

LIPOXYGENÁZY A ICH VÝZNAM V BIOCHEMICKÝCH PROCESOCH V RASTLINNÝCH ORGANIZMOCH

IVANA HOLKOVÁ, LÝDIA BEZÁKOVÁ,
MARIÁN VANKO, FRANTIŠEK BILKA
a MAREK OBLOŽINSKÝ

Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava
holkova@fpharm.uniba.sk

Došlo 15.2.08, prepracované 8.7.08, prijaté 6.8.08.

Kľúčové slová: lipoxigenáza, lipoxigenázová cesta, oxilipíny, kyselina jasmónová, signálne transdukčné procesy

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika a výskyt rastlinných lipoxigenáz
3. Lipoxigenázová cesta
4. Regulácia lipoxigenázovej cesty
5. Úloha LOX v semenách rastlín
6. Úloha LOX počas vegetatívneho rastu
7. Úloha LOX v obranných procesoch rastlín
8. Úloha LOX v programovanej smrti rastlinných buniek
9. Záver

1. Úvod

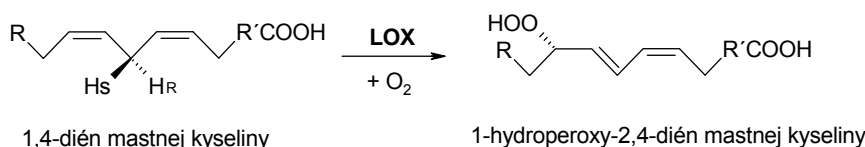
Lipoxigenázy (LOX, linoleát: oxygen oxidoreduktázy, EC 1.13.11.12) sú dioxygenázy obsahujúce nehémové železo, ktoré katalyzujú tvorbu hydroperoxidových derivátov polynenasýtených mastných kyselín. Tieto enzýmy boli predmetom intenzívneho výskumu predovšetkým v živočíšnych systémoch. Premenou kyseliny arachidónovej na kyselinu hydroperoxyeikozatetraénovú katalyzujú živočíšne LOX prvý krok v syntéze regulačných molekúl ako sú lipoxíny a leukotriény, ktoré sú mediátormi zápalových procesov a alergických reakcií v organizme.

V porovnaní so živočíšnymi LOX je funkcia LOX v rastlinách doteraz oveľa menej objasnená. Lipoxigenázy majú aj v rastlinách ústredné postavenie v metabolickej ceste označovanej ako lipoxigenázová (oktadekánová) cesta, ktorej produkty majú funkciu ako rastové regulátory, antimikrobiálne a antifungálne zlúčeniny, aromatické látky a tiež ako signálne molekuly. Na základe funkcie produktov LOX cesty a tiež na základe vzájomného vzťahu medzi zvýšením expresie proteínu LOX a začiatkom špecifických procesov sa predpokladá účasť LOX počas rastu a vývinu rastlín a tiež v odpovedi rastlín na stres, ako je napríklad poranenie alebo infekcia rastlín patogénmi. V poslednom období sa stále viac vedeckých skupín venuje štúdiu lipoxigenáz izolovaných z rôznych rastlinných druhov. Získanie poznatkov o LOX je jedným z predpokladov pochopenia jej fyziologickej úlohy v rastlinnej bunke. Objasnenie funkcií LOX v rastlinách je komplikované prítomnosťou viacerých izoenzymových foriem LOX a ich rôznou tkanivovo-špecifickou a vývinovo regulovanou expresiou. Štúdium tohto enzýmu v rastlinách má význam nielen z hľadiska biochemického, ale vzhľadom na zapojenie LOX do procesov signalizácie a regulácie biosyntézy sekundárnych metabolitov, aj z hľadiska možného využitia získaných poznatkov vo farmácii a medicíne.

2. Charakteristika a výskyt rastlinných lipoxigenáz

Lipoxigenázy katalyzujú polohovo a priestorovo špecifickú adíciu molekulového kyslíka na polynenasýtené mastné kyseliny s *cis,cis*-1,4-pentadiénovou konfiguráciou (ako sú napr. kyselina linolová, kyselina linolénová alebo kyselina arachidónová) za tvorby príslušných hydroperoxidových derivátov (obr. 1). V rastlinách sú substrátmi LOX najmä kyselina linolová a linolénová, ktoré sú hlavnými polynenasýtenými mastnými kyselinami rastlinných membránových fosfolipidov.

