

ЛИПОКСИГЕНАЗЫ БАКТЕРИЙ И ПРОСТЕЙШИХ МОГУТ УЧАСТВОВАТЬ В МЕЖКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ И ПОДАВЛЕНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА*

© 2020 Г.Ф. Куракин^{1**}, А.М. Самоукина², Н.А. Потапова^{3,4}

¹ Тверской государственный медицинский университет Минздрава России, кафедра биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики, 170100 Тверь, Россия; электронная почта: kurackin-georgy@yandex.ru

² Тверской государственный медицинский университет Минздрава России, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, 170100 Тверь, Россия; электронная почта: anna_samoukina@mail.ru

³ Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, 127051 Москва, Россия; электронная почта: nadezhdalpotapova@gmail.com

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 19.06.2020

После доработки 22.07.2020

Принята к публикации 22.07.2020

Липоксигеназы распространены в организмах животных, растений и грибов, где вовлечены в широкий круг процессов межклеточной сигнализации. Ранее было установлено присутствие липоксигеназ у ряда бактерий и простейших, но их биологическое значение остаётся неясным. Также было выдвинуто несколько не имеющих экспериментального подтверждения гипотез об их функции. Целью нашей работы стал эволюционный и таксономический анализ бактериальных и протозойных липоксигеназ для оценки их функции с применением биоинформатических методов. Мы выполнили поиск последовательностей липоксигеназ с использованием BLAST, построили филогенетические деревья и сети и проанализировали полученные данные. Наши результаты поддерживают гипотезу об участии липоксигеназ в образовании многоклеточных структур у микроорганизмов и их возможном эволюционном значении в происхождении многоклеточности. Помимо этого, мы нашли подтверждение связи липоксигеназ с подавлением иммунного ответа хозяина паразитическими и симбиотическими бактериями, в том числе опасными оппортунистическими патогенами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: липоксигеназы, бактерии, простейшие, биоинформатика, филогенетика, сигнализация, многоклеточность, оппортунистические патогены.

DOI: 10.31857/S0320972520090067

ВВЕДЕНИЕ

Липоксигеназы — это ферменты, катализирующие окисление полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) с образованием гидропероксидов [1]. Они представлены семейством белков с консервативной среди эукариот структурой. В их активном сайте содержится негемовое железо или редко марганец [2]. Липоксигеназы широко распространены у животных, растений и грибов [3, 4], выполняя идентичную функцию: синтезируемые ими окисленные производные ПНЖК, оксипирины, являются биологически активными веществами.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-168, 03.09.2020.

** Адресат для корреспонденции.

Основным субстратом липоксигеназ позвоночных является арахидоновая кислота. Их продукты — лейкотриены, гидрокси- и оксоэйкозатетраеновые кислоты и липоксины — регулируют воспалительную реакцию, а также апоптоз клеток, функцию тромбоцитов и развитие опухоли [4–8].

Продукты липоксигеназной реакции у растений также участвуют в ответе на повреждение и атаку патогенными микроорганизмами [9–11]. Наиболее известными являются жасмонаты — циклические оксипирины, структурно напоминающие простагландины животных и обладающие выраженной гормональной активностью [10].

Помимо высших растений, липоксигеназы присутствуют у водорослей и мхов. Предполагается, что у бурых водорослей по липоксигеназному пути синтезируются феромоны, осуществ-

влияющие химическую аттракцию между мужской и женской гаметой [12]. У мхов липоксигеназный путь, по всей видимости, необходим для нормального развития [13].

Наиболее интересной особенностью липоксигеназного пути грибов является присутствие марганцевых липоксигеназ (MnLOX), содержащих в активном центре вместо иона железа ион марганца. Предполагается их функция как фактора инвазии, а также в обеспечении чувства кворума и смены формы у диморфных грибов [12].

Таким образом, у многоклеточных организмов липоксигеназы вовлечены преимущественно в процессы межклеточной коммуникации, а также в процесс антимикробной защиты и микробной агрессии.

В связи с этим важным представляется факт наличия липоксигеназ у ряда бактерий и простейших. Методами молекулярной генетики и биоинформатики было установлено присутствие липоксигеназ в 0,5% секвенированных геномов бактерий (по состоянию на 2015 г.) [14]. Лишь немногие из этих ферментов изучены *in vitro*: липоксигеназы двух цианобактерий рода *Nostoc* [15, 16], одной цианобактерии рода *Anabaena* [17], миксобактерии *Mucococcus xanthus* [18] и псевдомонады *Pseudomonas aeruginosa* [19, 20]. Из числа простейших последовательность липоксигеназы описана только у слизевика *Dictyostelium discoideum* [3]. При этом на сегодняшний день функции бактериальных и протозойных липоксигеназ остаются малоизученными [2, 14, 21].

Наибольший объём данных по распространённости липоксигеназ у бактерий суммирован в обзоре Horn et al. [14], однако не проведено детализированного исследования связи их наличия с экофизиологией соответствующих организмов. В указанном обзоре отмечена высокая встречаемость липоксигеназ у нитрифицирующих бактерий и выдвинуто предположение об их связи с метаболизмом азота [14, 22]. Упомянута также высокая распространённость липоксигеназ у цианобактерий и сделана попытка эволюционно связать этот факт с «Кислородной катастрофой» (Great Oxidation Event), вызванной их активностью [14]. Однако биохимические механизмы такой связи остаются не вполне ясными.

Больше всего функциональных данных накоплено по липоксигеназе опасного оппортунистического и нозокомиального патогена — синегнойной палочки (*P. aeruginosa*). Её фермент, вероятно, действует как фактор патогенности. Было обнаружено, что он способен синтезировать из жирных кислот организма-хозяина липокси-

ны с противовоспалительным и локальным иммуносупрессивным действием. На основании этого предполагается, что *P. aeruginosa* использует липоксигеназу для подавления иммунитета хозяина [19, 20]. В последнее время также появились данные, что другой изофермент её липоксигеназы запускает ферроптоз бронхиального эпителия, расщепляя фосфолипиды клетки-хозяина [23].

При этом Horn et al. особо отмечают, что у большинства бактерий, патогенных для человека, липоксигеназы не обнаружены. В частности, отмечается их отсутствие у стафилококков, стрептококков, микобактерий туберкулёза и лепры, холерного вибриона, *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae* [14]. Авторы делают вывод, что для реализации патогенности у этих бактерий липоксигеназы не являются необходимыми [14].

В работе Goloshchapova et al. [24] наиболее полно суммированы существующие гипотезы о функции бактериальных липоксигеназ:

а) межклеточная сигнализация — такая функция постулируется для *P. aeruginosa* и предполагается для миксобактерий, демонстрирующих сложные социальные паттерны поведения;

б) инвазивный рост и разрушение клеточных мембран патогеном — такой механизм предполагается для *P. aeruginosa*;

в) уклонение от иммунного ответа — такая стратегия обсуждалась выше на примере *P. aeruginosa*;

г) липоксигеназа как сенсор кислорода — такая функция предполагается для липоксигеназы *P. aeruginosa* на основе её низкой аффинности к кислороду;

д) детоксикация ПНЖК, опасных для многих бактерий.

Однако в упомянутой работе не приводятся экспериментальные данные в поддержку той или иной гипотезы.

Оптимальным решением в условиях недостатка экспериментальных данных является филогенетическое и таксономическое профилирование бактериальных и протозойных липоксигеназ и сравнение полученных профилей с литературными данными об экофизиологии соответствующих организмов. Однако на сегодняшний день объём таких работ недостаточен.

В обзоре Horn et al. [14] приводится только таксономический профиль на уровне типа, что не позволяет найти ассоциации с экофизиологией. Hansen et al. [25] провели филогенетическое профилирование бактериальных липоксигеназ, однако они сравнивали свои результаты с биохимическими, а не экофизиологическими данными.

Целью нашей работы стало установление связи филогенетического и таксономического распределения липоксигеназ бактерий и простейших с их экофизиологическими особенностями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск вероятных последовательностей липоксигеназ проводился с помощью программы BLAST [26] в базах UniProt (<https://www.uniprot.org/blast/>) [27] и NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Мы использовали две базы для снижения вероятности ложноотрицательного результата. Основной поиск среди бактерий проводили в базе данных UniProt, уточняющий поиск — в NCBI. Для эукариот основной поиск проводили в NCBI, уточняющий — в UniProt. Использование различных баз для бактерий и простейших связано с тем, что BLAST UniProt более оптимальна для визуального контроля большого количества выравниваний (более 500 — для бактерий), в то время как NCBI оптимальна для прицельного поиска среди относительно небольшого числа последовательностей (что имело место для простейших).

В качестве запросов использовали последовательности липоксигеназ из базы данных Swiss-Prot, максимально удалённые филогенетически: арахидонат-12-липоксигеназа человека (UniProt ID: P18054) [28], марганцевая липоксигеназа гриба *Gaeumannomyces graminis* (UniProt ID: Q8X151) [29] и линолеат-9/13-липоксигеназа бактерии *P. aeruginosa* (UniProt ID: Q8RNT4) [30].

Функциональная активность обнаруженных белков была определена косвенным методом по наличию консервативного липоксигеназного домена, которое проверялось с помощью онлайн-сервиса Batch-CD-Search [31] с использованием базы данных CDD [32] и пороговой величины E 0,01. При сомнительном результате BLAST (значение E близко к единице) также вручную проверяли наличие консервативных металлсвязывающих остатков.

На дальнейших этапах анализа использовали только последовательности, имеющие в своей структуре липоксигеназный домен и консервативные металлсвязывающие остатки. Их наличие позволяет с высокой вероятностью предполагать функциональную активность этих белков, поэтому в дальнейшем они будут упоминаться как липоксигеназы и считаться таковыми.

С целью таксономического анализа распространённости липоксигеназ рассчитывали скор-

ректированный показатель встречаемости для каждого порядка.

$$\text{Встречаемость} = (\text{Число родов с липоксигеназами} / \text{Число предсказанных протеомов}) \times 100$$

Количество предсказанных протеомов оценивали по базе данных UniProt, учитывали только невырожденные протеомы. Такая формула нивелирует влияние различий в количестве доступных геномов/протеомов.

Множественные выравнивания строили с помощью доступной онлайн программы MAFFT v. 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) [33, 34] по алгоритму с итеративным уточнением FFT-NS-i [35], последовательности с большим количеством инсерций и делеций удаляли интегрированным с MAFFT v. 7 сервером MaxAlign [36]. Филогенетические деревья строили в программах MAFFT методом объединения соседей и MEGA [37] — методом минимальной эволюции. В обоих случаях использовали консервативные сайты и Пуассоновскую модель замен. Для тестирования узлов дерева использовали бутстрэп-метод с 500 повторениями. Визуализация и анализ филогенетических деревьев проводили в доступной онлайн среде iTOL (<https://itol.embl.de/>) [38].

