



УДК 547.915:577.152:581.198

ГЕОМЕТРИЧЕСКАЯ КОНФИГУРАЦИЯ 12,13-ЭПОКСИ-9,11-ОКТАДЕКАДИЕНОВОЙ КИСЛОТЫ – ПРОДУКТА РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ АЛЛЕНОКСИДСИНТАЗОЙ ЛЬНА (СУР74А)

© 2005 г. Н. В. Медведева*, Ш. К. Латыпов**, А. А. Баландина**,
Л. Ш. Мухтарова*, А. Н. Гречкин**

*Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111, Казань, а/я 30;

** Институт органической и физической химии КазНЦ РАН, Казань

Поступило в редакцию 16.05.2005 г. Принято к печати 20.05.2005 г.

Методом ЯМР исследована геометрическая конфигурация окиси аллена, короткоживущего продукта реакции, катализируемой алленоксидсинтазой льна (СУР74А). Структура (9Z,11E)-12,13-эпокси-9,11-октадекадиеновой кислоты была установлена на основании данных ядерного эффекта Оверхаузера.

Ключевые слова: алленоксидсинтаза; окись аллена, конфигурация; лен (*Linum usitatissimum* L.).

Окиси аллена жирных кислот являются нестабильными интермедиатами липоксигеназного сигнального каскада в растениях и кораллах [1–5]. Образование этих продуктов у растений контролируется ферментом алленоксидсинтазой (АОС, КФ 4.2.1.92), относящимся к новому подсемейству СУР74А макросемейства цитохромов P450.

Окиси аллена, синтезируемые АОС льна, ранее были выделены и охарактеризованы с помощью спектроскопии ЯМР [2]. Однако конфигурация двойной связи при окисране остается невыясненной. Настоящая работа посвящена установлению конфигурации этой двойной связи, элемента структуры, определяющего способность окисей аллена к циклизации [6, 7].

АОС из семян льна и (9Z,11E,13S)-13-гидроперокси-9,11-октадекадиеновую кислоту (13-НРОД) получали, как описано ранее [6], и очищали с помощью ВЭЖХ на нормальной фазе. 13-НРОД (1 мг) инкубировали с 3 мл раствора АОС (3.5 МЕ/мл) в фосфатном буфере, рН 7.0 в течение 20 с при 0°C. Продукты экстрагировали гексаном (4 мл, 0°C). Экстракт концентрировали и обрабатывали diazometаном (0°C, 3 мин). Полученные метиловые эфиры растворяли в гексане (1 мл) и хранили при –85°C. Единственное неполярное соединение (I) (УФ-максимум при 236 нм) было обнаружено при анализе продуктов методом ВЭЖХ (при –20°C) на цианопропиловой колонке Separon SIX CN (5 мкм, 3.2 × 150 мм), рас-

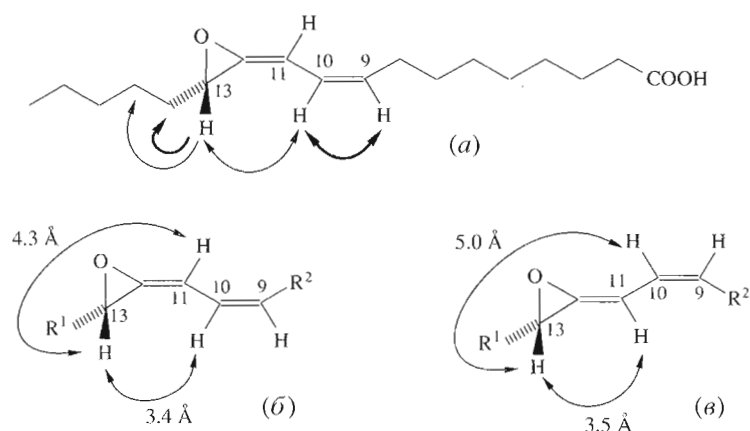
творитель гексан–диэтиловый эфир, 999 : 1 (по объему), скорость потока 0.4 мл/мин. Метанолиз соединения (I) приводит к метиловому эфиру (9Z)-12-оксо-13-метокси-9-октадеценовой кислоты [1]: масс-спектр, m/z (I, %): 309 (1.5) [$M^+ - MeO$], 115 (100) [$M^+ - (C1-C12)$], 83 (74) [115 – MeOH]. Свободная карбоновая кислота (I) в гексановом растворе превращается в макролактон (9Z)-12-оксо-9-октадецен-11-олид [3]: масс-спектр, m/z (I, %): 294 (4.1) [M^+], 181 (14) [$M^+ - (C12-C18)$], 135 (23), 113 (100) [$M^+ - 181$].