Lipoxigenázy sa nachádzajú vo väčšine rastlinných orgánov, pričom ich aktivita sa mení v závislosti od stupňa vývinu a vplyvu stresových faktorov. Najvyššia aktivita LOX bola pozorovaná v kľúčiacich semenách a rýchlo sa deliacich pletivách¹. LOX sú monoméne proteíny



Obr. 1. Reakcia katalyzovaná lipoxigenázou (LOX)

s molekulovou hmotnosťou 94–104 kDa. V rastlinách sa nachádza niekoľko izoenzymových foriem LOX. Zo semien sóje boli izolované tri izoenzymy² LOX (L-1, L-2 a L-3) a ďalších päť izoenzymových foriem LOX bolo charakterizovaných v listoch sóje³, v hľuzách a listoch zemiakov boli identifikované tri izoenzymové formy⁴, štyri u paradajky⁵, dve izoformy boli izolované z cíceru⁶ a tiež z kličných listov uhorky⁷ a repky⁸. Jednotlivé izoenzymy sa líšia svojimi vlastnosťami a subcelulárnou lokalizáciou. Väčšina rastlinných LOX sú solubilné enzýmy nachádzajúce sa v cytoplazme buniek⁹. Prítomnosť LOX však bola zistená aj v iných bunkových kompartmentoch – v stróme chloroplastov¹⁰, v lipidových telieskach¹¹, vo vakuolách¹², a tiež v mitochondriách¹³. LOX bola detegovaná aj v plazmatickej membráne¹⁴, v mikrozomálnych membránach¹¹ a v membráne chloroplastov¹⁵. Jednotlivé izoenzymové formy lipoxigenáz s rôznou vnútrobunkovou lokalizáciou majú aj rôznu funkciu v bunke. LOX prítomná v stróme chloroplastov je zodpovedná za syntézu signálnej molekuly – kyseliny jasmónovej indukovanej pri poranení rastliny¹⁵. LOX lipidových teliesok zabezpečuje mobilizáciu zásobných lipidov počas klíčenia semien olejnatých rastlín¹⁶. Lipoxigenázy prítomné vo vakuolách sú využívané ako vegetatívne zásobné proteíny¹.

3. Lipoxigenázová cesta

Metabolická cesta premeny vyšších polynenasýtených mastných kyselín prebiehajúca cez lipoxigenázou katalyzovanú reakciu a za ňou nasledujúce reakcie sú spoločne označované ako oktadekánová (lipoxigenázová) cesta. Hydroperoxydy polynenasýtených mastných kyselín, ktoré vznikajú pri LOX reakcii, sú ďalšími enzýmami metabolizované na biologicky aktívne zlúčeniny, nazývané oxylipíny. Tieto zlúčeniny vznikajúce v jednotlivých vetvách lipoxigenázovej cesty sú dôležité signálne molekuly (kyselina jasmónová, kyselina 12-oxo-fytodiénová), antimikrobiálne a antifungálne zlúčeniny (aldehdy, divinylétery), prchavé látky (alkoholy). Významnú funkciu majú v období vývinu rastliny a pri adaptácii rastliny na rôzne formy biotického alebo abiotického stresu.

V živočíšnych bunkách bola lipoxigenázová cesta skúmaná veľmi intenzívne, pretože vedie k syntéze eikozanoidov (leukotriénov, lipoxínov) dôležitých v niekoľkých fyziologických procesoch, napr. v zápalovej odpovedi charakteristickej pre alergické prejavy, ako sú astma, artritída, v chemotaktickej a mitogénnej odpovedi v bunkách hladkých svalov obehového systému¹⁷. Štruktúrna podobnosť týchto látok so zlúčeninami izolovanými z rastlín viedla k skúmaniu metabolickej cesty ich biosyntézy aj v rastlinách. Ako prvý lipoxigenázovú cestu v rastlinách popísali Vick a Zimmerman (1983)¹⁸ a potvrdili význam kyseliny jasmónovej v procesoch prenosu signálu. Iniciovali zvýšený záujem o štúdium signalizácie v rastlinách, čo viedlo k objaveniu aj ďalších bioaktívnych látok zo skupiny oktadekanoidov zúčastňujúcich sa na regulácii viacerých rastlinných odpovedí.