В дополнение к деревьям мы строили и изучали филогенетические сети. Для их построения и визуализации использовали программу SplitsTree [39]. Деревья и сети строили как для всего набора обнаруженных липоксигеназ, так и выборочно для некоторых групп с целью более детального анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Таксономическое распределение липоксигеназ поддерживает гипотезу об их связи с межклеточной сигнализацией. Таксономическое распределение липоксигеназ на уровне типов, в целом, соответствовало работе Horn et al. [14]. Однако мы провели более детальный анализ на уровне порядков. Липоксигеназы оказались наиболее распространены у представителей порядков Oscillatoriales (20,93), Мухососкалей (16,87) и Nostocales (14,29) (рис. 1). Порядки Oscillatoriales и Nostocales объединяют цианобактерии с нитчатой морфологией, Мухососкалей — бактерии, образующие плодовые тела. Среди цианобактерий липоксигеназы таксономически распределены следующим образом: Oscillatoriales (20,93) > Nostocales (14,29) > Synechococcales (6,67) > Chroococcales (4,49), т.е. более представ-

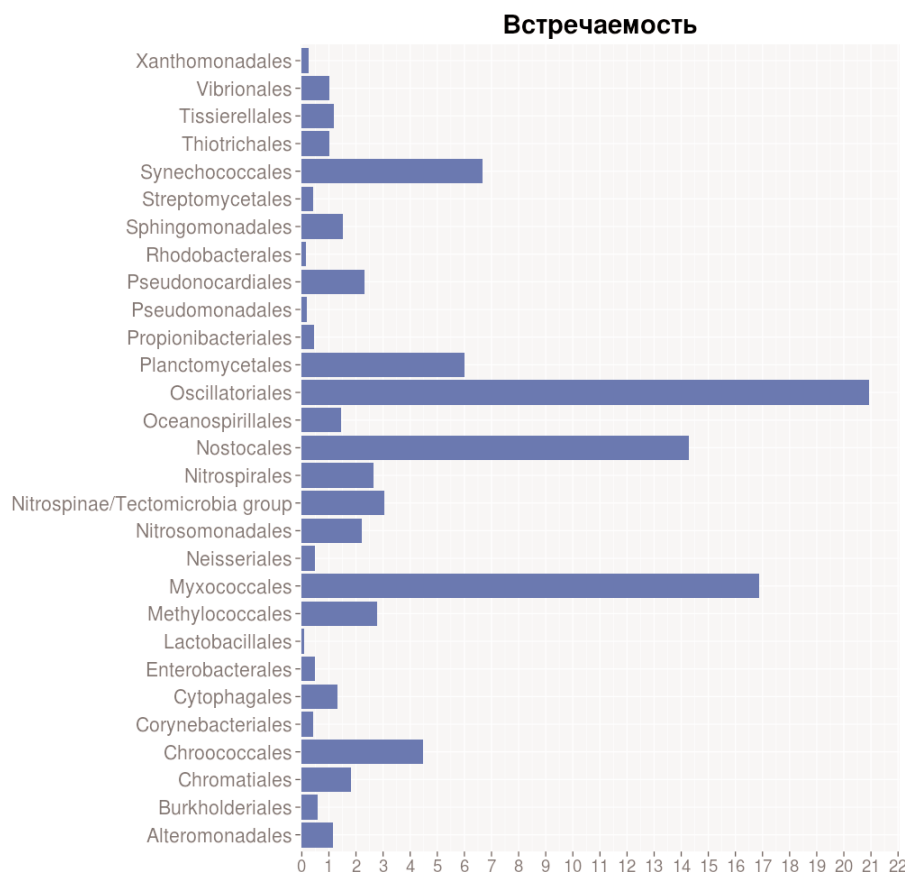


Рис. 1. Встречаемость липоксигеназ в различных порядках бактерий. Изображение получено с использованием R Studio (версия 1.2.1335)

лены у многоклеточных цианобактерий, чем у одноклеточных. Это приводит к предположению, что у бактерий липоксигеназы ассоциированы с образованием многоклеточных структур.

Для простейших расчёт встречаемости с поправкой на протеомы затруднителен из-за малого количества доступных данных. По нескорректированному показателю липоксигеназы наиболее распространены в таксонах Oomycota (12 видов и 5 родов) и Mycetozoa (7 видов и 6 родов) (рис. 2). Для первого характерно образование грибоподобных мицелиальных форм, представители второго иначе называются слизевиками и образуют многоклеточные структуры истинных плазмодиев или псевдоплазмодиев и плодовых тел. В остальных группах простейших липоксигеназы присутствуют у 1–2 видов. Такая картина также согласуется с предположением о связи липоксигеназ и многоклеточности. Дополнительную информацию представил филогенетический анализ.

Филогенетический анализ показывает тесную эволюционную связь липоксигеназ и многоклеточности. На филогенетических деревьях и в филогенетической сети липоксигеназы цианобакте-

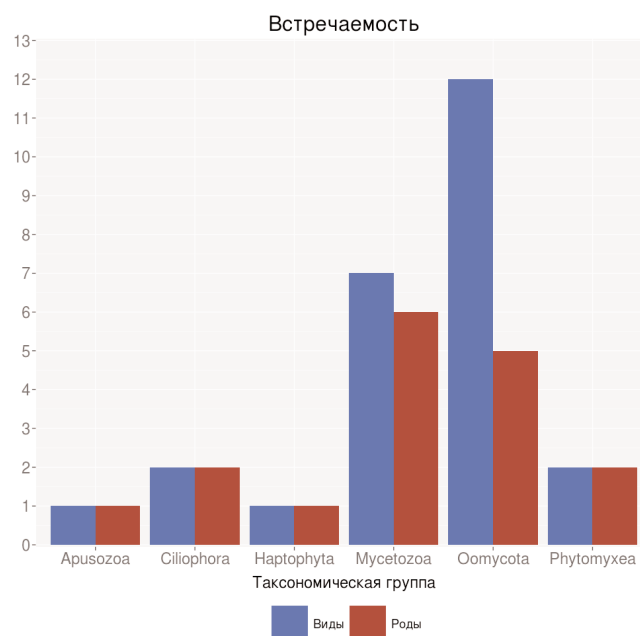


Рис. 2. Распространённость липоксигеназ у простейших (показатели не скорректированы на число доступных протеомов). Изображение получено с использованием R Studio (версия 1.2.1335)

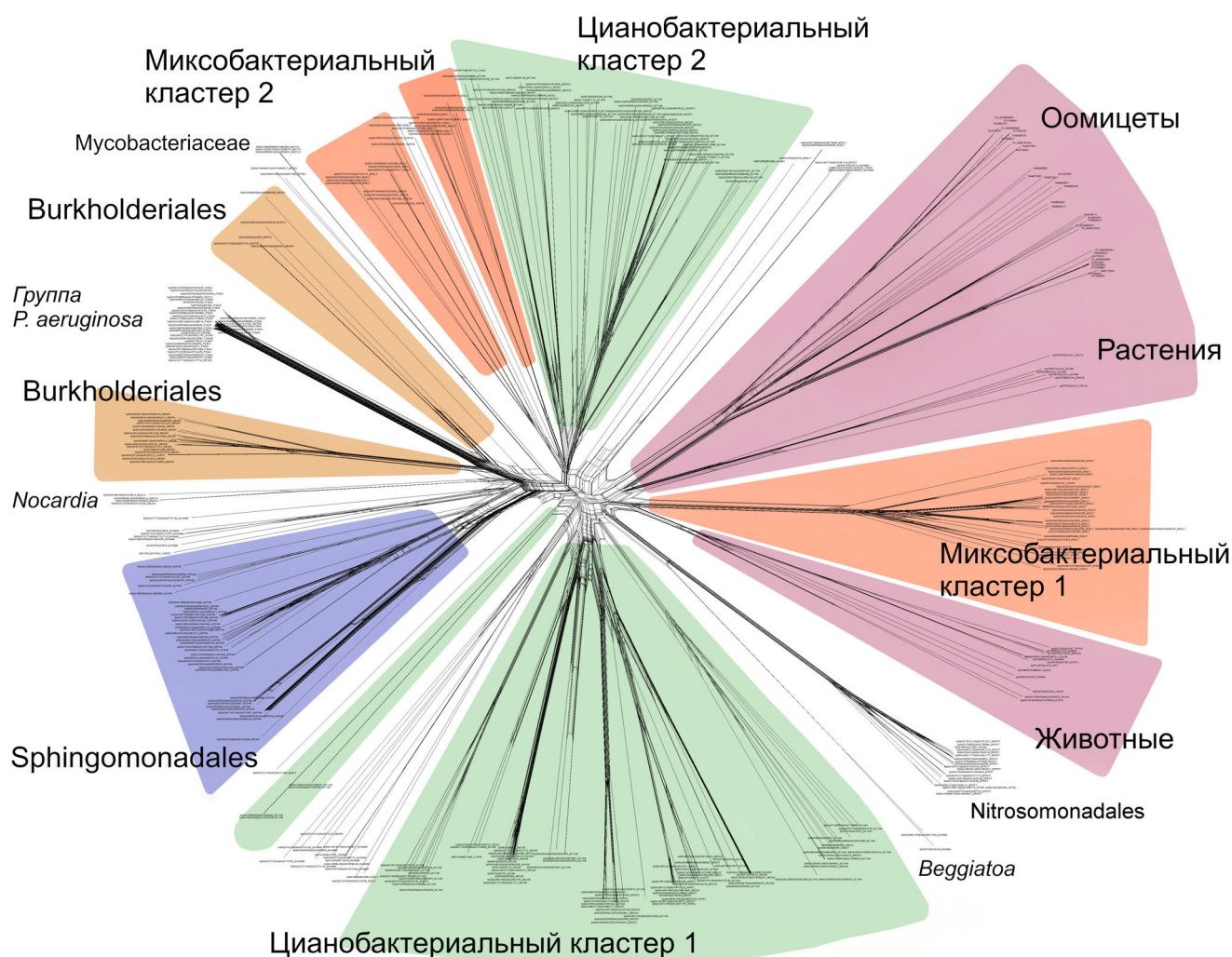


Рис. 3. Филогенетическая сеть для всех проанализированных липоксигеназ. Изображение построено с использованием программы SplitsTree [39]

рий образуют два крупных обособленных кластера, на рисунках обозначенные как «цианобактериальный кластер 1» и «цианобактериальный кластер 2». Наиболее чётко они прослеживаются в филогенетической сети (рис. 3) и в деревьях, построенных методом минимальной эволюции (рис. 4). Обнаружение их разными методами делает вероятной их монофилию, несмотря на довольно низкую бутстрэп-поддержку (не более 59). Кроме того, таксономическая структура кластеров в значительной степени перекрывается, а приблизительно 15–20% видов и штаммов в обоих из них совпадает. Такая ситуация может наблюдаться, если кластеры происходят из одного общего предка, изначально обладавшего двумя изоферментами липоксигеназы.

Остальные таксономические группы — как бактериальные, так и эукариотические — представлены на деревьях и в филогенетической се-

ти только одним кластером или отдельными ветвями, причём все эти ответвления тяготеют к одному из двух цианобактериальных кластеров. Сегмент дерева между кластерами резко обеднен отходящими ветвями, а в консенсусном дереве вообще их не имеет. Это приводит к предположению, что липоксигеназы впервые возникли у цианобактерий и впоследствии (уже после дупликации гена липоксигеназы у их общего предка) были заимствованы остальными группами путём горизонтального переноса. В филогенетической сети отражением этого процесса является отхождение обоих кластеров цианобактерий из центра сети, в то время как остальные группы большей частью объединены в два сетеобразных кластера на периферии центрального узла.

