0.87; t; 7.1 (H17)	H17
(1)	51.03; <u>COOMe</u>	3.37; s	H2
(11)	OH	1.56; d; 2.7 (H11)	H11

Таблица 4. ^1H -ЯМР данные (^1H -ЯМР, 2D-COSY, HSQC, HMBC) для соединения **1b** (Me эфир). 600 МГц, [$^2\text{H}_6$]бензол, 303 К.

Номер положения	^{13}C химический сдвиг (ppm); функциональная группа	^1H химический сдвиг (ppm); множественность; константа взаимодействия (Гц)	Корреляция множественных связей гетероядер
1	173.37; <u>COOMe</u>		COO <u>Me</u> , H2
2	34.25; CH ₂	2.11; t; 7.5 (H3)	H3, COO <u>Me</u>
3	25.35; CH ₂	1.53; m;	H2, H4
4	29.51; CH ₂	1.14; m	H3
5	29.51; CH ₂	1.07-1.20; m	
6	29.87-29.50; CH ₂	1.07-1.30; m	
7	30.32-29.80; CH ₂	1.19-1.38; m	H8a, H8b
8a	32.03; CH ₂	1.40; m	H7, H9
8b	32.03; CH ₂	1.34; m	H7, H9
9	56.63; CH	2.82; ddd; 6.1 (H8a); 5.1 (H8b); 2.2 (H10)	H8a, H8b, H10
10	61.70; CH	2.71; dd; 5.1 (H11); 2.2 (H9)	H9, H11
11	68.27; CH	4.25 dddd; 8.5 (H12); 5.3 (OH); 5.1 (H10); 1.1 (H13)	H10, H12
12	133.69; CH	5.53; ddt; 11.0 (H13); 8.5 (H11); 1.4 (H14)	H11, H13
13	133.55; CH	5.45; ddt; 11.0 (H12); 7.4 (H14); 1.1 (H11)	H12, H14
14	28.41; CH ₂	1.97; m	H13, H15
15	26.39; CH	1.25; m	H14, H16
16	31.83; CH	1.15-1.24; m	H15
17	23.07; CH ₂	1.23; m	H18
18	14.35; CH ₃	0.87; t; 7.2 (H17)	H17
(1)	51.05; COO <u>Me</u>	3.37; s	H2
(11)	OH	1.54; d; 5.3 (H11)	H11

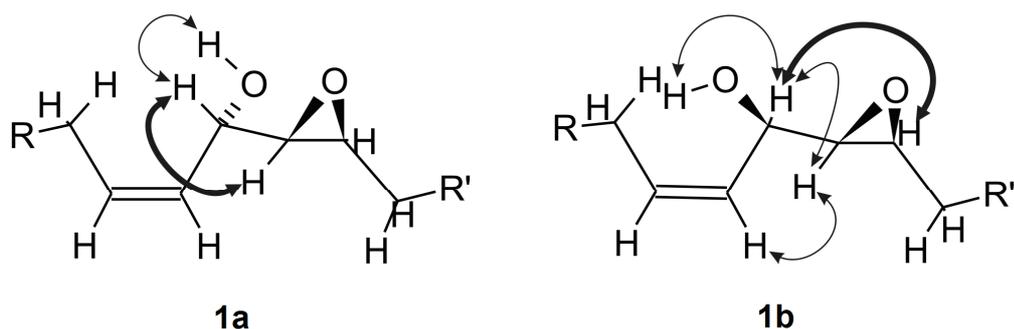


Рис. 27. Корреляция ядерного эффекта Оверхаузера в NOESY спектре эпимеров **1a** и **1b**.

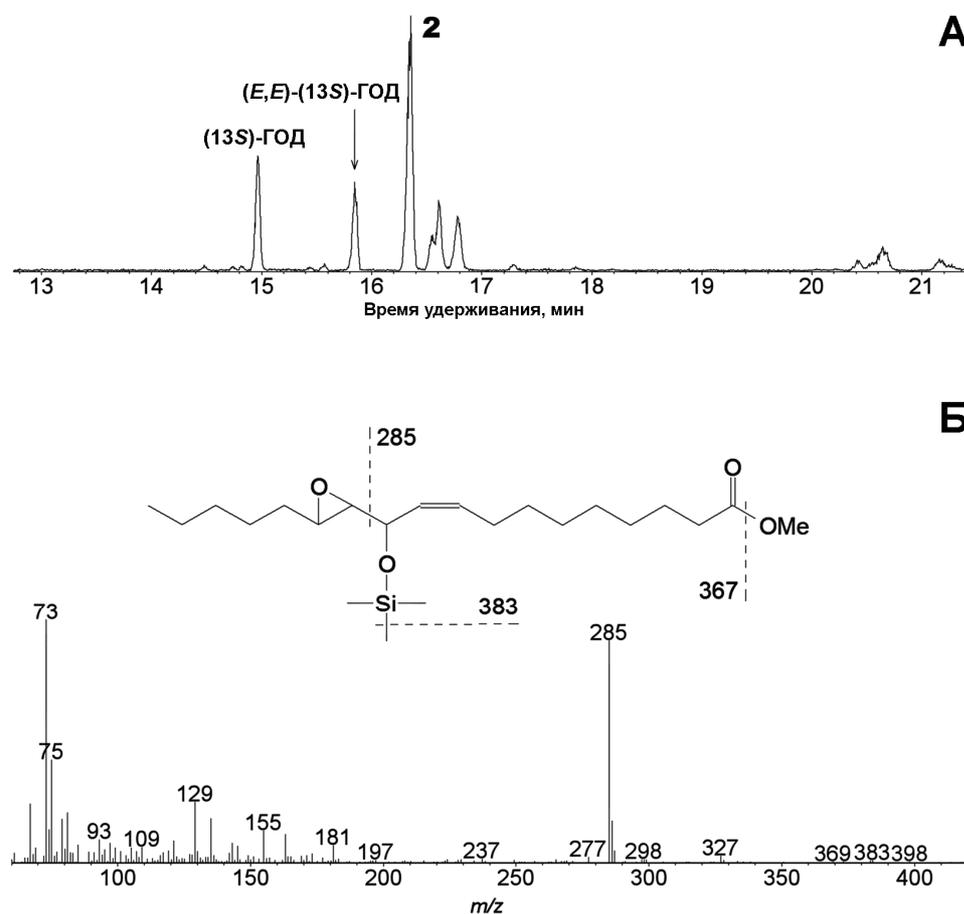


Рис. 28. Результат ГХ-МС анализа продуктов инкубации (Me/TMC) рекомбинантного фермента CYP5164V1 с 13-ГПОД. **(А)** ГХ-МС хроматограмма по полному ионному току продуктов инкубации (Me/TMC). **(Б)** Масс-спектр и схема фрагментации продукта **2** (Me/TMC). Условия инкубации, экстракции и анализа описаны в разделе 2.17.

Каталитическое гидрирование продукта **2** над PtO₂ с последующими метилированием и триметилсилилированием приводит к образованию соединения, спектр которого содержит [M – Me]⁺ при *m/z* 385 (9.7 %); [M – Me – MeOH]⁺ при *m/z* 353 (1.9 %); [M – CH₃(CH₂)₄CHO]⁺ при *m/z* 301 (10.1 %); [M – C12/C18]⁺ при *m/z* 287 (48.8 %); при *m/z* 271 (17.2 %); [M – (CH₂)₉COOMe]⁺ при *m/z* 215 (7.6 %); [TMC]⁺ при *m/z* 73 (100 %). Спектр соответствует структуре 11-гидрокси-12,13-эпокси-октадекановой кислоте (Me/TMC), подтверждая идентификацию продукта **2**. Минорные пики, элюируемые после продукта **2** (Рис. 28А) имеют идентичные профили масс-спектров. Таким образом, они являются стереоизомерами соединения **2**, различаясь преимущественно стереоконфигурацией при C11 или C12. Анализ продуктов превращения 13-ГПОД методом ЯМР не проводили.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что фермент СУР5164В1 *E. siliculosus* является эпоксиалкогольсинтазой. В соответствии с принятой номенклатурой ферментов СУР74, ферменту присвоено тривиальное название EsEAS (эпоксиалкогольсинтаза *E. siliculosus*), также как и соответствующему гену – *EsEAS*. До настоящего времени единственным охарактеризованным ферментом данного типа являлась эпоксиалкогольсинтаза VfEAS ланцетника, по степени сходства последовательности принадлежащая клану СУР74 цитохромов P450 (Lee *et al.*, 2008). Таким образом, EsEAS стала вторым охарактеризованным ферментом данного типа и первым охарактеризованным ферментом клана СУР74 бурых водорослей.

3.4 Механизм каталитического действия эпоксиалкогольсинтазы

EsEAS *E. siliculosus*

Чтобы расшифровать механизм каталитического действия EsEAS, проводили эксперименты с использованием меченого ¹⁸O. Изначально EsEAS инкубировали с [¹⁸O₂-гидроперокси]9-ГПОД. Масс-спектр меченого продукта **1** (Me/TMC), представленный на рисунке 29, содержит M⁺ при *m/z* 402 (соответст-

вующий 398 в спектре немеченого продукта) и $[M - Me]^+$ при m/z 387 (соответствующий 383 в спектре немеченого продукта). Рассчитали общее содержание ^{18}O в соединении **1**. Полученные данные указывают, что 73.27 ± 0.46 % соединения **1**, полученного в результате инкубации EsEAS с $[^{18}O_2\text{-гидроперокси}]9\text{-ГПОД}$, содержит два атома ^{18}O . Оставшаяся часть содержит ^{18}O только в эпоксидной группе. При этом анализ показал, что исходная $[^{18}O_2\text{-гидроперокси}]9\text{-ГПОД}$ содержала 84.95 ± 0.52 % ^{18}O . Анализ проводили следующим образом. $[^{18}O_2\text{-гидроперокси}]9\text{-ГПОД}$ последовательно восстанавливали боргидридом натрия, метилировали diazometаном и триметилсилилировали. Полученная $[^{18}O]9\text{-ГОД}$ была подвергнута ГХ-МС анализу при мониторинге по селективному току. Содержание ^{18}O оценивали исходя из относительной распространенности пар ионов 384.3 и 382.3, $[M]^+$; 313.2 и 311.2 $[M-C_5H_{11}]^+$; 227.2 и 225.2 $[M-(CH_2)_8COOMe]^+$. Анализ методом ГХ-МС при мониторинге по селективному току выявил включение 2, 1 и 0 атомов ^{18}O на основании содержания $[M - Me]^+$ при m/z 387.3, 385.3 и 383.3, соответственно (таблица 5А). Относительное содержание разных видов соединения **1**, содержащих 1 или 0 атомов ^{18}O в гидроксильной группе оценивали по интегральной интенсивности пика соединения **1** на хроматограммах при мониторинге по селективному ионному току при m/z 201.2 и 199.2, соответственно (Таблица 5Б). Расчеты проводили по результатам измерения площади пиков соединения **1** в соответствующих ионных хроматограммах. Полученные данные корректировали в соответствии с относительным содержанием рассматриваемых m/z ионов в спектре немеченого продукта.

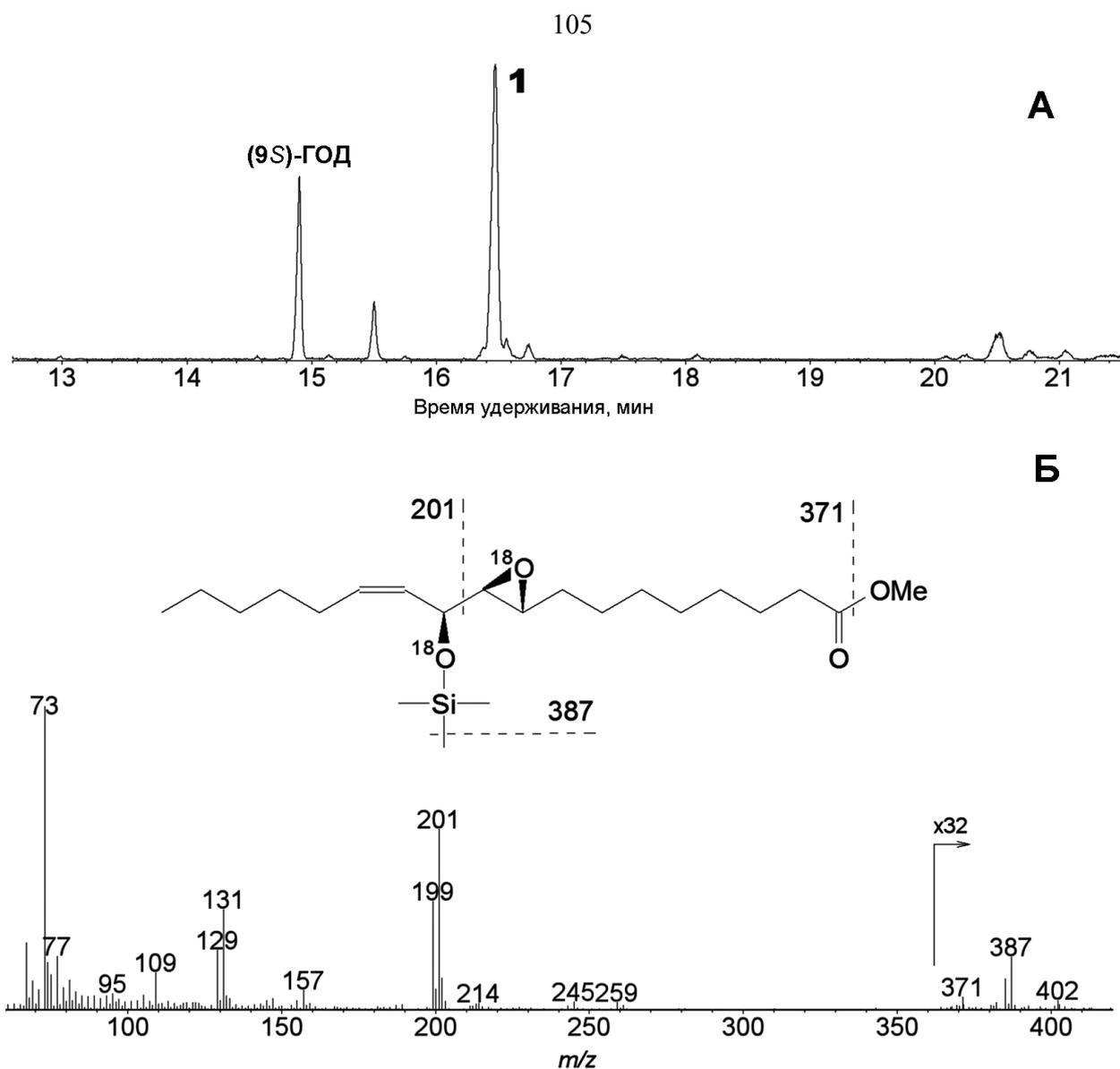


Рис. 29. Результат ГХ-МС анализа продуктов инкубации (Me/TMC) рекомбинантного фермента EsEAS с [¹⁸O₂-гидроперокси]9-ГПОД. (А) ГХ-МС хроматограмма по полному ионному току продуктов инкубации (Me/TMC). (Б) Масс-спектр и схема фрагментации продукта **1** (Me/TMC), полученного в результате инкубации EsEAS с [¹⁸O₂-гидроперокси]9-ГПОД. Условия инкубации, экстракции и анализа описаны в разделе 2.17.

Таблица 5А. Встраивание ^{18}O из [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД в соединение **1**, оцененное по интегральной интенсивности пика соединения **1** на хроматограммах при мониторинге по селективному ионному току (соответствующему ионам m/z 387.3, 385.3 и 383.3).

Ион, m/z	Относительное содержание разных видов соединения 1 , содержащих 2, 1 или 0 атомов ^{18}O , %
387.3	54.60±0.40
385.3	37.34±0.13
383.3	8.06±0.53

Таблица 5Б. Встраивание ^{18}O в гидроксильную группу (C11) соединения **1** после инкубации EsEAS с [$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД, немеченой 9-ГПОД в атмосфере $^{18}\text{O}_2$, или немеченой 9-ГПОД в [$^{18}\text{O}_2$]воде.

Источник ^{18}O	Содержание изотопа ^{18}O в гидроксильной группе C11, соединение 1 , %
[$^{18}\text{O}_2$ -гидроперокси]9-ГПОД	62.10 ± 0.40
$^{18}\text{O}_2$ атмосфера	24.23 ± 0.66
[$^{18}\text{O}_2$]вода	7.45 ± 0.39

Механизмы каталитического действия EsEAS и описанной ранее эпокси-алкогольсинтазы VfEAS ланцетника (Lee *et al.*, 2008) являются сходными. Оба продуцируют эпокиспирты. EsEAS синтезирует преимущественно (9*S*,10*S*,11*S*)-эпимер эпокиспирта с *транс*-эпоксидом, тогда как VfEAS – (*S*,*R*,*S*)-стереоизомеры с *цис*-эпоксидом (Lee *et al.*, 2008). Результатов по изучению механизма каталитического действия VfEAS до сих пор опубликовано не было. В результате каталитического действия EsEAS наблюдается следующая картина. Практически весь эпоксидный и ок. 70 % гидроксильного кислорода эпокиспирта имеет происхождение из [¹⁸O₂-гидроперокси]9-ГПОД. Таким образом, EsEAS преимущественно синтезирует эпокиспирты посредством изомеризации гидроперекиси. В результате инкубаций EsEAS с немеченой гидроперекисью в атмосфере или воде, содержащих меченый ¹⁸O, было показано, что оставшаяся часть гидроксильного кислорода имеет происхождение из атмосферы, и следовая часть – из воды (Рис. 30). Полученные данные свидетельствуют, что ферментативная реакция идет следующим образом: (1) гомолиз гидропероксидной группы; (2) перегруппировка образующегося оксирадикала с образованием эпоксиаллильного радикала; (3) рекомбинация эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется эпокиспирт (Рис. 31).

Помимо ЭАС, изомеризацию гидроперекисей жирных кислот катализируют ГПЛ, также входящие в состав клана CYP74 и широко распространенные у высших растений. Оба атома ¹⁸O из ¹⁸O₂-гидроперекиси встраиваются в полуацеталь – первичный продукт гидропероксидлиазной реакции (Grechkin, Hamberg, 2004; Grechkin *et al.*, 2006). Два других фермента клана CYP74 – АОС и ДЭС являются дегидразами; и, следовательно, проследить судьбу обоих атомов кислорода в превращениях, катализируемых этими ферментами, невозможно.