K adícii molekulového kyslíka na 18-uhlíkaté polynenasýtené mastné kyseliny (kyselinu linolovú alebo linolénovú) prostredníctvom LOX dochádza na jednom alebo druhom konci *cis,cis*-1,4-pentadiénovej štruktúry, teda na 9. alebo 13. atóme uhlíka. Môžu tak vzniknúť dva rôzne polohové izoméry (9*S*)-hydroperoxy- alebo (13*S*)-hydroperoxyderiváty polynenasýtených mastných kyselín, na základe čoho sú rastlinné LOX označované ako 9-LOX alebo 13-LOX. Vzniknuté 13- alebo 9-hydroperoxidové deriváty sú následne metabolizované v jednej z vetiev lipoxigenázovej cesty¹⁹. Na obr. 2 sú znázornené jednotlivé vetvy v prípade, že substrátom je kyselina linolénová (C 18:3) a jej dioxygenáciu katalyzuje 13-LOX. Produktom je kyselina 13-hydroperoxy-[9(*Z*),11(*E*),15(*Z*)]-oktadekatriénová (13-HPOT).

Peroxygenázová vetva

Enzým peroxygenáza (POX), nazývaná tiež hydroperoxidizoméráza, premieňa hydroperoxidové deriváty polynenasýtených mastných kyselín intramolekulovým prenosom kyslíka na epoxy- alebo dihydrodiol polyénové mastné kyseliny²⁰. Z 13-HPOT vzniká kyselina 15,16-epoxy-13-hydroxy-[9(*Z*),11(*E*)]-oktadekadiénová.

Divinylétersyntázová vetva

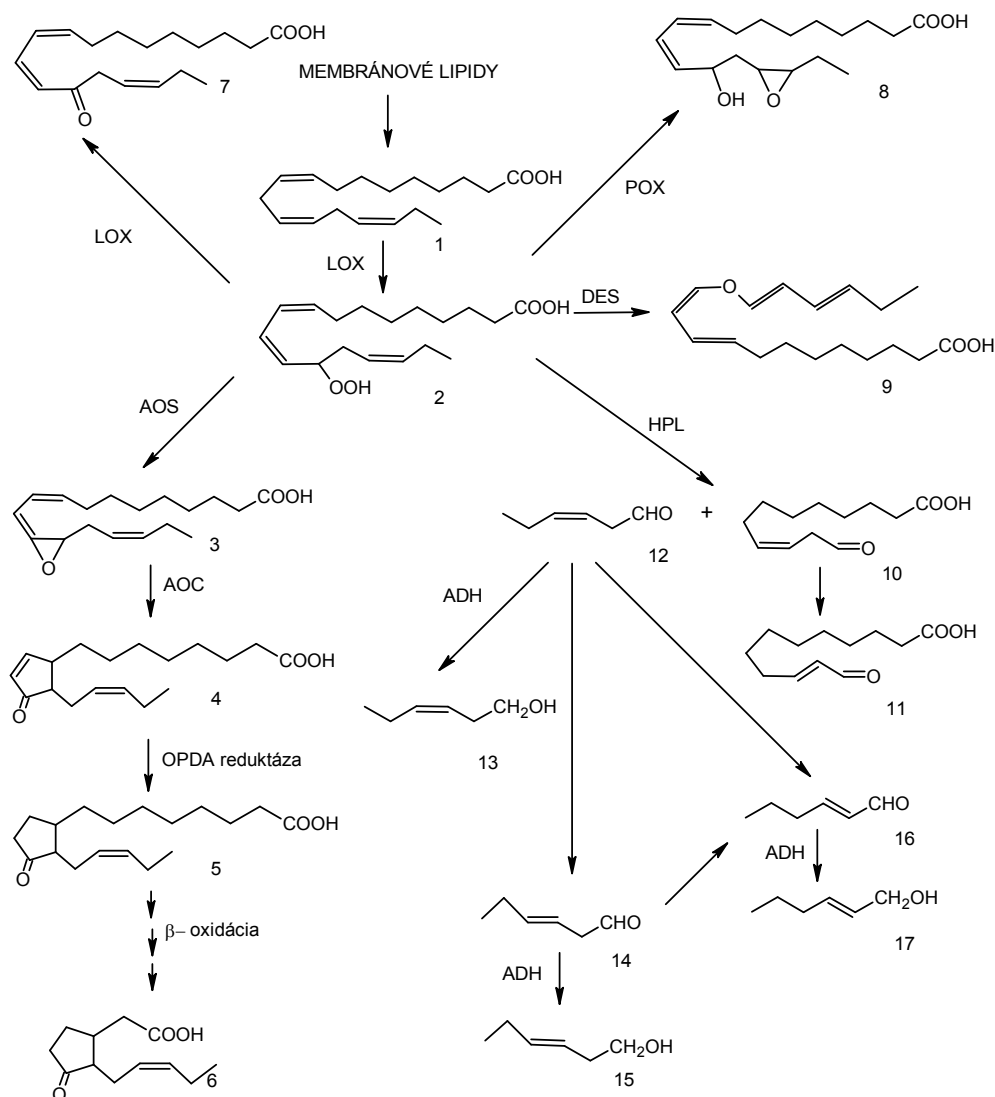
Produktami tejto metabolickej cesty katalyzovanej divinylétersyntázou (DES) sú divinylétery. Tieto látky sú dôležité pri obrane rastliny pred patogénmi^{21,22}.