Наличие двух цианобактериальных кластеров является основным отличием наших резуль-

татов от результатов Hansen et al. [25]. В построенных ими деревьях фигурирует только один кластер цианобактерий, по разные стороны от которого располагаются две большие группы протеобактерий, в то время как в построенных нами деревьях и сетях присутствуют два кластера цианобактерий. Это можно объяснить меньшим количеством исследований у Hansen et al. (29 против >500 — в нашем исследовании) [25], что либо не позволило обнаружить второй кластер, либо привело к группировке всех цианобактериальных липоксигеназ в один кластер.

Тем не менее в наших деревьях аналогично можно выделить две группы протеобактериальных липоксигеназ, располагающихся по разные стороны от цианобактериальных кластеров. Каждая из протеобактериальных групп тяготеет к одному из цианобактериальных кластеров.

Липоксигеназы миксобактерий также формируют два кластера (по одному в каждой про-

теобактериальной группе). Первый из них (миксобактериальный кластер 1) имеет монофилетический характер с бутстрэп-поддержкой 100 и включает в себя максимальное количество родов, тем самым являясь вероятным кандидатом на происхождение от общего предка миксобактерий. Следует отметить, что в деревьях он представлен длинной ветвью, а в сети практически равноудалён от обоих цианобактериальных кластеров, т.е. дистанция между ним и цианобактериями велика.

Миксобактериальный кластер 2 не имеет единого предкового узла и состоит, как минимум, из двух групп общего происхождения, отходящих от ствола цианобактериального кластера 2. В некоторых деревьях он разбивается на большее количество стволов. В филогенетической сети он обособлен и тесно соседствует с цианобактериальным кластером 2, однако это говорит лишь о филогенетической близости этих двух кластеров.

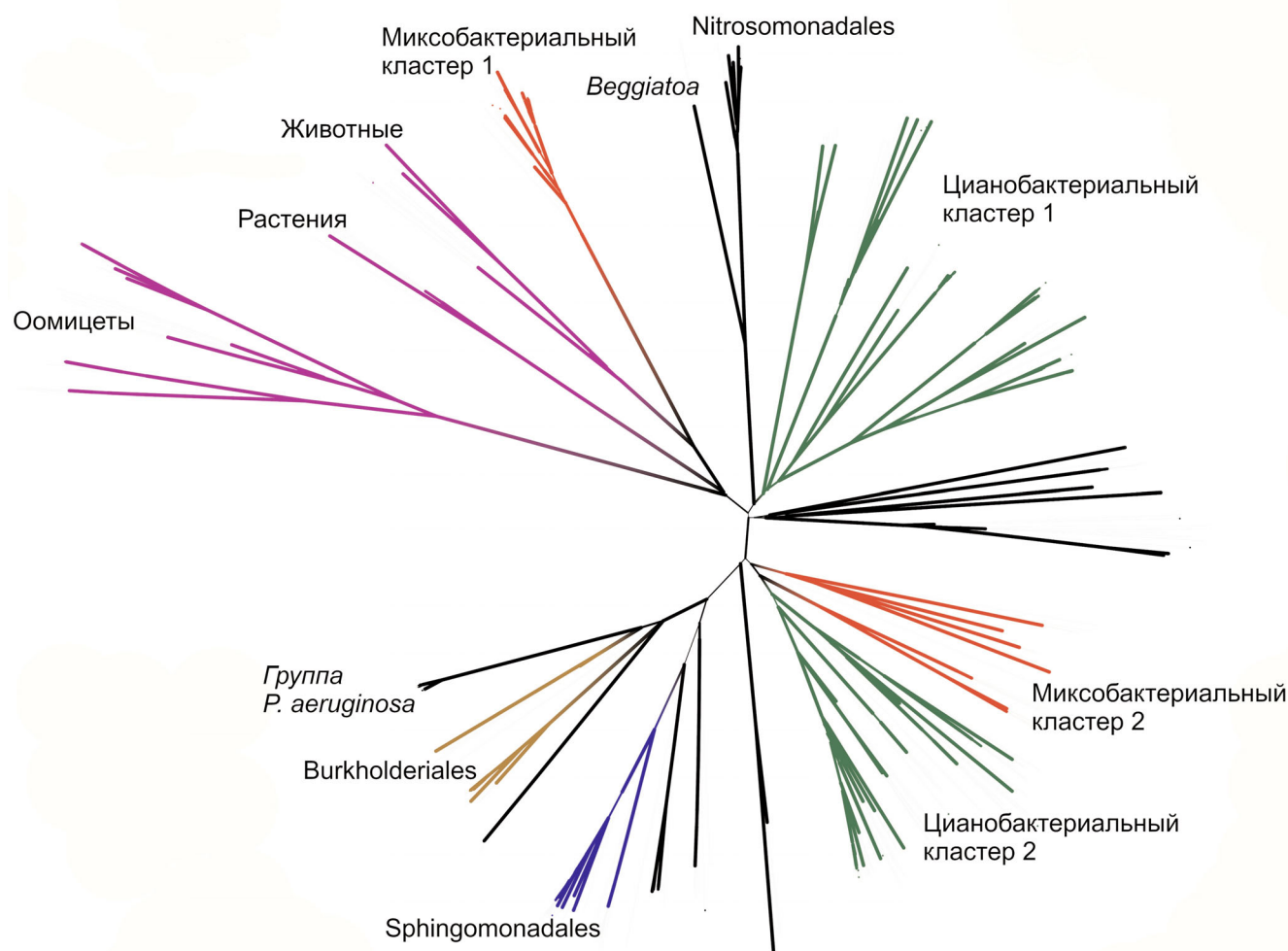


Рис. 4. Исходное филогенетическое дерево для всех проанализированных липоксигеназ, построенное методом минимальной эволюции в программе MEGA [37]. Уровни бутстрэп-поддержки представлены толщиной линий. Изображение получено с использованием сервера iTOL [38]

При этом миксобактериальные кластеры, как и цианобактериальные, перекрываются по таксономическому составу, и часть штаммов в них совпадает. Это приводит к вопросу о том, у какой из этих таксономических групп (цианобактерии или миксобактерии) липоксигеназы появились впервые, а какая заимствовала их путём горизонтального переноса? Существует третий вариант, при котором оба таксона унаследовали липоксигеназы от общего предка, однако он представляется маловероятным: топология деревьев и сети не отражает филогении основных таксонов бактерий (в частности миксобак-

терии не находятся в тесном родстве с цианобактериями). Кроме того, из такой гипотезы следовало бы наличие липоксигеназ у последнего общего предка бактерий с утратой их большинством ныне живущих таксонов, что сомнительно.

Для решения данного вопроса мы проанализировали деревья, на которых представлены только миксобактерии и цианобактерии (рис. 5, а). Мы обнаружили, что миксобактериальный кластер 1 (самый объёмный) имеет сестринскую группу цианобактериальных липоксигеназ с бутстрэп-поддержкой 100. Данная группа не

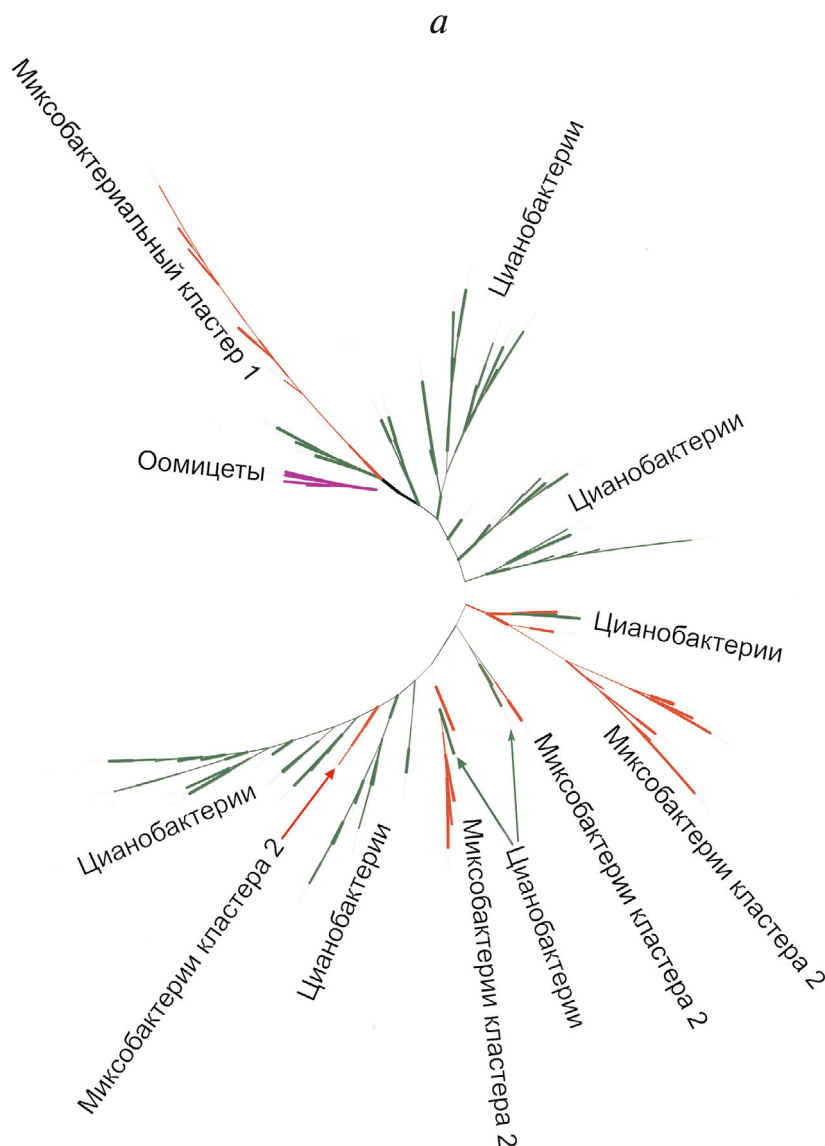


Рис. 5. а — Филогенетическое дерево, прицельно отображающее филогенетические отношения липоксигеназ цианобактерий и миксобактерий (метод ближайшего соседа, программа MAFFT [33, 34]). Оомицеты использованы в качестве внешней группы. Уровни бутстрэп-поддержки представлены толщиной линий. Ввиду отображения дополнительных групп цианобактериальные кластеры четко не выделяются, в то время как кластеры миксобактерий по-прежнему узнаваемы. Изображение получено с помощью сервера iTOL [38]

отображена на деревьях для всего набора данных, так как удалена при выравнивании программой MaxAlign. Аналогично данный кластер располагается в филогенетической сети для той же самой подвыборки (рис. 5, б). В силу этого маловероятен горизонтальный перенос липоксигеназ от общего предка миксобактерий к цианобактериям — скорее следует предположить прямой или опосредованный перенос от цианобактерий к миксобактериям.