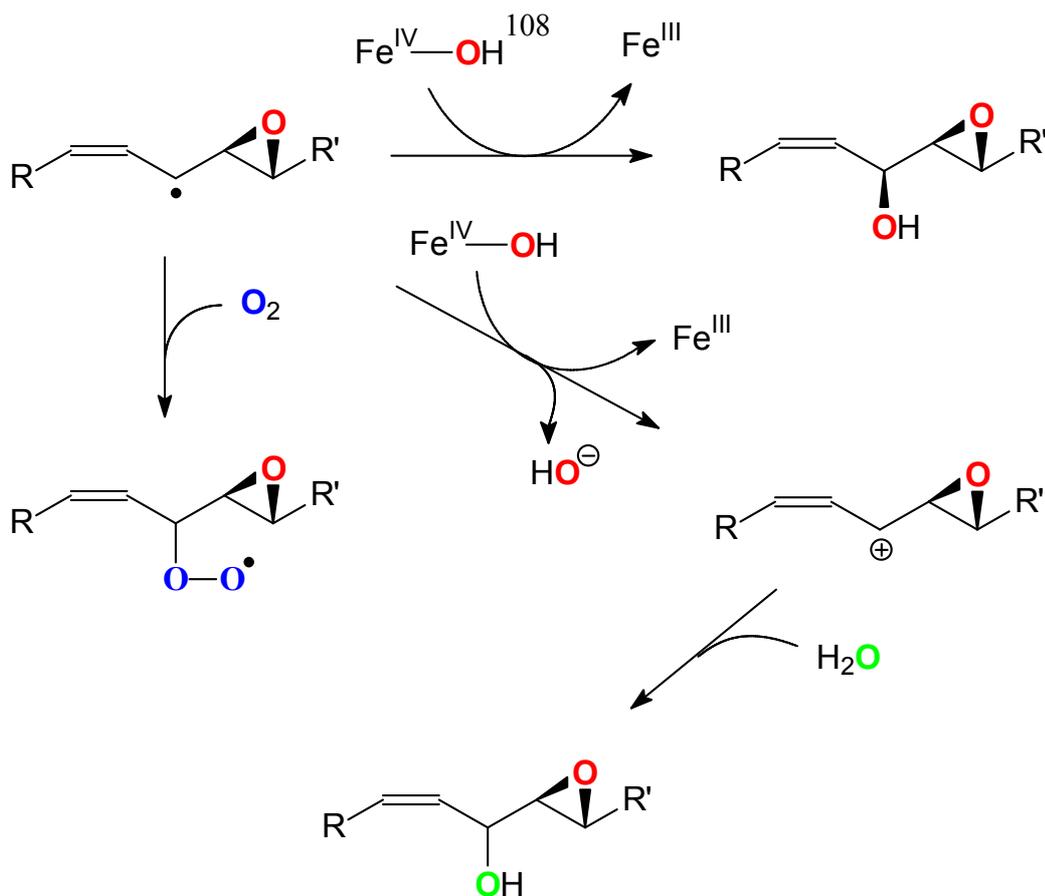


Рис. 30. Схема превращения эпоксиаллильного радикала при участии EsEAS. Эпоксиаллильный радикал образуется на начальной стадии в результате гомолиза O-O связи в молекуле гидроперекиси жирной кислоты и перегруппировки образующегося оксирадикала. Верхняя часть схемы показывает основное превращение, а именно – перегруппировку гидроперекиси в эпокиспирт (кислород гидроперекиси отмечен красным цветом). На левой части схемы представлено включение атмосферного кислорода (отмечен синим цветом) в гидро(перо)кси группу. На нижней части схемы показано встраивание кислорода из воды (кислород воды отмечен зеленым цветом). Происходит окисление эпоксиаллильного радикала в эпоксиаллильный карбокатион с последующим нуклеофильным замещением последнего гидроксильной группой из воды.

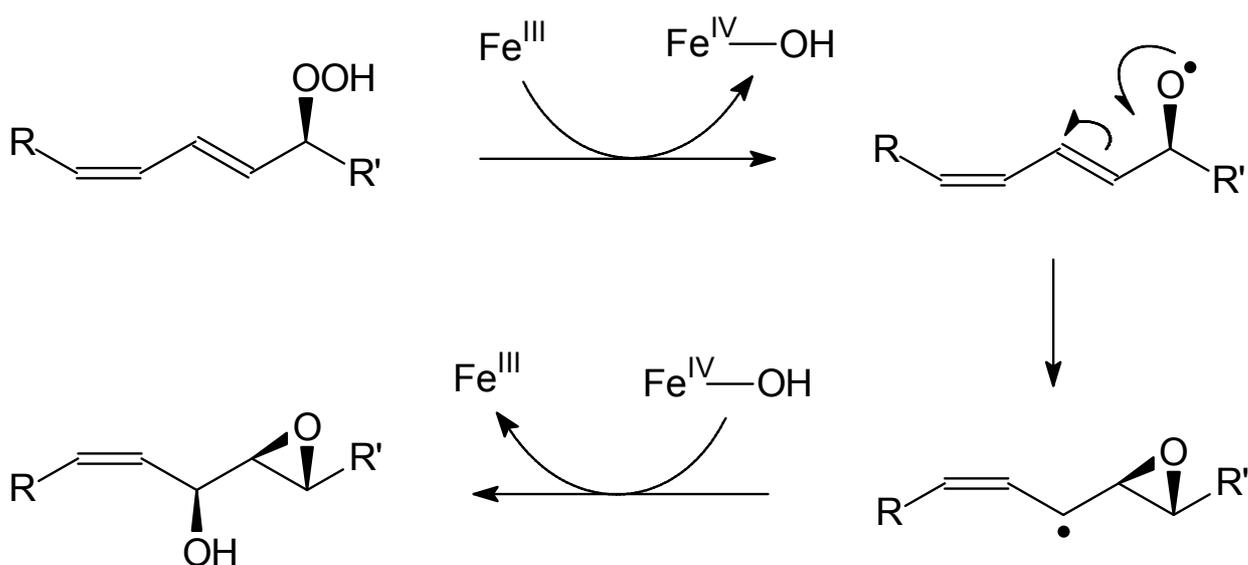


Рис. 31. Предполагаемый механизм реакции, катализируемой EsEAS.

3.5 Анализ оксилипинового профиля бурых водорослей разных видов

Выбор 9- и 13-гидроперекисей линолевой и α -линоленовой кислот в качестве модельных субстратов для изучения каталитической активности фермента CYP5164V1 основан на данных литературы, а также на результатах анализа профилей оксилипинов ряда бурых водорослей. Согласно полученным ранее данным известно, что бурые водоросли обладают сложным составом полиеновых жирных кислот. Предварительные исследования указывают также на богатый набор оксилипинов у данных организмов.

В талломах бурых водорослей основными жирными кислотами являются α -линоленовая, стеарионовая и эйкозапентаеновая кислоты (Jamieson, Reid, 1972; Khotimchenko *et al.*, 2002). Линолевая кислота выявляется в меньшем количестве. Эти жирные кислоты также были обнаружены при анализе профилей оксилипинов следующих бурых водорослей: *Cystoseira crinita* (Ivanova *et al.*, 2013), *L. angustata* (Gerwick, 1994), *L. digitata* (Küpper *et al.*, 2009), *Padina pavonica* и *Cystoseira nodicaulis* (Silva *et al.*, 2013).

Различные C₁₈ и C₂₀ эпокиспирты были ранее обнаружены у красных (Jiang, Gerwick, 1997; Bernart, Gerwick, 1994; Gerwick, 1996), зеленых (Bernart *et al.*, 1993) и диатомовых (Lamari *et al.*, 2013) водорослей. Насколько нам известно, до сих пор не было информации об обнаружении эпокиспиртов у бурых водорослей. В то же время описано выявление у бурых водорослей большого разнообразия оксипинов, включая дивиниловые эфиры (Proteau, Gerwick, 1993), а также различные производные 1,2-эпоксициклопентанов и циклопропанов (Proteau *et al.*, 1994; Kousaka *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2012). В талломе *E. siliculosus* также было обнаружено большое разнообразие оксипинов, синтезирующихся при воздействии больших концентраций меди (Ritter *et al.*, 2014). Все эти оксипины синтезируются посредством внутримолекулярных превращений эпоксиаллильного радикала. Таким образом, реакции их биосинтеза протекают сходным образом с реакциями образования эпокиспиртов.

Нами был проведен скрининг оксипинового профиля бурых водорослей нескольких видов: *Saccharina cichorioides*, *Sargassum pallidum*, *Coccophora langsdorfii* и *Pilaella littoralis*. Материал был собран во время экспедиции на побережье Японского моря в Хасанском районе ДВФО в окрестностях биостанции ДВО РАН. Для проведения анализа собранные талломы водорослей замораживали в жидком азоте и гомогенизировали механически. После оттаивания жирные кислоты из гомогенатов экстрагировали гексаном, метилировали и триметилсилилировали, после чего их спектры анализировали методом ГХ-МС (Раздел 2.19). Были получены следующие результаты.

У всех изученных бурых водорослей в спектре оксипинов обнаружены линолевая кислота, а также ряд эпокиспиртов и тригидрокси-кислот, что указывает на наличие в талломах этих представителей бурых водорослей эпоксиалкогольсинтазной активности. Известно, что тригидрокси-кислоты являются продуктами гидролиза эпокиспиртов (Hamberg, 1999; Hamberg, Olsson, 2011).

У всех видов выявлена 12,13-эпокси-11-гидрокси-9-октадеценовая кислота, у трех видов (кроме *S. pallidum*) – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая кислота; эти соединения являются продуктами превращения 13-ГПОД и 9-ГПОД, соответственно. При этом соотношение различных оксилипинов у всех изученных видов сильно варьирует (Рис. 32).

Кроме того, в спектрах всех бурых водорослей были обнаружены несколько изомеров гидроксикислот, у которых гидроксильная группа расположена в положениях C9, C12, C13 (Рис. 32). Гидрокси-кислоты образуются в результате модификации соответствующих свободных гидроперекисей в ходе подготовки образцов для анализа методом ГХ-МС. 9- и 13-изомеры характерны для наземных растений, тогда как 12-изомер – нет (является уникальными для бурых водорослей). Выявление 9- и 13-гидроксикислот свидетельствует о наличии 9- и 13-липоксигеназной активностях в талломах описанных представителей бурых водорослей.

Таким образом, EsEAS является возможным участником липоксигеназного каскада *E. siliculosus*, существование которого подтверждается наличием в геноме как минимум четырех генов липоксигеназ, расположенных по данным ORCAE в локусах Es-03_000010, Es-03_000020, Es-20_003620 и Es-20_003630. Сопоставление последовательностей кодируемых ими ферментов с таковыми наземных растений свидетельствует, что липоксигеназы *E. siliculosus* обладают наибольшим сходством с 9-специфичными липоксигеназами (Рис. 33). Поскольку EsEAS эффективно превращает 9-гидроперекись линолевой кислоты, можно сделать предположение, что в талломе *E. siliculosus* могут протекать реакции превращения линолевой кислоты при последовательном участии 9-специфичных липоксигеназ и EsEAS.

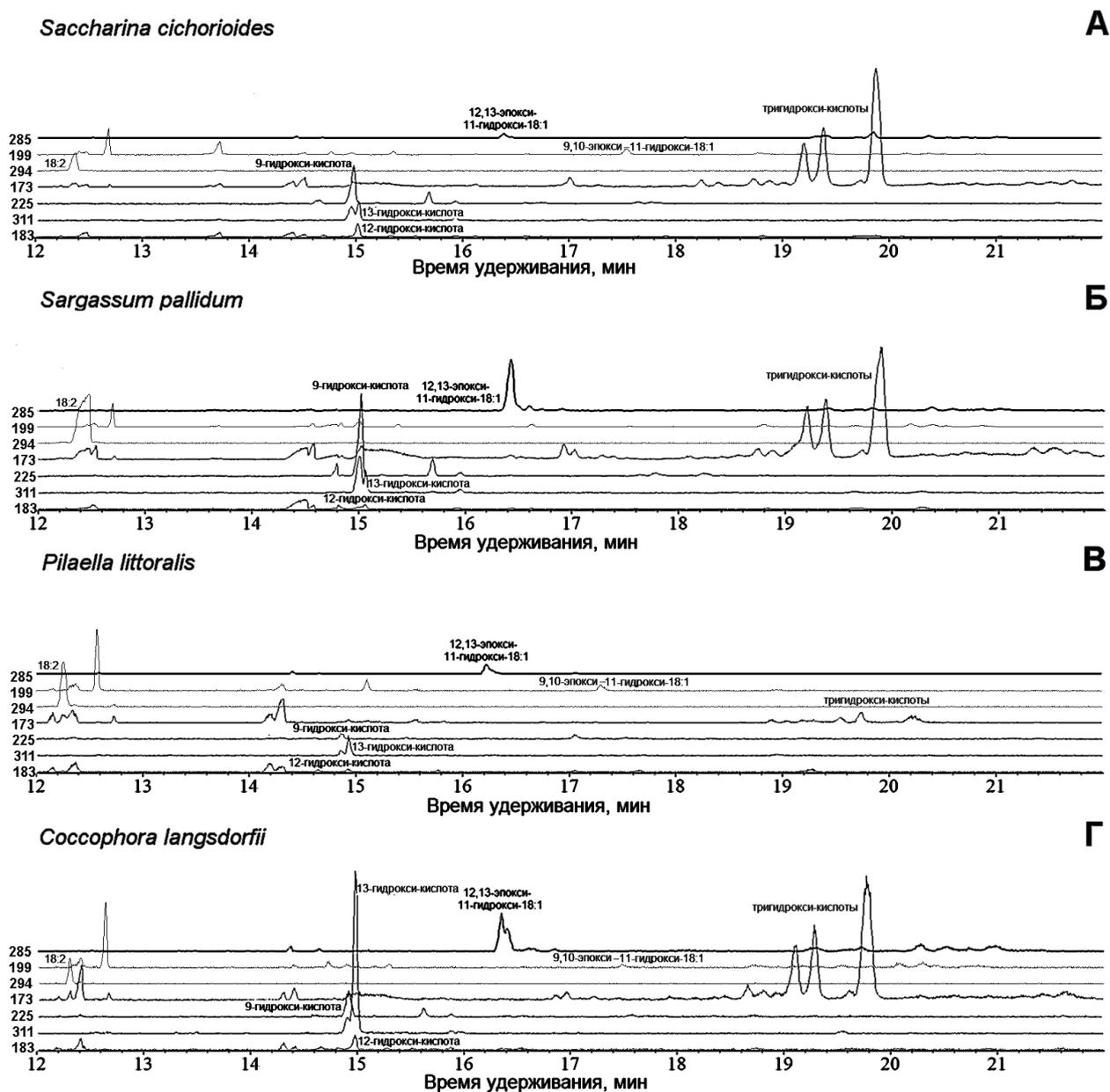


Рис. 32. Хроматограммы профиля жирных кислот (Me/TMC) бурых водорослей *S. cichorioides*, *S. pallidum*, *C. langsdorfii* и *P. littoralis* по селективным ионным токам, которые соответствуют: m/z 285 – 12,13-эпокси-11-гидрокси-9-октадеценовой, m/z 199 – 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовой, m/z 294 – линолевой кислотам, m/z 173 – тригидрокси-кислотам, m/z 225 – 9-гидрокси-кислоте, m/z 311 – 13-гидрокси-кислоте, m/z 183 – 12-гидрокси-кислоте.

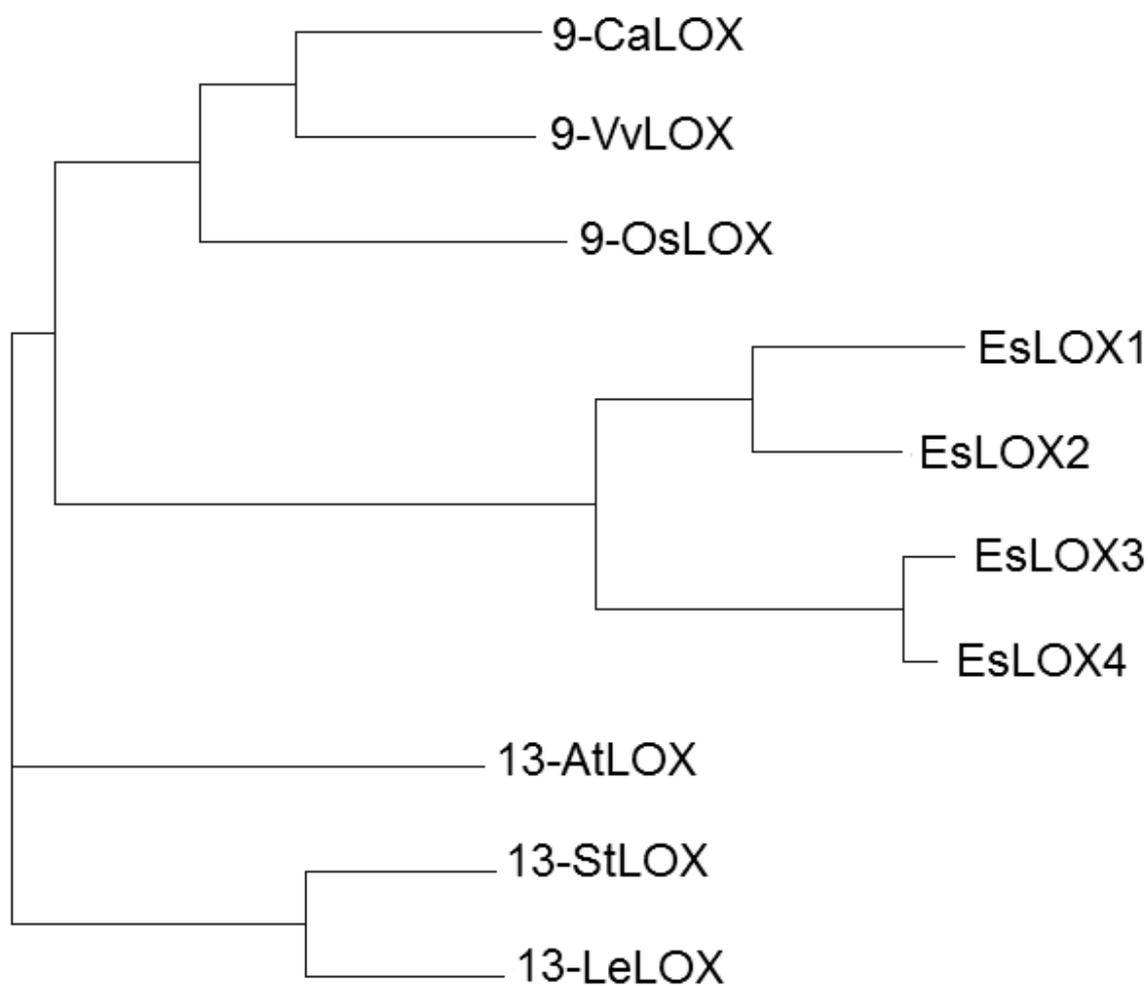


Рис. 33. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей липоксигеназ *E. siliculosus* с 9-специфичными липоксигеназами растений: Ca, *C. annuum*; CaLOX, ABF19103; Vv, *Vitis vinifera*; VvLOX, NP_001268178; Os, *O. sativa*; OsLOX, BAD02945; Es, *E. siliculosus*; EsLOX1, CBJ33122; EsLOX2, CBJ33123; EsLOX3, CBN79156; EsLOX4, CBN79157; At, *A. thaliana*; AtLOX, CAG38328; St, *S. tuberosum*; StLOX, CAA65268; Le, *L. esculentum*; LeLOX, NP_001234259.

3.6. Анализ взаимосвязи структуры и функций цитохромов P450 клана CYP74

Одним из наиболее распространенных методов для изучения взаимосвязи структуры и функций ферментов является сайт-направленный мутагенез. К настоящему времени этот метод получил широкое распространение при изучении ферментов семейства CYP74. В литературе опубликованы результаты сайт-направленного мутагенеза трех представителей семейства CYP74: двух алленоксидсинтаз – LeAOS3 томата (Toporkova *et al.*, 2008; 2010) и AtAOS резуховидки Таля (Lee *et al.*, 2008) и гидропероксидлиазы MtHPL люцерны (Toporkova *et al.* 2010). При этом замены проводили в разных каталитически важных доменах. Ряд мутаций в последовательностях LeAOS3 (F295I, S297A, K302S) и MtHPL (F284I, N285T/A, F287V, G288I) были проведены в домене IHCD. Было показано, что аминокислотные остатки этого домена участвуют непосредственно в каталитическом действии ферментов. С противоположной от I-спирали стороны к гему примыкает другой консервативный домен – ERR-триада. Внутри этого домена также были проведены две замены и получены мутантные формы LeAOS3 D359R и T366Y (Toporkova *et al.*, 2010). Сайт F137 в аминокислотной последовательности AtAOS был выявлен на основании рентгеноструктурного анализа (Lee *et al.*, 2008) и находится между первым и вторым участками распознавания субстрата (Gotoh, 1992). Все описанные мутантные формы сохранили способность утилизировать те же субстраты, что и ферменты дикого типа. Однако в реакциях, катализируемых мутантными формами LeAOS3 K302S, S297A и T366Y, наряду с α -кетолом, который появляется в результате спонтанного превращения окиси аллена – первичного продукта алленоксидсинтазной реакции, появилось значительное количество 9-оксононановой кислоты – продукта спонтанного распада полуацетала, который является первичным продуктом гидропероксидлиазной реакции. Таким образом, данные мутанты проявляли активность как АОС, так и ГПЛ. Аналогичная ситуация наблюдалась

в результате инкубации субстрата с мутантной формой AtAOS F137L. Мутантная форма LeAOS3 F295I проявляла исключительно гидропероксидлиазную активность; алленоксидсинтазная активность отсутствовала. С другой стороны, замена D359R в последовательности ERR-триады не привела к изменениям в механизме катализа.

