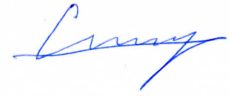


На правах рукописи



Стариков Александр Юрьевич

Изучение субстратной специфичности десатураз жирных кислот цианобактерий

1.5.21. — физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

чл.-корр. РАН, профессор

Лось Дмитрий Анатольевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Кормилец Олеся Николаевна, д.б.н., профессор РАН, ведущий научный сотрудник Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск.

Котлова Екатерина Робертовна, к.б.н., ведущий научный сотрудник Лаборатории аналитической фитохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург.

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток.

Защита состоится 25 мая 2023 г. в 11 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук 24.1.138.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: +7(499) 678-5420, электронная почта m-azarkovich@mail.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук и на сайте <https://ippras.ru>.

Автореферат разослан 23 марта 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета:

кандидат биологических наук

Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Цианобактерии – граммотрицательные бактерии, способные фиксировать углекислый газ и выделять кислород в процессе фотосинтеза. Они возникли около 3,5 млрд. лет назад и считаются одними из древнейших живых организмов на планете. Предполагается, что именно они, вступив в симбиоз с клеткой, неспособной к фотосинтезу, стали предшественником хлоропластов растений. Сходство фотосинтетических мембран цианобактерий и тилакоидных мембран хлоропластов эукариотических водорослей и высших растений является одним из убедительных аргументов в пользу теории симбиогенеза. Высокие скорости роста и накопления биомассы, разработанные методы проведения генетических манипуляций и относительно небольшие размеры известных геномов, делают этих фотосинтетиков удобными модельными объектами для изучения различных физиологических процессов и метаболических путей фотосинтезирующих клеток высших растений. Наиболее изученные штаммы цианобактерий (например, *Synechocystis* sp. PCC 6803 или *Synechococcus elongatus* PCC 7942) называют «зелёными *Escherichia coli*».

Цианобактерии представляют интерес для различных областей промышленности и сельского хозяйства: получения биотоплива, синтеза метаболитов, утилизации сточных вод и т.д. Объединяющим эти задачи можно рассматривать липидный метаболизм цианобактерий. Например, очистка сточных вод, перенасыщенных фосфатами и нитратами, при культивировании цианобактерий, приводит к накоплению биомассы, которая в дальнейшем может быть использована для производства биотоплива. Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), такие как α - и γ -линоленовая (18:3), стеарионовая (18:4) кислоты важны для поддержания здоровья человека. Одним из ключевых ферментов синтеза ненасыщенных ЖК являются десатуразы – семейство оксигеназ, удаляющих два атома водорода из углеводородной цепи остатка ЖК, тем самым катализирующих формирование двойной углеродной связи в *cis*-положении. Для подобных ферментов характерна селективность не только по отношению к длине углеводородной цепи, но и к её положению на молекуле глицерина (стереоспецифичность или *sn*-положение от англ. *stereo-specific numbering*). Десатуразы ЖК (ДЖК) могут проявлять специфичность к типу молекулы липида, степени ненасыщенности ацильной цепи и т.д. Знания этих «предпочтений» позволяет подбирать оптимальные организмы для культивирования или гены для гетерологической экспрессии и реализации поставленных перед производством задач. Помимо этого, экспрессия генов десатураз может способствовать повышению холодостойкости сельскохозяйственных культур: сохранение вязкости мембраны клеток при более низких температурах может быть обеспечено за счёт увеличения доли ненасыщённых ЖК в липидах, её формирующих.

Степень разработанности темы

На основе классических работ по определению механизма прохождения реакции десатурации было сделано предположение о том, что все ДЖК относятся к группе Δ , то есть, они отсчитывают определённое число атомов от карбоксильного конца, и вносят двойную связь. Так же было определено, что именно $\Delta 9$ -десатураза (DesC)

является первичной и способна к взаимодействию с насыщенными ацилами, в то время как всем остальным десатуразам необходимо наличие двойной связи в остатке ЖК. Однако, однозначных данных о предпочтении к субстрату и методе «отсчёта» для десатураз DesA ($\Delta 12$) и DesD ($\Delta 6$) не было получено. В зависимости от предпочтений того или иного автора, их могли относить как к группе Δ - (отсчитывающим от карбоксильного конца), так и к ω - (отсчитывающим от метильного конца) десатуразам. Также оставались неясными причины наличия коротких ЖК (миристиновой (C14) и миристоолеиновой (C14:1 Δ^9)) в одних штаммах цианобактерий и отсутствие их в других при схожем наборе ДЖК.

В связи с этим актуальной задачей является расширение спектра изучаемых ферментов – анализ активности ДЖК не только из модельных организмов, но и из штаммов, с необычным ЖК составом. Кроме этого, необходимо развитие новых подходов к анализу ЖК: культивирование клеток цианобактерий в присутствии нехарактерных для них ЖК, использование современных методов хроматографии и масс-спектрометрии необычных производных ЖК.

Цели и задачи исследования

Цель работы – изучение специфичности $\Delta 9$ -, $\Delta 12$ - и $\Delta 6$ -ДЖК в отношении длины цепи ЖК и способа «отсчета» при образовании двойной связи.

Для достижения поставленной задачи были сформулированы следующие задачи:

- 1) получить трансформанты *Synechococcus elongatus* PCC 7942, экспрессирующие гены *glr2623* ($\Delta 12$), *slr1350* ($\Delta 12$), *slr0262* ($\Delta 6$) и *desC1200* ($\Delta 9$) ДЖК, а также ацилтрансферазы *plsC1200*.
- 2) исследовать влияние конститутивной экспрессии данных генов на состав ЖК трансформантов;
- 3) провести культивирование полученных трансформантов в присутствии нетипичных ЖК (вакценовой и гептадеценовой) и подтвердить их включение в липидный метаболизм клеток;
- 4) достоверно подтвердить положения двойных связей в синтезирующихся диеновых ЖК из экзогенных вакценовой и гептадеценовой кислот.

Научная новизна

Впервые получены результаты, подтверждающие механизм внесения двойной связи ацил-липидными $\Delta 12$ - (DesA) и $\Delta 6$ - (DesD) десатуразами цианобактерий; установлены ферменты, играющие роль в формировании пула коротких (C14) ЖК. Показано, что:

- 1) $\Delta 12$ -ДЖК DesA (*glr2623*, *slr1350*) вносит вторую двойную связь «отсчитывая» три атома углерода от первой двойной связи в ацильном остатке в сторону метильного конца;
- 2) $\Delta 6$ -ДЖК DesD (*slr0262*) вносит двойную связь в положение Δ^6 вне зависимости от длины цепи и наличия в ЖК преобладающих двойных связей;

3) Длина цепи ЖК определяется специфичностью ацилтрансферазы *PlsC*, в то время как образование двойных связей Δ^9 -ДЖК *DesC* зависит от длины ацильной цепи.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты имеют фундаментальное значение. Они раскрывают механизм формирования первой и второй двойных связей в остатках ЖК. Определён фермент, обеспечивающий формирование ЖК с короткой цепью, который может быть использован в биотехнологии при создании штаммов – продуцентов биодизеля.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных экспериментальных данных. Автор принимал участие в подготовке статей к публикации и представлял результаты исследований на конференциях.