Миксобактериальный кластер 2 во всех деревьях представлен несколькими стволами, что приводит к наиболее «экономной» гипотезе.

Она состоит в возникновении липоксигеназы у общего предка цианобактерий и в горизонтальном переносе к миксобактериям обеих её изоферментов. Возможно, сначала произошёл однократный перенос первого изофермента к общему предку миксобактерий, давший начало миксобактериальному кластеру 1. Далее последовал множественный перенос второго изофермента к миксобактериям после разделения их на несколько ветвей, что отражается в наших моделях как миксобактериальный кластер 2.

В построенных нами деревьях ветви, образованные эукариотами, тяготели к цианобактери-

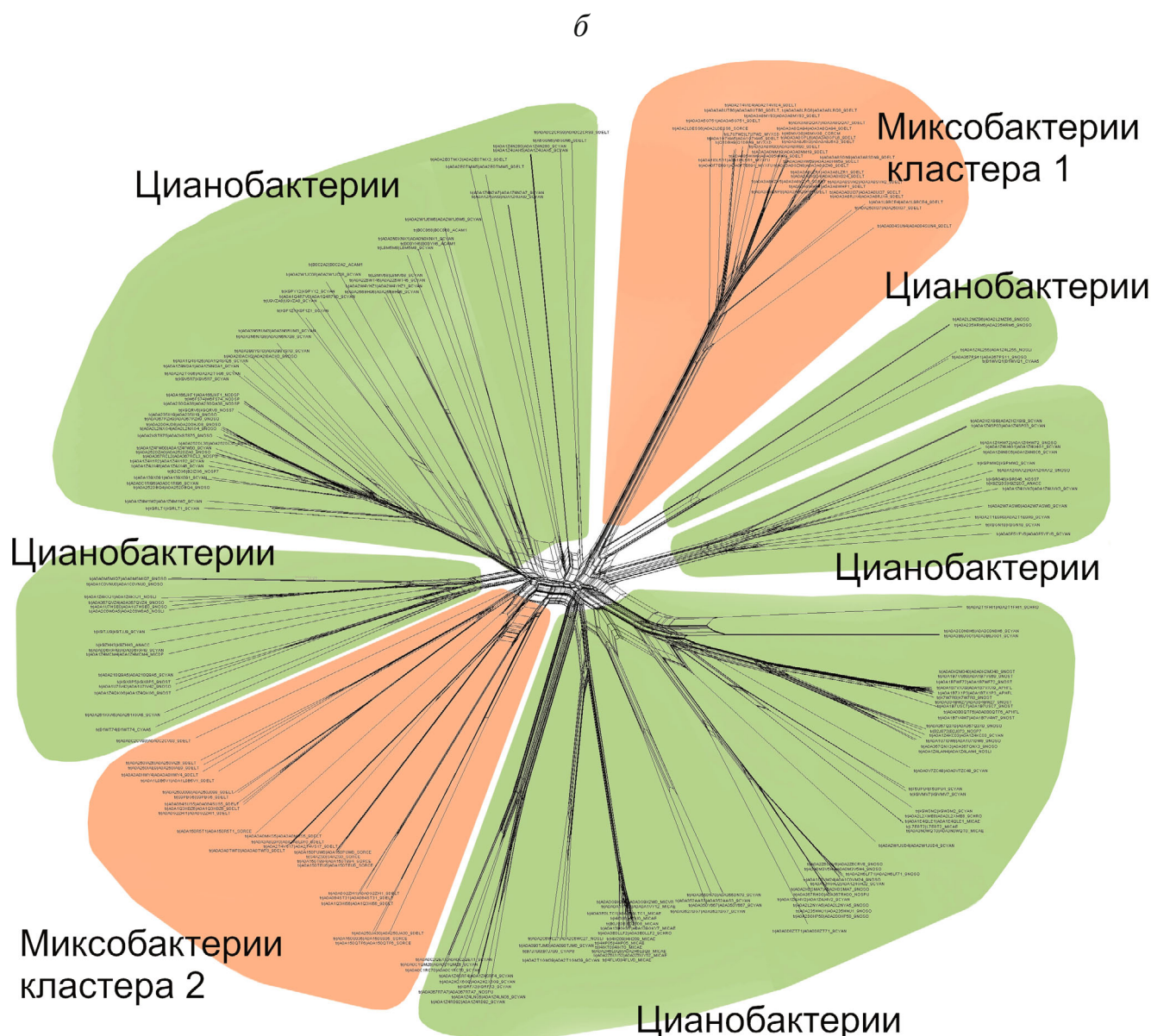


Рис. 5. б — Филогенетическая сеть для липоксигеназ миксобактерий и цианобактерий. Как и на рис. 5, а, миксобактериальный кластер 1 имеет сестринскую группу цианобактерий. Также более чётко визуализируется миксобактериальный кластер 2. Изображение построено с использованием программы SplitsTree [39]

альному кластеру 1, но нет более детальных данных об их эволюционных отношениях. Топология их варьировалась в разных деревьях, но они нигде не образовывали монофилетического кластера. В филогенетической сети они исходят из одного сетеобразного кластера, однако это может быть следствием притяжения длинных ветвей. Таким образом, эукариоты, возможно, получили свои липоксигеназы в результате нескольких последовательных событий горизонтального переноса генов.

Мы построили дерево для выборки эукариот и миксобактерий кластера 1. В нём прослеживается общее происхождение липоксигеназ оомицет и марганцевых липоксигеназ грибов (бутстрэп-поддержка 93) (рис. 6). Это особенно интересно в контексте сходной жизненной формы и экологии этих организмов. Также уверенно можно говорить о происхождении липоксигеназ растений и зелёных водорослей от общего предка (бутстрэп-поддержка 95), что ожидаемо с биологических позиций. Можно предположить близкое родство липоксигеназ инфузорий *Oxytrichia trifallax* и *Stylonichia lemnae* и липоксигеназ диктиостелиевых слизевиков (*Dictyosteliomycetes*) (бутстрэп-поддержка 63,6). Последние также образуют монофилетический кластер с

бутстрэп-поддержкой 100, однако последовательность простотелиевого слизевика *Planoprotostelium fungivorum* оказывается за его пределами, их происхождение неясно.

Самой интересной находкой является тесная филогенетическая связь между липоксигеназами животных и миксобактериальным кластером 1 (рис. 6). Эти две группы в построенных деревьях имеют общего предка с бутстрэп-поддержкой до 76, при этом липоксигеназы животных не кластеризуются с другими эукариотами. В филогенетической сети миксобактериальный кластер 1 находится внутри сетеобразного кластера эукариот. Такая тесная связь позволяет предположить либо горизонтальный перенос липоксигеназ к миксобактериям от животных, либо обратный процесс.

В реконструированной нами эволюционной истории крупные кластеры липоксигеназ оказываются связаны с многоклеточными жизненными формами организмов. Такая тенденция прослеживается начиная с возникновения фермента у общего предка представленных в анализе цианобактерий: скорее всего, он был многоклеточным [40, 41]. Паттерн распределения липоксигеназ у его многоклеточных и одноклеточных потомков аналогичен распространению ре-



Рис. 6. Филогенетическое дерево, прицельно отображающее филогенетические отношения липоксигеназ эукариот и миксобактерий кластера 1 (метод минимальной эволюции, программа MEGA [37], визуализация в iTOL [38]). Цианобактерии использованы как внешняя группа, величины бутстрэп-поддержки представлены толщиной линий

Встречаемость липоксигеназы у бактерий — паразитов и симбионтов

Порядок	Виды
Burkholderiales	<i>Variovorax</i> sp. YR752, <i>V.</i> sp. YR750, <i>V.</i> sp. SCN 67–85, <i>V.</i> sp. Root434, <i>V.</i> sp. Root411, <i>V.</i> sp. PDC80, <i>V.</i> sp. EL159, <i>V.</i> sp. CF313, <i>V.</i> sp. 770b2, <i>V.</i> sp. 54 <i>Variovorax paradoxus</i> , <i>V. guangxiensis</i> , <i>V. gossypii</i> , <i>Pelomonas</i> sp. Root1237, <i>P.</i> sp. Root1217, <i>Massilia namu- cuonensis</i> , <i>Duganella</i> sp. HH105, <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>B. ubonensis</i> , <i>B. gladioli</i> , <i>B. singularis</i> , <i>B. pyrrocinia</i> , <i>B. anthina</i> , <i>B. thailandensis</i> , <i>B. stagnalis</i> , <i>B.</i> sp. MSHR3999, <i>B.</i> sp. Bp9126, <i>B.</i> sp. Bp9125, <i>B.</i> sp. Bp9002, <i>Acidovorax cavernicola</i> , [<i>Pseudomonas</i>] <i>mesoacidophila</i>
Corynebacteriales	<i>Nocardia seriolae</i> , <i>Nocardia pseudobrasilensis</i> , <i>N. altamirensis</i> , <i>Mycobacteroides abscessus</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Rhodococcus</i> sp. C1–24, <i>Rhodococcus</i> sp. 66b
Enterobacterales	<i>Yersinia nurmii</i> , <i>Pluralibacter gergoviae</i> , <i>Photorhabdus temperata</i> , <i>Kosakonia</i> sp. AG348, <i>K. sacchari</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Cedecea lapagei</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Holosporales	<i>Candidatus Finniella inopinata</i>
Lactobacillales	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>
<i>Nitrospinae/ Tectomicrobia</i> group	<i>Candidatus Entotheonella palauensis</i>
Oceanospirillales	<i>Ketobacter</i> sp., <i>K. alkanivorans</i> , <i>Gyruella sunshinyii</i> , <i>Endozoicomonas numazuensis</i> <i>Bermanella</i> sp. 47_1433_sub80_T6
Oligoflexales	<i>Pseudobacteriovorax antillogorgiicola</i> , <i>Oligoflexus tunisiensis</i>
Pseudomonadales	<i>Pseudomonas</i> sp. RW410, <i>P.</i> sp. MWU13–2625, <i>P.</i> sp. MWU12–2534b, <i>P.</i> sp. HMSC065H01, <i>P.</i> sp. HMSC059F05, <i>P. aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>
Pseudonocardiales	<i>Kutzneria</i> sp. 744, <i>K. buriramensis</i> , <i>K. albida</i> , <i>Amycolatopsis xylanica</i> , <i>Pseudonocardia acaciae</i>
Streptomycetales	<i>Streptacidiphilus albus</i>
Vibrionales	<i>Vibrio</i> sp. vnigr-6D03, <i>V. quintilis</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. penaeicida</i> , <i>Photobacterium proteolyticum</i> , <i>P. profundum</i> , <i>P. marinum</i> , <i>P. indicum</i> , <i>P. frigidophilum</i> , <i>Grimontia</i> sp. AD028, <i>G. marina</i> , <i>Grimontia indica</i> , <i>G. celer</i> , <i>Enterovibrio norvegicus</i> , <i>Enterovibrio coralii</i> , <i>E. calviensis</i> , <i>Enterovibrio nigricans</i>

Примечание: красным цветом выделены бактерии — оппортунистические патогены человека, зелёным — патогены и симбионты растений, синим — паразиты и симбионты животных, оранжевым выделены бактерии, несущие молекулярные признаки оппортунистической патогенности. Виды, выделенные двумя цветами, выполняют две экологические функции. На сером фоне даны названия бактерий, для которых экофизиология на сегодняшний день не описана. Название рода в квадратных скобках обозначает недавнюю реклассификацию.