Hydroperoxidlyázová vetva

Hydroperoxidlyáza (HPL) katalyzuje oxidatívne štiepenie uhlíkovodíkového reťazca 9- alebo 13-HPOT medzi hydroperoxidovým uhlíkom a uhlíkom susednej násobnej väzby (intramolekulová C-C väzba je destabilizovaná v dôsledku reaktívneho hydroperoxidu). Vznikajú aldehydy s krátkym reťazcom (C₆- alebo C₉-aldehydy) a oxokyseliny (C₁₂- alebo C₉-)²³. Z 13-HPOT (obr. 2) vzniká kyselina 12-oxo-9(*Z*)-dodecénová a 3(*Z*)-hexenal. Následne nastáva izomerizácia na stabilnejšie zlúčeniny: kyselinu 12-oxo-10(*E*)-dodecénovú (traumatín) a 3(*E*)-hexenal. Alkoholdehydrogenáza (ADH) môže ďalej redukovať hexenal na príslušný alkohol (hexenol), ktorý spolu s vytvoreným aldehydom zodpovedajú za špecifickú tzv. zelenú vôňu listov²⁴. Aldehydy tiež plnia dôležitú úlohu v obrane rastliny pri jej napadnutí patogénmi. Traumatín známy ako hormón poranenia sa ľahko oxiduje na kyselinu traumatínovú. Obidve látky sa zapájajú do hojenia poranení v rastlinných pletivách²⁵.

Allenoxidsyntázová vetva

Allenoxidsyntáza (AOS), nazývaná tiež hydroperoxid-dehydratáza, premieňa 13-HPOT na nestabilný epoxid kyselinu 12,13(*S*)-epoxy-[9(*Z*),11(*E*),15(*Z*)]-oktadekatriénovú (12,13-EOT). Tento epoxid je potom neenzymaticky hydrolyzovaný na α-ketol alebo γ-ketol, alebo je enzýmom allenoxicyklázou (AOC) cyklizovaný na biologicky aktívnu zlúčeninu – kyselinu 12-oxo-10,15(*Z*)-fytodiénovú (OPDA)²⁶. Následnou redukciou dvojitej väzby medzi 10.



Obr. 2. Lipoxigenázová metabolická cesta³¹. Dioxygenácia kyseliny linolénovej (C18:3) [1] katalyzovaná 13-lipoxigenázou – LOX. DES – divinylétersyntáza, HPL – hydroperoxidlyáza, ADH – alkoholdehydrogenáza, AOS – allenoxidsyntáza, AOC – allenoxidcykláza, OPDA reductáza – reductáza kyseliny 12-oxo-10,15(Z)-fytodiénovej. 2 – kyselina 13(S)-hydroperoxy-[9(Z),11(E),15(Z)]-oktadekatriénová (HPOT), 3 – kyselina 12,13(S)-epoxy-[9(Z),11(E),15(Z)]-oktadekatriénová, 4 – kyselina 12-oxo-10,15(Z)-fytodiénová, 5 – kyselina 3-oxo-2(2'(Z)-pentenyl)-cyklopentan-1-oktánová, 6 – kyselina jasmónová, 7 – kyselina 13-keto-[9(Z),11(E),15(Z)]-oktadekatriénová, 8 – kyselina 15,16-epoxy-13-hydroxy-[9(Z),11(E)]-oktadekadiénová, 9 – kyselina eterolénová (divinyléter), 10 – kyselina 12-oxo-9(Z)-dodecénová, 11 – kyselina 12-oxo-10(E)-dodecénová (traumatin), 12 – 3(Z)-hexenal, 13 – 3(Z)-hexen-1-ol, 14 – 3(E)-hexenal, 15 – 3(E)-hexenol, 16 – 2(E)-hexenal, 17 – 2(E)-hexenol