Достоверность результатов

Результаты, содержащиеся в диссертационной работе, получены с применением как классических, так и современных методов биохимии и молекулярной биологии. Для анализа проб использовалось высокотехнологичное оборудование. Анализ полученных результатов проводился с применением MS Excel. Значимая часть данных была опубликована в рецензируемых российских и зарубежных журналах и доложена на конференциях всероссийского уровня.

Методология и методы исследования

В ходе исследования были использованы различные экспериментальные методы, используемые в биохимии, генетике, микробиологии, молекулярной биологии, физиологии растений. Работа выполнена с применением современных методов и оборудования. Идентификация и количественное определение производных ЖК проводилось с использованием хромато-масс-спектрометрии. Работа с культурами клеток микроорганизмов проводилась с использованием общепринятых и отработанных методик с сохранением аксеничности и стерильности культуры. Результаты исследования проходили статистическую обработку.

Положения, выносимые на защиту

1. Ацил-липидные Δ^{12} -десатуразы, кодируемые генами *glr2623* (*Gloeobacter violaceus* PCC 7942) и *slr1350* (*Synechocystis* sp. PCC 6803), отвечают за формирование диеновых кислот и вносят двойную связь, «отсчитывая» три атома углерода от предыдущей двойной связи в сторону метильного конца жирнокислотного остатка.
2. Ацил-липидная Δ^6 -десатураза, кодируемая геном *slr0262* (*Synechocystis* sp. PCC 6803), вносит двойную связь в положение Δ^6 вне зависимости от длины углеродной цепи и наличия в ней предсуществующих двойных связей.
3. Коэкспрессия генов ацилтрансферазы *plsC1200* и десатуразы *desC1200* (*Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200) обеспечивает синтез большого количества

миристиновой и миристоолеиновой кислот в клетках *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы представлены в форме стендовых и устного доклада на научных конференциях: IV Всероссийская конференция по геномному секвенированию, Москва, 2016; Международная школа-конференция «Цианопрокариоты/цианобактерии: систематика, экология, распространение», Сыктывкар, 2019; XXXII Зимняя молодёжная научная школа; ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ; Москва, 2020; Green Christmas Session “Photosynthetic microorganisms for sustainable development”, International online conference, Rome, Italy, 2021; VI Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Водоросли: проблемы таксономии и экологии, использование в мониторинге и биотехнологии», Москва, 2022.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из них 7 - статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объём диссертации

Материалы диссертации изложены на 132 страницах машинописного текста, содержат 32 рисунка, 6 таблиц, 4 приложения. Диссертация построена по классической схеме и состоит из титульного листа, оглавления, текста диссертации, списка сокращений, списка литературы и приложений. Текст диссертации содержит в себе введение, основную часть, состоящую из таких глав как «обзор литературы», «материалы и методы», «результаты и их обсуждение», и заключения. Список литературы содержит 188 наименований, 181 из которых – на иностранном языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Обзор литературы содержит информацию по основным группам десатураз, включая историю их открытия, механизм прохождения реакции и их значение в липидном метаболизме клетке. Так же раскрыто широкое поле применения данных ферментов в биотехнологии.

Глава 2. Материалы и методы

Объекты исследования. В данной работе в качестве объектов исследования использовали штаммы цианобактерий (*Synechocystis* sp. PCC 6803, *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200) и *Escherichia coli*.

Культуры *Synechocystis* sp. PCC 6803 (разновидность штамма GT — Glucose Tolerant), *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Cyanobacterium* sp. IPPASB-1200 получены из Коллекции микроводорослей IPPAS Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Культура *Escherichia coli*, штамм XL1-Blue (генотип: recA1endA1gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]) приобретена в фирме «Евроген» (кат. # CC001).

Культуры *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC 7942 поддерживали на агаризованной (1,2% бактоагара Vasto™Agar) среде BG-11 с добавлением 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5, на чашках Петри (диаметром 9 см). Линии цианобактерий-трансформантов поддерживали в аналогичных условиях с добавлением соответствующих антибиотиков необходимой концентрации. Культуру *Gloeobacter violaceus* sp. PCC 7421 поддерживали в 250 мл жидкой среды BG-11. Культуру *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200 поддерживали на агаризованной (1,2% бактоагара, Vasto™Agar) среде Заррука на чашках Петри. Культуры цианобактерий поддерживали при температуре 25°C и при постоянном освещении люминесцентными лампами интенсивностью 50 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$.

Клетки *E. coli* выращивали на среде LB с содержанием агара 1,5% на чашках Петри при температуре 37°C с добавлением соответствующих антибиотиков или в жидкой среде LB объемом 5 мл.

Интенсивное культивирование цианобактерий проводилось в специальных сосудах с барботёром. Культивирование с экзогенными кислотами осуществлялось путём добавления к интенсивной культуре калиевых солей гептадеценовой и вакценовой кислот до концентрации 0,1 мМ.

Молекулярное клонирование. На первом этапе работы было проведено выделение геномной ДНК из изучаемых цианобактерий. Затем гены интереса были перенесены в вектор pTrc99A под контроль промотора Trc, обеспечивающего конститутивную экспрессию в клетках *Synechococcus*. Гены интереса вместе с участком промоторной области были перенесены в векторы pAM1303 и pNS2, позволяющими посредством гомологичной рекомбинации трансформировать клетки *Synechococcus*. Вектор pNS2 был сконструирован в ходе работы для получения двойных трансформантов на основе вектора pTrc99A и содержал участки рекомбинации к участку NS2 генома *S. elongatus*. Векторы, полученные в ходе клонирования, проверяли методом ПЦР и рестрикционным анализом, а также секвенированием по Сэнгеру.

Трансформация *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Трансформацию цианобактерий проводили согласно стандартным методикам. Первичный отбор колоний проводили на чашках, содержащих спектиномицин или канамицин (кассеты устойчивости из векторов pAM1303 и pNS2, соответственно). Степень сегрегации модифицированных хромосом оценивали методом ПЦР. Колонии, достигшие полной сегрегации (все копии нейтрального сайта содержали в себе исследуемые конструкции), использовали в дальнейшей работе.

Анализ транскриптов. Из культуры клеток выделяли РНК, подтверждали отсутствие дегградации и на её основе получали библиотеку кДНК. Путем ПЦР с полученной кДНК в качестве матрицы и праймерами, специфичными к изучаемым генам, получали продукты ожидаемого размера. Таким образом подтверждали прохождение транскрипции генов интереса в трансформантах. В качестве положительного контроля в реакциях ОТ-ПЦР использовали реакцию с праймерами к гену *desC* *S. elongatus*.

Анализ ЖК. Анализировали как липидные экстракты из трансформантов, так и целые клетки. Для подтверждения включения экзогенных кислот в мембранные липиды, экстракт разделяли методом ТСХ на пластинках (10 x 10 см, толщина слоя силикагеля 250 мкм, размер пор 60 Å (TLC Silicagel 60, Fluka™), и отдельные фракции липидов метилировали с последующим анализом с помощью ГХ-МС. Из фракции МГДГ (основного липидного класса) получали литиевые аддукты для анализа на масс-спектрометре Shimadzu 8040, совмещённом с УВЭЖХ NexeraX2 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Для получения литиевых производных МГДГ растворяли в 200 мкл смеси хлороформ-метанол (1:4) и затем добавляли 50 мкл 100 мМ раствора CH_3COOLi (Sigma-Aldrich, кат. №517992) в метаноле. Образец вводили в масс-спектрометр через капилляр со скоростью 0,4 мл мин⁻¹. Давление газа носителя (аргона) составляло 230 кПа.