В случае мутантных форм MtHPL F284I, F287V, N285A, G288I и N285T помимо основного продукта реакции (9Z)-12-оксододеценовой кислоты выявлялись дополнительные продукты, а именно – (9Z,11E)-13-оксотридекадиеновая и (9Z)-11-оксоундеценовая кислоты, что является результатом спонтанного разрезания и свидетельствует о нарушениях в ферментативном катализе.

Однако, несмотря на успешные эксперименты по превращению ферментов семейства CYP74 в результате сайт-направленного мутагенеза, до сих пор не было опубликовано ни одного сообщения об экспериментах по попытке превращения ферментов клана CYP74 в результате единичных замен аминокислотных остатков. Это, вероятно, является следствием низкой степени сходства аминокислотных последовательностей представителей клана CYP74, не позволяющей выявить сайты, участвующие в формировании того или иного типа катализа. Мы проанализировали результат множественного выравнивания ферментов семейства и клана CYP74, обращая внимание при этом на ERR-триаду, поскольку последовательность этого домена является наиболее консервативной для всех цитохромов суперсемейства P450. Кроме того, ранее внутри этого домена был выявлен сайт, замена в котором привела к приобретению алленоксидсинтазой LeAOS3 томата свойств гидропероксидлиазы. Анализ выявил внутри ERR-триады сайт, в котором у всех ферментов семейства и клана CYP74 есть три варианта несинонимичных аминокислотных остатков (Рис. 34). Подобные сайты являются наиболее вероятными кандидатами на детерминанты типа каталитической активности. В данном сайте практически все алленоксидсинтазы, а также гидропероксидлиазы подсемейства CYP74C содержат остаток ароматиче-

ской аминокислоты. В то же время ферменты подсемейства CYP74B в данном сайте содержат остаток цистеина, а дивинилэфирсинтазы подсемейства CYP74D – остаток валина. Ферменты клана CYP74 в данном сайте содержат остатки тех же аминокислот: EsEAS – остаток цистеина, алленоксидсинтаза ApAOS коралла *A. palmata* – остаток валина, эпоксиалкогольсинтаза VfEAS ланцетника – остаток тирозина, ферменты метиловых бактерий – остаток метионина – серосодержащей, как и цистеин, аминокислоты. Мы предположили, что данный сайт участвует непосредственно в каталитическом действии ферментов CYP74, в том числе EsEAS. Для проверки данного предположения мы провели сайт-направленный мутагенез EsEAS, получили мутантные формы EsEAS C365F и C365V и провели сравнительную характеристику фермента дикого типа с мутантными формами. Кроме того, провели аналогичные эксперименты с ферментами семейства CYP74, обладающими сходной субстратной специфичностью, однако содержащие несинонимичные аминокислотные остатки в выбранном сайте, а именно – алленоксидсинтазой LeAOS3 (CYP74C3; GenBank: AF454634.1) томата (*L. esculentum*) и дивинилэфирсинтазой NtDES (CYP74D3; GenBank: NM_001325677.1) табака обыкновенного (*N. tabacum*), после чего провели сравнение с результатами, полученными для EsEAS. На первом этапе данной работы получили ферменты LeAOS3 и NtDES дикого типа (Раздел 3.7), после чего получили мутантные формы LeAOS3 F391V и F391C, NtDES V379F и V379C и проанализировали их каталитические свойства по сравнению с ферментами дикого типа.

3.7. Получение рекомбинантных ферментов дикого типа – алленоксидсинтазы LeAOS3 (CYP74C3) томата и дивинилэфирсинтазы NtDES (CYP74D3) табака

Ген *NtDES*, кодирующий полипептид длиной 478 аминокислотных остатков, был клонирован группой профессора Ф. Кардинале в 2007 году. Соответст-

вующий рекомбинантный фермент был охарактеризован; он катализирует превращение 9-гидроперекиси линолевой кислоты в колнелевую кислоту (Fammarino *et al.*, 2007). Ген *NtDES*, клонированный в неэкспрессирующем векторе pBSK, был нам любезно предоставлен профессором Ф. Кардинале.

На первом этапе мы переклонировали OPC рекомбинантной *NtDES* в экспрессирующий вектор pET-32 Ek/LIC (Рис. 14) методом безлигазного клонирования и оптимизировали методику получения рекомбинантного фермента дикого типа. Эффективность использования данного вектора для получения высокоактивных препаратов растительных ферментов СYP74 была показана в ряде работ (Gogolev *et al.*, 2012, Gorina *et al.*, 2014, 2016).

Для создания рекомбинантной плазмиды OPC гена *NtDES* амплифицировали с помощью ПЦР, используя высокоточную Kod-полимеразу (Novagen, США) и праймеры NTF и NTR (Таблица 6), комплементарные 5'- и 3'-концам гена *NtDES* и содержащие вспомогательные последовательности, комплементарные одноцепочечным концам вектора. Эффективность амплификации проверили с помощью электрофоретического разделения в агарозном геле (Рис. 35). После обработки полученного ампликона T4 ДНК-полимеразой полученные односторонние липкие концы сплавляли с выступающими концами вектора (Раздел 2.4). Полученную конструкцию поместили в клетки штамма *E. coli* NovaBlue (Раздел 2.7). Созданная нами генетическая конструкция предусматривала включение вспомогательных полипептидов в N- и C-концевые последовательности рекомбинантного белка, в том числе гексагистидиновый фрагмент, позволяющий проводить очистку методом металлоаффинной хроматографии. В области, кодирующей C-концевую часть белка, также содержится вставка, кодирующая гексагистидиновый полипептид, позволяющий проводить очистку методом металлоаффинной хроматографии. Данной рекомбинантной плазмидой также трансформировали клетки штамма *E. coli* NovaBlue (Раздел 2.7).

Таблица 6. Праймеры для переклонирования ОРС гена *NtDES* в экспрессирующий вектор pET-32 Ek/LIC, а также для проверки наличия ОРС гена *LeAOS3*. Вспомогательные последовательности, комплементарные одноцепочечным концам вектора и необходимые для метода безлигазного клонирования, выделены серым цветом.

Название праймера	Последовательность 5' – 3'	T _m , °C
NtF	gACgACgACAAGATgTCTTCCTTTTAgTATCATCA	65,6
NtR	gAggAgAAgCCCggTCAAgtTgCTTTAgTTAATgT	68,3
LeF	GCACACTTTCCTCTACCTTACATCC	58
LeR	CCCCTCCAGCCTCTTTAACCGC	59

Олигонуклеотиды синтезировали в ЗАО «Евроген» (Москва).

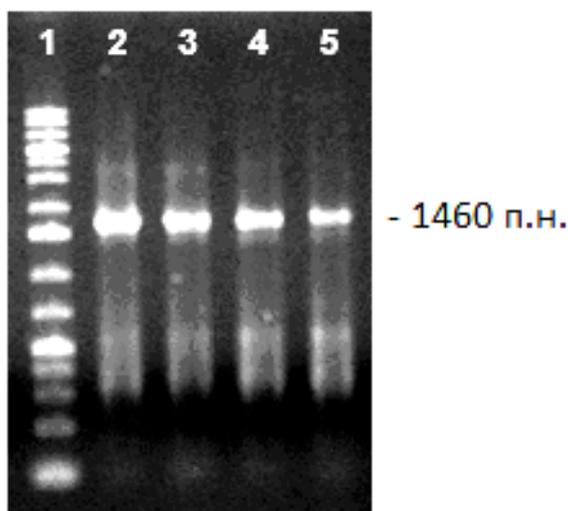


Рис. 35. Электрофореграмма продуктов амплификации, полученных с помощью ПЦР плазмидной ДНК, выделенной из нескольких клонов штамма *E. coli* NovaBlue (2, 3, 4, 5), трансформированного вектором pET-32 Ek/LIC со вставкой ОРС гена *NtDES*, 1 – маркер молекулярного веса GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas, Канада).

Из трансформантов, полученных в результате трансформации клеток *E. coli* NovaBlue рекомбинантными плазмидами, содержащими ОРС генов *NtDES* и *LeAOS3*, выделяли плазмидную ДНК с помощью коммерческого набора Plasmid Miniprep.

Концентрацию плазмидной ДНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop 1000. Наличие целевых вставок проверяли с помощью ПЦР (Раздел 2.2) с парами ген-специфичных праймеров NTF/NTR (для *NtDES*) и LeF/LeR (для *LeAOS3*) (Таблица 6), и последующего электрофоретического разделения в агарозном геле (Рис. 36). Отсутствие спонтанных мутаций проверяли с помощью ДНК-анализатора (Раздел 2.5).

Плазмидные ДНК, содержащие ОРС генов *LeAOS3* и *NtDES*, выделенные из культур клеток штамма *E. coli* NovaBlue, использовали для трансформации экспрессирующих штаммов *E. coli* BL21(DE3)pLysS и Rosetta-gami(DE3)pLysS В, соответственно (Раздел 2.7). Для наработки рекомбинантных ферментов *LeAOS3* и *NtDES* мы использовали методику, разработанную ранее для получения рекомбинантной эпоксиалкогольсинтазы EsEAS *E. siliculosus* (Раздел 2.11). В случае использования Rosetta-gami(DE3)pLysS В учитывали, что этот штамм обладает устойчивостью к следующим антибиотикам: хлорамфеникол, канамицин и тетрациклин. На рисунке 37 представлены электрофореграммы тотальных белков клеток продуцентов через 14 часов после индукции синтеза и накопления целевых белков по приведенному протоколу. Дополнительные полипептиды размером около 70 кДа (*NtDES*) и 56 кДа (*LeAOS3*), появляющиеся после добавления в культуру ИПТГ, свидетельствуют об эффективности разработанной процедуры для получения рекомбинантных ферментов *LeAOS3* и *NtDES*. Очистку рекомбинантных ферментов *LeAOS3* и *NtDES* дикого типа проводили по методике, разработанной ранее для получения рекомбинантной эпоксиалкогольсинтазы EsEAS *E. siliculosus* (Раздел 2.11).

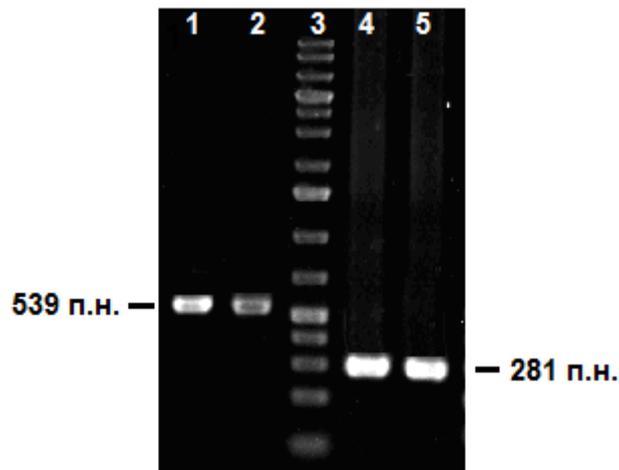


Рис. 36. Электрофореграмма продуктов амплификации, полученных с помощью ПЦР плазмидных ДНК, выделенных из нескольких клонов штамма *E. coli* NovaBlue, трансформированных вектором pET-23a со вставкой OPC гена *LeAOS3* (1, 2) и вектором pET-32 Ek/LIC со вставкой OPC гена *NtDES* (4, 5). 3 – маркер молекулярного веса GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas, Канада).

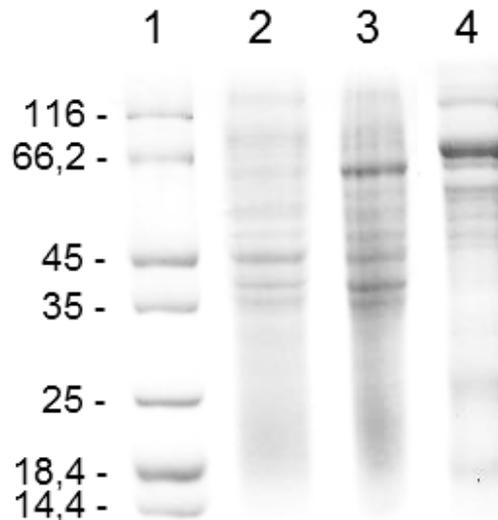


Рис. 37. Электрофореграмма экспрессии рекомбинантных генов *LeAOS3* и *NtDES*: 1 – маркер молекулярного веса SDS-PAGE Standarts Low Range (Bio-Rad, США); 2 – тотальный белок клеток *E. coli* без рекомбинантных плазмид; 3 и 4 – тотальный белок клеток *E. coli*, трансформированных вектором pET-23a со вставкой OPC гена *LeAOS3* и pET-32 Ek/LIC со вставкой OPC гена *NtDES*, соответственно, через 14 часов после добавления ИПТГ.

3.8. Каталитические свойства мутантных форм

EsEAS, *LeAOS3* и *NtDES*

Замены в выбранных сайтах *EsEAS* C365F и C365V, *LeAOS3* F391V и F391C, *NtDES* V379F и V379C проводили методом сайт-направленного мутагенеза на основе ПЦР (Раздел 2.2). Праймеры, отвечающие требованиям метода сайт-направленного мутагенеза на основе ПЦР и использованные для получения мутаций, приведены в таблице 7.

На рисунке 38 приведена электрофореграмма эксперимента по сайт-направленному мутагенезу гена *EsEAS* методом ПЦР с модифицированными праймерами *EsC-FF* и *EsC-FR* для получения мутантной формы *EsEAS* C365F. Электрофореграммы результатов остальных экспериментов по сайт-направленному мутагенезу *EsEAS*, *LeAOS3* и *NtDES* не показаны. Получение и очистку мутантных форм проводили, как описано выше для ферментов дикого типа. Полученные очищенные препараты ферментов дикого типа и их мутантных форм (Рис. 39) инкубировали со 100 мкг (9*S*)-ГПОД в 10 мл Na-фосфатного буфера (100 мМ, рН 7.0) при 25 °С в течение 15 мин, после чего продукты реакций экстрагировали и модифицировали, как описано выше для фермента *EsEAS* дикого типа (Раздел 2.17).

Получили следующие результаты. Инкубация *NtDES* дикого типа с 9-ГПОД приводила к образованию двух продуктов в соотношении 10:1 (Рис. 40А, время удерживания основного продукта 15.25 мин, время удерживания минорного продукта 15.8 мин). Масс-спектры обоих продуктов (Рис. 41А) содержали следующие основные ионы: M^+ при m/z 308 (18 %), $[M - MeO]^+$ при m/z 277 (0.6 %), $[M - CH_3(CH_2)_3]$ при m/z 251 (4 %), m/z 179 (3 %), m/z 165 (8 %), m/z 137 (15 %), m/z 123 (20 %), m/z 109 (17 %), m/z 95 (39 %), m/z 81 (186 %), m/z 67 (100 %) – и были идентичны спектру 9-[(1'*E*,3'*Z*)-нонадиенилокси]-(8*E*)-нонановой (колнелевой) кислоты (Fammartino *et al.*, 2007). В результате гидрирования над PtO_2 оба продукта превращались в 10-оксаноадекановую кислоту (Me).

Таблица 7. Специфичные праймеры для сайт-направленного мутагенеза генов *EsEAS*, *LeAOS3* и *NtDES*. Замещаемые нуклеотиды выделены серым цветом:

Название праймера	Последовательность 5' – 3'	T _m
EsC-FF	GGCGACATGCTGTTCTGCCACCACCCTTTG	74.2
EsC-FR	CAAAGGGTGGTGGCAGAACAGCATGTGCGCC	74.2
EsC-VF	GGCGACATGCTGGTCTGCCACCACCCTTTG	75.7
EsC-VR	CAAAGGGTGGTGGCAGACCAGCATGTGCGCC	75.7
NtV-FF	AAGGTCAGTTCCTCTTCGGATATCAGCCC	65.2
NtV-FR	GGGCTGATATCCGAAGAGGAACTGACCTT	65.2
NtV-CF	GGTCAGTTCCTCTGCGGATATCAGCCC	66.3
NtV-CR	GGGCTGATATCCGCAGAGGAACTGACC	66.3
LeF-VF	GAAAGATGAATTGATTGTTGGTTATCAACCCTTAGC	65.6
LeF-VR	GCTAAGGGTTGATAACCAACAATCAATTCATCTTTC	65.6
LeF-CF	GAAAGATGAATTGATTTGTGGCTATCAACCCTTAGC	67.0
LeF-CR	GCTAAGGGTTGATAGCCACAAATCAATTCATCTTTC	67.0

Олигонуклеотиды синтезировали в ЗАО «Евроген» (Москва).

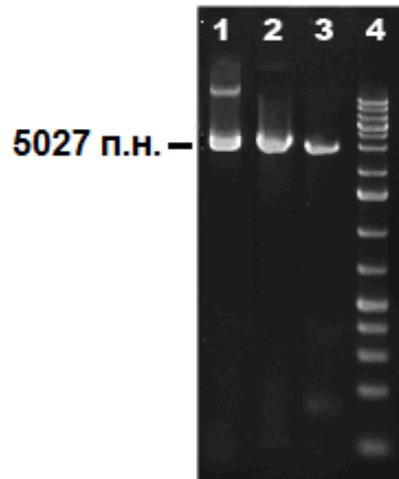


Рис. 38. Электрофореграмма результата сайт-направленного мутагенеза гена *EsEAS*: 1 – исходная плазмида, выделенная из клеток *E. coli*; 2 – наработанная с помощью ПЦР плазмида рЕТ-23а, содержащая модифицированный ген *EsEAS*; 3 – наработанная с помощью ПЦР плазмида рЕТ-23а, содержащая модифицированный ген *EsEAS*, после обработки рестриктазой *DpnI*; 4 – маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Канада).

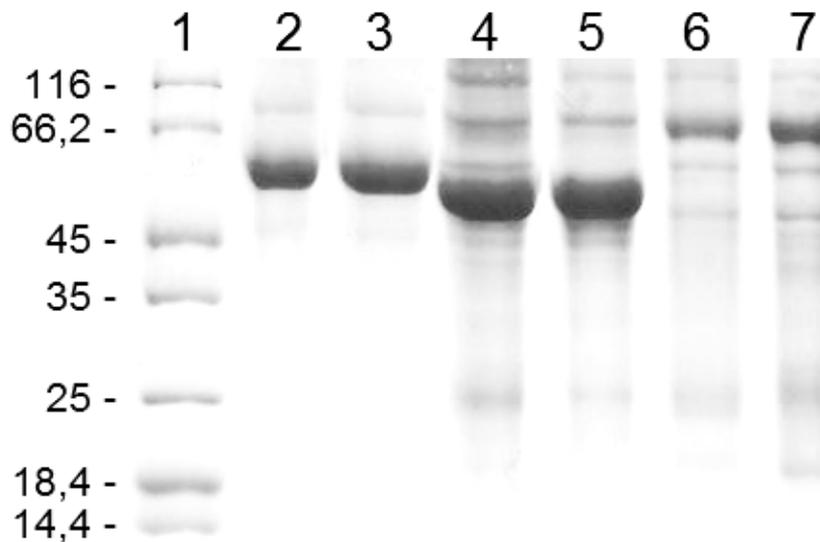


Рис. 39. Электрофореграмма очищенных методом металлоаффинной хроматографии мутантных форм ферментов LeAOS3 F391V (2) и F391C (3), EsEAS C365F (4) и C365V (5), NtDES V379F (6) и V379C (7). 1 – маркер молекулярного веса SDS-PAGE Standarts Low Range (Bio-Rad, США).

Масс-спектр этого соединения содержал следующие основные ионы: M^+ при m/z 314 (0.3 %), $[M - MeO]^+$ при m/z 283 (3 %), $[M - Me(CH_2)_8]^+$ при m/z 187 (36 %), $[M - Me(CH_2)_8O + H]^+$ при m/z 172 (25 %), $[187 - MeOH]^+$ при m/z 155 (81 %), $[M - Me(CH_2)_8O - MeOH]^+$ при m/z 139 (56 %), $[139 - H]^+$ при m/z 138 (80 %), m/z 87 (75 %), m/z 74 (100 %). Эти результаты позволили нам идентифицировать основной продукт превращения 9-ГПОД при участии NtDES дикого типа как колнелевую кислоту. Минорный изомер колнелевой кислоты по времени удерживания (15.8 мин) соответствует аутентичному образцу колнелевой кислоты со всеми *транс*-двойными связями. Идентификация этого изомера подтверждена данными ЯМР-спектроскопии (данные не представлены). Наряду с колнелевой кислотой, NtDES дикого типа продуцировала следовые количества 9-оксононановой кислоты (Me) – продукта гидропероксидлиазной реакции (менее 1 % тотального продукта, как определено по интегрированию хроматограммы по полному ионному току).

