

Разработка дрожжевой тест-системы для количественного определения гиспидина

Научный руководитель – Мышкина Надежда Михайловна

Блохина А.Е.¹, Палкина К.А.²

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия, *E-mail: anne.blokhina@gmail.com*; 2 - Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия, *E-mail: palkina_1993@mail.ru*

Гиспидин — это поликарбонильное соединение (поликетид), вторичный метаболит растений и грибов, широко распространённый в природе. В последние годы интерес к гиспидину неуклонно растёт: группы учёных по всему миру изучают его биологическую активность, демонстрируя высокий терапевтический потенциал этого соединения в борьбе с окислительным стрессом, с раковыми и сердечно-сосудистыми заболеваниями (Lee et al. 2011). Кроме того, гиспидин является непосредственным предшественником люциферина грибов — 3-гидроксигиспидина (Kaskova et al. 2017). Интермедиаты биосинтетического пути люциферина грибов, а также участвующие в нем ферменты, были описаны ранее в нашей лаборатории (Kotlobay et al. 2018). Данная система является генетически кодируемой и имеет большой потенциал для создания люминесцентных инструментов для биоимиджинга.

Биосинтез гиспидина в грибах осуществляет фермент гиспидинсинтаза. Это большой мультидоменный фермент, постадийно катализирующий превращение кофейной кислоты в гиспидин. Для активации гиспидинсинтазы необходима посттрансляционная модификация. Крупные белки сложно использовать в метаболической инженерии, поэтому мы рассмотрели альтернативный путь биосинтеза гиспидина: с помощью поликетидсинтаз из различных растений. Совместно с дополнительным ферментом поликетидсинтазы превращают подобные кофейной кислоте субстраты в поликетиды, структура которых также подобна гиспидину. Мы проверили несколько растительных поликетидсинтаз в дрожжах *Pichia pastoris* и определили три наиболее активные. Далее мы сравнили количество гиспидина, производимого из кофейной кислоты дрожжами, экспрессирующими гены разных поликетидсинтаз, со стандартными образцами гиспидина с помощью капельного теста. В качестве тест-системы мы использовали линии дрожжей *Pichia pastoris*, экспрессирующих гены биолюминесцентной системы гриба *Neonothopanus nambi*: при обработке таких дрожжей гиспидином они синтезируют люциферин (3-гидроксигиспидин), который затем окисляется кислородом воздуха под действием люциферазы с испусканием света. Интенсивность биолюминесценции пропорциональна количеству гиспидина, поэтому мы использовали данный метод для количественной оценки активности поликетидсинтаз. Таким образом мы определили самую активную поликетидсинтазу для биосинтеза гиспидина и оценили количество гиспидина, который могут произвести культуры дрожжей.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-29-08049.

Источники и литература

- 1) Kaskova, Zinaida M., Felipe A. Dörr, Valentin N. Petushkov, Konstantin V. Purtov, Aleksandra S. Tsarkova, Natalja S. Rodionova, Konstantin S. Mineev, et al. 2017. "Mechanism and Color Modulation of Fungal Bioluminescence." *Science Advances* 3 (4): e1602847.

- 2) Kotlobay, Alexey A., Karen S. Sarkisyan, Yuliana A. Mokrushina, Marina Marcet-Houben, Ekaterina O. Serebrovskaya, Nadezhda M. Markina, Louisa Gonzalez Somermeyer, et al. 2018. “Genetically Encodable Bioluminescent System from Fungi.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (50): 12728–32.
- 3) Lee, In-Kyoung, and Bong-Sik Yun. 2011. “Styrylpyrone-Class Compounds from Medicinal Fungi *Phellinus* and *Inonotus* Spp., and Their Medicinal Importance.” *The Journal of Antibiotics* 64 (5): 349–59.