a 11. atómom uhlíka OPDA-reduktázou (ako koenzým využíva NADH) vzniká kyselina 3-oxo-2(2'(Z)-pentenyl)-cyklopentan-1-oktánová (OPC), ktorá následne prechádza 3 cyklami β -oxidácie, pričom sa vytvára konečný produkt tejto vetvy lipoxigenázovej cesty – kyselina jasmónová (JA)¹⁸. JA aj OPDA sú významné signálne molekuly v odpovedi rastliny na rôzne formy stresu. Z kyseliny jasmónovej sa v rastlinách vytvárajú ďalšie metabolity s biologickou aktivitou ako napr. metyljasmonát, kyselina kurkubová (derivát JA s hydroxylovaným cyklopentáno-

vým kruhom) alebo konjugáty s aminokyselinami, najmä s leucínom a izoleucínom¹⁹.

Reduktázová vetva

Hydroperoxidy polynenasýtených mastných kyselín môžu byť redukované na hydroxyderiváty, ktoré majú antimikrobiálnu aktivitu. Mechanizmus redukcie ešte nie je presne objasnený, ale predpokladá sa účasť glutatiónu v tejto reakcii²⁷.

Lipoxygenázou katalyzovaná vetva

Za určitých podmienok je lipoxygenáza schopná katalyzovať homolytické rozštiepenie O-O väzby HPOT za vzniku alkoxidových radikálov, z ktorých sa následne vytvárajú ketodiény²⁸. Vznik ketoderivátov polynenasýtených mastných kyselín v lipoxygenázovej ceste bol potvrdený, avšak ich funkcia zostáva neobjasnená²⁹.

Epoxyalkoholsyntázová vetva

Táto vetva lipoxygenázovej cesty bola zatiaľ identifikovaná iba u rastlín čeľade *Solanaceae*. Pôsobením enzýmu epoxyalkoholsyntázy (EAS) dochádza k intramolekulovému preusporiadaniu 13- alebo 9-HPOT, pričom vznikajú epoxy-hydroxyderiváty polynenasýtených mastných kyselín²². Produkty tejto reakcie sú rovnaké ako produkty, ktoré sa vytvárajú v peroxygenázovej vetve lipoxygenázovej cesty, lišia sa iba stereochemicky. Predpokladá sa, že tieto látky majú funkciu v obranných reakciách rastlín³⁰.

4. Regulácia lipoxygenázovej cesty

V lipoxygenázovej ceste sa vytvárajú viaceré zlúčeniny s významnou biologickou funkciou. Hlavným miestom regulácie tejto metabolickej cesty je reakcia vzniku 9- alebo 13-hydroperoxidových derivátov katalyzovaná LOX, ktoré sú ďalej metabolizované v jednej zo siedmich vetiev lipoxygenázovej cesty. Lipoxygenázy poskytujú substráty pre aktivitu ďalších enzýmov tejto metabolickej cesty a zohrávajú tak kľúčovú úlohu¹⁹.

Najviac poznatkov o regulácii bolo zatiaľ získaných o AOS vetve. Expresia génov kódujúcich biosyntézu kyseliny jasmónovej je indukovaná poranením alebo pôsobením metyljasmonátu a systemínu. Tieto údaje boli experimentálne potvrdené v listoch zemiakov, rajčín a arabkovky, kde došlo k zvýšeniu syntézy mRNA 13-LOX, AOS a AOC^{5,32,33}. Biosyntéza JA je regulovaná nasledujúcimi faktormi: a) dostupnosťou substrátu, čo je výsledkom stimulačných faktorov a signálov z vonkajšieho prostredia; b) pletivovo špecifickou tvorbou a akumuláciou kyseliny jasmónovej; c) metabolickou transformáciou JA na jej metylester alebo na prchavý degradačný produkt *cis*-jasmón¹⁹. Regulácie ďalších vetiev lipoxygenázovej cesty sú menej objasnené, predpokladá sa, že sú regulované dostupnosťou substrátu a tiež ďalšími regulačnými mechanizmami, ako sú fosforylácia /defosforylácia enzýmov³⁴ alebo degradácia enzýmov ubiquitináciou³⁵.