Анализ методом ГХ-МС продуктов инкубации LeAOS3 дикого типа с 9-ГПОД выявил α -кетол – (12Z)-9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовой кислоты (Grechkin *et al.*, 2008). Этот продукт формируется в результате гидролиза первичного продукта алленоксидсинтазной реакции – окиси аллена – (12Z)-9,10-эпокси-10,12-октадекадиеновой кислоты. Помимо этого, в реакции образуется следовое количество гидропероксидлиазного продукта – 9-оксононановой кислоты. Тем не менее, продукты алленоксидсинтазной реакции преобладают.

Все исследованные мутантные формы LeAOS3, NtDES и EsEAS сохранили способность использовать (9S)-ГПОД в качестве субстрата. Однако, в отличие от ферментов дикого типа, некоторые мутантные формы проявляли активности, не характерные для ферментов дикого типа. Кроме того, среди регистрируемых продуктов реакций, катализируемых всеми мутантными формами, обнаруживался продукт термического разложения ТМС-перокси-производного – (9S,10E,12Z)-9-гидрокси-10,12-октадекадиеновая кислота. Этот результат свиде-

тельствует о присутствии среди продуктов остатка гидроперекиси и о более низкой активности мутантных форм по сравнению с ферментами дикого типа.

Замены в последовательностях EsEAS C365F и C365V и LeAOS3 F391V и F391C не привели к изменениям типа каталитической активности. Результатом мутаций было снижение каталитической активности по сравнению с ферментом дикого типа, что указывает на возможное значение данного сайта в каталитическом действии или корректном фолдинге ферментов.

В отличие от LeAOS3 и EsEAS, в результате замен V379C и V379F в последовательности NtDES произошли изменения каталитической активности по сравнению с ферментом дикого типа (Рис. 40Б). Мутантная форма NtDES V379F проявляет 25 % активности по сравнению с ферментом дикого типа. В отличие от NtDES дикого типа, NtDES V379F продуцирует дивиниловый эфир (Me/TMC) в следовом количестве (Рис. 40Б) Масс-спектр основного продукта превращения 9-ГПОД при участии NtDES V379F идентичен опубликованному ранее масс-спектру α -кетола – 9-гидрокси-10-оксо-12-октадеценовой кислоты (Me/TMC) (Рис. 40Б, 41Б) (Grechkin *et al.*, 2008). Восстановление NaBH_4 основного продукта с последующими метилированием, гидрированием над катализатором Адамса привело к превращению его в пару диастереоизомеров *эритро*- и *трео*-9,10-дигидроксистеариновой кислоты (Me/TMC), масс-спектры которых идентичны и содержат следующие основные ионы: $[\text{M} - \text{Me}]^+$ при m/z 459 (0.5 %), $[\text{M} - \text{MeO}]^+$ при m/z 443 (2 %), $[\text{M} - \text{Me}(\text{CH}_2)_7\text{CHOTMS} + \text{TMS}]^+$ при m/z 332 (12 %), $[\text{M} - \text{Me}(\text{CH}_2)_7\text{CHOTMS}]^+$ при m/z 259 (94 %), $[\text{M} - 259]^+$ при m/z 215 (77 %), m/z 155 (27 %), $[\text{CH}_2=\text{O}^+-\text{SiMe}_3]$ m/z 103 (19 %), $[\text{Me}_3\text{Si}]^+$ at m/z 73 (100 %). Эти данные подтверждают идентификацию основного продукта превращения 9-ГПОД при участии NtDES V379F как α -кетола (Me/TMC; 84.5 % тотальных продуктов, как определено по интегрированию хроматограммы по полному ионному току).

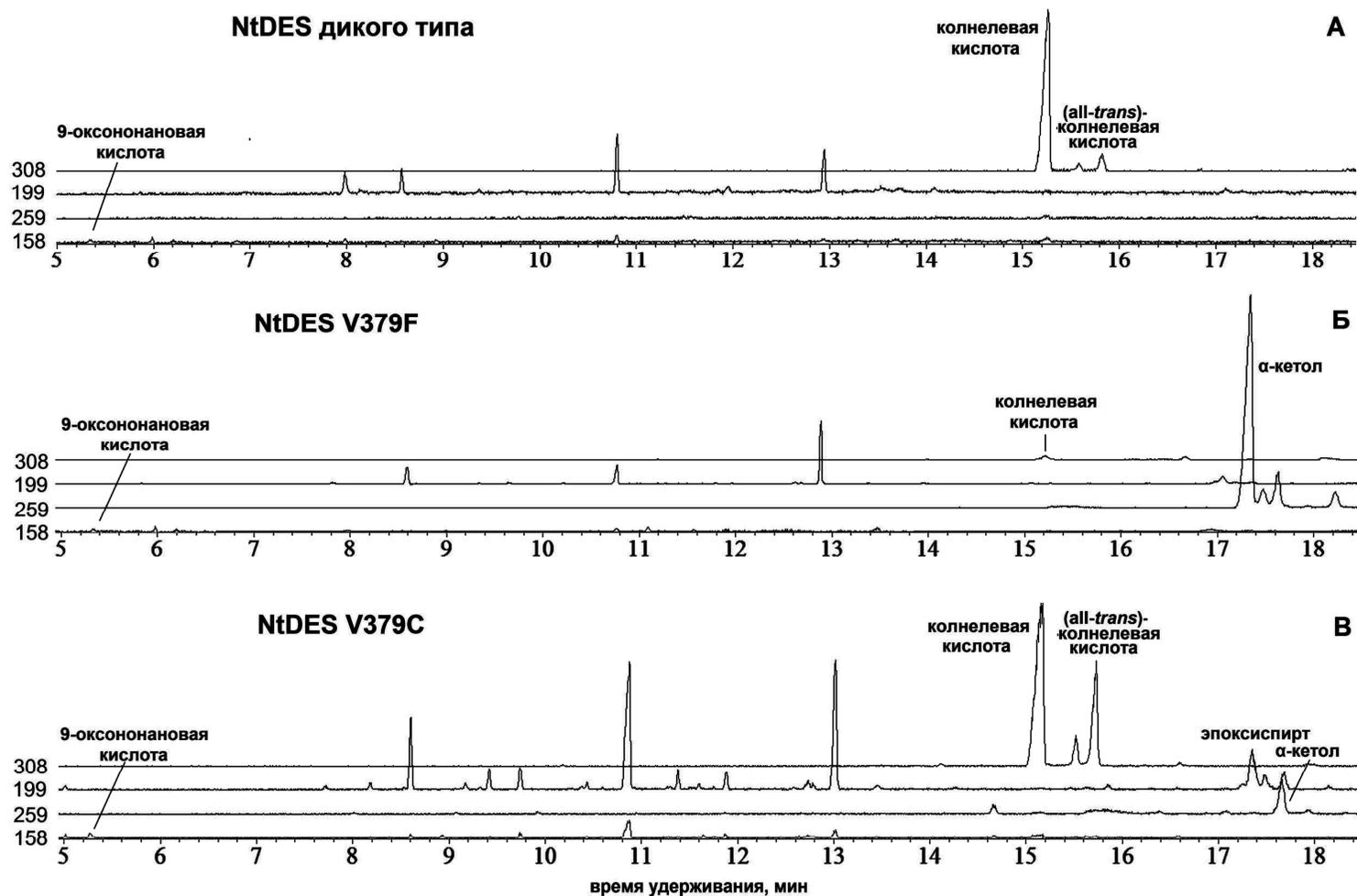


Рис. 40. Хроматограммы анализа продуктов превращения (9*S*)-ГПОД (Me/TMC) при участии NtDES дикого типа (А) и его мутантных форм NtDES V379F (Б) и NtDES V379C (В) по селективным ионным токам, которые соответствуют следующим соединениям: 308 – колнелевая кислота, 199 – эпоксиспирт 9,10-эпокси-11-гидрокси-октадецеиновая кислота, 259 – α-кетол, 158 – 9-оксононановая кислота.

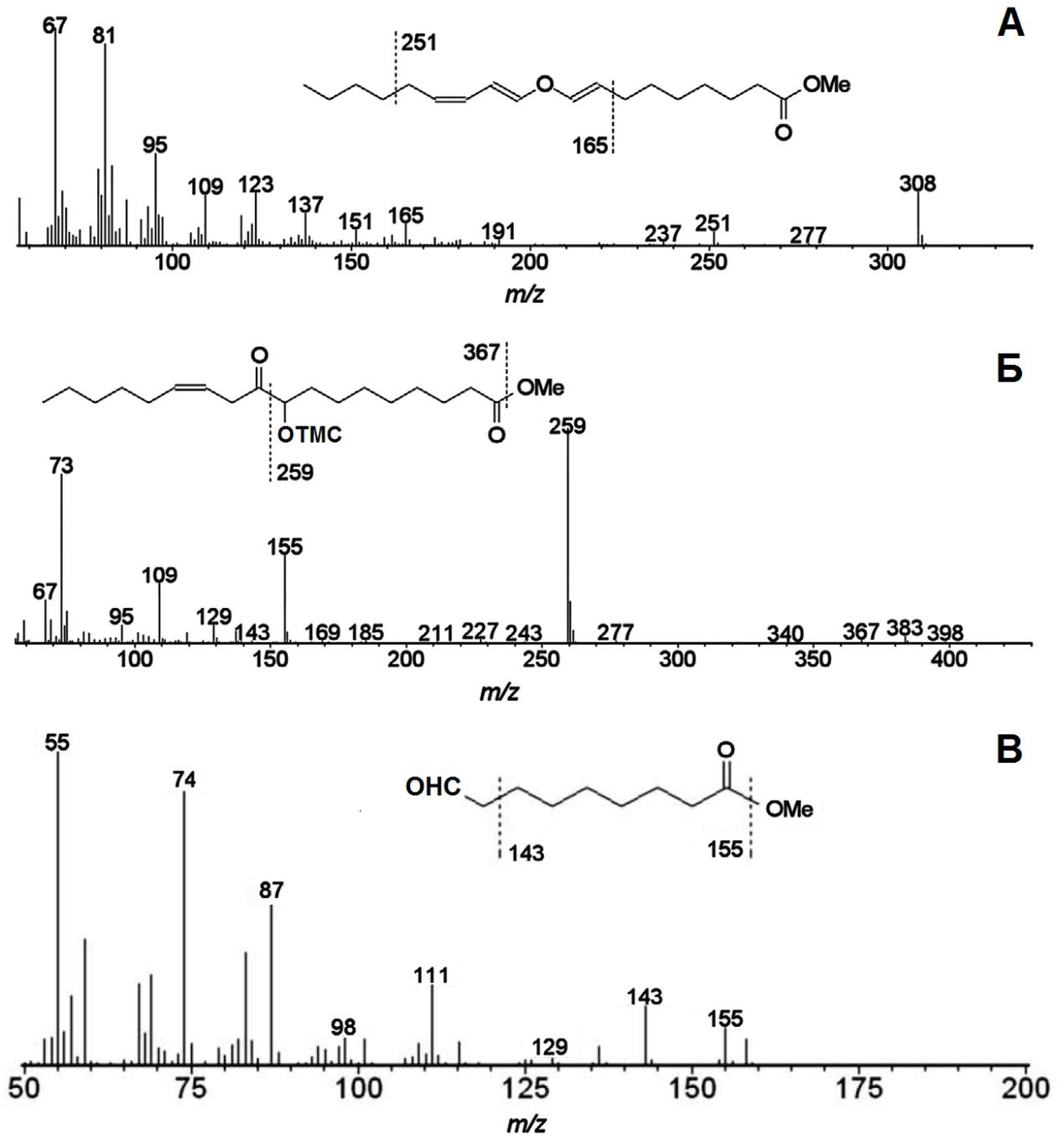


Рис. 41. Электронные масс-спектры и схемы фрагментации продуктов превращения (9*S*)-ГПОД (Me/TMC) при участии NtDES дикого типа и его мутантных форм NtDES V379F и V379C: колнелевая кислота (А), α -кетол (Б) и 9-оксононановая кислота (В).

Кроме того, в реакции образовывалась 9-оксононановая кислота в том же количестве, что и в случае реакции, катализируемой ферментом дикого типа. Таким образом, мутантная форма NtDES V379F проявляет алленоксидсинтазную активность с минорными гидропероксидлиазной и дивинилэфирсинтазной активностями.

Мутантная форма NtDES V379C обладает каталитической активностью, сопоставимой с таковой фермента дикого типа (Рис. 40В). Однако, в отличие от последнего, в результате инкубации NtDES V379C с субстратом – (9S)-ГПОД – образуется небольшое количество продуктов, характерных для других ферментов CYP74, а именно – α -кетол (алленоксидсинтазный продукт), 9,10-эпокси-11-гидрокси-октадеценовая кислота (эпоксиалкогольсинтазный продукт), а также следовые количества 9-оксононановой кислоты (гидропероксидлиазный продукт) (Рис. 40В). Масс-спектр α -кетола представлен на рисунке 40Б, 9,10-эпокси-11-гидрокси-октадеценовой кислоты – на рисунке 25Б, 9-оксононановой кислоты – на рисунке 41В.

Таким образом, в результате единичных замен аминокислотных остатков выполнено превращение (практически полное или частичное) дивинилэфирсинтазы NtDES табака в алленоксидсинтазу, гидропероксидлиазу и эпоксиалкогольсинтазу. Полученные данные подтверждают предположение о сходстве механизмов каталитического действия у разных ферментов CYP74 и свидетельствуют о том, что эпоксиаллильный радикал представляет собой не только промежуточный продукт катализа CYP74 (Grechkin, 1998), но и своеобразную точку переключения в механизме катализа CYP74. Первой стадией катализа у всех ферментов CYP74 является гомолиз гидроперокси-группы (Рис. 42) с образованием эпоксиаллильного радикала и соединения II ($\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-OH}$ комплекс). В зависимости от первичной структуры фермента эпоксиаллильный радикал претерпевает различные превращения. Второй стадией у эпоксиалкогольсинтаз явля-

ется присоединение гидроксильного радикала с образованием эпокиспиртов, которые в результате гидролиза превращаются в тригидрокси-кислоты.

Второй стадией у АОС является отщепление атома водорода с образованием *экзо*-двойной связи при оксиране, что приводит к образованию окиси аллена. У гидропероксидлиаз и дивинилэфирсинтаз вторая стадия иная – гомолиз углерод-углеродной связи в оксиране с образованием винилоксикарбинильного радикала. Заключительным этапом катализа ДЭС является отщепление атома водорода от радикала с образованием второй двойной связи дивинилового эфира. Заключительным этапом катализа ГПЛ является рекомбинация винилоксикарбинильного радикала с гидроксильным радикалом с образованием полуацетала, который распадается на альдегид и ω -оксокислоту.

3.9. Значение N-концевой последовательности для каталитического действия EsEAS

Для ряда ферментов было описано значение N- и C-концевых последовательностей для каталитического действия. В том числе это было сделано для ключевых ферментов липоксигеназного каскада – липоксигеназ. В литературе описан эксперимент по гидролизу липоксигеназы GmLOX1 сои пептидазой с образованием C-концевого и N-концевого доменов (Di Venere *et al.*, 2003). Липоксигеназную активность в данном случае проявлял исключительно C-концевой домен, который содержал атом негемового железа. Предполагается, что β -складчатые структуры N-концевого домена участвуют во взаимодействии с мембранами и с ионами некоторых металлов, что является необходимым для проявления активности (Tatulian *et al.*, 1998). До сих пор подобную работу для цитохромов P450 не проводили. Первый экзон кодирующей последовательности EsEAS содержит субстрат-распознающий сайт 1 и аминокислотный остаток, участвующий в стабилизации субстрата. Замена этого остатка F137L приводила к частичному превращению AtAOS в гидропероксидлиазу (Lee *et al.*, 2008).

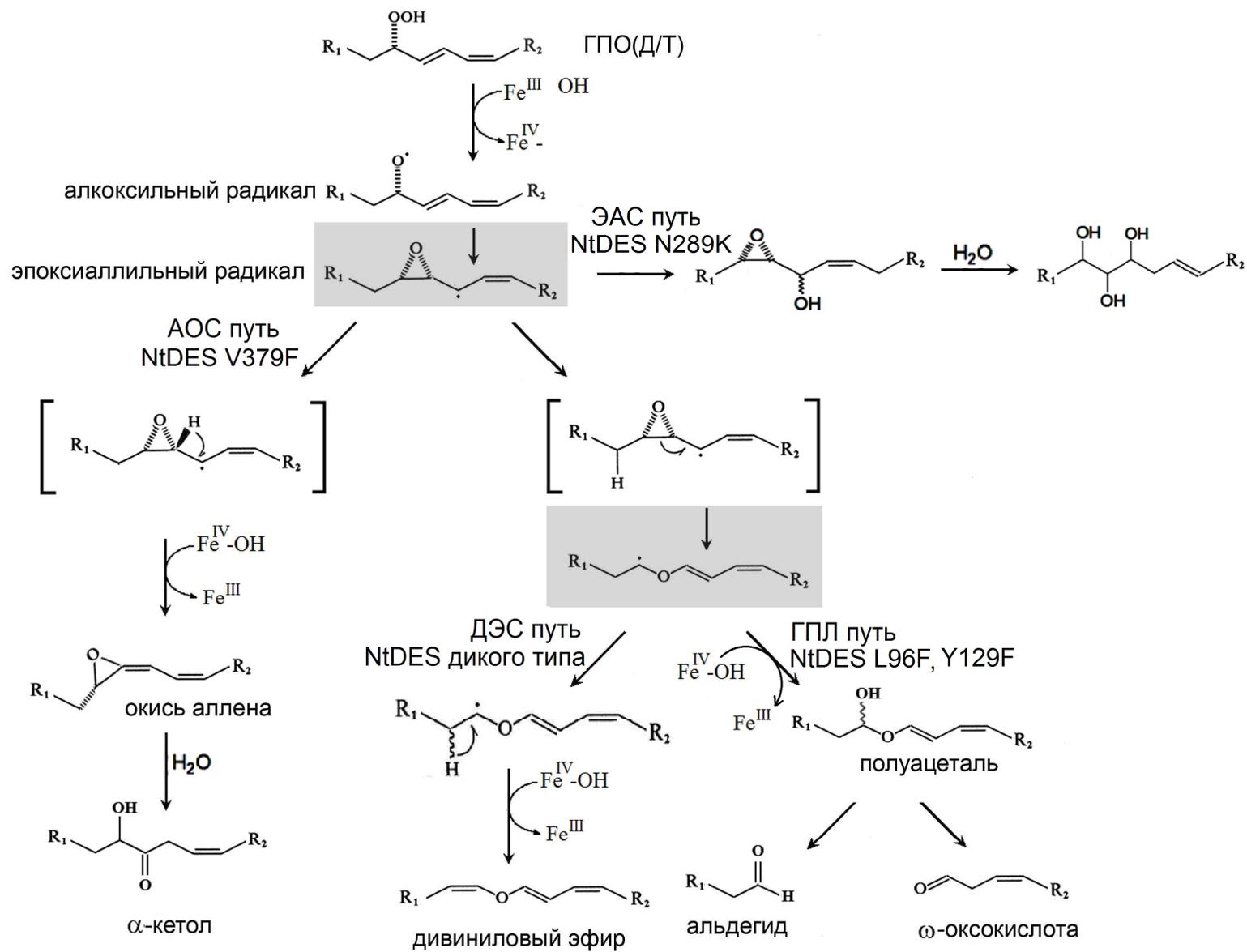


Рис. 42. Схема переключения механизма катализа в результате единичных замен аминокислотных остатков.