гуляторов, необходимых для дифференцировки [41]: высокая встречаемость у многоклеточных форм и низкая — у одноклеточных.

Предполагаемый нами эволюционный путь липоксигеназ следует за появлением многоклеточности в различных таксонах. Как таксономически, так и филогенетически липоксигеназы связаны с образованием многоклеточных структур. Так как у «истинных» многоклеточных организмов липоксигеназы задействованы в межклеточной сигнализации, можно предположить, что они выполняют аналогичную функцию у бактерий и простейших, образующих многоклеточные формы. Таким образом, наши данные поддерживают гипотезу о связи бактериальных и протозойных липоксигеназ с межклеточной сигнализацией (гипотеза (а), «Введение»).

Немногочисленные экспериментальные данные по функции липоксигеназ микроорганизмов могут служить дополнительным подтверждением этой гипотезы. Даже не образующая многоклеточные структуры *P. aeruginosa* использует оксипипины как медиаторы чувства кворума [42], у образующего многоклеточные структуры *M. xanthus* продукты липоксигеназы усиливают дёргающуюся (twitching) подвижность [43]. У мутантного по гену липоксигеназы *Dictyostelium discoideum*, относящегося к Mycetozoa, нарушена кульминационная фаза формирования плодового тела [44].

Таксономическое распределение липоксигеназ поддерживает гипотезу об их участии в сигнализации «бактерия—хозяин». Помимо цианобактерий, миксобактерий и некоторых эукари-

от, крупные кластеры образуют только липоксигеназы сфингобактерий (*Sphingomonadales*) и представители порядка *Burkholderiales*. Остальные липоксигеназы встречаются спорадически у отдельных представителей рода, семейства или порядка. В филогенетических деревьях они образуют одиночные ветви или образуют небольшие таксономически гетерогенные кластеры. В дальнейшем мы будем говорить о такой ситуации как о спорадической встречаемости.

Ниже будет показано, что представители порядка *Burkholderiales* обладают экофизиологическими свойствами, общими со спорадически встречающимися обладателями липоксигеназ, поэтому будут рассматриваться вместе с ними.

Многие бактерии из данной группы патогенны (таблица). Множественные последовательности липоксигеназ были обнаружены у *P. aeruginosa*, что согласуется с экспериментальными данными. Мы обнаружили липоксигеназы у многих других бактерий со сходным профилем патогенности. Почти все они являются оппортунистическими или нозокомиальными патогенами и сравнительно редко вызывают внебольничные инфекции у иммунокомпетентных лиц. Обнаруженные обладатели липоксигеназ способны поражать многие органы, однако для большинства из них наиболее характерны хирургические инфекции кожи и мягких тканей, поражение лёгких (у пациентов, страдающих сопутствующей лёгочной патологией), сепсис, инфицирование катетеров [45–50]. Для них также характерна резистентность к антибиотикам.

Среди этой группы бактерий присутствуют как широко известные оппортунистические патогены (*P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* [51], *Enterobacter cloacae* [52]), так и «новые» (emerging) возбудители с аналогичными свойствами. К числу последних относятся такие бактерии, как *Nocardia pseudobrasiliensis* [53], *Rhodococcus erythropolis* [54], и такой яркий представитель, как недавно описанная *Cedecea lapagei* [55, 56]. К ним же относятся некоторые представители рода *Burkholderia*: *B. stagnalis* и *B. singularis*, которые были впервые выделены из респираторных образцов [57, 58], *Burkholderia gladioli*, ранее известная как патоген растений и недавно описанная как возбудитель инфекций у человека [59–61], и *Burkholderia thailandensis* [62].

Как и в обзоре Horn et al. [14], мы не обнаружили липоксигеназ у специфических облигатных патогенов. [14]. Единственное различие касается *K. pneumoniae*, у которой мы обнаружили липоксигеназу. Однако эта бактерия входит в

группу преимущественно оппортунистических патогенов *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*. Её высокая внебольничная патогенность считается исключительной чертой и следствием наличия массивной полисахаридной капсулы [45].

Таким образом, спорадическая встречаемость липоксигеназ оказывается связана с патогенностью, но не со специфическими высокопатогенными видами (что большей частью согласуется с результатами обзора Horn et al. [14]). Липоксигеназы более характерны для бактерий с ослабленной патогенностью, поражающих только иммунокомпрометированных хозяев. Особенно чётко это наблюдается на примере *B. thailandensis* (обладателя липоксигеназы), близкородственной возбудителю мелиоидоза *Burkholderia pseudomallei* (лишённой липоксигеназы), но отличающейся от неё существенно более низкой вирулентностью [62]. В тот же самый тренд укладывается наличие липоксигеназы у условно-патогенных *Burkholderia*, но отсутствие у возбудителя сапа *Burkholderia mallei* и возбудителя мелиоидоза *B. pseudomallei*.

Среди выявленных обладателей липоксигеназ встречаются не только оппортунистические патогены, но и бактерии, ассоциированные с животными или растениями. Они могут проявлять себя и как патогены, и как симбионты. Обладатели липоксигеназы с симбиотическими функциями обычно специализированы на определённом круге хозяев. Виды, ассоциированные с растениями, зачастую являются стимулирующими рост (growth-promoting) или биоконтрольными агентами. Таковы *Rhodococcus 66b* [63], *Variovorax paradoxus* [64, 65], *Gyneruella sunshinyii* [66] и *Pseudomonas fluorescens* (может поражать человека, но это не характерно для неё и происходит редко) [46, 67, 68].

Патогенные представители, наоборот, поражают и растения, и человека. Яркие примеры таких бактерий — *B. gladioli*, *Burkholderia cepacia* [50] и сама *P. aeruginosa*, также являющаяся фитопатогеном и поражающая широкий круг хозяев [69, 70]. Таким образом, патогенные обладатели липоксигеназ являются так называемыми межцарственными патогенами (cross-kingdom pathogens). По данной группе патогенов написан подробный обзор [71], где рассматриваются молекулярные предпосылки для таких свойств. Для человека межцарственные патогены обычно являются возбудителями оппортунистических или нозокомиальных инфекций в связи с тем, что их факторы патогенности, хорошо функционирующие в организме растений, не могут в полной мере преодолеть действие защитных систем организма человека [71, 72]. Возможно, липоксигеназа является ещё одним типичным фактором

вирулентности, предрасполагающим к «межцарственному перескоку» (cross-kingdom host jump) и оппортунистической патогенности.

Обнаружение липоксигеназ у бактерий со сходными патогенными свойствами поддерживает гипотезы об их связи с вирулентностью. Большинство описанных выше бактерий рассмотрены как аналоги *P. aeruginosa*, липоксигеназа которой охарактеризована как фактор уклонения от иммунного ответа. Полученные нами данные позволяют распространить это предположение на многие другие виды. Таким образом, данные о распространенности липоксигеназ согласуются с гипотезой об их участии в инвазии (гипотезы (б) и (в), «Введение»).

Это предположение также можно распространить на некоторые обладающие липоксигеназой бактерии, экофизиология которых пока не описана. У таких видов обнаружены генные или белковые последовательности, свидетельствующие в пользу возможной условной патогенности или переноса генов вирулентности от возбудителей оппортунистических инфекций. К ним относятся:

1) *Grimontia indica*, обладающая набором факторов вирулентности, «урезанным» по сравнению с типовым патогенным видом *Grimontia hollisiae*, что может рассматриваться как молекулярный признак условной патогенности [73];

2) *Oligoflexus tunisiensis*, имеющий ген RND-насоса, на 67% сходный с генами мультилекарственной резистентности *Achromobacter xylosoxidans* и *P. aeruginosa* [74];

3) оказавшиеся в группе *P. aeruginosa* псевдомонады с неясной видовой принадлежностью: *Pseudomonas* sp. *HMSC059F05*, *Pseudomonas* sp. *HMSC065H01* и *Pseudomonas* sp. *RW410*; по нашим собственным результатам, полученным при поиске BLAST, экзотоксин А и эластаза этих штаммов обнаруживают высокую степень идентичности таковым у *P. aeruginosa* (99,5% и более).

Ассоциированные с животными обладатели липоксигеназ в основном связаны с морскими видами. Так, *Endozoicomonas numazuensis* [75] и *Candidatus Entothoonella palauensis* [76] являются симбионтами губок, *Pseudobacteriovorax antillorgiicola* [77] и *Enterovibrio coralii* [78] выделены из кораллов, *Enterovibrio nigricans* [79] и *Enterovibrio norvegicus* [80] — из кишечника рыб. *Nocardia seriolae* охарактеризована как возбудитель нокардиоза рыб [81].

Один из ассоциированных с животными видов, *Photorhabdus temperata*, является одновременно симбионтом энтомопатогенной нематоды и патогеном для её хозяев [82]. В целом, среди рассмотренных обладателей липоксигеназы

наблюдаются как симбиотические, так и паразитические стратегии. Это делает более вероятной гипотезу (в) из «Введения» — уклонение от иммунного ответа, чем гипотезу (б), связанную с инвазивным ростом: подавление иммунитета хозяина необходимо и симбионту, и патогену, в то время как симбионт не нуждается в факторах инвазивного роста.

Филогенетические данные поддерживают предположение о связи липоксигеназ с симбиозом и патогенностью. Липоксигеназы некоторых условно-патогенных бактерий образуют на филогенетических деревьях и в сети кластер из близкородственных последовательностей, отличающихся лишь единичными аминокислотными заменами. Бутстрэп-поддержка данного кластера равна 100. Большая часть последовательностей в нём принадлежит *P. aeruginosa*, поэтому мы назвали его «группа *P. aeruginosa*». Помимо упомянутого вида эта группа включает в себя липоксигеназы опасных внутригоспитальных патогенов: *Streptococcus dysgalactiae*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *A. baumannii*, а также липоксигеназу *P. fluorescens*.

Вследствие малого числа различий между последовательностями группы *P. aeruginosa* филогенетические отношения внутри неё неясны (рис. 7): бутстрэп-поддержка большинства узлов филогенетического дерева крайне низка (30 и менее). На фоне этого выделяются листья, образуемые липоксигеназами *S. dysgalactiae*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. fluorescens* и одной из липоксигеназ *A. baumannii* — вместе с сестринскими последовательностями *P. aeruginosa* они отходят от узлов с относительно высокой бутстрэп-поддержкой (>65%). Это свидетельствует о совсем недавних (по эволюционным меркам) горизонтальных переносах гена липоксигеназы от *P. aeruginosa* к другим внутригоспитальным патогенам. Таким образом, липоксигеназа может распространяться между патогенами также, как гены резистентности к антибиотикам (следует отметить, что резистентность к антибиотикам и наличие липоксигеназы чаще всего сочетаются у патогенов из нашего списка).