Минорные фракции МЭЖК получали путём разделения их по ЕСН, (эквивалентному углеродному числу) используя метод обращённой ВЭЖХ на приборе Shimadzu LC20 с детектором SPD20МА, коллектором фракций FRC-10, с изократической элюцией ацетонитрилом (колонка – ZorbacC18; 250 мм x 4,6 мм, 5 мкм). При разделении по ЕСН было получено 5 пиков со значениями от 12 до 18. Каждая из фракций была собрана в отдельную пробирку. Состав каждой фракции оценивали методом ГХ-МС. Минорные МЭЖК дегидратировали в диметоксизолиновые или никотиниловые производные.

Анализ метиловых, никотиниловых и диметоксизолиновых эфиров ЖК проводили с помощью ГХ-МС на приборе Agilent 7890A GC (Agilent Technologies, Inc., США) с квадрупольным МС-детектором Agilent 5975С соединённым с 60-м капиллярной колонкой DB-23 (внутренний диаметр – 0,25 мм; стационарная фаза толщиной 0,25 мкм – (50% цианопропил)-метилполисилоксан; кат. № US8897617Н). Условия разделения МЭЖК: расход газа 1 мл/мин; линейная скорость газа-носителя в колонке 1 мл/мин (для остальных производных – 1,5 мл/мин); объем вводимого образца 1 мкл (~10 мкг МЭЖК); делитель потока 1:10, температура испарителя 260°C. Температурная программа градиентного анализа: от 130°C до 170°C с шагом 6,5°C/мин; от 170°C до 215°C – 2,5°C/мин; поддержание 215°C на протяжении 25 мин; нагрев до 240°C со скоростью 40°C/мин и выдержка при этой температуре в течение 30 мин. Рабочая температура МС-детектора – 240°C, энергия ионизации – 70 эВ. Идентификацию индивидуальных видов производных ЖК МЭЖК и расчёт их количественного содержания в пробах проводили с использованием данных расширенного пакета встроенных рабочих программ MSD Chem Station G1701EA E.02.00.493 и библиотеки спектров NIST. Эксперименты и анализы ЖК состава проводили в трёх повторностях. Разница в результатах между биологическими повторностями составляла не более 5–10%, и не более 0,5% для аналитических.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Определение способа «отсчёта» при образовании двойной связи ацил-липидными $\Delta 12$ -десатуразами цианобактерий. На первом этапе работы были получены векторы, содержащие гены изучаемых $\Delta 12$ -ДЖК под контролем Trc-промотора. Клеточные линии *S. elongatus*, отобранные на селективной среде, были проанализированы на наличие транскриптов генов интереса и использованы в дальнейших анализах.

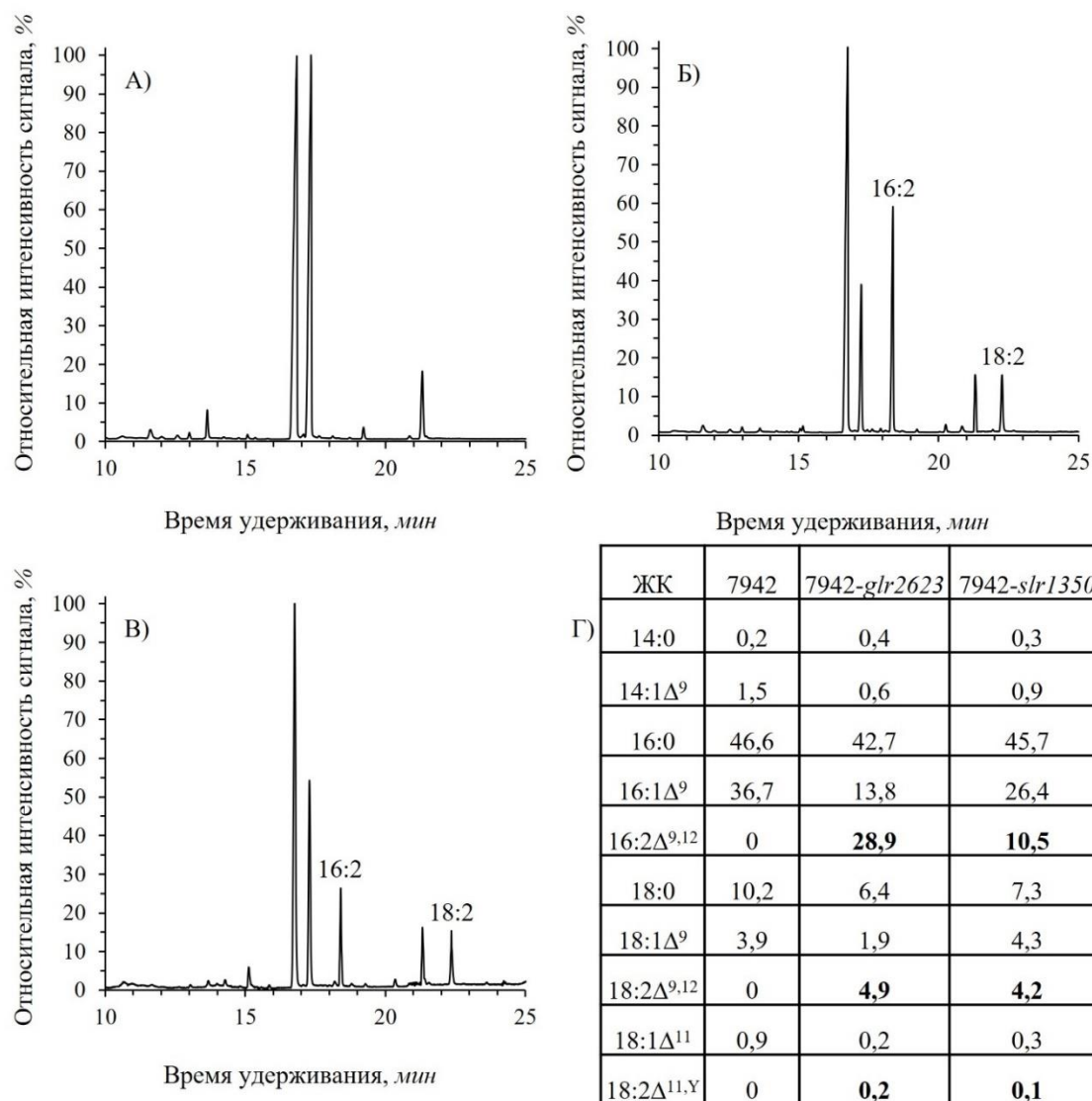


Рисунок 1. Результаты ГХ-МС анализа культуры клеток *Synechococcus elongatus* PCC 7942 дикого типа и трансформантов, экспрессирующих гены $\Delta 12$ -ДЖК. Хроматографическое разделение МЭЖК, полученных при эстерификации суммы липидов изучаемых культур: А) – культура клеток дикого типа; Б) – культура клеток, экспрессирующая ген *glr2623*; В) – культура клеток, экспрессирующая ген *slr1350*. 16:2 и 18:2 – гекса- и октадекадиеновые ЖК соответственно. Г) – состав ЖК (%) *S. elongatus* (7942) и трансформантов *S. elongatus*, экспрессирующих гены *glr2623* (7942-*glr2623*) и *slr1350* (7942-*slr1350*). Соответствующие ЖК: 14:0 – миристиновая; 14:1 Δ^9 – миристоолеиновая; 16:0 – пальмитиновая; 16:1 Δ^9 – пальмитоолеиновая; 16:2 $\Delta^{9,12}$ – гексадекадиеновая; 18:0 – стеариновая; 18:1 Δ^9 – олеиновая; 18:1 Δ^{11} – вакценовая; 18:2 $\Delta^{9,12}$ – октадекадиеновая; 18:2 $\Delta^{11,Y}$ – октадекадиеновая, производная от вакценовой. Жирным выделены качественные изменения ЖК-состава – диеновые кислоты.