Мы удалили полностью этот экзон и получили рекомбинантную плазмиду на основе вектора рЕТ-23а, содержащую кодирующую последовательность укороченного белка EsEAS. Процедуры получения, очистки и анализа каталитической активности укороченного белка были аналогичны таковым, разработанным для полного белка. Удаление N-концевой последовательности размером 107 аминокислотных остатков незначительно снизил каталитическую активность фермента, при этом специфичность образования продуктов осталась практически неизменной (Рис. 43). Таким образом, несмотря на укорочение последовательности EsEAS на треть, механизм каталитического действия практически не меняется. Следовательно, для каталитического действия важной является C-концевая последовательность EsEAS.

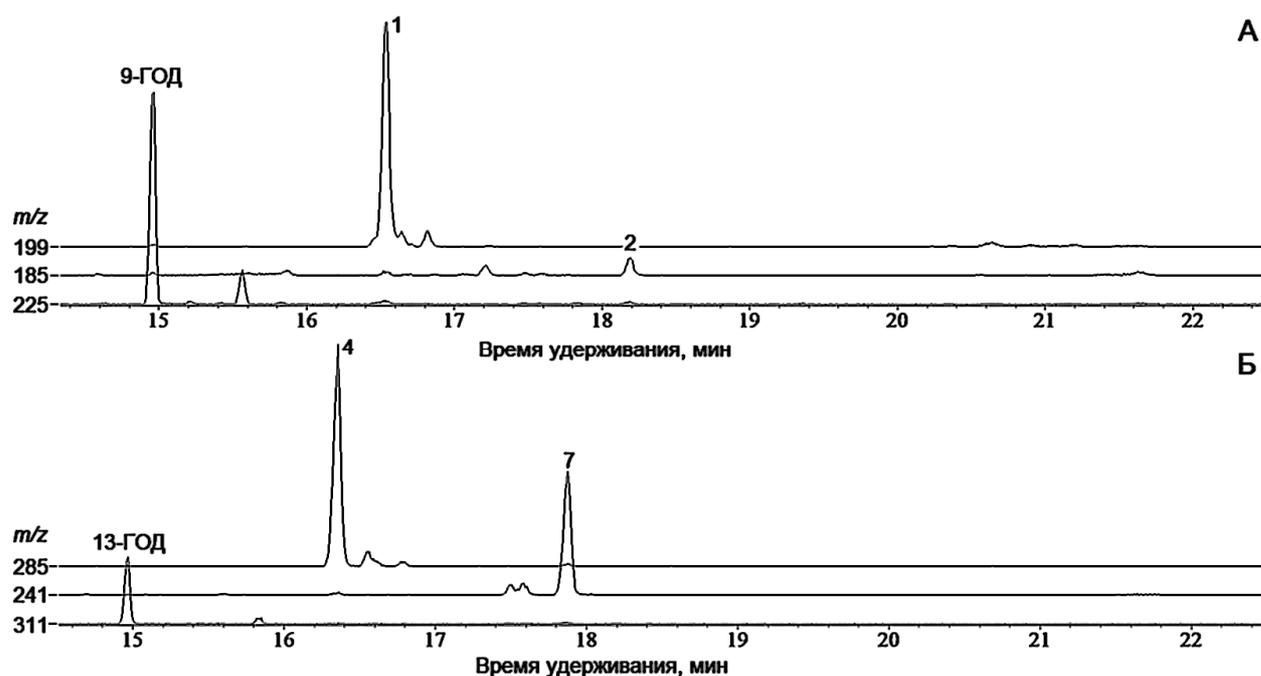


Рис. 43. Хроматограммы продуктов инкубации укороченного фермента EsEAS с (9*S*)-ГПОД (А) и (13*S*)-ГПОД (Б). Появление 9- и 13-ГОД свидетельствует об остатке непрореагировавшей гидроперекиси в реакционной смеси и, как следствие, о снижении каталитической активности. Масс-спектры продуктов **1** и **2** представлены на рисунке 22Б и В; масс-спектры продуктов **4** и **7** – на рисунке 23Б и В.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с современной классификацией бурые водоросли относятся к кластеру Chromalveolata, одному из шести кластеров эукариотических организмов (Simpson, Roger, 2004; Adl *et al.*, 2005): (1) Opisthokonta – животные, грибы, хоанофлагеллаты и представители рода *Mesomycetozoa*; (2) Amoebozoa – классические амебы, миксомицеты, многие раковинные амебы, некоторые амебы-жгутиконосцы, и несколько видов, у которых отсутствуют митохондрии; (3) Excavata – оксимонады, парабазалиды, дипломонады, Jakobids и несколько других родов гетеротрофных жгутиконосцев, включая *Euglenozoa* и *Heterolobosea*; (4) Rhizaria – фораминиферы, большинство классических радиолярий и представители рода Cercozoa с нитевидными псевдоподиями, как у многих амеб-жгутиконосцев и некоторых раковинных амеб; (5) Plantae – глаукофитовые, красные и зеленые водоросли и высшие растения; (6) Chromalveolata – альвеолы (инфузории, динофлагеллаты, апикомплексы), страменопилы (бурые водоросли, диатомовые водоросли, зооспоровые грибы и опалиниды), гаптофитовые и криптофитовые водоросли (Рис. 44; Simpson, Roger, 2004).

По данным молекулярно-филогенетического анализа кластер Chromalveolata является монофилетическим; ядро клана составляет клад альвеолы/страменопилы (Harper *et al.*, 2005). Некоторые исследователи в результате мультигенного филогенетического анализа пришли к заключению, что гаптофитовые водоросли и две другие группы кластера Chromalveolata – страменопилы и альвеолы – формируют монофилетическую группу, сестринскую по отношению к зеленым растениям. По их мнению, глаукофитовые и красные водоросли находятся у основания клада, включающего также зеленые растения и представителей кластера Chromalveolata.

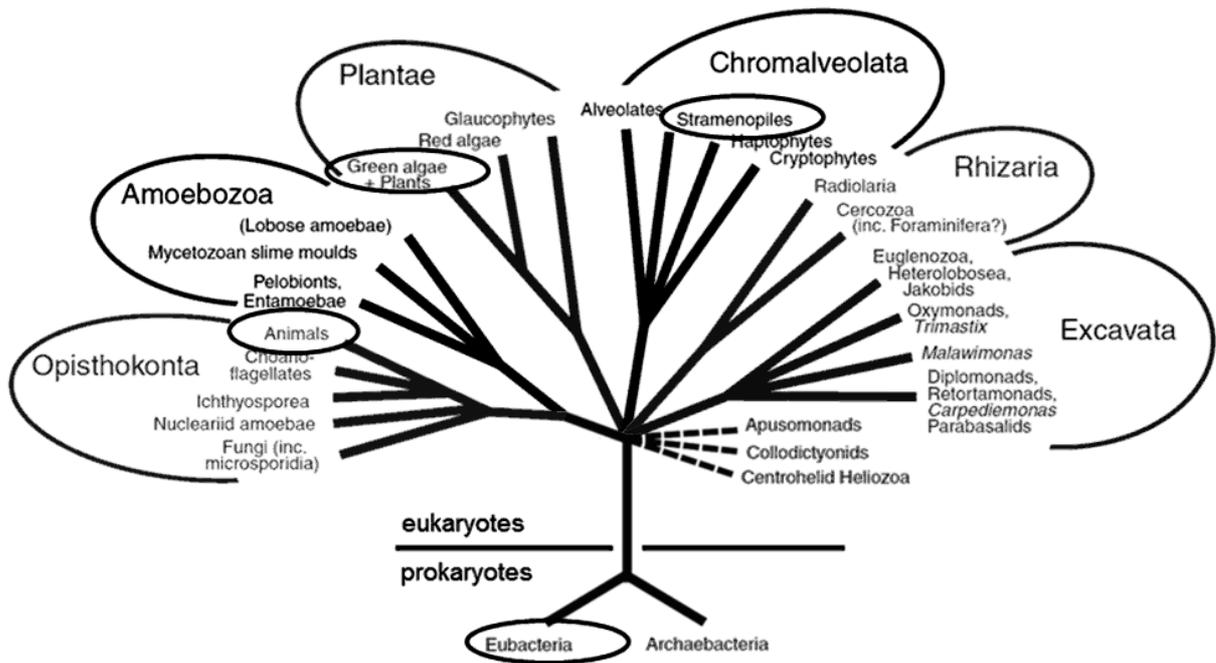


Рис. 44. Древо, иллюстрирующее, что большинство эукариот организовано в шесть основных групп (Simpson, Roger, 2004). Группы эукариот, в которых к настоящему времени обнаружены ферменты клана СУР74, обведены овалами.

Согласно сделанным выводам, возникновение клада сопровождалось процессом становления первичного эндосимбиоза (Nozaki *et al.*, 2009). После отделения красных и, позднее, бурых водорослей произошла потеря первичной пластиды. В то же время, исследователи полагают, что бурые водоросли возникли в результате слияния зеленых водорослей с красными. Подтверждением этому служит тот факт, что у бурых водорослей обнаружены гены, характерные для зеленых водорослей, включая гены киназ и белков-переносчиков, типичных для многоклеточных наземных растений. Близкое родство зеленых растений и представителей кластера Chromalveolata также подтверждает факт обнаружения одинаковых замен в пластидных генах (Nozaki *et al.*, 2009).

Несмотря на трудности классификации, нет сомнений в том, что бурые водоросли, наземные растения и животные разделились на раннем этапе эволюции эукариот. При этом бурые водоросли обладают многими метаболическими

особенностями, которые до настоящего времени в достаточной степени не изучены. Секвенирование генома первого представителя бурых водорослей – *E. siliculosus* позволило сделать большой шаг в эволюционных исследованиях, в том числе расширить представление о двух ключевых процессах, результаты которых послужили предпосылками возникновения высших форм жизни на Земле – становления многоклеточности и развития фотосинтеза. При этом в ходе истории планеты сложная многоклеточная форма жизни развивалась из одноклеточных организмов в пяти независимых направлениях эволюции: у животных, растений, грибов, красных и бурых водорослей.

В настоящее время ферменты CYP74 распространены, главным образом, среди сосудистых растений. В связи с этим многие исследователи считают липоксигеназный каскад эволюционным приобретением высших растений, а именно – печеночников (*Marchantiophyta*). Было высказано предположение, что появление липоксигеназного каскада связано с возникновением и развитием алленоксидсинтазного пути, который у покрытосеменных растений является источником важных сигнальных соединений – жасмонатов. Появление данных о присутствии у прокариот (протеобактерии) и животных (ланцетник, кораллы) (Lee *et al.*, 2008) оксипинов и ферментов, обладающих каталитическими свойствами и аминокислотными последовательностями, сходными с таковыми ферментов CYP74, привело к объединению всех этих ферментов (зачастую относящихся к разным семействам) в клан CYP74 (Nelson, 2006). При этом распространение данных ферментов за пределы наземных растений связывалось с событиями горизонтального переноса генов в эволюционной истории клана (Nelson, Werck-Reichhart, 2011; Nelson *et al.*, 2013). Было предложено два варианта обмена генетической информацией. По одной из версий перенос генов происходил от наземных растений к протеобактериям и затем от протеобактерий к морским животным (Nelson, Werck-Reichhart, 2011). По другому сценарию тех же авторов (Nelson *et al.*, 2013) наземные растения получили гены фер-

ментов CYP74 от морских животных посредством протеобактерий.

Обнаружение нами функционального фермента клана CYP74 у одного из видов бурых водорослей – морских организмов, которые представляют самостоятельную ветвь эволюции эукариот (Рис. 44), значительно уменьшает вероятность признания горизонтального переноса в качестве основного инструмента эволюции данного клана. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о древнем эволюционном происхождении ферментов CYP74.

Описанный фермент CYP5164B1 является первым CYP74-подобным ферментом бурых водорослей и вторым цитохромом P450, проявляющим эпоксиалкогольсинтазную активность. Ранее была описана единственная эпоксиалкогольсинтаза – фермент VfEAS (CYP440A1) клана CYP74 ланцетника (*B. floridae*) (Lee *et al.*, 2008). Механизмы каталитического действия EsEAS и VfEAS являются сходными. Ферментативная реакция идет следующим образом: (1) гомолиз гидроперекисной группы; (2) перегруппировка образующегося оксирадикала с образованием эпоксиаллильного радикала; (3) рекомбинация эпоксиаллильного радикала с гидроксильным радикалом, в результате чего образуется эпокиспирт (Рис. 31).

Соединения, содержащие оксиранил-карбинольную группу, подобные продукту каталитического действия EsEAS, образуются в результате превращений гидроперекисей жирных кислот, происходящих в присутствии кислот (Gardner *et al.*, 1984; Gardner *et al.*, 1984), ионов Fe^{3+} (Gardner, 1975) и гематина (Dix, Marnett, 1985). Эпокиспирты также образуются в качестве минорных продуктов при участии некоторых цитохромов P450, в частности, алленоксидсинтаз (Song *et al.*, 1993; Hughes *et al.*, 2008). Эти данные свидетельствуют о том, что превращение гидроперекисей происходит посредством гомолиза гидроперекисной группы, и эпоксиаллильный радикал является промежуточным продуктом всех ферментов клана CYP74. Превращение эпоксиаллильного радикала при участии разных типов ферментов CYP74 происходит по-разному. До

недавнего времени были известны три типа ферментов CYP74, а именно – АОС, ГПЛ, ДЭС. Фермент VfEAS ланцетника – первая ЭАС (Lee *et al.*, 2008), специфически продуцирующая эпокиспирты. EsEAS (CYP5164B1) – второй цитохром P450, обладающий специфической эпоксиалкогольсинтазной активностью (наряду с VfEAS). Фермент CYP5164B1 является, несомненно, филогенетически родственным клану CYP74, преимущественно ферментам метиловобактерий и животных. Вставка из 9 аминокислотных остатков в гем-связывающем домене и отсутствие кислород-связывающего домена также являются отличительными особенностями, объединяющими EsEAS и ферменты клана CYP74. Основные механистические особенности (формирование эпоксиаллильного радикала в качестве промежуточного продукта) также являются общими. Все полученные данные позволили нам классифицировать новый белок как CYP74-подобный фермент. На данный момент времени, это первый охарактеризованный рекомбинантный фермент, участвующий в биосинтезе оксипинонов у бурых водорослей.

На филогенетическом древе эпоксиалкогольсинтаза EsEAS *E. siliculosus* находится между ферментами семейства и клана CYP74 (Рис. 20). Ближе всего среди представителей клана CYP74 к EsEAS оказываются ферменты протеобактерий, что указывает на древнее расхождение ферментов CYP74 бурых водорослей с остальными представителями клана CYP74.

По всей вероятности, образование эпокиспиртов, но не жасмонатов, является наиболее архаичным вариантом липоксигеназного каскада. Полученные нами данные о продукции эпокиспиртов мутантными формами некоторых растительных ферментов CYP74 могут послужить примером возврата данных ферментов к базовому механизму катализа. С этой точки зрения возникновение алленоксидсинтаз, гидропероксидлиаз и дивинилэфирсинтаз у высших растений и развитие соответствующих сигнальных систем, в том числе интенсивно изучаемой жасмонат-зависимой сигнальной системы, следует рассматривать не как

первоначальное событие, а как совершенствование имеющегося древнего ферментативного инструмента. Хотя полностью физиологическая роль эпокиспиртов и их производных еще не ясна, не вызывает сомнения их древнее возникновение в окислительном метаболизме жирных кислот. Подтверждением этому может служить обнаружение у цианобактерий *Acaryochloris marina* наряду с окисью аллена (9*S*,10*S*,13*S*)-эпокиспиртов (Niisuke *et al.*, 2009). Образование данных продуктов связывают с активностью других гем-содержащих ферментов, относящихся к мини-каталазам.

Дальнейшие исследования помогут выяснить физиологическую роль липоксигеназного каскада у морских организмов и расширить представление о месте ферментов СYP74 в эволюционной истории цитохромов P450.

ВЫВОДЫ

1. В геноме *Ectocarpus siliculosus* выявлен ген, кодирующий фермент CYP5164B1, обладающий высокой степенью сходства с ферментами CYP74; на основе искусственно синтезированной последовательности, кодирующей фермент CYP5164B1 получен соответствующий очищенный рекомбинантный фермент.
2. Установлено, что предпочтительным субстратом рекомбинантного фермента CYP5164B1 является 9-гидроперекись линолевой кислоты, основным продуктом превращения которой является 9,10-эпокси-11-гидрокси-октадеценовая кислота, в основном, ее (9*S*,10*S*,11*S*)-эпимер с *транс*-эпоксидом. Фермент CYP5164B1 идентифицирован как 9-гидропероксид-специфичная эпоксиалкогольсинтаза. Новому ферменту присвоено тривиальное название EsEAS.
3. В талломах бурых водорослей *Saccharina cichorioides*, *Sargassum pallidum*, *Coccophora langsdorfii* и *Pilaella littoralis* выявлены линолевая кислота, эпокси-пирты (12,13-эпокси-11-гидрокси-9-октадеценовая (у всех видов) и 9,10-эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовая (у всех видов, кроме *S. pallidum*) кислоты) и три-гидрокси-кислоты, свидетельствующие о наличии эпоксиалкогольсинтазной активности, а также выявлено наличие 9-, 12- и 13-липоксигеназной активности.
4. По данным филогенетического анализа, а также структурным и механистическим особенностям фермент CYP5164B1 является представителем клана CYP74.
5. Для сравнительной характеристики свойств фермента CYP5164B1 были получены очищенные ферменты со сходной субстратной специфичностью: алленоксидсинтаза LeAOS3 (CYP74C3) томата (*Lycopersicon esculentum*) и дивинилэфирсинтаза NtDES (CYP74D3) табака обыкновенного (*Nicotiana tabacum*).
6. Методом биоинформационного анализа внутри консервативного каталитически важного домена выявлен сайт, в котором ферменты клана CYP74, ката-

лизирующие разные реакции, содержат несинонимичные аминокислотные остатки. Методом сайт-направленного мутагенеза получены мутантные формы фермента CYP5164B1 по данному сайту, а также мутантные формы алленоксидсинтазы LeAOS3 и дивинилэфирсинтазы NtDES. Охарактеризованы каталитические свойства полученных мутантов по сравнению с ферментами дикого типа.

7. Замены в последовательностях фермента CYP5164B1 C365F и C365V и алленоксидсинтазы LeAOS3 F391V и F391C не привели к изменениям типа каталитической активности. Результатом мутаций было снижение каталитической активности по сравнению с ферментом дикого типа.

8. В результате единичных мутаций в последовательности дивинилэфирсинтазы NtDES произошли изменения в механизме каталитического действия. Мутантная форма NtDES V379C катализирует образование продуктов алленоксидсинтазной, гидропероксидлиазной, дивинилэфирсинтазной и эпоксиалкогольсинтазной реакций. Мутантная форма NtDES V379F катализирует образование преимущественно продуктов алленоксидсинтазной реакции, а также следовые количества продуктов дивинилэфирсинтазной и гидропероксидлиазной реакции.

9. Установлено, что для каталитической активности фермента CYP5164B1 основное значение играет С-концевая, но не N-концевая последовательность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гловер, Д. Клонирование ДНК. Методы / Д. Гловер.– М.: Мир, 1988. – 538 с.
2. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
3. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – 288 с.
4. Adl, S.M. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists / S.M. Adl, A.G. Simpson, M.A. Farmer, R.A. Andersen, O.R. Anderson, J.R. Barta, S.S. Bowser, G. Brugerolle, R.A. Fensome, S.Q. Frederic, T.Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C.E. Lane, L.A. Lewis, J. Lodge, D.H. Lynn, D.G. Mann, R.M. McCourt, L. Mendoza, O. Moestrup, S.E. Mozley-Standridge, T.A. Nerad, C.A. Shearer, A.V. Smirnov, F.W. Spiegel, M.F. Taylor // J Eukaryot Microbiol. -2005. – Vol. 52. – N.5. – P. 399-451.
5. Andreou, A.Z. On the substrate binding of linoleate 9-lipoxygenases / A.Z. Andreou, E. Hornung, S. Kunze, S. Rosahl, I. Feussner // Lipids. – 2009. – Vol. 44. – N.3. - P. 207–215.
6. Andreou, A. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals / A. Andreou, F. Brodhun, I. Feussner // Prog Lipid Res. – 2009. – Vol. 48. – N.3-4. - P. 148-170.
7. Arnold, T.M. Evidence for methyl jasmonate-induced phlorotannin production in *Fucus vesticulosus* (*Phaeophyceae*) / T.M. Arnold, N.M. Targett, C.E. Tanner, W.I. Hatch, K.E. Ferrari // J Phycol. – 2001. – Vol. 37. – P. 1026-1029.
8. Aslund, F. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status / F. Aslund, M. Zheng, J. Beckwith, G. Storz // Proc Natl Acad Sci USA. – 1999. – Vol. 96 – N.11. – P. 6161-6165.