Дополнительным подтверждением связи липоксигеназ и патогенеза/симбиоза служит тот факт, что сама группа *P. aeruginosa* расположена внутри клады, образованной патогенными и симбиотическими представителями порядка Burkholderiales (рис. 8). В этой же кладе находятся патогенные представители рода *Nocardia*. Бутстрэп-поддержка узла в основании клады составляет 90 — в дереве, построенном в MAFFT, и более 99 — в дереве, построенном в программе MEGA. Скорее всего, наличие этой

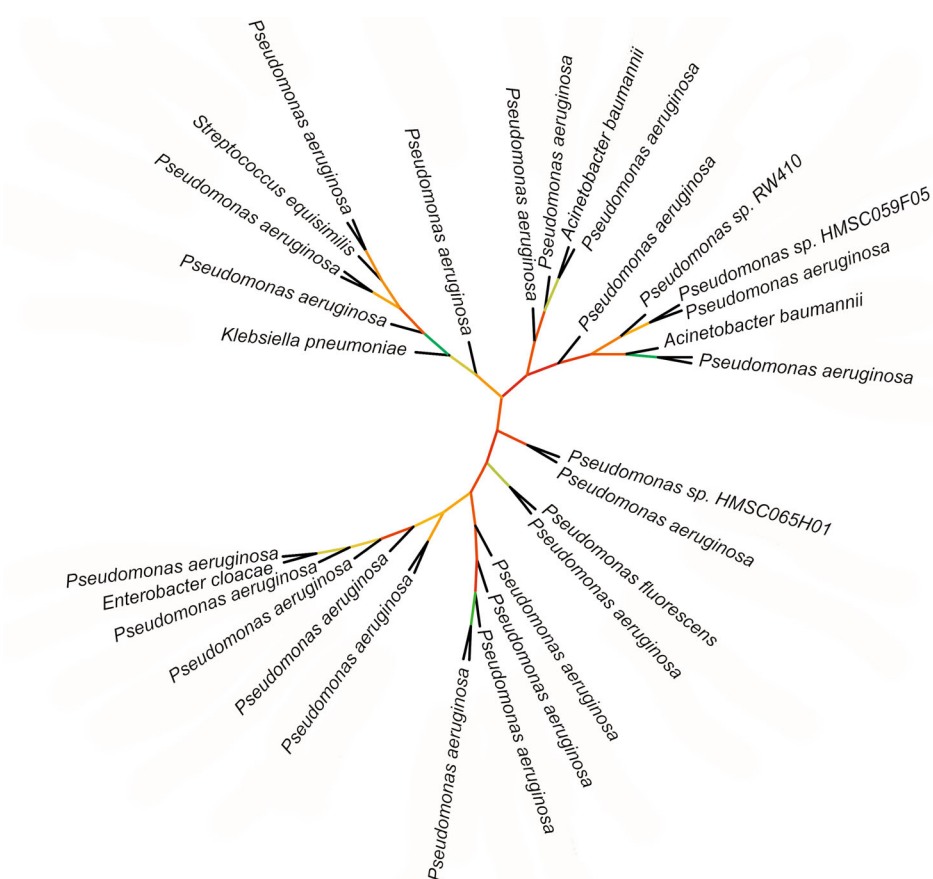


Рис. 7. Исходное филогенетическое дерево для группы *P. aeruginosa*, построенное методом минимальной эволюции в программе MEGA [37]. В отличие от предыдущих иллюстраций, уровни бутстрэп-поддержки показаны цветом (красный — низкая поддержка, зелёный — высокая). Визуализация в iTOL [38]

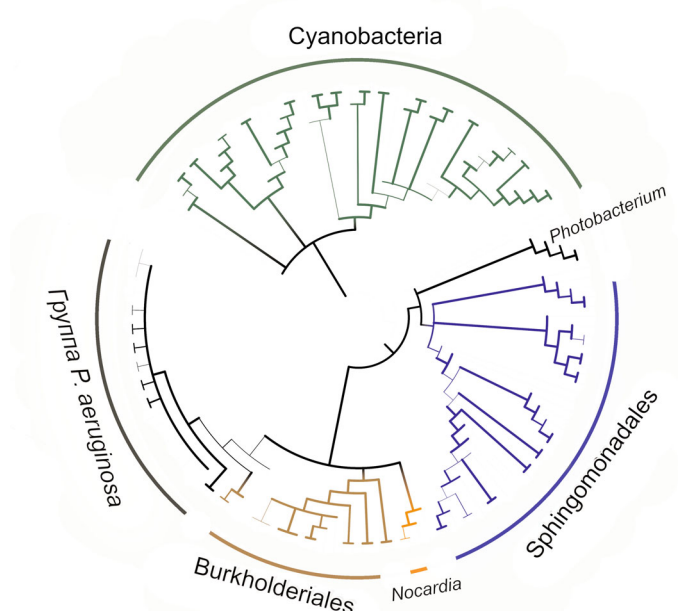


Рис. 8. Консенсусное дерево, построенное в программе MEGA [37] методом минимальной эволюции для представителей группы *P. aeruginosa*, порядков Burkholderiales и Sphingomonadales, родов *Nocardia* и *Photobacterium*. Цианобактерии использованы в качестве внешней группы для расчёта бутстрэп-поддержки. На данном дереве длины ветвей не соответствуют эволюционным расстояниям (в группе *P. aeruginosa* они крайне малы). Величины бутстрэп-поддержки представлены толщиной ветвей. Визуализация в iTOL [38]

клады отражает события горизонтального переноса гена липоксигеназы от одной патогенной/симбиотической бактерии к другой.

Мы также провели дополнительное филогенетическое исследование липоксигеназы «нового» (emerging) нозокомиального патогена *C. lapagei*. Ввиду большого количества инсерций и делеций удалось изучить только один изофермент. Двумя методами (построением филогенетического дерева методом минимальной эволюции и построением филогенетической сети) удалось показать, что её липоксигеназа тесно родственна липоксигеназе другого нозокомиального патогена *Pluralibacter gergoviae*. Это соответствует предположению о липоксигеназе, как о горизонтально переносимом факторе вирулентности, и демонстрирует эволюционную связь липоксигеназ и патогенности.

Заключительные положения и нерешённые проблемы. При поиске в BLAST с теми же запросами, что для бактерий и простейших, не удалось обнаружить липоксигеназ у архей. Это согласуется с данными Hogn et al. [14] и объяснимо с биохимических позиций: липоксигеназный путь начинается с фосфолипазы A_2 , расщепляющей фосфолипиды цитоплазматической мембраны, что невозможно у архей в связи с иным строением мембраны. Этот факт также согласуется с нашим сценарием возникновения липоксигеназ у бактерий (а именно — цианобактерий) и заимствования её эукариотами.

К сожалению, многие бактерии, которые, по результатам нашего исследования, обладают липоксигеназой, были открыты лишь в последнее время, и их экофизиология недостаточно охарактеризована. В силу этого не удаётся сделать никаких выводов относительно бактерий порядков Alteromonadales, Bdellovibrionales, Cytophagales, Chromatiales, Sphingomonadales и представителей родов *Photobacterium*, *Enterovibrio*. Дальнейшие исследования, возможно, смогут дать ответ на этот вопрос. В группе простейших пока не удаётся выдвинуть гипотезы относительно функциональной роли липоксигеназ у видов *Oxytrichia trifalax*, *S. lemnae*, *Emiliana huxleyi* и *Thecamonas trahens*. Дальнейшие исследования в этом направлении представляются особенно интересными, так как могут предоставить дополнительные подтверждения или опровержения нашим выводам.

Обнаруженные в нашем исследовании липоксигеназы плазмодиофоровых слизевиков и представителей рода *Phytophthora* интересны тем, что могут укладываться в обе гипотезы: как о связи липоксигеназ с многоклеточностью, так и

о связи с патогенностью. С одной стороны, *Phytophthora* имеет грибоподобное строение, а плазмодиофоровые слизевики образуют синцитиальный плазмодий, что можно рассматривать как тенденцию к многоклеточности. С другой стороны, представители обоих таксонов — фитопатогенны. Вопрос, какую конкретно роль выполняет липоксигеназа у данных организмов, пока остаётся открытым.

В начале работы был суммирован ряд имеющихся в настоящее время гипотез о функциональном значении бактериальных и протозойных липоксигеназ. Мы провели биоинформатический анализ с целью найти подтверждение какому-либо из них.

Результаты обработки таксономических данных, реконструкции эволюционных деревьев и сетей согласуются с двумя из рассмотренных предположений — о связи с многоклеточностью и межклеточной сигнализацией (гипотеза (а) во «Введении») и о подавлении иммунного ответа хозяина паразитом или симбионтом (гипотеза (в) во «Введении»).

Первая из гипотез имеет эволюционное значение. Появление липоксигеназ у организмов с примитивной межклеточной кооперацией и дифференцировкой может означать их участие в самом происхождении многоклеточности. Выяснение конкретных механизмов сигнального действия продуктов липоксигеназ требует дальнейших исследований.