Анализ общего ЖК-состава трансформантов показал наличие не только ожидаемых «9,12»-диеновых ЖК, но и пика 18:2, предположительно производного от вакценовой (18:1 Δ^{11}) кислоты. Типичные хроматограммы и усреднённые значения массовых долей ЖК приведены на Рис. 1.

Для определения субстрат-специфичности изучаемых десатураз и анализа механизма отсчёта точки внесения второй двойной связи трансформанты были выращены в присутствии ЖК нетипичных для *S. elongatus*. Добавление *цис*-вакценовой кислоты приводило к увеличению доли 18:2 $\Delta^{11,Y}$. Видимо, это связано с тем, что небольшая доля вакценовой кислоты встречается и в клетках дикого типа. При добавлении гептадеценовой кислоты (нехарактерной для цианобактерий) к среде культивирования в ЖК-составе трансформантов появлялась новая нечетная диеновая кислота (17:2 $\Delta^{10,X}$) (Табл. 1).

Таблица 1. ЖК-состав (%) клеток *S. elongatus* (7942) и трансформантов, экспрессирующих гены *slr1350* (7942-*slr1350*) и *glr2623* (7942-*glr2623*), выращенных в присутствии экзогенных кислот – гептадеценовой (17:1 Δ^{10}) или вакценовой (18:1 Δ^{11}).

	7942	7942- <i>glr2623</i>	7942- <i>slr1350</i>	7942	7942- <i>glr2623</i>	7942- <i>slr1350</i>
ЖК	+17:1 Δ^{10}			+18:1 Δ^{11}		
16:0	47,9	45,3	51,2	43,2	42,3	45,4
16:1 Δ^9	24,1	22,8	17,4	21,4	15,3	4,2
16:2 $\Delta^{9,12}$	0	2,8	3,2	0	10,2	15,8
17:1 Δ^{10}	9,4	7,9	6,3	0	0	0
17:2 $\Delta^{10,X}$	0	4,3	4,8	0	0	0
18:0	17,3	13,7	13,2	9,5	5,5	11,4
18:1 Δ^9	0,9	1,2	0,4	3,4	3,2	0,1
18:2 $\Delta^{9,12}$	0	1,4	2,3	0	6	4,5
18:1 Δ^{11}	0,4	0,3	0,8	22,5	12	9
18:2 $\Delta^{11,Y}$	0	0,3	0,4	0	5,5	9,6

Соответствующие ЖК: 14:0 – миристиновая; 14:1 Δ^9 – миристоолеиновая; 16:0 – пальмитиновая; 16:1 Δ^9 – пальмитоолеиновая; 16:2 $\Delta^{9,12}$ – гексадекадиеновая; 17:1 Δ^{10} – гептадеценовая; 17:1 $\Delta^{10,X}$ – гептадекадиеновая; 18:0 – стеариновая; 18:1 Δ^9 – олеиновая; 18:1 Δ^{11} – вакценовая; 18:2 $\Delta^{9,12}$ – октадекадиеновая, 18:2 $\Delta^{11,Y}$ – октадекадиеновая, производная от вакценовой. Курсивом выделены экзогенные ЖК, жирным – соответствующие им производные.

Для подтверждения включения экзогенных кислот в мембраны клеток цианобактерий из них были получены липидные экстракты и выделены отдельные липидные классы методом ТСХ: МГДГ (моноголактозидиацилглицериды); ДГДГ (дигалактозидиацилглицериды); СХДГ (сульфохиновозилдиацилглицериды) и ФГ (фосфатидилглицерин). Полученные липиды эстерифицировали и анализировали

методом ГХ-МС. В отдельных фракциях были так же обнаружены метиловые эфиры 17:1 Δ^{10} и её диеновой производной (Табл. 2). Данный факт подтверждает включение экзогенной кислоты в состав мембран и её доступность как субстрата для изучаемых ацил-липидных ДЖК.

Таблица 2. ЖК-состав (%) основных классов липидов *S. elongatus* (7942) и его трансформантов, экспрессирующих ген *slr1350* (*slr1350*), выращенных в присутствии экзогенных кислот.

ЖК	МГДГ		ДГДГ		СХДГ		ФГ	
	7942	<i>slr1350</i>	7942	<i>slr1350</i>	7942	<i>slr1350</i>	7942	<i>slr1350</i>
14:0	0,4	0,2	0,52	1,13	0,4	0,83	0,39	0,46
14:1 Δ^9	0,97	0,27	0,85	0,47	0	0,15	0	0,17
16:0	42,8	51,1	30,73	55,5	29,23	58,32	32,59	51,67
16:1 Δ^9	26,97	24,55	16,75	23,07	10,69	22,65	14,65	17,26
16:2 $\Delta^{9,12}$	0	12,92	0	10,31	0	4,68	0	12,14
17:1 Δ^{10}	<i>0,51</i>	<i>0,02</i>	<i>0,19</i>	<i>0,41</i>	<i>0,15</i>	<i>0,63</i>	<i>0,52</i>	<i>0,61</i>
17:2 $\Delta^{10,13}$	0	0,54	0	0,66	0	0,45	0	1,06
18:0	23,58	0,72	48,2	2,25	56,72	2,78	44,47	1,12
18:1 Δ^9	4,53	0,06	2,75	0,21	2,65	0,39	7,06	0,13
18:1 Δ^{11}	0,24	0,18	0	0,21	0,16	0,44	0,31	0,41
18:2 $\Delta^{9,12}$	0	9,26	0	5,47	0	8,11	0	14,31
18:2 $\Delta^{11,14}$	0	0,18	0	0,3	0	0,58	0	0,65

Соответствующие ЖК: 14:0 – миристиновая; 14:1 Δ^9 – миристоолеиновая; 16:0 – пальмитиновая; 16:1 Δ^9 – пальмитоолеиновая; 16:2 $\Delta^{9,12}$ – гексадекадиеновая; 17:1 Δ^{10} – гептадеценовая; 17:1 $\Delta^{10,13}$ – гептадекадиеновая; 18:0 – стеариновая; 18:1 Δ^9 – олеиновая; 18:1 Δ^{11} – вакценовая; 18:2 $\Delta^{9,12}$ – октадекадиеновая, 18:2 $\Delta^{11,14}$ – октадекадиеновая, производная от вакценовой. Курсивом выделены экзогенные ЖК, жирным – соответствующие им производные.

Полученный экстракт МГДГ так же анализировали на масс-спектрометре Shimadzu 8040, совмещённом с УВЭЖХ NexeraX2. Полученный в результате спектр фрагментов дал дополнительные доказательства включения гептадеценовой кислоты в мембранные липиды и наличие в них диеновых ЖК. Масс-спектрометрия МЭЖК позволяет установить размеры ацила и количество двойных связей в нём.