9. Bak, S. Cytochromes P450 / S. Bak, F. Beisson, G. Bishop, B. Hamberger, R. Höfer, S. Paquette, D. Werck-Reichhart // *Arabidopsis Book*. – 2011. – doi: 10.1199/tab.0144.
10. Baldauf, S.L. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data / S.L. Baldauf, A.J. Roger, I. Wenk-Siefert, W.F. Doolittle // *Science*. – 2000. – Vol. 290. – N.5493. – P. 972-977.
11. Barbosa, M. Biologically active oxylipins from enzymatic and nonenzymatic routes in macroalgae / M. Barbosa, P. Valentão, P.B. Andrade // *Mar. Drugs*. - 2016. - Vol. 14– N.1. - P. 23.
12. Berger, F. Cell fate determination by the cell wall in early *Fucus* development / F. Berger, A. Taylor, C. Brownlee // *Science*. – 1994. – Vol. 263. – N.5152. – P. 1421-1423.
13. Bernart, M.W. Unprecedented oxylipins from the marine green alga *Acrosiphonia coalita* / M.W. Bernart, G.G. Whatley, W.H. Gerwick // *J Nat Prod*. - 1993. - Vol. 56. – N.2. - P. 245-259.
14. Bernart, M.W. Eicosanoids from the tropical red alga *Murrayella pericladus* / M.W. Bernart, W.H. Gerwick // *Phytochemistry*. - 1994. - Vol. 36. – N.5. - P. 1233-1240.
15. Bernhardt, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts / *J Biotechnol*. – 2006. - Vol. 124. – N.1. – P. 128-45.
16. Blee, E. Phytooxylipins and plant defense reactions / *Prog Lipid Res*. – 1998a. – Vol. 37. – N.1. – P. 33–72.
17. Blee, E. Biosynthesis of phytooxylipins: the peroxygenase pathway / *Fett-Lipid*. – 1998b. – Vol. 100. – N.4-5. – P. 121-127.
18. Blee, E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense / *Trends Plant Sci*. – 2002. – Vol. 7. – N.7. – P. 315-322.

19. Boonprab, K. C6-Aldehyde formation by fatty acid hydroperoxide lyase in the brown alga *Laminaria angustata* / K. Boonprab, K. Matsui, M. Yoshida, Y. Akakabe, A. Chirapart, T. Kajiwara // *Z Naturforsch.* – 2003a. – Vol. 58. – N.3-4. – P. 207–214.
20. Boonprab, K. Hydroperoxyarachidonic acid mediated n-hexanal and (*Z*)-3- and (*E*)-2-nonenal formation in *Laminaria angustata* / K. Boonprab, K. Matsui, Y. Akakabe, N. Yotsukura, T. Kajiwara // *Phytochemistry.* – 2003b. – Vol. 63. – N.6. – P. 669–678.
21. Bornhorst, J.A. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags / J.A. Bornhorst, J.J. Falke // *Methods Enzymol.* - 2000. - Vol. 326. - P. 245-254.
22. Bouget, F.Y. Position dependent control of cell fate in the *Fucus* embryo: role of intercellular communication / F.Y. Bouget, F. Berger, C. Brownlee // *Development.* – 1998. – Vol. 125. – N.11. – P. 1999-2008.
23. Brash, A.R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate / *J Biol Chem.* – 1999. – Vol. 274. – N.34. – P. 23679–23682.
24. Brash, A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes / *Phytochemistry.* - 2009. - Vol. 70. – N.13-14. - P. 1522-1531.
25. Brownlee, C. Choosing sides: establishment of polarity in zygotes of fucoid algae / C. Brownlee, F.Y. Bouget, F. Corellou // *Semin Cell Dev Biol.* – 2001. – Vol. 12. – N.5. – P. 345-351.
26. Browse, J. Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants / *Vitam Horm.* – 2005. – Vol. 72. – P. 431–456.
27. Bryant, R.W. Isolation of a new lipoxygenase metabolite of arachidonic acid 8,11,12-trihydroxy-5,9,14-eicosatrienoic acid from human platelets / R.W. Bryant, J.M. Bailey // *Prostaglandins.* – 1979. – Vol. 17. – N.1. – P. 9-18.
28. Caldelari, D. A rapid assay for the coupled cell free generation of oxylipins / E. Farmer // *Phytochemistry.* – 1998. – Vol. 47. – N.14. – P. 599-604.

29. Chechetkin, I.R. A lipoxygenase-divinyl ether synthase pathway in flax (*Linum usitatissimum* L.) leaves / I.R. Chechetkin, A. Blufard, M. Hamberg, A.N. Grechkin // *Phytochemistry*. – 2008. – Vol. 69. – N.10. – P. 2008-2015.
30. Choi, H.G. Inhibition of prostaglandin D2 production by trihydroxy fatty acids isolated from *Ulmus davidiana* var. *japonica* / H.G. Choi, Y.M. Park, Y. Lu, H.W. Chang, M.K. Na, S.H. Lee // *Phytother. Res.* – 2012. – Vol. 27. – N.9. - P. 1376-1380.
31. Choi, H. Cymatherelactone and cymatherols A–C, polycyclic oxylipins from the marine brown alga *Cymathere triplicate* / H. Choi, P.J. Proteau, T. Byrum, W.H. Gerwick // *Phytochemistry*. - 2012. – Vol. 73. – N.1. - P. 134-141.
32. Cock, J.M. The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae / J.M. Cock, L. Sterck, P. Rouze, D. Scornet, A.E. Allen, G. Amoutzias, V. Anthouard, F. Artiguenave, J.M. Aury, J.H. Badger, B. Beszteri, K. Billiau, E. Bonnet, J.H. Bothwell, C. Bowler, C. Boyen, C. Brownlee, C.J. Carrano, B. Charrier, G.Y. Cho, S.M. Coelho, J. Collen, E. Corre, C. Da Silva, L. Delage, N. Delaroque, S.M. Dittami, S. Doulbeau, M. Elias, G. Farnham, C.M. Gachon, B. Gschloessl, S. Heesch, K. Jabbari, C. Jubin, H. Kawai, K. Kimura, B. Kloareg, F.C. Kupper, D. Lang, A. Le Bail, C. Leblanc, P. Lerouge, M. Lohr, P.J. Lopez, C. Martens, F. Maumus, G. Michel, D. Miranda-Saavedra, J. Morales, H. Moreau, T. Motomura, C. Nagasato, C.A. Napoli, D.R. Nelson, P. Nyvall-Collen, A.F. Peters, C. Pommier, P. Potin, J. Poulain, H. Quesneville, B. Read, S.A. Rensing, A. Ritter, S. Rousvoal, M. Samanta, G. Samson, D.C. Schroeder, B. Segurens, M. Strittmatter, T. Tonon, J.W. Tregear, K. Valentin, P. von Dassow, T. Yamagishi, Y. Van de Peer, P. Wincker // *Nature*. – 2010. – Vol. 465. – P. 617-621.
33. Coelho, S.M. Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca(2+) wave propagation in *Fucus* rhizoid cells / S.M. Coelho, A.R. Taylor, K.P. Ryan, I. Sousa-Pinto, M.T. Brown, C. Brownlee // *Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14. – N.10. – P. 2369-2381.

34. Corellou, F. A S/M DNA replication checkpoint prevents nuclear and cytoplasmic events of cell division including centrosomal axis alignment and inhibits activation of cyclin-dependent kinase-like proteins in fucoid zygotes / F. Corellou, S. R. Bisgrove, D.L. Kropf, L. Meijer, B. Kloareg, F.Y. Bouget // *Development*. - 2000. – Vol. 127. – N.8. – P. 1651-1660.
35. Corellou, F. Cell cycle-dependent control of polarised development by a cyclin-dependent kinase-like protein in the *Fucus* zygote / F. Corellou, C Brownlee, B. Kloareg, F.Y. Bouget // *Development*. – 2001. Vol. 128. – N.21. - P. 4383-4392.
36. Cowley, T. Local and systemic effects of oxylipins on powdery mildew infection in barley / T. Cowley, D. Walters // *Pest Management Science*. – 2005. – Vol. 61. – N.6. – P. 572-576.
37. Cristea, M. A G316A mutation of manganese lipoxygenase augments hydroperoxide isomerase activity: mechanism of biosynthesis of epoxyalcohols / M. Cristea, E.H. Oliw // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – N.26. – P. 17612-17623.
38. Crombie, L. The enzymic formation of colneleic acid, a divinyl ether fatty acid: experiments with [(9*S*)-¹⁸O₂]hydroperoxyoctadeca-(10*E*),(12*Z*)-dienoic acid / L. Crombie, D.O. Morgan, E.H. Smith // *J Chem Soc Chem Commun*. – 1987. - P. 503-504.
39. Crombie, L. An isotopic study (²H and ¹⁸O) of the enzymic conversion of linoleic acid into colneleic acid with carbon chain fracture: the origin of shorter chain aldehydes / L. Crombie, D.O. Morgan, E.H. Smith // *J Chem Soc Perkin Trans*. – 1991. – Vol. 1. – N.3. – P. 567-575.
40. Croteau, R. Biosynthesis of hydroxyfatty acid polymers: Enzymatic epoxidation of 18-hydroxyoleic acid to 18-hydroxy-*cis*-9,10-epoxystearic acid by a particulate preparation from spinach (*Spinacia oleracea*) / R. Croteau, P.E. Kolattukudy // *Arch Biochem Biophys*. – 1975. – Vol. 170. – P. 61-72.

41. D'Alessandro, M. Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods / M. D'Alessandro, T.C. Turlings // *Analyst*. – 2006. – Vol. 131. – N.1. – P. 24-32.
42. Dawis, R.H. The age of model organisms / *Nat Rev Genet*. – 2004. – Vol. 5. – N.1. – P. 69–75.
43. De Franco, P. Whole genome survey of the glutathione transferase family in the brown algal model *Ectocarpus siliculosus* / P. De Franco, S. Rousvoal, T. Tonon, C. Boyen // *Marine Genomics*. - 2009. – Vol. 1. – N.3-4. – P. 135-148.
44. Delaroque, N. The complete DNA sequence of the *Ectocarpus siliculosus* virus EsV-1 genome / N. Delaroque, D.G. Müller, G. Bothe, T. Pohl, R. Knippers, W. Bolland // *Virology*. – 2001. – Vol. 287. – N.1. – P. 112-132.
45. De Vetten, N. A cytochrome *b5* is required for full activity of flavonoid 3',5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors / N. De Vetten, J. Ter Horst, H.P. Van Schaik, A. De Boer, J. Mol, R. Koes // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1999. – Vol. 96. – N.2. – P. 778-783.
46. Di Venere, A. Structure-to-function relationship of mini-lipoxygenase, a 60-kDa fragment of soybean lipoxygenase-1 with lower stability but higher enzymatic activity / A. Di Venere, M.L. Salucci, G. van Zadelhoff, G. Veldink, G. Mei, N. Rosato, A. Finazzi-Agrò, M. Maccarrone // *J Biol Chem*. – 2003. – Vol. 278. – N.20. – P. 18281-18288.
47. Dittami, S.M. Global expression analysis of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) reveals large-scale reprogramming of the transcriptome in response to abiotic stress / S.M. Dittami, D. Scornet, J.L. Petit, B. Ségurens, C. Da Silva, E. Corre, M. Dondrup, K.H. Glatting, R. König, L. Sterck, P. Rouzé, Y. Van de Peer, J.M. Cock, C. Boyen, T. Tonon // *Genome Biol*. – 2009. – Vol. 10. – N.6. – P. 1-20.

48. Dix, T.A. Conversion of linoleic acid hydroperoxide to hydroxy, keto, epoxy-hydroxy, and trihydroxy fatty acids by hematin / T.A. Dix, L.J. Marnett // *J Biol Chem.* - 1985. - Vol. 260. – N.9. - P. 5351-5357.
49. Draisma, S.G.A. Evolution and taxonomy in the Phaeophyceae: effects of the molecular age on brown algal systematics / S.G.A. Draisma, A.F. Peters, R.L. Fletcher // *The British Phycological Society.* – 2003. - P. 87-102.
50. Durst, F. Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases / F. Durst, D. R. Nelson // *Drug Metab Drug Interact.* – 1995. – Vol. 12. – N.3-4. – P. 189-206.
51. Engelberth, J. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack / J. Engelberth, H.T. Alborn, E.A. Schmelz, J.H. Tumlinson // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. - Vol. 101. – N.6. – P. 1781-1785.
52. Eschen-Lippold, L. Reduction of divinyl ether-containing polyunsaturated fatty acids in transgenic potato plants / L. Eschen-Lippold, G. Rothe, M. Stumpe, C. Göbel, I. Feussner, S. Rosahl // *Phytochemistry.* – 2007. – Vol. 68. – N.6. – P. 797–801.
53. Espelie, K.E. Composition of lipid-derived polymers from different anatomical regions of several plant species / K.E. Espelie, B.B. Dean, P.E. Kolattukudy // *Plant Physiol.* – 1979. – Vol. 64. – N.6. – P. 1089-1093.
54. Falardeau, P. Metabolism of 8,11,14-eicosatrienoic acid in human platelets / P. Falardeau, M. Hamberg, B. Samuelsson // *Biochim Biophys Acta.* – 1976. – Vol. 441. – N.2. – P. 193-200.
55. Fammartino, A. Characterisation of a divinyl ether biosynthetic pathway specifically associated with pathogenesis in *Nicotiana tabacum* / A. Fammartino, F. Cardinale, C. Göbel, L. Mène-Saffrané, J. Fournier, I. Feussner, M.T. Esquerré-Tugayé // *Plant Physiol.* – 2007. – Vol. 143. – N.1. – P. 378-388.
56. Farmer, E.E. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves / E.E. Farmer, C.A. Ryan // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1990. – Vol. 87. – N.19. – P. 7713–7716.

57. Fatouros, N.E. Herbivore-induced plant volatiles mediate in-flight host discrimination by parasitoids / N.E. Fatouros, J.J. van Loon, K.A. Hordijk, H.M. Smid, M. Dicke // *J Chem Ecol.* – 2005 . – Vol. 31. – N.9. – P. 2033-2047.
58. Feussner, I. The lipoxygenase pathway / I. Feussner, C. Wasternack // *Annu Rev Plant Biol.* – 2002. – Vol. 53. – P. 275–297.
59. Feyereisen, R. Arthropod CYPomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution / *Biochim Biophys Acta.* – 2011. – Vol. 1814. – N.1. – P. 19-28.
60. Feyereisen, R. Insect CYP genes and P450 enzymes. *Insect Molecular Biology and Biochemistry* / R. Feyereisen. - Elsevier, London, 2012. – P. 236–316.
61. Fontana, A. LOX-induced lipid peroxidation mechanism responsible for the detrimental effect of marine diatoms on zooplankton grazers / A. Fontana, G. d’Ippolito, A. Cutignano, G. Romano, N. Lamari, A. Massa Gallucci, G. Cimino, A. Miralto, A. Ianora // *Chem Bio Chem.* – 2007. – Vol. 8. – N.15. – P. 1810-1818.
62. Froehlich, J.E. Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope / J.E. Froehlich, A. Itoh, G.A. Howe // *Plant Physiol.* – 2001. – Vol. 125. – N.1. - P. 306–317.
63. Galliard, T. The enzymic conversion of linoleic acid into 9-(nona-1',3'-dienoxy)non-8-enoic acid, a novel unsaturated ether derivative isolated from homogenates of *Solanum tuberosum* tubers./ T. Galliard, D.R. Phillips, // *Biochem J.* – 1972. – Vol. 129. – N.3. – P. 743-753.
64. Galliard, T. Novel divinyl ether fatty acids in extracts of *Solanum tuberosum* / T. Galliard, D.R. Phillips, // *Chem Phys Lipids.* – 1973. – Vol. 11. – N.3. – P. 173-180.
65. Galliard, T. The enzymic and non-enzymic degradation of colneleic acid, an unsaturated fatty acid ether intermediate in the lipoxygenase pathway of linoleic acid oxidation in potato (*Solanum tuberosum*) tubers / T. Galliard, D.A. Wardale, J.A. Mathew // *Biochem J.* – 1974. – Vol. 138. – N.1. – P. 23-31.

66. Galliard, T. Enzymic reactions of fatty acid hydroperoxides in extracts of potato tuber. I. Comparison 9 D and 13 L hydroperoxy octadecadienoic acids as substrates for the formation of a divinyl ether derivative / T. Galliard, J.A. Mathew // *Biochim Biophys Acta*. – 1975. – Vol. 398. – N.1. – P. 1-9.
67. Galliard, T. *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, vol. 4, Lipids: Structure and Function / T. Galliard, H.W.-S. Chan., P.K. Stumpf, E.E. Conn // Academic Press, New York, NY. – 1980. - P. 131-161.
68. Gao, J.M. A new trihydroxy fatty acid from the ascomycete, Chinese truffle *Tuber indicum* / J.M. Gao, C.Y. Wang, A.L. Zhang, J.K. Liu // *Lipids*. – 2001. – Vol. 36. – N.12. – P. 1365-1370.
69. Gardner, H.W. Positional specificity of γ -ketol formation from linoleic acid hydroperoxides by a corn germ enzyme / H.W. Gardner, R. Kleiman, D.O. Christianson, D. Weisleder // Reprinted from *Lipids*. – 1975. – Vol. 10. – N.10. – P. 602-608.
70. Gardner, H.W. Decomposition of linoleic acid hydroperoxides. Enzymic reactions compared with nonenzymic / *J Agr Food Chem*. - 1975. - Vol. 23. – N.2. - P. 129-136.
71. Gardner, H.W. Lipid enzymes: Lipases, lipoxygenases and hydroperoxides, in *Autoxidation in Food and Biological Systems* / M.G. Simic, M. Karel // New York Plenum Press. – 1980. – P. 447-504.
72. Gardner, H.W. Linoleate hydroperoxides are cleaved heterolytically into aldehydes by a Lewis acid in aprotic solvent / H.W. Gardner, R.D. Plattner // *Lipids*. – 1984. – V. 19. – P. 294 – 299.
73. Gardner, H.W. Acid-catalyzed transformation of 13(S)-hydroperoxylinoleic acid into epoxyhydroxyoctadecenoic and trihydroxyoctadecenoic acids / H.W. Gardner, E.C. Nelson, L.W. Tjarks, R.E. England // *Chem Phys Lipids*. 1984. – Vol. 35. – N.2. – P. 87-101.

74. Gardner, H.W. Lipoxygenase pathway in cereals. *Advances in Cereal Science and Technology* / H.W. Gardner - Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, MN, 1988. – P. 161-215.
75. Gardner, H.W. Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants / *Biochim Biophys Acta*. – 1991. – Vol. 1084. – N.3. – P. 221–239.
76. Gerwick, W.H. Structure and biosynthesis of marine algal oxylipins / *Biochim Biophys Acta*. – 1994. – Vol. 1211. – N.3. – P. 243-255.
77. Gerwick, W.H. Epoxy allylic carbocations as conceptual intermediates in the biogenesis of diverse marine oxylipins / *Lipids*. - 1996. - Vol. 31. – N.12. - P. 1215-1231.
78. Gerwick, W.H. Biogenesis and biological function of marine algal oxylipins / W.H. Gerwick, M.A. Roberts, A. Vulpanovici, D.L. Ballantine // *Adv Exp Med Biol*. - 1999. - Vol. 447. - P. 211-218.
79. Göbel, C. Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells / C. Göbel, I. Feussner, A. Schmidt, D. Scheel, J. Sanchez-Serrano, M. Hamberg, S. Rosahl // *J Biol Chem*. – 2001. – Vol. 276. – N.9. – P. 6267-6273.
80. Göbel, C. Oxylipin profiling in pathogen infected potato leaves / C. Göbel, I. Feussner, M. Hamberg, S. Rosahl // *BBA-Mol Cell Biol L*. – 2002. – Vol. 1584. – N.1. – P. 55-64.
81. Gogolev, Y.V. Green leaf divinyl ether synthase: Gene detection, molecular cloning and identification of a unique CYP74B subfamily member / Y.V. Gogolev, S.S. Gorina, N.E. Gogoleva, Y.Y. Toporkova, I.R. Chechetkin, A.N. Grechkin // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol. 1821. – N.2. – P. 287–294.
82. Gorina, S.S. Detection and molecular cloning of CYP74Q1 gene: identification of *Ranunculus acris* leaf divinyl ether synthase / S.S. Gorina, Y.Y. Toporkova, L.S. Mukhtarova, I.R. Chechetkin I.R., B.I. Khairutdinov, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // *Biochim Biophys Acta*. – 2014. – Vol. 1841. – N.9. – P. 1227-1233.