Спектр 1H -ЯМР (AVANCE 600 (Bruker), 600 МГц, n -[$^2H_{14}$]гексан, 233 К): 1H -ЯМР: 5.86 (1 H, дд, $J_{9,10}$ 11.0, $J_{10,11}$ 11.7, H10), 5.65 (1 H, д, H11), 5.12 (1 H, дт, $J_{8,9}$ 7.5, H9), 3.51 (3 H, с, COOMe), 3.45 (1 H, т, J 4.7, H13), 2.18 (2 H, т, J 7.4, H2), 2.11 (2 H, м, H8), 1.74 (1 H, м, H14a), 1.64 (1 H, м, H14b), 1.57 (2 H, м, H3), 1.45 (2 H, м, H15), ~1.3 (12 H, H4/H7, H16, H17), ~0.9 (3 H, H18). Сигналы 1.3 и 0.9 перекрыты сигналами растворителя и определены приближенно по данным 2D-COSY. Спектры 1H -ЯМР и 2D-COSY полностью подтверждают структуру соединения (I) как (9Z,11E)-12,13-эпокси-9,11-октадекадиеновой кислоты [2], однако не дают информации о геометрии 11,12-двойной связи. Для ее выяснения были проведены эксперименты по измерению ядерного эффекта Оверхаузера с использованием метода DPGNOE [8]. Данные ЯЭО представлены на рисунке.

Наличие ЯЭО между H10 и H13 (рисунок, а) позволяет говорить о том, что протоны H10 и H13 пространственно сближены. Вместе с тем, ЯЭО между H11 и H13 не наблюдается. Результаты компьютерного моделирования (рисунок, б) показывают, что расстояние между H10 и H13 у 11E-изомера составляет около 3.4 Å. Таким обра-

Сокращения: 13-НРОД – (9Z,11E,13S)-13-гидроперокси-9,11-октадекадиеновая кислота; АОС – алленоксидсинтаза; 2D-COSY – двумерная корреляционная спектроскопия; ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера.

Автор для переписки (эл. почта: Grechkin@mail.knc.ru; тел.: (8432) 92-75-35; факс: (8432) 92-77-45).



Выяснение геометрической конфигурации окиси аллена (I) с помощью ЯЭО. *a* – наблюдаемые основные ЯЭО. Жирные стрелки – сильные эффекты; тонкие – умеренные эффекты. *б* и *в* – расстояния между некоторыми протонами (11*E*)- (*б*) и (11*Z*)- (*в*) изомеров 12,13-эпокси-9,11-октадекадиеновой кислоты. R¹ = *n*-пентил, R² = -(CH₂)₇COOMe.

зом, ЯЭО между H10 и H13 у 11*E*-изомера возможен. В то же время у 11*Z*-изомера расстояние между H10 и H13 значительно больше, около 5.0 Å (рисунок, *в*), что делает маловероятным обнаруживаемый ЯЭО между этими протонами. Напротив, у (11*Z*)-изомера достаточно сближены протоны H11 и H13 (рисунок, *в*). Таким образом, у 11*Z*-изомера возможен ЯЭО между H11 и H13, но в наших экспериментах он не наблюдался. Полученные данные ЯЭО позволяют сделать вывод, что двойная связь при окисирани имеет *E*-конфигурацию (рисунки *a*, *б*). Именно такая геометрия необходима для аннуляции окиси аллена и ее превращения в циклопентенон [6, 7]. Таким образом, АОС семян льна обладает высокой специфичностью, синтезируя лишь 11*E*-изомер окиси аллена.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантами Президиума РАН (программа “Молекулярная и клеточная биоло-

гия”), РФФИ № 03-04-48660, 05-03-32558 и ведущей научной школы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hamberg M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1987. V. 920. P. 76–84.
2. Brash A.R., Baertschi S.W., Ingram C.D., Harris T.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 3382–3386.
3. Hamberg M., Gardner H.W. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1992. V. 1165. P. 1–18.
4. Grechkin A.N. // *Prog. Lipid Res.* 1998. V. 37. P. 317–352.
5. Tijet N., Brash A.R. // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002. V. 68–69. P. 423–431.
6. Grechkin A.N. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1994. V. 1213. P. 199–206.
7. Grechkin A.N., Chechetkin I.R., Mukhtarova L.S., Hamberg M. // *Chem. Phys. Lipids*. 2002. V. 120. P. 87–99.
8. Stott K., Stonehouse J., Keeler J., Hwang T.L., Shaka A.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 4199–4200.

Geometrical Configuration of 12,13-Epoxyoctadeca-9,11-dienoic Acid, a Product of the Reaction Catalyzed by Flaxseed Allene Oxide Synthase (CYP74A)

N. V. Medvedeva*, Sh. K. Latypov**, A. A. Balandina**,
L. Sh. Mukhtarova*, and A. N. Grechkin**

#Phone: (8432) 92-7535; fax: (8432) 92-7745; e-mail: grechkin@mail.knc.ru

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
P. O. Box 30, Kazan, Tatarstan, 420111 Russia

**Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Scientific Center,
Russian Academy of Sciences, Kazan, Tatarstan, Russia

The geometrical configuration of a short-living allene oxide reaction product that arises under the catalysis by flaxseed allene oxide synthase (CYP74A) was studied by NMR spectroscopy. The structure of (9*Z*,11*E*)-12,13-epoxyoctadeca-9,11-dienoic acid was established for it from the results of the nuclear Overhauser effect. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: allene oxide, configuration; allene oxide synthase; flax (*Linum usitatissimum*)