Для точного определения положения диеновых связей необходимо получать другие производные – диметилноксазолиновые или никотиниловые. Разница в массах

определённых характеристических ионов этих производных позволяет узнать точное положение диеновых связей. Суммарный препарат МЭЖК был разделён методом ВЭЖК на отдельные фракции по ЕСН. Это позволило сконцентрировать и выделить отдельные минорные фракции, которые затем дериватизировали и концентрировали.

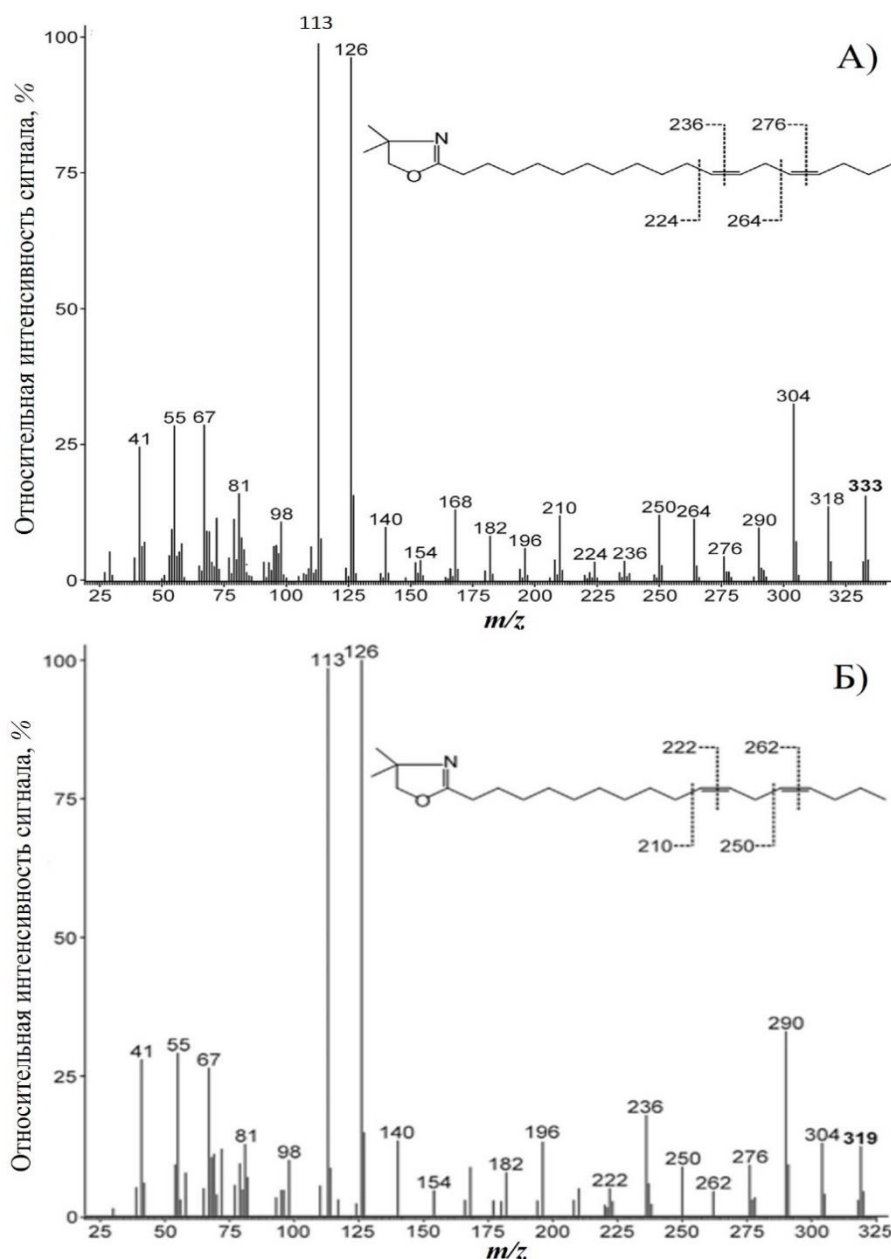


Рисунок 2. MS/MS спектры ДМОКС производных необычных диеновых кислот, формирующихся в клетках *S. elongatus*, экспрессировавших ген *glr2623*. А) спектр октадекадиеновой кислоты 18:2Δ^{11,14}; Б) спектр гептадекадиеновой кислоты 17:2Δ^{10,13}. m/z – отношение массы к заряду частиц, образующихся при фрагментации метаболитов.

Молекулярный ион m/z = 333 (Рис. 2, А) соответствует 4,4-диметилкоксазолиновому (ДМОКС) эфиру октадеценной кислоты. Начиная с иона m/z = 318 серия ионов с разницей в 14 соответствует разрыву связи -CH₂-, в то время как разница в 12 указывает на фрагмент -CH=CH-. Присутствие пары ионов m/z = 224-236 и m/z = 264-276 явно указывает на двойные связи в молекуле октадекадиеновой кислоты у атомов C11 и C14. Аналогичный анализ ионов был проведён для иона гептадекадиеновой кислоты – m/z = 319 (Рис. 2, Б). Пары m/z =

210-222 и $m/z = 250-262$ свидетельствуют о двойных связях у 10 и 13 атомов. Аналогичные данные были получены при анализе штаммов, экспрессирующих ген *slr1350*.

Проведенные ранее эксперименты по экспрессии $\Delta 12$ -ДЖК растений (*fad-2* ген из *Arachis hypogaea* L.) в культуре *S. cerevisiae*, содержащей исходно только $\Delta 9$ -десатуразу, а значит - только мононенасыщенные ЖК, показали, что трансформированные клетки дрожжей синтезировали соответствующие диеновые кислоты из пальмитоолеиновой и олеиновой кислоты в стандартных условиях культивирования. Добавление к среде культивирования *cis*-10-нонадеценной кислоты ($19:1\Delta^{10}$) приводило к появлению диеновой кислоты $19:2\Delta^{10,13}$. Этот эксперимент демонстрирует, что $\Delta 12$ -ДЖК эндоплазматического ретикула не отсчитывает от метильного конца или от эфирной группы при образовании второй двойной связи. Вторая двойная связь вносится только в мононенасыщенные ацильные группы на расстоянии трёх атомов углерода в сторону метильного конца.

Определение способа «отсчёта» при образовании двойной связи ацил-липидными $\Delta 6$ -ДЖК цианобактерий. Трансформант, экспрессирующий $\Delta 6$ -ДЖК (*sll0262*), был получен по методике, описанной ранее. При анализе ЖК-состава полученных трансформантов в клетках были обнаружены не только диеновые производные, но и моноеновые. Результаты ГХ-МС и расчёты массовых долей (%) ЖК приведены на рисунке (Рис. 3).