83. Gorina, S.S. 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, E.O. Smirnova, I.R. Chechetkin, B.I. Khairutdinov, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // *Biochim Biophys Acta*. - 2016. - Vol. 1861. – N.4. - P. 301-309.
84. Gosse-Kobo, B. Total synthesis of unsaturated trihydroxy C-18 fatty acids / B. Gosse-Kobo, P. Mosset, R. Gree // *Tetrahedron Letters*. – 1989. – Vol. 30. – N.32. – P. 4235-4236.
85. 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. – N.1. – P. 83-90.
86. Graça, J. Diglycerol alkenedioates in suberin: building units of a poly(acylglycerol) polyester / J. Graça, H. Pereira // *Biomacromolecules*. – 2000. – Vol. 1. – N.4. – P. 519-522.
87. Graham, S.E. How similar are P450s and what can their differences teach us / S.E. Graham, J.A. Peterson // *Arch Biophys Biochem*. – 1999. – Vol. 369. – N.1. – P. 24-29.
88. Graner, G. Screening of oxylin for control of oilseed rape (*Brassica napus*) fungal pathogens / G. Graner, M. Hamberg, J. Meijer // *Phytochemistry*. – 2003. – Vol. 63. – N.1. – P. 89–95.
89. Graveland, A. Enzymatic oxidations of linoleic acid and glycerol-1-monolinoleate in doughs and flour-water suspensions / *J Am Oil Chem Soc*. – 1970. – Vol. 47. – N.9. – P. 352-361.
90. Grechkin, A.N. Divinyl ether synthase from garlic (*Allium sativum* L.) bulbs: sub-cellular localization and substrate regio-and stereospecificity / A.N. Grechkin, M. Hamberg // *FEBS Letters*. – 1996a. – Vol. 388. – N.2-3. – P. 112-114.

91. Grechkin, A.N. On the mechanism of biosynthesis of divinyl ether oxylipins by enzyme from garlic bulbs / A.N. Grechkin, A.V. Ilyasov, M. Hamberg // *Eur J Biochem.* – 1997. – Vol. 245. – N.1. – P. 137-142.
92. Grechkin, A.N. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway / *Prog Lipid Res.* – 1998. - Vol. 37. – N.5. – P. 317–352.
93. Grechkin, A.N. The lipoxygenase pathway in tulip (*Tulipa gesneriana*): detection of the ketol route / A.N. Grechkin, L.S. Mukhtarova, M. Hamberg // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 352. – N.2. – P. 501-509.
94. Grechkin, A.N. Hydroperoxide lyase and divinyl ether synthase / *Prostaglandins & Other Lipid Mediators.* – 2002. – Vol. 68–69. – P. 457–470.
95. Grechkin, A.N. The “heterolytic hydroperoxide lyase” is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal / A.N. Grechkin, M. Hamberg // *Biochim Biophys Acta.* - 2004. - Vol. 1636. – N.1. - P. 47-58.
96. Grechkin, A.N. Hydroperoxide lyases (CYP74C and CYP74B) catalyze the homolytic isomerization of fatty acid hydroperoxides into hemiacetals / A.N. Grechkin, F. Brühlmann, L.S. Mukhtarova, Y.V. Gogolev, M. Hamberg // *Biochim Biophys Acta.* – 2006. – Vol. 1761. – N.12. – P. 1419-1428.
97. Grechkin, A.N. Tomato CYP74C3 is a multifunctional enzyme not only synthesizing allene oxide but also catalyzing its hydrolysis and cyclization / A.N. Grechkin, L.S. Mukhtarova, L.R. Latypova, Y.V. Gogolev, Y.Y. Toporkova, M. Hamberg // *Chem Bio Chem.* – 2008. – Vol. 9. – N.15. – P. 2498–2505.
98. Grodberg, J. Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the ompT gene of *Escherichia coli* K-12 / J. Grodberg, M.D. Lundrigan, D.L. Toledo, W.F. Mangel, J.J. Dunn // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – Vol. 16. – N.3. – P. 1209.
99. Gullner, G. Up-regulated expression of lipoxygenase and divinyl ether synthase genes in pepper leaves inoculated with Tobamoviruses / G. Gullner, A. Kunstler, L. Kiraly, M. Pogany, I. Tobias // *Physiological and Molecular Plant Pathology.* – 2010.

– Vol. 74. – N.5-6. – P. 387-393.

100. Hamberg, M. Isolation and structure of lipoxygenase from *Saprolegnia parasitica* / *Biochemica et Biophysica Acta*. – 1986. – Vol. 876. – N.3. – P. 688-692.

101. Hamberg, M. Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism / M. Hamberg, P. Fahlstadius // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1990. – Vol. 276. – N.2. – P. 518–526.

102. Hamberg, M. Oxylin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance / Hamberg M., Gardner H.W. // *Biochim Biophys Acta*. – 1992. – Vol. 1165. – N.1. - P. 1–18.

103. Hamberg, M. Peroxygenase-catalyzed fatty acid epoxidation in cereal seeds (sequential oxidation of linoleic acid into 9(*S*),12(*S*),13(*S*)-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid) / M. Hamberg, G. Hamberg // *Plant Physiol*. – 1996. – Vol. 110. – N.3. – P. 807-815.

104. Hamberg, M. A pathway for biosynthesis of divinyl ether fatty acids in greenleaves / *Lipids*. – 1998. – Vol. 33. – N.11. – P. 1061–1071.

105. Hamberg, M. An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylin in leaves of potato / *Lipids*. – 1999. – Vol. 34. – N.11. – P. 1131–1142.

106. Hamberg, M. New cyclopentenone fatty acids formed from linoleic and linolenic acids in potato / *Lipids*. – 2000. – Vol. 35. – N.4. – P. 353-363.

107. Hamberg, M. Biosynthesis of new divinyl ether oxylin in *Ranunculus* plants / *Lipids*. - 2002. - Vol. 37. – N.4. - P. 427-433.

108. Hamberg, M. Isolation and structures of two divinyl ether fatty acids from *Clematis vitalba* / *Lipids*. – 2004. – Vol. 39. – N.6. – P. 565–569.

109. Hamberg, M. Efficient and specific conversion of 9-lipoxygenase hydroperoxides in the beetroot. Formation of pinellic acid. / M. Hamberg, U. Olsson // *Lipids*. – 2011. – Vol. 46. – N.9. – P. 873-878.

110. Hannemann, F. Cytochrome P450 systems – biological variations of electron transport chains / F. Hannemann, A. Bichet, K. M. Ewen, R. Bernhardt // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. – 2007. – Vol. 1770. – N.3. – P. 330-344.
111. Harper, J.T. On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes / J.T. Harper, E. Waanders, P.J. Keeling // *Int J Syst Evol Microbiol*. - 2005. - Vol. 55. – N.1. - P. 487-496.
112. Hatanaka, A. Oxygen incorporation in cleavage of 18O-labeled 13-hydroperoxylinoleyl alcohol into 12- hydroxy-(3Z)-dodecenal in tea chloroplasts / A. Hatanaka, T. Kajiwara, J. Sekiya, H. Toyota // *Z. Naturforsch.* – 1986. – Vol. 41. – N.3. – P. 359 – 362.
113. Hatanaka, A. The biogenesis of green odour by green leaves / *Phytochemistry*. – 1993. – Vol. 34. – P. 1201 – 1218.
114. Hengen, P. Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli* / *Trends in Biochemical Sciences*. - 1995. - Vol. 20. – N.7. - P. 285–286.
115. Herman, R.P. Properties of the soluble arachidonic acid 15-lipoxygenase and 15-hydroperoxide isomerase from the oomycete *Saprolegnia parasitica* / R.P. Herman, M. Hamberg // *Prostaglandins*. – 1987. – Vol. 34. – N.1. – P. 129-139.
116. Hoffmann, I. Expression of fusion proteins of *Aspergillus terreus* reveals a novel allene oxide synthase / I. Hoffmann, F. Jernerren, E.H. Oliw // *J Biol Chem*. – 2013. – Vol. 288. – N.16. – P. 11459-11469.
117. Hou, C.T. A novel compound, 12,13,17-trihydroxy-9(Z)-octadecenoic acid, from linoleic acid by a new microbial isolate *Clavibacter* sp. ALA2. / *JAOCS*. – 1996. – Vol. 73. – N.11. – P. 1359-1362.
118. Hou, T. Effect of environmental factors on the production of oxygenated unsaturated fatty acids from linoleic acids by *Bacillus megaterium* ALA2 / *Appl Microbiol Biotechnol*. - 2005. - Vol. 69. – N.14. - P. 463-468.

119. Howe, G.A. Oxylipin metabolism in response to stress / G.A. Howe, A.L. Schillmiller // *Curr Opin Plant Biol.* – 2002. – Vol. 5. – N.3. – P. 230-236.
120. Howe, G.A. Plant immunity to insect herbivores / G.A. Howe, G. Jander // *Annu Rev Plant Biol.* – 2008. – Vol. 59. – P. 41–66.
121. Hughes, R.K. Evidence for communality in the primary determinants of CYP74 catalysis and of structural similarities between CYP74 and classical mammalian P450 enzymes / R.K. Hughes, F.K. Yousafzai, R. Ashton, I.R. Chechetkin, S.A. Fairhurst, M. Hamberg, R. Casey // *Proteins.* - 2008. - Vol. 72. – N.4. - P. 1199-1211.
122. Hughes, R.K. Plant cytochrome CYP74 family: biochemical features, endocellular localisation, activation mechanism in plant defence and improvements for industrial applications / R.K. Hughes, S. De Domenico, A. Santino // *Chembiochem.* – 2009. – Vol. 10. – N.7. – P. 1122-1133.
123. Inoue, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids / H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama // *Gene.* - 1990. - Vol. 96. – N.1. - P. 23-28.
124. Itoh, A. Molecular cloning of a divinyl ether synthase. Identification as a CYP74 cytochrome P-450 / A. Itoh, G.A. Howe // *J Biol Chem.* - 2001. - Vol. 276. – N.5. - P. 3620-3627.
125. Itoh, A. Identification of a jasmonate-regulated allene oxide synthase that metabolizes 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids / A. Itoh, A.L. Schillmiller, B.C. McCaig, G.A. Howe // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277. – N.48. – P. 46051-46058.
126. Ivanova, V. Fatty acid composition of Black Sea *Ulva rigida* and *Cystoseira crinite* / V. Ivanova, M. Stancheva, D. Petrova // *Bulg J Agric Sci.* - 2013. - Vol. 1. - P. 42-47.
127. Jamieson, G.R. The component fatty acids of some marine algal lipids / G.R. Jamieson, E.H. Reid // *Phytochemistry.* - 1972. - Vol. 11. – N.4. - P. 1423-1432.

128. Jiang, Z.D. Novel oxylipins from the temperate red alga *Polyneura latissima*: evidence for an arachidonate 9(*S*)-lipoxygenase / Z.D. Jiang, W.H. Gerwick // *Lipids*. – 1997. – Vol. 32. – N.3. – P. 231-235.
129. Jin, J. 8*R*-lipoxygenase-catalyzed synthesis of a prominent *cis*-epoxyalcohol from dihomogamma-linolenic acid: a distinctive transformation compared with *S*-lipoxygenases / J. Jin, W.E. Boeglin, J.K. Cha, A.R. Brash // *Journal of Lipid Research*. – 2012. – Vol. 53. – N.2. – P. 292-299.
130. Jones, R.L. The identification of trihydroxyeicosatrienoic acids as products from the incubation of arachidonic acid with washed blood platelets / R.L. Jones, P.J. Kerry, N.L. Poyser, I.C. Walker, N.H. Wilson // *Prostaglandins*. – 1978. – Vol. 16. – N.4. – P. 583-589.
131. Kato, T. Structures and synthesis of unsaturated trihydroxy C18 fatty acids in rice plant suffering from rice blast disease / T. Kato, Y. Yamaguchi, N. Abe, T. Ueyehara, T. Namai, M. Kodama, Y. Shiobara // *Tetrahedron Letters*. – 1985. – Vol. 26. – P. 2357-2360.
132. Kato, T. Structural elucidation of naturally occurring 9,12,13-trihydroxy fatty acids by a synthetic study / T. Kato, Y. Yamaguchi, T. Hirukawa, N. Hoshino // *Agricultural Biological Chemistry*. – 1991. – Vol. 55. – N.5. – P. 1349-1357.
133. Kazan, K. Jasmonate signaling: toward an integrated view / K. Kazan, J.M. Manners // *Plant Physiol.* - 2008. - Vol. 146. – N.4. - P. 1459-1468.
134. Kelly, D.E. The CYPome (Cytochrome P450 complement) of *Aspergillus nidulans* / D.E. Kelly, N. Krasevec, J. Mullins, D.R. Nelson // *Fungal Genetics and Biology*. – 2009. – Vol. 46. – N.1. – P. 53-61.
135. Kemper, B. Structural basis for the role in protein folding of conserved proline-rich regions in cytochromes P450 / *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2004. – Vol. 199. – N.3. – P. 305-315.

136. Khotimchenko, S.V. Fatty acids of marine algae from the Pacific coast of North California / S.V. Khotimchenko, V.E. Vaskovsky, T.V. Titlyanova // *Botanica Marina*. – 2002. – Vol. 45. – P. 17-22.
137. Kim, H. Production of isomeric 9,10,13 (9,12,13)-trihydroxy-11E(10E)-octadecenoic acid from linoleic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR31 / H. Kim, H.W. Gardner, C.T. Hou // *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. – 2000. – Vol. 25. – N.2. – P. 109-115.
138. Kim, I. Partial purification and properties of a hydroperoxide lyase from fruits of pear / I. Kim, W. Grosch // *J Agric Food Chem*. – 1981. – Vol. 29. – N.6. – P. 1220-1225.
139. Kishimoto, K. Components of C6-aldehyde-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against a necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea* / K. Kishimoto, K. Matsui, R. Ozawa, J. Takabayashi // *Plant Sci*. – 2006. – Vol. 170. – N.4. - P. 715–723.
140. Koeduka, T. Biochemical characterization of allene oxide synthases from the liverwort *Marchantia polymorpha* and green microalgae *Klebsormidium flaccidum* provides insight into the evolutionary divergence of the plant CYP74 family / T. Koeduka, K. Ishizaki, C.M. Mwenda, K. Hori, Y. Sasaki-Sekimoto, H. Ohta, T. Kohchi, K. Matsui // *Planta*. - 2015. - Vol. 242. – N.5. - P. 1175-1186.
141. Kousaka, K. Novel oxylipin metabolites from the brown alga *Eisenia bicyclis* / K. Kousaka, N. Ogi, Y. Akazawa, M. Fujieda, Y. Yamamoto, Y. Takada, J. Kimura // *J Nat Prod*. – 2003. – Vol. 66. –N.10. – P. 1318–1323.
142. Küpper, F.C. Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata* / F. C. Küpper, B. Kloareg, J. Guern, P. Potin // *Plant Physiol*. – 2001. – Vol. 125. – N.1. – P. 278-291.
143. Küpper, F.C. Free fatty acids and methyl jasmonate trigger defense reactions in *Laminaria digitata* / F.C. Küpper, E. Gaquerel, A. Cosse, F. Adas, A.F. Peters, D.G.

- Müller, B. Kloareg, J.-P. Salaün, P. Potin // *Plant Cell Physiol.* - 2009. - Vol. 50. – N.4. - P. 789-800.
144. Kurata, K. Ecklonialactones-C-F from the brown alga *Ecklonia stolonifera* / K. Kurata, K. Taniguchi, K. Shiraishi, M. Suzuki // *Phytochemistry.* – 1989. – Vol. 33. – N.1. – P. 155–159.
145. La Camera, S. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways / S. La Camera, G. Gouzerh, S. Dhondt, L. Hoffmann, B. Fritig, M. Legrand, T. Heitz // *Immunol Rev.* – 2004. – Vol. 198. – P. 267–284.
146. Lamari, N. Specificity of lipoxygenase pathways supports species delineation in the marine diatom genus *Pseudo-nitzschia* / N. Lamari, M.V. Ruggiero, G. d'Ipollito, W.H. Kooistra, A. Fontana, M. Montresor // *PLoS One.* - 2013. - Vol. 8. – N.8. - P. 73281.
147. Lee, D.S. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes / D.S. Lee, P. Nioche, M. Hamberg, C.S. Raman // *Nature.* – 2008. – Vol. 455. – P. 363–368.
148. Leon, J. Wound signalling in plants / J. Leon, E. Rojo, J.J. Sanchez-Serrano // *J Exp Bot.* – 2001. – Vol. 52. – N.354. - P. 1–9.
149. Li, L. Modes of heme binding and substrate access for cytochrome P450 CYP74A revealed by crystal structures of allene oxide synthase / L. Li, Z. Chang, Z. Pan, Z-Q. Fu, X. Wang // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2008. – Vol. 105. – N.37. – P. 13883–81388.
150. Liavonchanka, A. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis / A. Liavonchanka, I. Feussner // *J Plant Physiol.* – 2006. – Vol. 163. – N.3. – P. 348–357.
151. Lin, J.T. Identification of diacylglycerol and triacylglycerol containing 11,12,13-trihydroxy-9,14-octadecadienoic acid in castor oil / J.T. Lin, G.Q. Chen // *N Biotechnol.* - 2011. - Vol. 28. – N.2. - P. 203-208.

152. Long, M. Intron phase correlation and the evolution of the intron/exon structures of genes / M. Long, C. Rosenberg, W. Gilbert // Proc Natl Acad Sci USA. – 1995. – Vol. 92. – N.26. – P. 12495-12499.
153. Maeda, H. Tocopherol functions in photosynthetic organisms / H. Maeda, D. DellaPenna // Curr Opin Plant Biol. – 2007. – Vol. 10. – N.3. – P. 260–265.
154. Maier, I. *Maullinia ectocarpii* gen. et sp. nov. (*Plasmodiophorea*), an intracellular parasite in *Ectocarpus siliculosus* (*Ectocarpales*, *Phaeophyceae*) and other filamentous brown algae / I. Maier, E. Parodi, R. Westermeier, D.G. Müller // Protist. – 2000. – Vol. 151. – N.3. – P. 225-238.
155. Mansuy, D. The great diversity of reactions catalyzed by cytochrome P450 / Comp Biochem Physiol Part C. – 1998. – Vol. 121. – N.1-3. – P. 5-14.
156. Masui, H. An antifungal compound, 9,12,13-trihydroxy-(*E*)-10-octadecenoic acid, from *Colocasia antiquorum* inoculated with *Ceratocystis fimbriata* / H. Masui, T. Kondo, M. Kojima / Phytochemistry. – 1989. – Vol. 28. – N.10. – P. 2613-2615.
157. Matsui, K. Fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme, hydroperoxide lyase, from tea leaves / K. Matsui, H. Toyota, T. Kajiwara, T. Kakuno, A. Hatanaka // Phytochemistry. – 1991. – Vol. 30. – N.7. – P. 2109–2113.
158. Matsui, K. Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B) / K. Matsui, M. Shibutani, T. Hase, T. Kajiwara // FEBS Lett. – 1996. – Vol. 394. – P. 21 – 24.
159. Matsui, K. Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyases from cucumber / K. Matsui, C. Ujita, S. Fujimoto, J. Wilkinson, B. Hiatt, V. Knauf, T. Kajiwara, I. Feussner // FEBS Lett. – 2000. – Vol. 481. – N.2. – P. 183-188.
160. Mita, G. Molecular cloning and characterization of an almond 9-hydroperoxide lyase, a new CYP74 targeted to lipid bodies / G. Mita, A. Quarta, P. Fasano, A. De Paolis, G.P. Di Sansebastiano, C. Perrotta, R. Iannacone, E. Belfield, R. Hughes, N. Tsesmetzis, R. Casey, A. Santino // J Exp Bot. – 2005. – Vol. 56. – N.419. – P. 2321-2333.