5. Úloha LOX v semenách rastlín

V semenách olejnatých rastlín sa LOX zúčastňuje mobilizácie zásobných lipidov počas klíčenia. U olejní sú lipidy hlavným zdrojom energie v tomto procese, kým v iných rastlinách napr. zemiakoch sa na produkciu ATP využívajú zásoby škrobu. Počas skorých štádií klíčenia dochádza k indukcií LOX a následne k oxidácii esterifikovaných polynenasýtených mastných kyselín v lipidových

telieskach. Oxidované mastné kyseliny v triacylglyceroloch sú následne prednostne odštiepované lipázami a uvoľňované z lipidových teliesok do cytoplazmy⁷⁶. Predpokladá sa, že slúžia ako substrát pre β -oxidáciu. Účasť LOX lipidových teliesok v skorých štádiách klíčenia bola experimentálne potvrdená v semenách uhorky (*Cucumis sativus* L.), tabaku (*Nicotiana tabacum* L.) a repky (*Brassica napus* L.)¹⁶.

V semenách podzemnice (*Arachis hypogaea* L.) bol gén kódujúci PnLOX1 indukovaný po infikovaní hubou *Aspergillus*. Produkty reakcie katalyzovanej PnLOX1 – 13-HPOT a 13-HPOD ovplyvňovali syntézu mykotoxínu, čo potvrdzuje funkciu tejto LOX v obranných reakciách³⁶. Taktiež pre LOX *Arabidopsis thaliana* sa predpokladá funkcia v obrane kľúčnych rastlín produkciou antimikrobiálnych látok, ale tiež v raste a vývine, ktorý je regulovaný produktami lipoxygenázovej cesty³⁷.

Zo semien sóje boli izolované 3 izoenzýmy LOX (L-1, L-2 a L-3)². Počas prvých dní klíčenia semien tieto izoenzýmy zaniknú a v kľúčnych listoch sú syntetizované tri ďalšie izoenzýmové formy LOX. Na rozdiel od LOX v semenách uhorky, sójové LOX v semenách aj v kľúčnych listoch nie sú asociované s lipidovými telieskami. Nachádzajú sa v cytoplazme alebo vakuolách. Pri klíčení semien sóje nedochádza k významnej oxidácii polynenasýtených mastných kyselín. Zistilo sa, že lipoxygenázy v semenách sóje sa nezúčastňujú na mobilizácii zásobných lipidov počas klíčenia, ale majú význam ako zásobné proteíny⁹. V listoch sóje bolo charakterizovaných ďalších 5 izoenzýmových foriem LOX označených ako vegetatívne lipoxygenázy (VLXA, VLXB, VLXC, VLXD a VLXE). Tieto LOX boli lokalizované tiež v cytoplazme a vakuolách. Zúčastňujú sa nielen v metabolizme lipidov, ale sú využívané aj ako vegetatívne zásobné proteíny v závislosti od potreby rastlín uskladiť nadbytok dusíka³.

6. Úloha LOX počas vegetatívneho rastu

Vývinový proces, ktorého aspekty boli intenzívne skúmané je tvorba hlúz u zemiakov. V zemiakoch boli izoenzýmy LOX detegované v hlúzách a v koreňoch. mRNA kódujúca LOX1 bola lokalizovaná v najaktívnejšie rastúcich častiach hlúz zemiakov. V transgénnych rastlinách, v ktorých bola aktivita LOX znížená, došlo k značnej redukcii tvorby hlúz. Hľuzy, ktoré sa vytvorili, boli zdeformované a menšie. Uvedené LOX sa zúčastňovali na kontrole rastu a vývoja hlúz iniciáciou syntézy oxylipínov, regulujúcich rast buniek počas ich tvorby. Konkrétne sa v tomto procese potvrdila úloha kyseliny tuberónovej (kyselina 12-hydroxyjasmónová)³⁸.