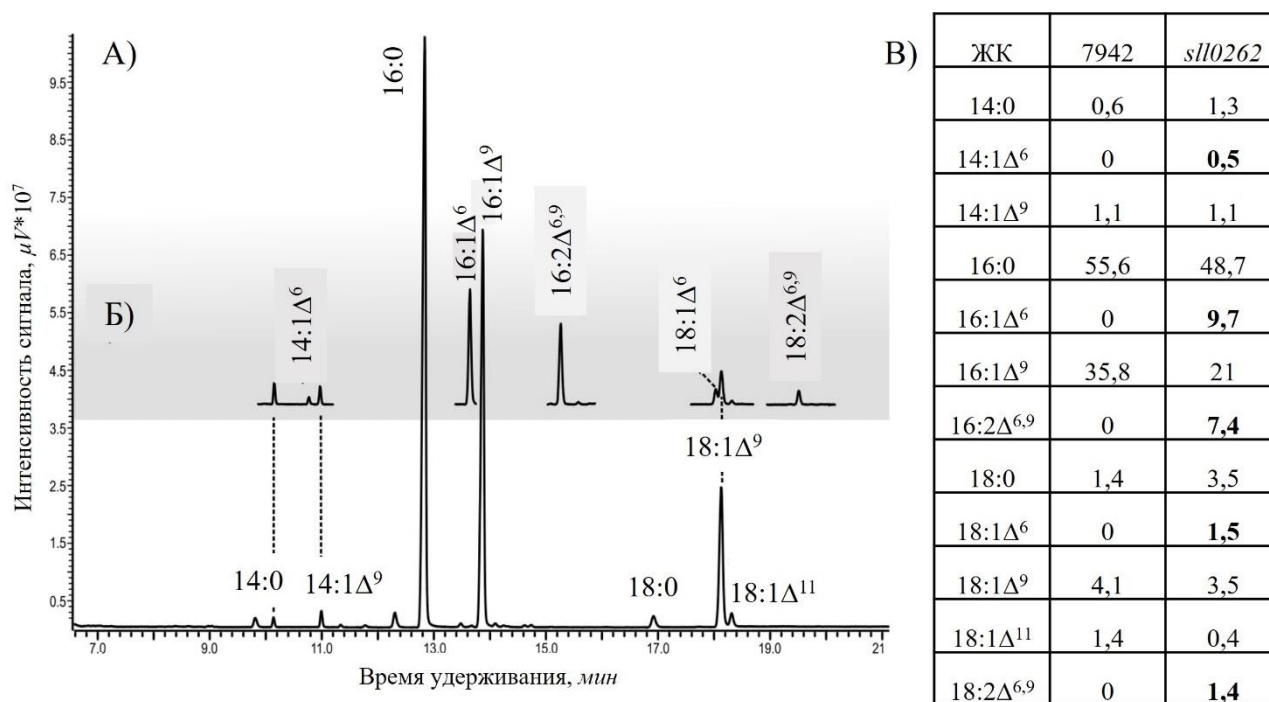


Рисунок 3. Разделение метиловых эфиров жирных кислот, полученных из суммарных липидов штамма *S. elongatus* PCC 7942 дикого типа (А) и трансформанта, экспрессирующего ген *desD* (*sll026*) (Б, серая панель). Массовые доли соответствующих ЖК, в % от общей массы. Жирным отмечены $\Delta 6$ производные, отсутствующие в клетках дикого типа. МЭЖК: 14:0 – миристиновой кислоты; 14:1 Δ^6 – тетрадеценной; 14:1 Δ^9 – миристоолеиновой; 16:0 – пальмитиновой; 16:1 Δ^6 – гексадеценной; 16:1 Δ^9 – пальмитоолеиновой; 16:2 $\Delta^{6,9}$ – гексадекадиеновой; 18:0 – стеариновой; 18:1 Δ^6 – октадеценной; 18:1 Δ^9 – олеиновой; 18:2 $\Delta^{6,9}$ – октадекадиеновой.

При культивировании в присутствии калиевой соли *цис*-10-гептадеценовой кислоты в пробах была обнаружена её диеновая производная. Описанным ранее методом её вместе с другими минорными фракциями выделяли и дериватизировали в форму никотинового эфира. Масс-спектр этих соединений приведён ниже (Рис. 4).

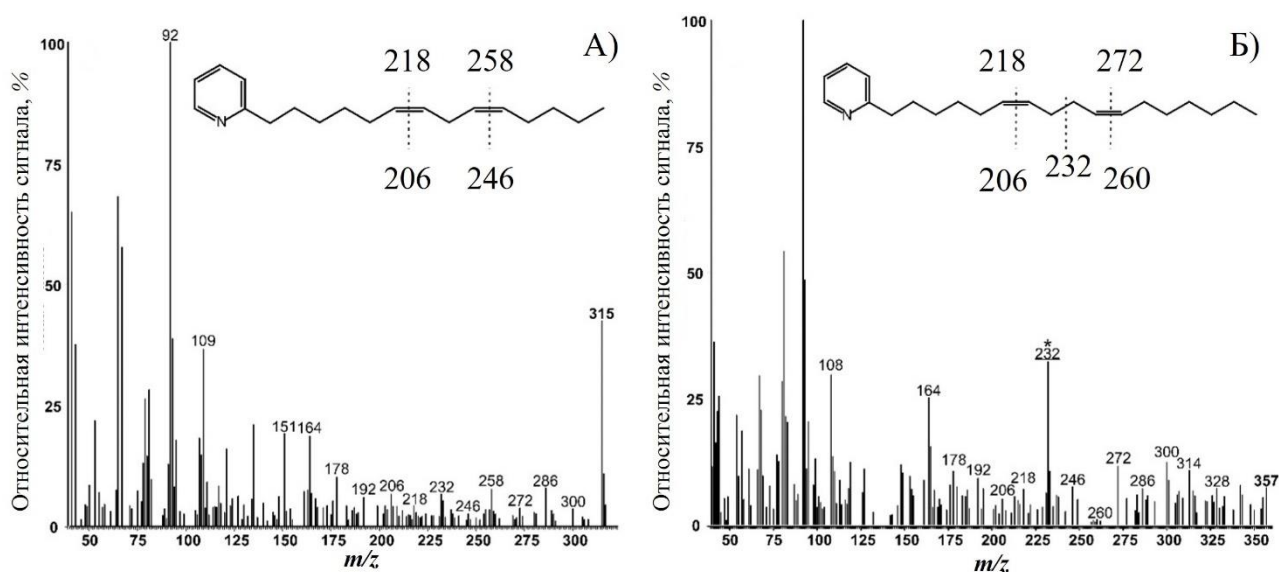


Рисунок 4. Масс-спектры никотиновых производных *цис,цис*-6,9-тетрадекадиеновой (А) и *цис,цис*-6,10-гептадекадиеновой (Б) кислот, полученные после предварительного концентрирования МЭЖК из суммарных липидов клеток *Synechococcus*, экспрессирующих ген *desD* и выращенных в присутствии калиевой соли *цис*-17:1 Δ^{10} .

Молекулярный ион $m/z = 315$ (Рис. 4, А) принадлежит никотиновому производному тетрадекадиеновой кислоты. Его молекулярный ионный пик был определен при $m/z = 315$. Он типичен тем, что имеет характерные ионы с $m/z = 92$, 108, 151 и 164, которые являются фрагментами пиридинового кольца, а ионы с m/z до 315 образуются путем фрагментации ацильной цепи. Разрывы в 40 е.а.м. 178-218 и 218-258 указывают на Δ^6 - и Δ^9 -положение двойных связей. При анализе спектра гептакадиеновой кислоты (Рис. 4 Б) были получены следующие данные: ион с $m/z=357$ свидетельствует о длине ацила в 17С и двух двойных связях; разрывы в 12 е.а.м. между $m/z = 206$ и 218, а также $m/z = 260$ и 272 вместе с соответствующими промежутками в 40 е.а.м. между $m/z = 178$ и 218 и $m/z = 232$ и 272 указывают на расположение двойных связей в положениях Δ^6 и Δ^{10} . Наличие различных моноеновых производных Δ^6 , диеновых производных как от Δ^9 , так и от необычной *цис*-17:1 Δ^{10} доказывает, что ген *sll0262* кодирует Δ^6 -ДЖК.