161. McHugh, D.J. A Guide to the Seaweed Industry / D.J. McHugh. - FAO Fisheries Technical Paper No. 441, 2003. – P. 105.
162. Mizutani, M. Diversification of P450 genes during land plant evolution / M. Mizutani, D. Ohta // *Annu Rev Plant Biol.* – 2010. – Vol. 61. - P. 291-315.
163. Morant, M. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation / M. Morant, S. Bak, B.L. Møller, D. Werck-Reichhart // *Curr Opin Biotechnol.* – 2003. – Vol. 14. – N.2. – P. 151-162.
164. Mosblech, A. Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation / A. Mosblech, I. Feussner, I. Heilmann // *Plant Physiol Biochem.* - 2009. – Vol. 47. – N.6. – P. 511-517.
165. Müller, D. G. Viruses in marine brown algae / D.G. Müller, M. Kapp, R. Knippers // *Adv Virus Res.* – 1998. – Vol. 50. – P. 49-67.
166. Müller, M.J. Archetype signals in plants: the phytoprostanes / *Curr Opin Plant Biol.* – 2004. - Vol. 7. – P. 441–448.
167. Nagai, T. Pinellic acid from the tuber of *Pinellia ternata* Breitenbach as an effective oral adjuvant for nasal influenza vaccine / T. Nagai, H. Kiyohara, K. Munakata, T. Shirahata, T. Sunazuka, Y. Harigaya, H. Yamada // *Int Immunopharmacol.* – 2002. – Vol. 2. – N.8. – P. 1183-1193.
168. Nagai, T. Anti-allergic activity of a Kampo (Japanese herbal) medicine “Sho-seiryu-to (Xiao-Qing-Long-Tang)” on airway inflammation in a mouse model / T. Nagai, Y. Arai, M. Emori, S.Y. Nunome, T. Yabe, T. Takeda, H. Yamada // *Int Immunopharmacol.* – 2004. – Vol. 4. – N.10-11. – P. 1353-1365.
169. Nagasato, C. Influence of the centrosome in cytokinesis of brown algae: polyspermic zygotes of *Scytosiphon lomentaria* (*Scytosiphonales*, *Phaeophyceae*) / C. Nagasato, T. Motomura // *J Cell Science.* – 2002. - Vol. 115. – N.12. – P. 2541-2548.
170. Nelson D.R. Cytochrome P450 and the individuality of species / *Arch Biochem Biophys.* – 1999. – Vol. 369. – P. 1-10.

171. Nelson, D.R. Comparative genomics of rice and arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot / D.R. Nelson, M.A. Schuler, S.M. Paquette, D. Werck-Reichhart, S. Bak // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 135. – N.2. – P. 756-772.
172. Nelson, D.R. Cytochrome P450 nomenclature / *Methods Mol Biol.* – 2006. – Vol. 320. – P. 1-10.
173. Nelson, D.R. The cytochrome P450 homepage / *Hum Genomics.* – 2009. - Vol. 4. – N.1. – P. 59-65.
174. Nelson, D. A P450-centric view of plant evolution / D. Nelson, D. Werck-Reichhart // *Plant J.* - 2011. - Vol. 66. – N.1. - P. 194-211.
175. Nelson, D.R. The cytochrome P450 genesis locus: the origin and evolution of animal cytochrome P450s / D.R. Nelson, J.V. Goldstone, J.J. Stegeman // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* - 2013. - Vol. 368. – N.1612. – P. 1-22.
176. Niisuke, K. Biosynthesis of a linoleic acid allylic epoxide: mechanistic comparison with its chemical synthesis and leukotriene A biosynthesis / K. Niisuke, W.E. Boeglin, J.J. Murray, C. Schneider, A.R. Brash // *J Lipid Res.* – 2009. – Vol. 50. – N.7. – P. 1448-1455.
177. Noordermeer, M.A. Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics / M.A. Noordermeer, A.J. Van Dijken, S.C. Smeekens, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – Vol. 267. - N.9. – P. 2473 – 2482.
178. Noordermeer, M.A. Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance / M.A. Noordermeer, G.A. Veldink, J.F. Vliegthart // *Chem Bio Chem.* – 2001. – Vol. 2. – N.7-8. – P. 494–504.
179. Nozaki, H. Phylogenetic positions of *Glaucophyta*, green plants (*Archaeplastida*) and *Haptophyta* (*Chromalveolata*) as deduced from slowly evolving nuclear

genes / H. Nozaki, S. Maruyama, M. Matsuzaki, T. Nakada, S. Kato, K. Misawa // Mol Phylogenet Evol. - 2009. - Vol. 53. - N.3. - P. 872-80.

180. Ogorodnikova, A.V. Oxylipins in the spikemoss *Selaginella martensii*: Detection of divinyl ethers, 12-oxophytodienoic acid and related cyclopentenones / A.V. Ogorodnikova, F.K. Mukhitova, A.N. Grechkin // Phytochemistry. - 2015. - Vol. 118. - P. 42-50.

181. Ohta, H. The occurrence of lipid hydroperoxide-decomposing activities in rice and the relationship of such activities to the formation of antifungal substances / H. Ohta, K. Shida, Y.L. Peng, I. Furusawa, J. Shishiyama, S. Aibara, Y. Morita // Plant Cell Physiol. - 1990. - Vol. 31. - N.8. - P. 1117-1122.

182. Omura, T. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature / T. Omura, R. Sato // The Journal of Biological Chemistry. - 1964. - Vol. 239. - P. 2370-2378.

183. Pace-Asciak, C.R. The enzymatic conversion of arachidonic acid into 8,11,12-trihydroxyeicosatrienoic acid. Resolution of rat lung enzyme into two active fractions / C.R. Pace-Asciak, K. Mizuno, S. Yamamoto // Biochim Biophys Acta. - 1982. - Vol. 712. - N.1. - P. 142-145.

184. Paquette, S.M. Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana* / S.M. Paquette, S. Bak, R. Feyereisen // DNA Cell Biol. - 2000. - Vol. 19. - N.5. - P. 307-317.

185. Pérez, A.G. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits / A.G. Pérez, C. Sanz, R. Olías, J.M. Olías // J Agric Food Chem. - 1999. - Vol. 47. - N.1. - P. 249-253.

186. Peters, A.F. Proposal of *Ectocarpus siliculosus* as a model organism for brown algal genetics and genomics / A.F. Peters, D. Marie, D. Scornet, B. Kloareg, J. M. Cock // Journal of Phycology. - 2004a. - Vol. 40. - N.6. - P. 1079-1088.

187. Peters, A.F. Inheritance of organelles in artificial hybrids of the isogamous multicellular chromist alga *Ectocarpus siliculosus* (*Phaeophyceae*) / A.F. Peters, D.

- Scornet, D.G. Müller, B. Kloareg, J.M. Cock // *Eur J Phycol.* – 2004b. – Vol. 39. – N.3. – P. 235-242.
188. Piazza, G.J. Preparation of fatty epoxy alcohols using oat seed peroxygenase in nonaqueous media / G.J. Piazza, T.A. Foglia, A. Nunez // *Journal of Oil & Fat Industries.* – 1999. – Vol. 76. – N.5. – P. 551-555.
189. Podust, L. M. Crystal structure of cytochrome P450 14a–sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors / L.M. Podust, T.L. Poulos, M.R. Waterman // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2001. – Vol. 98. – N.6. – P. 3068–3073.
190. Pohnert, G. The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms / G. Pohnert, W. Boland // *Nat Prod Rep.* – 2002. – Vol. 19. – N.1. – P. 108-122.
191. Potin, P. Biotic interactions of marine algae / P. Potin, K. Bouarab, J.-P. Salaün, G. Pohnert, B. Kloareg // *Curr Op Plant Biol.* – 2002. – Vol. 5. – N.4. – P. 308-317.
192. Poulos, T.L. High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam / T.L. Poulos, B.C. Finzel, A.J. Howard // *J Mol Biol.* – 1987. – Vol. 195. – N.3. – P. 687-700.
193. Poulos, T.L. Thirty years of heme peroxidase structural biology / *Arch Biochem Biophys.* – 2010. – Vol. 500. – N.1. – P. 3-12.
194. Powles, S.B. Evolution in action: plants resistant to herbicides / S.B. Powles, Q. Yu // *Annu Rev Plant Biol.* – 2010. – Vol. 61. – P. 317-347.
195. Prinz, W.A. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm / W.A. Prinz, F. Aslund, A. Holmgren, J. Beckwith // *J Biol Chem.* – 1997. – Vol. 272. – N. 25. – P. 15661-15667.
196. Prost, I. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens / I. Prost, S. Dhondt, G. Rothe, J. Vi-

- cente, M.J. Rodriguez, N. Kift, F. Carbonne, G. Giffiths, M.-T. Esquerre-Tugaye, S. Rosahl, C. Castresana, M. Hamberg, J. Fournier // *Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 139. – N. 4. – P. 1902–1913.
197. Proteau, P.J. Cymathere ethers A and B: bicyclic oxylipins from the marine brown alga *Cymathere triplicate* / P.J. Proteau, W.H. Gerwick // *Tetrahedron Lett.* – 1992. – Vol. 33. – P. 4393–4396.
198. Proteau, P.J. Divinyl ethers and hydroxy fatty acids from three species of *Laminaria* (brown algae) / P.J. Proteau, W.H. Gerwick // *Lipids.* – 1993. – Vol. 28. – N.9. – P. 783-787.
199. Proteau, P.J. Absolute stereochemistry of neohalicholactone from the brown alga *Laminaria sinclairii* / P.J. Proteau, J.V. Rossi, W.H. Gerwick // *J Nat Prod.* - 1994. - Vol. 57. – N.12. - P. 1717-1719.
200. Riley, J.M. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening tomato fruit / J.M. Riley, C. Willemot, J.E. Thompson // *Postharvest Biol Technol.* – 1996. – Vol. 7. – N.1-2. – P. 97–107.
201. Ritter, A. Copper stress induces biosynthesis of octadecanoid and eicosanoid oxygenated derivatives in the brown algal kelp *Laminaria digitata* / A. Ritter, S. Goulitquer, J.P. Salaun, T. Tonon, J.A. Correa, P. Potin // *New Phytol.* – 2008. – Vol. 180. – N.4. – P. 809-821.
202. Schenkman, J.B. Spectral analyses of cytochromes P450 / J.B. Schenkman, I. Jansson // *Methods Mol Biol.* – 2006. – Vol. 320. – P. 11-18.
203. Schilmiller, A.L. Systemic signalling in the wound response / A.L. Schilmiller, G.A. Howe // *Curr Opin Plant Biol.* – 2005. – Vol. 8. – N.4. – P. 369–377.
204. Schneider, C. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis / C. Schneider, D.A. Pratt, N.A. Porter, A.R. Brash // *Chem Biol.* – 2007a. – Vol. 14. – N.5. – P. 473–488.
205. Schuler, M.A. Functional genomics of P450s / M.A. Schuler, D. Werck-Reichhart // *Annu Rev Plant Biol.* – 2003. – Vol. 54. – P. 629-637.

206. Schuler, M.A. Arabidopsis cytochrome P450s through the looking glass: a window on plant biochemistry / M.A. Schuler, H. Duan, M. Bilgin, S. Ali // *Phytochemistry Rev.* – 2006. – Vol. 5. – N.2. – P. 205-237.
207. Schüssler, A. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution / A. Schüssler, D. Schwarzott, C. Walker // *Mycol Res.* – 2001. – Vol. 105. – N.12. – P. 1413–1421.
208. Shiojiri, K. Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: an approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens / K. Shiojiri, K. Kishimoto, R. Ozawa, S. Kugimiya, S. Urashimo, G. Arimura, J. Horiuchi, T. Nishioka, K. Matsui, J. Takabayashi // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103. – N.45. – P. 16672-16676.
209. Silva, G. Distinct fatty acid profile of ten brown macroalgae / G. Silva, R.B. Pereira, P. Valentão, P.B. Andrade, C. Sousa // *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy.* – 2013. – Vol. 23. – N.4. – P. 608-613.
210. Simpson, A.G. The real 'kingdoms' of eukaryotes / A.G. Simpson, A.J. Roger // *Current Biology.* – 2004. – Vol. 14. – N. 17. – P. 693-696.
211. Somerville, C. Lipids. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* / C. Somerville, J. Browse, J.G. Jaworski, J.B. Ohlrogge, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones // Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 2000. – P. 456–527.
212. Song, W.C. Formation of epoxyalcohols by a purified allene oxide synthase. Implications for the mechanism of allene oxide synthesis / W.C. Song, S.W. Baertschi, W.E. Boeglin, T.M. Harris, A.R. Brash // *J Biol Chem.* – 1993. – Vol. 268. – N.9. – P. 6293-6298.
213. Stodola, F.H. 8,9,13-Trihydroxydocosanoic acid, an extracellular lipid produced by a yeast / F.H. Stodola, R.F. Vesonder, L.J. Wickerham // *Biochemistry.* – 1965. – Vol. 4. – N.7. – P. 1390-1394.

214. Stoltzfus, A. Intron “sliding” and the diversity of intron positions / A. Stoltzfus, J.M.J. Logsdon, J. D. Palmer, W. F. Doolittle // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1997. – Vol. 94. – N.20. – P. 10739-10744.
215. Stratmann, K. Biosynthesis of pheromones in female gametes of marine brown algae (*Phaeophyceae*) / K. Stratmann, W. Boland, D.G. Mueller // *Tetrahedron*. – 1993. – Vol. 49. – N.18. – P. 3755-3766.
216. Stumpe, M. A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells / M. Stumpe, R. Kandzia, C. Gobel, S. Rosahl, I. Feussner // *FEBS Letters*. – 2001. – Vol. 507. – N.3. – P. 371-376.
217. Stumpe, M. Formation of oxylipins by CYP74 enzymes / M. Stumpe, I. Feussner // *Phytochem Rev*. – 2006. – Vol. 5. – N.2. – P. 347–357.
218. Su, C. Manganese lipoxygenase. Purification and characterization / C. Su, E.H. Oliw // *J Biol Chem*. – 1998. – Vol. 273. – N.21. – P. 13072-13079.
219. Suemune, H. Synthesis of unsaturated trihydroxy C-18 fatty acids isolated from rice plants suffering from rice blast disease / H. Suemune, T. Harabe, K. Sakai // *Chem Pharm Bull*. – 1988. – Vol. 36. – N.9. – P. 3632-3637.
220. Tatulian, S.A. Uncovering a calcium-regulated membrane-binding mechanism for soybean lipoxygenase-1 / S.A. Tatulian, J. Steczko, W. Minor // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 37. – N.44. – P. 15481-15490.
221. Thompson, J.D. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools / J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins // *Nucleic Acids Res*. – 1997. – Vol. 25. – N.24. – P. 4876-4882.
222. Tijet, N. Purification, molecular cloning, and expression of the gene encoding fatty acid 13-hydroperoxide lyase from guava fruit / N. Tijet, U. Waspi, D.J.H. Gasikin, P. Hunziker, B.L. Muller, E.N. Vulfson, A. Slusarenko, A.R. Brash, I.M. Whitehead // *Lipids*. – 2000. – V. 35. – P. 709 – 720.

223. Tijet, N. Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids / N. Tijet, C. Schneider, B.L. Muller, A.R. Brash // *Arch Biochem Biophys.* – 2001. – Vol. 386. – N.2. – P. 281-289.
224. Todd, J.S. The absolute configuration of ecklonialactones A, B, and E, novel oxylipins from brown algae of the genera *Ecklonia* and *Egregia* / J.S. Todd, P.J. Proteau, W.H. Gerwick // *J Nat Prod.* – 1994. – Vol. 57. – N.1. – P. 171–174.
225. Toporkova, Y.Y. Determinants governing the CYP74 catalysis: conversion of allene oxide synthase into hydroperoxide lyase by site-directed mutagenesis / Y.Y. Toporkova, Y.V. Gogolev, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin // *FEBS Letters.* – 2008. – Vol. 582. – N.23-24. – P. 3423-3428.
226. Toporkova, Y.Y. Alteration of catalysis of CYP74C subfamily enzymes as a result of site-directed mutagenesis / Y.Y. Toporkova, E.V. Osipova, L.Sh. Mukhtarova, Y.V. Gogolev, A.N.Grechkin // *Dokl Biochem Biophys.* – 2010. – Vol. 435. – P. 287-290.
227. Van Poecke, R.M. Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis / R.M. Van Poecke, M.A. Posthumus, M. Dicke // *J Chem Ecol.* – 2001. – Vol. 27. – N.10. – P. 1911-1928.
228. Walters, D.R. Rapid accumulation of trihydroxy oxylipins and resistance to the bean rust pathogen *Uromyces fabae* following wounding in *Vicia faba* / D.R. Walters, T. Cowley, H. Weber // *Annals of Botany.* – 2006. – Vol. 97. – N.5. – P. 779-784.
229. Wang, J.-Z. Studies on chemical constituents of *Codonopsis pilosula* / J.-Z. Wang, F.-B. Wang // *Nat Prot Res Dev.* – 1996. – Vol. 8. – P. 8-12.
230. Wang, X. Signaling functions of phosphatidic acid / X. Wang, S.P. Devaiah, W. Zhang, R. Welti // *Prog Lipid Res.* - 2006. – Vol. 45. – N.3. – P. 250–278.

231. Wasternack, C. The wound response in tomato—role of jasmonic acid / C. Wasternack, I. Stenzel, B. Hause, G. Hause, C. Kutter, H. Maucher, J. Neumerkel, I. Feussner, O. Miersch // *J Plant Physiol.* – 2006. – Vol. 163. – N.3. – P. 297–306.
232. Wasternack, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development / *Ann Bot.* – 2007. – Vol. 100. –N.4. – P. 681–697.
233. Wasternack, C. Multifunctional enzymes in oxylipin metabolism / C. Wasternack, I. Feussner // *Chem Bio Chem.* – 2008. – Vol. 9. – N.15. – P. 2373–2375.
234. Weber, H. Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves / H. Weber, A. Chetelat, D. Caldelari, E.E. Farmer // *Plant Cell.* – 1999. – Vol. 11. – N.3. – P. 485–493.
235. Wennman, A. Secretion of two novel enzymes, manganese 9S-lipoxygenase and epoxy alcohol synthase, by the rice pathogen *Magnaporthe salvinii* / A. Wennman, E.H. Oliw // *Journal of Lipid Research.* – 2013. – Vol. 54. –N.3. – P. 762–775.
236. Werck-Reichhart, D. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance / D. Werck-Reichhart, A. Hehn, L. Didierjean // *Trends Plant Sci.* – 2000. – Vol. 5. – N.3. – P. 116-123.
237. Werck-Reichhart, D. Cytochromes P450: a success story / D. Werck-Reichhart, R. Feyereisen // *Genome Biol.* – 2000. – Vol. 1. – N.6. – P. 1-7.
238. Williams, P.A. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity / P.A. Williams, J. Cosme, V. Sridhar, E. Johnson, D.E. McRee // *Mol Cell.* – 2000. – Vol. 5. – N.1. – P. 121-131.
239. Xue, H. Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects / H. Xue, X. Chen, G. Li // *Curr Opin Plant Biol.* – 2007. – Vol. 10. – N.5. – P. 483–9.

240. Zoller, M.J. Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA / M.J. Zoller, M. Smith // *Nucleic Acids Research*. – 1982. – Vol. 10. – N.20. – P. 6487-6500.
241. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
242. <http://www.comparative-legumes.org>
243. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>
244. <http://bioinformatics.psb.ugent.be/orcae/>
245. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
246. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>