V rajčínach boli identifikované tri gény kódujúce LOX, označené ako TomloxA, TomloxB a TomloxC, ktoré boli aktívne počas dozrievania plodov. TomloxC kóduje LOX chloroplastov. Zistilo sa, že uvedené gény sú počas dozrievania plodov aktivované etylénom a doposiaľ bližšie neurčenými vývinovými faktormi. Predpokladá sa, že majú funkciu v obranných reakciách. LOX plodov sú tiež dôle-

žité v syntéze C6 aldehydov zodpovedných za typickú vôňu a chuť plodov rajčín a význam majú i v degradácii membrán tylakoidov pri premene chloroplastov na chromoplasty³⁹.

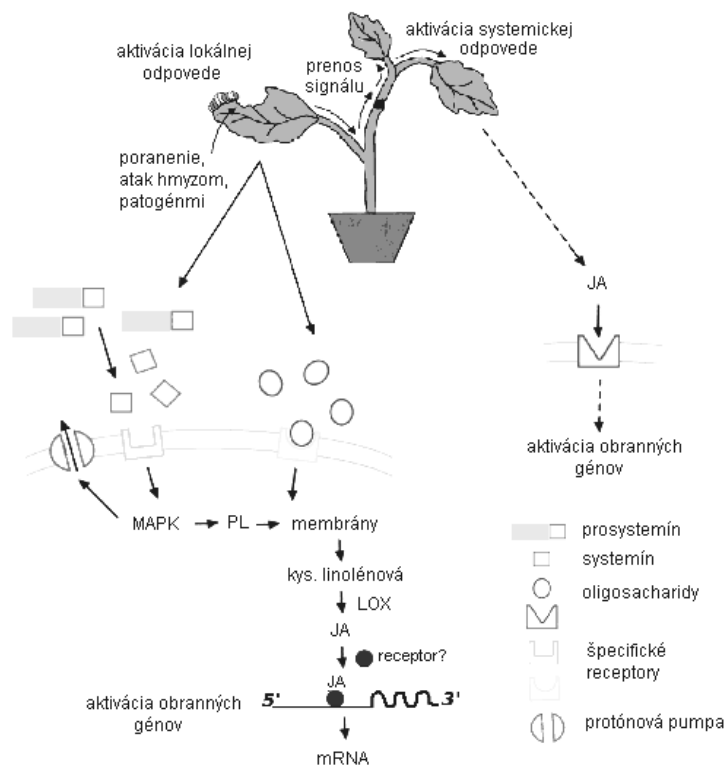
7. Úloha LOX v obranných procesoch rastlín

K aktivácii obranných procesov rastlín dochádza pri poranení, pri napadnutí rastlín škodcami alebo patogénmi. Tieto procesy vedú k zahojeniu poškodeného pletiva a tiež k aktivácii obranných mechanizmov s cieľom predísť ešte väčšiemu poškodeniu. Obranné mechanizmy indukované niekoľko minút prípadne hodín po poranení, pozostávajú zo syntézy (prípadne uvoľnenia) primárnych signálov, ich prijatia receptormi a následnej transmisie prostredníctvom špecifických signálnych molekúl, ktoré aktivujú transkripciu tzv. obranných génov. Proteíny kódované obrannými

génmi patria do rozličných kategórií. Sú to tzv. obranné proteíny ako napríklad inhibitory proteináz a proteolytické enzýmy, alebo enzýmy zapojené do biosyntézy obranných sekundárnych metabolitov. Ďalšiu skupinu indukovaných proteínov tvoria proteíny zúčastňujúce sa signálnej transdukčnej cesty, ako napríklad lipoxigenáza a kalmodulín⁴⁰.

Pri poškodení určitej časti rastlinného pletiva dochádza nielen k aktivácii obranných reakcií v mieste poškodenia (tzv. lokálna odpoveď), ale aj v iných častiach rastlinného organizmu (tzv. systemická odpoveď) (obr. 3). V rastlinách sa vyvinula zložitá sieť signalizácie indukovaná pri poranení, v ktorej sa zúčastňujú viaceré, štruktúrne často veľmi odlišné molekuly napr. oligopeptid systemín⁴¹, oligosacharidy uvoľnené z poškodených bunkových stien⁴², H_2O_2 ⁴⁷ a molekuly s hormonálnou aktivitou ako sú jasmonáty^{43,44}, etylén⁴⁵ a kyselina abscisová⁴⁶.