Механизм сигнализации между царствами для подавления иммунного ответа хозяина, наоборот, более детально изучен на примере *P. aeruginosa*. Наши данные позволяют распространить эту гипотезу на большое число бактерий и приблизительно очертить их круг. Весьма вероятно, что такой стратегией пользуются многие внутригоспитальные и оппортунистические патогены, приобретая липоксигеназу друг от друга в результате горизонтального переноса. Такой фактор вирулентности по опасности становится в один ряд с генами резистентности к антибиотикам, что диктует необходимость пристального внимания к липоксигеназе у патогенных микроорганизмов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Болдырев А. А., Кяйвярайнен Е. И., Илюха В. А. (2017) *Биомембранология: учебное пособие*, ИНФРА-М, Москва.
- Garreta, A., Val-Moraes, S. P., García-Fernández, Q., Busquets, M., Juan, C., Oliver, A., Ortiz, A., Gaffney, B. J., Fita, I., Manresa, A., and Carpena, X. (2013) Structure and interaction with phospholipids of a prokaryotic lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *FASEB J.*, **27**, 4811-4821, doi: 10.1096/fj.13-235952.
- Brash, A. R. (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate, *J. Biol. Chem.*, **274**, 23679-23682, doi: 10.1074/jbc.274.34.23679.
- Mashima, R., and Okuyama, T. (2015) The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives, *Redox Biol.*, **6**, 297-310, doi: 10.1016/j.redox.2015.08.006.
- Yokomizo, T. (2014) Two distinct leukotriene B4 receptors, BLT1 and BLT2, *J. Biochem.*, **157**, 65-71, doi: 10.1093/jb/mvu078.
- Kanaoka, Y., and Boyce, J. A. (2004) Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses, *J. Immunol.*, **173**, 1503-1510, doi: 10.4049/jimmunol.173.3.1503.
- Powell, W. S., and Rokach, J. (2015) Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, **1851**, 340-355, doi: 10.1016/j.bbalip.2014.10.008.
- Kieran, N. E., Maderna, P., and Godson, C. (2004) Lipoxins: potential anti-inflammatory, proresolution, and antifibrotic mediators in renal disease, *Kidney Int.*, **65**, 1145-1154, doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00487.x.
- Brodhun, F., and Feussner, I. (2011) Oxylipins in fungi, *FEBS J.*, **278**, 1047-1063, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08027.x.
- Хелдт Г.-В. (2011) *Биохимия растений*, БИНОМ, Лаборатория знаний, Москва.
- Wasternack, C. (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development, *Ann. Bot.*, **100**, 681-697, doi: 10.1093/aob/mcm079.
- Andreou, A., Brodhun, F., and Feussner, I. (2009) Biosynthesis of oxylipins in non-mammals, *Prog. Lipid Res.*, **48**, 148-170, doi: 10.1016/j.plipres.2009.02.002.
- De León, I. P., Hamberg, M., and Castresana, C. (2015) Oxylipins in moss development and defense, *Front. Plant Sci.*, **6**, 483, doi: 10.3389/fpls.2015.00483.
- Horn, T., Adel, S., Schumann, R., Sur, S., Kakularam, K. R., Polamarasetty, A., Redanna, P., Kuhn, H., and Heydeck, D. (2015) Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling, *Prog. Lipid Res.*, **57**, 13-39, doi: 10.1016/j.plipres.2014.11.001.
- Andreou, A. Z., Vanko, M., Bezakova, L., and Feussner, I. (2008) Properties of a mini 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutant forms, *Phytochemistry*, **69**, 1832-1837, doi: 10.1016/j.phytochem.2008.03.002.
- Lang, I., Göbel, C., Porzel, A., Heilmann, I., and Feussner, I. (2008) A lipoxygenase with linoleate diol synthase activity from *Nostoc* sp. PCC 7120, *Biochem. J.*, **410**, 347-357, doi: 10.1042/BJ20071277.
- Wang, X., Lu, F., Zhang, C., Lu, Y., Bie, X., Ren, D., and Lu, Z. (2014) Peroxidation radical formation and regio-specificity of recombined *Anabaena* sp. lipoxygenase and its effect on modifying wheat proteins, *J. Agric. Food. Chem.*, **62**, 1713-1719, doi: 10.1021/jf405425c.
- An, J. U., Hong, S. H., and Oh, D. K. (2018) Regiospecificity of a novel bacterial lipoxygenase from *Myxococcus xanthus* for polyunsaturated fatty acids, *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cel. Biol. Lipids*, **1863**, 823-833, doi: 10.1016/j.bbalip.2018.04.014.
- Vance, R. E., Hong, S., Gronert, K., Serhan, C. N., and Mekalanos, J. J. (2004) The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2135-2139, doi: 10.1073/pnas.0307308101.
- Banthiya, S., Kalms, J., Yoga, E. G., Ivanov, I., Carpena, X., Hamberg, M., Kuhn, H., and Scheerer, P. (2016) Structural and functional basis of phospholipid oxygenase activity of bacterial lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 1681-1692, doi: 10.1016/j.bbalip.2016.08.002.
- Porta, H., and Rocha-Sosa, M. (2001) Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event? *Microbiology*, **147**, 3199-3200, doi: 10.1099/00221287-147-12-3199.
- Koeduka, T., Kajiura, T., and Matsui, K. (2007) Cloning of lipoxygenase genes from a cyanobacterium, *Nostoc punctiforme*, and its expression in *Escherichia coli*, *Curr. Microbiol.*, **54**, 315-319, doi: 10.1007/s00284-006-0512-9.
- Dar, H. H., Tyurina, Y. Y., Mikulska-Ruminska, K., Shrivastava, I., Ting, H. C., et al. (2019) *Pseudomonas aeruginosa* utilizes host polyunsaturated phosphatidylethanolamines to trigger theft-ferroptosis in bronchial epithelium, *J. Clin. Invest.*, **128**, 4639-4653, doi: 10.1172/JCI99490.
- Goloshchapova, K., Stehling, S., Heydeck, D., Blum, M., and Kuhn, H. (2019) Functional characterization of a novel arachidonic acid 12S-lipoxygenase in the halotolerant bacterium *Myxococcus fulvus* exhibiting complex social living patterns, *MicrobiologyOpen*, **8**, e00775, doi: 10.1002/mbo3.775.
- Hansen, J., Garreta, A., Benincasa, M., Fusté, M. C., Busquets, M., Manresa, A. (2013) Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 4737-4747, doi: 10.1007/s00253-013-4887-9.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402, doi: 10.1093/nar/25.17.3389.
- UniProt Consortium (2018) UniProt: the universal protein knowledgebase, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 2699, doi: 10.1093/nar/gky092.
- Yoshimoto, T., Yamamoto, Y., Arakawa, T., Suzuki, H., Yamamoto, S., Yokoyama, C., Tanabe, T., and Toh, H. (1990) Molecular cloning and expression of human arachidonate 12-lipoxygenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 1230-1235, doi: 10.1016/0006-291x(90)91580-1.
- Hörnsten, L., Su, C., Osbourn, A. E., Hellman, U., and Oliw, E. H. (2002) Cloning of the manganese lipoxygenase gene reveals homology with the lipoxygenase gene family, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2690-2697, doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02936.x.
- Vidal-Mas, J., Busquets, M., and Manresa, A. (2005) Cloning and expression of a lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, *Antonie van Leeuwenhoek*, **87**, 245-251, doi: 10.1007/s10482-004-4021-1.

31. Marchler-Bauer, A., and Bryant, S. H. (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly, *Nucleic Acids Res.*, **32**, W327-W331, doi: 10.1093/nar/gkh454.
32. Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zheng, C., Geer, L. Y., and Bryant, S. H. (2017) CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures, *Nucleic Acids Res.*, **45**, D200-D203, doi: 10.1093/nar/gkw1129.
33. Katoh, K., Rozewicki, J., and Yamada, K. D. (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization, *Brief. Bioinform.*, **20**, 1160-1166, doi: 10.1093/bib/bbx108.
34. Kuraku, S., Zmasek, C. M., Nishimura, O., and Katoh, K. (2013) aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity, *Nucleic Acids Res.*, **41**, W22-W28, doi: 10.1093/nar/gkt389.
35. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., and Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3059-3066, doi: 10.1093/nar/gkf436.
36. Gouveia-Oliveira, R., Sackett, P. W., and Pedersen, A. G. (2007) MaxAlign: maximizing usable data in an alignment, *BMC Bioinformatics*, **8**, 312, doi: 10.1186/1471-2105-8-312.
37. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Mol. Biol. Evol.*, **35**, 1547-1549, doi: 10.1093/molbev/msy096.
38. Letunic, I., and Bork, P. (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees, *Nucleic Acids Res.*, **44**, W242-W245, doi: 10.1093/nar/gkw290.
39. Huson, D. H., and Bryant, D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies, *Mol. Biol. Evol.*, **23**, 254-267, doi: 10.1093/molbev/msj030.
40. Schirrmeister, B. E., Antonelli, A., and Bagheri, H. C. (2011) The origin of multicellularity in cyanobacteria, *BMC Evol. Biol.*, **11**, 45, doi: 10.1186/1471-2148-11-45.
41. Elhai, J., and Khudyakov, I. (2018) Ancient association of cyanobacterial multicellularity with the regulator HetR and an RGSGR pentapeptide-containing protein (PatX), *Mol. Microbiol.*, **110**, 931-954, doi: 10.1111/mmi.14003.
42. Martínez, E., Cosnahan, R. K., Wu, M., Gadila, S. K., Quick, E. B., Mobley, J. A., and Campos-Gómez, J. (2019) Oxylipins mediate cell-to-cell communication in *Pseudomonas aeruginosa*, *Commun. Biol.*, **2**, 1-10, doi: 10.1038/s42003-019-0310-0.
43. An, J. U., and Oh, D. K. (2018) Stabilization and improved activity of arachidonate 11S-lipoxygenase from proteobacterium *Mycobacterium xanthus*, *J. Lipid Res.*, **59**, 2153-2163, doi: 10.1194/jlr.M088823.
44. Basu, S., Fey, P., Pandit, Y., Dodson, R., Kibbe, W. A., and Chisholm, R. L. (2012) DictyBase 2013: integrating multiple Dictyostelid species, *Nucleic Acids Res.*, **41**, D676-D683, doi: 10.1093/nar/gks1064.
45. Левинсон У. (2015) *Медицинская микробиология и иммунология* (пер. с англ.), БИНОМ, Лаборатория знаний, Москва.
46. Бойцов А. Г., Васильев О. Д. (2013) В кн. *Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство* (под ред. Долгова В. В. и Меньшикова В. В.), ГЭОТАР-Медиа, Москва, с. 380-388.
47. Кафтырева Л. А., Бойцов А. Г., Макарова М. А. (2013) В кн. *Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство* (под ред. Долгова В. В. и Меньшикова В. В.), ГЭОТАР-Медиа, Москва, с. 342-365.
48. Тотолян А. А., Бурова Л. А., Дмитриев А. В., Суворов А. Н. (2013) В кн. *Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство* (под ред. Долгова В. В. и Меньшикова В. В.), ГЭОТАР-Медиа, Москва, с. 417-435.
49. Van't Wout, E. F., van Schadewijk, A., van Bortel, R., Dalton, L. E., Clarke, H. J., Tommassen, J., Marciniak, S. J., and Hiemstra, P. S. (2015) Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* induce both the unfolded protein and integrated stress responses in airway epithelial cells, *PLoS Pathog.*, **11**, doi: 10.1371/journal.ppat.1004946.
50. Stoyanova, M., Pavlina, I., Moncheva, P., and Bogatzevska, N. (2007) Biodiversity and incidence of *Burkholderia* species, *Biotechnology Biotechnological Equipment*, **21**, 306-310, doi: 10.1080/13102818.2007.10817465.
51. Antunes, L., Visca, P., and Towner, K. J. (2014) *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen, *Pathog. Dis.*, **71**, 292-301, doi: 10.1111/2049-632X.12125.
52. Davin-Regli, A. (2015) *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment, *Front. Microbiol.*, **6**, 392, doi: 10.3389/fmicb.2015.00392.
53. Lebeaux, D., Lanternier, F., Degand, N., Catherinot, E., Podglajen, I., Rubio, M. T., Suarez, F., Lecuit, M., Mainardi, J.-L., and Lortholary, O. (2010) *Nocardia pseudobrasiliensis* as an emerging cause of opportunistic infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 656-659, doi: 10.1128/JCM.01244-09.
54. Baba, H., Nada, T., Ohkusu, K., Ezaki, T., Hasegawa, Y., and Paterson, D. L. (2009) First case of bloodstream infection caused by *Rhodococcus erythropolis*, *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 2667-2669, doi: 10.1128/JCM.00294-09.
55. Hong, S. K., Lee, J. S., and Kim, E. C. (2015) First Korean case of *Cedecea lapagei* pneumonia in a patient with chronic obstructive pulmonary disease, *Ann. Lab. Med.*, **35**, 266-268, doi: 10.3343/alm.2015.35.2.266.
56. Herrera, V. R. C., De Silva, M. F. R., Alcaraz, H. O., Espiritu, G. C., Peña, K. C., and Melnikov, V. (2018) Death related to *Cedecea lapagei* in a soft tissue bullae infection: a case report, *J. Med. Case Rep.*, **12**, 328, doi: 10.1186/s13256-018-1866-x.
57. Vandamme, P., Peeters, C., De Smet, B., Price, E. P., Sarovich, D. S., Henry, D. A., Hird, T. J., Zlosnik, J. E. A., Mayo, M., Warner, J., Baker, A., Currie, B. J., and Carlier, A. (2017) Comparative genomics of *Burkholderia singularis* sp. nov., a low G+C content, free-living bacterium that defies taxonomic dissection of the genus *Burkholderia*, *Front. Microbiol.*, **8**, 1679, doi: 10.3389/fmicb.2017.01679.
58. De Smet, B., Mayo, M., Peeters, C., Zlosnik, J. E., Spilker, T., Hird, T. J., LiPuma, J. J., Kidd, T. J., Kaestli, M., Ginther, J. L., Wagner, D. M., Keim, P., Bell, S. C., Jacobs, J. A., Currie, B. J., and Vandamme, P. (2015) *Burkholderia stagnalis* sp. nov. and *Burkholderia territorii* sp. nov., two novel *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**, 2265-2271, doi: 10.1099/ijs.0.000251.
59. Segonds, C., Clavel-Batut, P., Thouverez, M., Grenet, D., Le Coustumier, A., Plésiat, P., and Chabanon, G. (2009) Microbiological and epidemiological features of clinical respiratory isolates of *Burkholderia gladioli*, *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 1510-1516, doi: 10.1128/JCM.02489-08.