Изучение детерминирования длины цепи ЖК и специфичности Δ^9 -ДЖК к длине цепи. Для выполнения поставленных задач были получены трансформанты *S. elongatus* РСС 7942, экспрессирующие гены *desC1200*, *plsC1200*, а также оба эти гена одновременно. Анализ ЖК-состава этих клеток приведён ниже (Рис. 5).

В клетках дикого типа и линии, экспрессировавшей ген ацилтрансферазы (*plsC*), обнаруживалось равное соотношение 16:1 Δ^9 к 16:0, составлявшее ~ 1 % (Рис. 5А). В клетках, экспрессирующих Δ^9 -ДЖК (*desC*) или одновременно *plsC+desC* из *Cyanobacterium*, это соотношение составляло 4,58 и 3,21, соответственно. Это говорит о том, что Δ^9 -ДЖК из *Cyanobacterium* активно взаимодействует с пальмитиновой кислотой в клетках *S. elongatus* и вносит в неё двойные связи.

В клетках линий трансформантов, экспрессирующих ген ацилтрансферазы (*plsC*), были обнаружены значительные количества (10,18 и 26,5 %) миристиновой кислоты (Рис. 5Б) Это подтверждает роль *PlsC* в формировании пула коротких ЖК в клетках цианобактерий. Клетки, экспрессирующие ген Δ^9 -ДЖК из *Cyanobacterium*, содержали несравненно большее количество миристоолеиновой кислоты, по сравнению с клетками дикого типа. Это свидетельствует о том, что Δ^9 -ДЖК *S. elongatus* неохотно десатурирует 14:0, в то время как Δ^9 -ДЖК из *Cyanobacterium* способна взаимодействовать в равной степени как с 14:0, так и с 16:0.

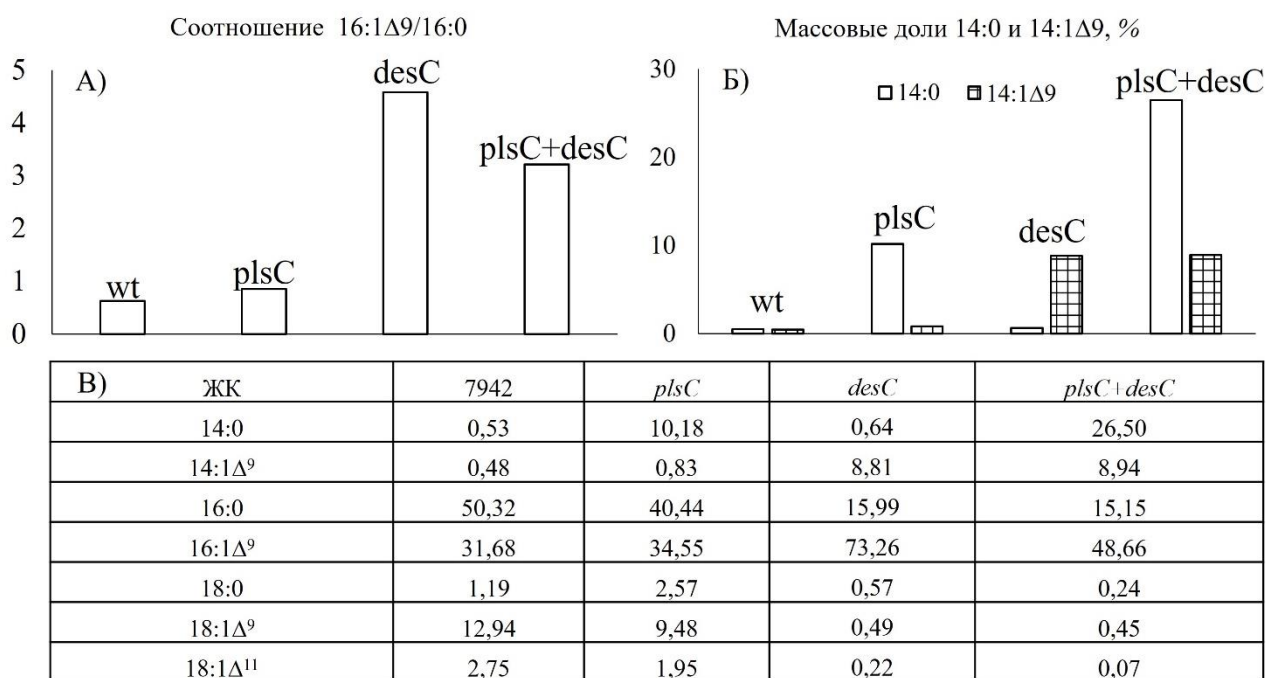


Рисунок 5. Результаты анализа ЖК-состава (%) клеток дикого типа (7942) и трансформантов, экспрессирующих гены *desC1200* (*desC*), *plsC1200* (*plsC*) и оба гена одновременно (*plsC+desC*). А) Соотношение 16:1 Δ^9 /16:0 в трансформантах; Б) Массовые доли коротких ЖК. В) Массовые доли ЖК, %: 14:0 – миристиновая; 14:1 Δ^9 – миристоолеиновая; 16:0 – пальмитиновая; 16:1 Δ^9 – пальмитоолеиновая; 18:0 – стеариновая; 18:1 Δ^9 – олеиновая; 18:1 Δ^{11} – вакценовая.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вязкость мембран – важный фактор поддержания гомеостаза клетки. Состав клеточных мембран, а значит и их вязкость, регулируется за счёт ферментов липидного метаболизма. Одними из первых охарактеризованных ферментов, участвующих в регуляции вязкости биологических мембран, были мембранные стеароил-КоА-десатуразы (SCD) мыши и человека. Также были получены кристаллические структуры растворимых ацил-АПБ десатураз высших растений. На основе этих структур можно предположить, что размеры канала, образующегося внутри фермента и связывающего метильный конец ацильной цепи, обуславливают положение вносимой двойной связи. Данные по рентгеноструктурному анализу мембранных стеароил-КоА-десатураз человека и мыши согласуются с этим принципом. Совокупность полученных данных позволяет предполагать, что каталитический центр десатураз находится в точке излома гидрофобного туннеля, в котором удерживается ацильный остаток. Значит, именно структура этого участка фермента обуславливает положение, в которое вносится *cis*-двойная связь.

Отсутствие экспериментальных данных по структуре ацил-липидных десатураз не позволяет сделать однозначных выводов. Однако на основе смоделированных на основе белковых последовательностей структур Δ^9 -ДЖК из *Arthrospira platensis* и Δ^5 -ДЖК *Bacillus cereus* можно сделать предположения об аналогичной роли туннельной структуры и в этом классе десатураз.

Результаты этой работы показывают, что длина цепи не влияет на формирование второй двойной связи ацил-липидной Δ^{12} -десатуразой. Туннель Δ^{12} -ДЖК одинаково способен к взаимодействию с остатками C16, C17, C18, C19. Так же на основе полученных результатов можно утверждать, что Δ^{12} -ДЖК не делают различий между эндо- и экзогенными субстратами и относятся к (x+3) типу десатураз, которые вносят двойную связь, «отсчитав» три атома углерода в сторону метильного конца от предсуществующей первой связи.