60. Quon, B. S., Reid, J. D., Wong, P., Wilcox, P. G., Javer, A., Wilson, J. M., and Levy, R. D. (2011) *Burkholderia gladioli* – a predictor of poor outcome in cystic fibrosis patients who receive lung transplants? A case of locally invasive rhinosinusitis and persistent bacteremia in a 36-year-old lung transplant recipient with cystic fibrosis, *Can. Respir. J.*, **18**, e64–e65, doi: 10.1155/2011/304179.
61. Imataki, O., Kita, N., Nakayama-Imahiji, H., Kida, J. I., Kuwahara, T., and Uemura, M. (2014) Bronchiolitis and bacteraemia caused by *Burkholderia gladioli* in a non-lung transplantation patient, *New Microbes. New Infect.*, **2**, 175, doi: 10.1002/nmi2.64.
62. Haraga, A., West, T. E., Brittnacher, M. J., Skerrett, S. J., and Miller, S. I. (2008) *Burkholderia thailandensis* as a model system for the study of the virulence-associated type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*, *Infect. Immun.*, **76**, 5402–5411, doi: 10.1128/IAI.00626-08.
63. Thatcher, L. F., Myers, C. A., O'Sullivan, C. A., and Roper, M. M. (2017) Draft genome sequence of *Rhodococcus* sp. strain 66b, *Genome Announc.*, **5**, e00229-17, doi: 10.1128/genomeA.00229-17.
64. Han, J. I., Spain, J. C., Leadbetter, J. R., Ovchinnikova, G., Goodwin, L. A., Han, C. S., Woyke, T., Davenport, K. W., and Orwin, P. M. (2013) Genome of the root-associated plant growth-promoting bacterium *Variovorax paradoxus* strain EPS, *Genome Announc.*, **1**, e00843-13, doi: 10.1128/genomeA.00843-13.
65. Han, J. I., Choi, H. K., Lee, S. W., Orwin, P. M., Kim, J., LaRoe, S. L., Kim, T.-G., O'Neil, J., Leadbetter, J. R., Lee, S. Y., Hur, C.-G., Spain, J. C., Ovchinnikova, G., Goodwin, L., and Han, C. (2011) Complete genome sequence of the metabolically versatile plant growth-promoting endophyte *Variovorax paradoxus* S110, *J. Bacteriol.*, **193**, 1183–1190, doi: 10.1128/JB.00925-10.
66. Chung, E. J., Park, J. A., Jeon, C. O., and Chung, Y. R. (2015) *Gynuella sunshinyii* gen. nov., sp. nov., an antifungal rhizobacterium isolated from a halophyte, *Carex scabrifolia* Steud., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**, 1038–1043, doi: 10.1099/ijls.0.000060.
67. Gibb, A. P., Martin, K. M., Davidson, G. A., Walker, B., and Murphy, W. G. (1995) Rate of growth of *Pseudomonas fluorescens* in donated blood, *J. Clin. Pathol.*, **48**, 717–718, doi: 10.1136/jcp.48.8.717.
68. Gershman, M. D., Kennedy, D. J., Noble-Wang, J., Kim, C., Gullion, J., Kacica, M., Jensen, B., Pascoe, N., Saiman, L., McHale, J., Wilkins, M., Schoonmaker-Bopp, D., Clayton, J., Arduino, M., Srinivasan, A., and Pseudomonas fluorescens Investigation Team (2008) Multistate outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy, *Clin. Infect. Dis.*, **47**, 1372–1379, doi: 10.1086/592968.
69. Walker, T. S., Bais, H. P., Déziel, E., Schweizer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R., and Vivanco, J. M. (2004) *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation, *Plant Physiol.*, **134**, 320–331, doi: 10.1104/pp.103.027888.
70. Rahme, L. G., Ausubel, F. M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B. C., Lau, G. W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M. W., Tsongalis, J., Walendziewicz, C. L., and Tompkins, R. G. (2000) Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8815–8821, doi: 10.1073/pnas.97.16.8815.
71. Van Baarlen, P., Van Belkum, A., Summerbell, R. C., Crous, P. W., and Thomma, B. P. (2007) Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**, 239–277, doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00065.x.
72. Relman, D. A., and Falkow, S. (2015) A molecular perspective of microbial pathogenicity, in *Principles and Practice of Infectious Diseases, Eighth Edition* (Bennett, J. E., Dolin, R., and Blaser, M. J., eds.), Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 1–10.
73. Singh, A., Vaidya, B., Khatri, I., Srinivas, T. N. R., Subramanian, S., Korpole, S., and Pinnaka, A. K. (2014) *Grimontia indica AK16T*, sp. nov., isolated from a seawater sample reports the presence of pathogenic genes similar to *Vibrio* genus, *PLoS One*, **9**, e85590, doi: 10.1371/journal.pone.0085590.
74. Nakai, R., Fujisawa, T., Nakamura, Y., Baba, T., Nishijima, M., Karray, F., Sami Sayadi, S., Isoda, N., Naganuma, T., and Niki, H. (2016) Genome sequence and overview of *Oligoflexus tunisiensis Shr3 T* in the eighth class Oligoflexia of the phylum Proteobacteria, *Stand. Genomic. Sci.*, **11**, 90, doi: 10.1186/s40793-016-0210-6.
75. Nishijima, M., Adachi, K., Katsuta, A., Shizuri, Y., and Yamasato, K. (2013) *Endozoicomonas numazuensis* sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from marine sponges, and emended description of the genus *Endozoicomonas* Kurahashi and Yokota 2007, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **63**, 709–714, doi: 10.1099/ijls.0.042077-0.
76. Schmidt, E. W., Obratsova, A. Y., Davidson, S. K., Faulkner, D. J., and Haygood, M. G. (2000) Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ -proteobacterium, "*Candidatus Entotheonella palauensis*", *Marine Biol.*, **136**, 969–977, doi: 10.1007/s002270000273.
77. McCauley, E. P., Haltli, B., and Kerr, R. G. (2015) Description of *Pseudobacteriovorax antillogorgicola* gen. nov., sp. nov., a bacterium isolated from the gorgonian octocoral *Antillogorgia elisabethae*, belonging to the family *Pseudobacteriovoracaceae* fam. nov., within the order *Bdellovibrionales*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**, 522–530, doi: 10.1099/ijls.0.066266-0.
78. Thompson, F. L., Thompson, C. C., Naser, S., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Munn, C., Bourne, D., and Swings, J. (2005) *Photobacterium rosenbergii* sp. nov. and *Enterovibrio coralii* sp. nov., vibrios associated with coral bleaching, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 913–917, doi: 10.1099/ijls.0.63370-0.
79. Pascual, J., Macian, M. C., Arahal, D. R., Garay, E., and Pujalte, M. J. (2009) Description of *Enterovibrio nigricans* sp. nov., reclassification of *Vibrio calviensis* as *Enterovibrio calviensis* comb. nov. and emended description of the genus *Enterovibrio* Thompson et al. 2002, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, 698–704, doi: 10.1099/ijls.0.001990-0.
80. Thompson, F. L., Hoste, B., Thompson, C. C., Goris, J., Gomez-Gil, B., Huys, L., De Los, P., and Swings, J. (2002) *Enterovibrio norvegicus* gen. nov., sp. nov., isolated from the gut of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae: a new member of the family Vibrionaceae, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 2015–2022, doi: 10.1099/00207713-52-6-2015.
81. URL: <https://thefishsite.com/articles/nocardia-seriolae-a-chronic-problem>.
82. Hurst, S., Rowedder, H., Michaels, B., Bullock, H., Jackobeck, R., Abebe-Akele, F., Durakovic, U., Gately, J., Janicki, E., and Tisa, L. S. (2015) Elucidation of the *Photothabdus temperata* genome and generation of a transposon mutant library to identify motility mutants altered in pathogenesis, *J. Bacteriol.*, **197**, 2201–2216, doi: 10.1128/JB.00197-15.

LIPOXYGENASES OF BACTERIA AND PROTOZOA MAY CONTRIBUTE TO CELL-TO-CELL SIGNALING AND IMMUNE RESPONSE SUPPRESSION*

G. F. Kurakin^{1**}, A. M. Samoukina², and N. A. Potapova^{3,4}

¹ Tver State Medical University Ministry of Health of Russia, Department of Biochemistry and Laboratory Medicine, 170100 Tver, Russia; E-mail: kurackin-georgy@yandex.ru

² Tver State Medical University Ministry of Health of Russia, Department of Microbiology, Virology, and Immunology, 170100 Tver, Russia; E-mail: anna_samoukina@mail.ru

³ Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, 127051 Moscow, Russia; E-mail: nadezhdalpotapova@gmail.com

⁴ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119234 Moscow, Russia

Received June 16, 2020

Revised July 22, 2020

Accepted July 22, 2020

Lipoxygenases are found in animals, plants, and fungi, where they are involved in a wide range of cell-to-cell signaling processes. The presence of lipoxygenases in a number of bacteria and protozoa has been also established, but their biological significance remains poorly understood. Several hypothetical functions of lipoxygenases in bacteria and protozoa have been suggested without experimental validation. The objective of our study was evaluating the functions of bacterial and protozoan lipoxygenases by evolutionary and taxonomic analysis using bioinformatics tools. Lipoxygenase sequences were identified and examined using BLAST, followed by analysis of constructed phylogenetic trees and networks. Our results support the theory on the involvement of lipoxygenases in the formation of multicellular structures by microorganisms and their possible evolutionary significance in the emergence of multicellularity. Furthermore, we observed association of lipoxygenases with the suppression of host immune response by parasitic and symbiotic bacteria including dangerous opportunistic pathogens.

Keywords: lipoxygenases, bacteria, protozoa, bioinformatics, phylogenetics, signaling, multicellularity, opportunistic pathogens