Функциональная активность ацил-липидной Δ^6 -десатуразы не связана с наличием двойных связей в ацильном остатке. Формирование двойных связей в положении Δ^6 происходит как в насыщенных ацилах, так и в ненасыщенных. Положение двойной связи так же не играет никакой роли: диеновые производные обнаруживаются как от Δ^9 , так и от Δ^{10} моноеновых ЖК. Эти данные свидетельствуют о том, что Δ^6 -ДЖК вносит двойную связь в ацил на расстоянии 6 атомов углерода, «отсчитывая» от карбоксильного конца остатка ЖК.

Экспрессия гена *plsC* привела к увеличению доли миристиновой кислоты, за счёт более активного переноса коротких ацильных остатков к молекулам глицерин-3-фосфата. Экспрессия гена *desC* увеличила долю мононенасыщенных Δ^9 C14 и C16 ЖК. Ко-экспрессия генов *plsC* и *desC* привела к увеличению доли миристиновой кислоты, увеличила долю 14:1 Δ^9 и изменила соотношение C16:0/C16:1 Δ^9 в сторону увеличения доли мононенасыщенной кислоты. Таким образом, можно утверждать, что специфичная к 14:0 ацилтрансфераза PlsC совместно со специфичной к 14:0 Δ^9 -ДЖК отвечают за формирование необычного состава ЖК у *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200.

ВЫВОДЫ

1. Ацил-липидные $\Delta 12$ -десатуразы относятся к семейству десатураз ($x+3$). Эти ферменты вносят вторую двойную связь независимо от длины субстрата, «отсчитывая» три атома углерода от предсуществующей двойной связи в сторону метильного конца ЖК.
2. Ацил-липидная $\Delta 6$ -десатураза способна играть роль «первичной», взаимодействуя с насыщенными ацильными остатками. $\Delta 6$ -ДЖК вносит двойную связь независимо от длины субстрата и наличия в нем предсуществующей двойной связи, «отсчитывая» 6 атомов углерода от карбоксильного конца.
3. Необычный состав ЖК цианобактерии *Cyanobacterium* sp. штамм IPPAS B-1200, обогащенный 14:0 и 14:1, обусловлен активностью ацилтрансферазы PlsC, обеспечивающей увеличение доли миристиновой кислоты за счёт увеличения оттока ацильных остатков из цикла элонгации, и $\Delta 9$ -ДЖК (DesC1200), способной эффективно взаимодействовать со всеми доступными (C14 и C16) субстратами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в международных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК

1. Starikov A. Y., Ussebaeva A. A., Sinetova M. A., Sarsekeyeva F. K., Zayadan B. K., Ustinova V. V., Kupriyanova E. V., Los D. A., Mironov K. S. (2016) Draft genome sequence of *Cyanobacterium* sp. strain IPPAS B-1200 with a unique fatty acid composition. *Genome Announcements*, 4(6), e01306-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01306-16>
2. Стариков А. Ю., Усербаева А. А., Лапина С. С., Миронов К. С., Маслова И. П., Пчёлкин В. П., Заядан Б. К., Синетова М. А., Лось Д. А. (2017) Субстратная специфичность ацил-липидной $\Delta 9$ -десатуразы из цианобактерии *Prochlorothrix hollandica* – продуцента миристолеиновой кислоты. *Физиология растений*, Т. 64., № 4, 295–300. <https://doi.org/10.7868/S0015330317040145>
3. Стариков А. Ю., Усербаева А. А., Миронов К. С., Сидоров Р. А., Заядан Б. К., Бедбенов В. С., Синетова М. А., Лось Д. А. (2018) Субстратная специфичность ацил-липидной $\Delta 9$ -десатуразы жирных кислот из цианобактерии *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 с необычным жирнокислотным составом. *Физиология растений*, Т. 65., №. 4, 270–278. <https://doi.org/10.7868/S0015330318040036>
4. Starikov A. Y., Sidorov R. A., Mironov K. S., Goriainov S. V., Los D. A. (2020) Delta or Omega? $\Delta 12$ ($\omega 6$) fatty acid desaturases count 3C after the pre-existing double bond. *Biochimie*, 179, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.009>
5. Sinetova M. A., Sidorov R. A., Medvedeva A. A., Starikov A. Y., Markelova A. G., Allakhverdiev S. I., Los D. A. (2021) Effect of salt stress on physiological parameters of microalgae *Vischeria punctata* strain IPPAS H-242, a superproducer of eicosapentaenoic acid. *Journal of Biotechnology*, 331, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.03.001>
6. Samylina O. S., Sinetova M. A., Kupriyanova E. V., Starikov A. Y., Sukhacheva M. V., Dziuba M. V., Tourova T. P. (2021) Ecology and biogeography of the ‘marine *Geitlerinema*’ cluster and a description of *Sodalinema orleanskyi* sp. nov., *Sodalinema*

gerasimenkoe sp. nov., *Sodalinema stali* sp. nov. and *Baaleninema simplex* gen. et sp. nov. (*Oscillatoriales*, *Cyanobacteria*). *FEMS Microbiology Ecology*, 97(8), fiab104. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab104>

7. Starikov A. Y., Sidorov R. A., Goriainov S. V., Los D. A. (2022) Acyl-lipid $\Delta 6$ -desaturase may act as a first FAD in cyanobacteria. *Biomolecules*, 12(12), 1795. <https://doi.org/10.3390/biom12121795>

Публикации в сборниках конференций

1. Стариков А. Ю., Сарсекеева Ф. К., Усербаева А. А., Заядан Б. К., Миронов К. С., Сидоров Р. А., Козлова А. Ю., Куприянова Е. В., Синетова М. А., Лось Д. А. (2016) Секвенирование *de novo* генома цианобактерии *Cyanobacterium* spp. с уникальным жирно-кислотным составом. Тез. 4-й Всероссийской конференции по геномному секвенированию. Москва, 18-19 мая 2016 г. С. 8.

2. Синетова М. А., Стариков А. Ю., Маркелова А. Г., Сидоров Р. А., Габриелян Д. А., Мессинева Е. М., Козлова А. Ю., Александрова Е. А., Самылина О. С. (2019) Экофизиологическая характеристика штаммов рода *Cyanobacterium*. Материалы докладов 2-й международной школы-конференции «Цианопрокариоты/цианобактерии: систематика, экология, распространение». Сыктывкар, Россия, 16–21 сентября 2019 г. С. 239–243.

3. Стариков А. Ю., Сидоров Р. А., Лось Д. А. (2020) Изучение субстрат-специфичности ацил-липидных десатураз *gll3735* и *glr2623* цианобактерии *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. XXXII Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 10-13 февраля 2020 г.

4. Sinetova M., Bobrovnikova L., Starikov A., Sidorov R., Mironov K., Los D. High-added-value compounds from microalgae (2021) Conference program and abstracts. Green Christmas Session “Photosynthetic microorganisms for sustainable development”. International online conference. Rome, Italy, P. 13.

5. Миронов К.С., Стариков А.Ю., Воронков А.С., Бобровникова Л.А., Заднепровская Е.В., Крапивина А.А., Синетова М.А. (2022) Регуляция синтеза липидов и крахмала у зеленых микроводорослей. Материалы VI Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Водоросли: проблемы таксономии и экологии, использование в мониторинге и биотехнологии». г. Москва, Россия, 12—17 сентября 2022 г. С. 36.