Primárne signály spúšťajúce poranením aktivované obranné odpovede neboli doposiaľ jednoznačne definova-



Obr. 3. Schéma obranných procesov indukovaných pri poranení rastlín, ataku hmyzom alebo patogénmi (spracované podľa^{34,58}). Pri poranení rastlín, ataku hmyzom alebo patogénmi dochádza nielen k aktivácii obranných reakcií v mieste poškodenia (tzv. lokálna odpoveď), ale aj v iných častiach rastlinného organizmu (tzv. systemická odpoveď). Primárne signály (systemín uvoľnený z neaktívneho prekursora - prosystemínu, oligouronidy uvoľnené z poškodených bunkových stien) interagujú s receptormi v plazmatickej membráne buniek, čo je prvým krokom zložitej vnútrobunkovej signalizačnej kaskády pozostávajúcej z aktivácie MAP kináz (MAPK), ktoré modulujú aktivitu protónových púmp, ďalej aktivácie fosfolipáz (PL) a uvoľnenia kyseliny linolénovej z membrán, ktorá je lipoxigenázou (LOX) a ďalšími enzýmami oktadekanovej cesty premieňaná na kyselinu jasmónovú (JA). JA je významným sekundárnym poslom, ktorý aktivuje expresiu obranných génov, a to nielen v mieste poškodenia, ale aj vo vzdialenejších nepoškodených častiach rastlín

né. Indukcia obranných odpovedí si často vyžaduje súčasné pôsobenie viacerých signálnych molekúl, ktoré môžu byť rozdielne u jednotlivých rastlinných druhov³⁴. Primárnym signálom sú napríklad oligosacharidy, ktoré sa pri poranení uvoľňujú z poškodených bunkových stien. Doares a spol. (1995)⁴² experimentálne dokázali, že oligouronidy z bunkových stien rastlín a chitosan pochádzajúci z bunkových stien húb indukovali po aplikácii v listoch rajčín (*Lycopersicon esculentum*) expresiu inhibítorov proteínáz. Oligosacharidy majú veľmi obmedzenú pohyblivosť, a preto je ich aktivita v signalizácii pri poranení spojená iba s aktiváciou obranných reakcií v mieste poškodenia – v tzv. lokálnej odpovedi⁴⁸. Ďalším signálom, ktorý indukoval expresiu obranných génov bol systemín. Je to peptid pozostávajúci z 18 aminokyselín, ktorý vzniká limitovanou proteolýzou – odštiepením C-konca z neaktívneho 200 aminokyselín obsahujúceho prekursora prosystemínu. Prítomnosť systemínu bola zatiaľ potvrdená iba u rastlín z čeľade *Solanaceae*⁴⁹. Systemín uvoľňovaný z poškodených miest sa viaže na špecifický receptor v membráne okolitých buniek a prenáša signál aj do vzdialenejších nepoškodených častí rastliny⁴¹. Je mobilným signálom dôležitým v tzv. systemickej odpovedi rastlín na poranenie³⁴.

Vplyvom uvedených primárnych signálov dochádza pri poranení rastlín k aktivácii oktadekánovej (lipoxygenázovej) cesty biosyntézy kyseliny jasmónovej (JA)^{50–52}. Predpokladá sa, že tieto signály interagujú s receptormi v membráne rastlinných buniek, pričom sa aktivujú procesy, ktoré vedú k rýchlemu zvýšeniu vnútrobunkovej hladiny JA. JA je derivátom kyseliny linolénovej, najviac zastúpenej mastnej kyseliny v lipidoch membrán v rastlinách. Predpokladá sa, že kyselina linolénová je uvoľnená z membránových lipidov pôsobením fosfolipázy A₂ a následne sa stáva substrátom LOX, počiatočného enzýmu oktadekánovej cesty⁵⁰.

Potvrdením zapojenia oktadekánovej cesty v procesoch signalizácie smerujúcich k aktivácii obranných génov bolo identifikovanie niekoľkých inhibítorov, ktoré blokujú túto cestu. Napríklad dietylдитиокарбамát sodný a salicylát sodný. Uvedené látky inhibovali oktadekánovú dráhu a syntézu inhibítorov proteínáz v odpovedi na poranenie, systemín a oligouronidy⁴². Inhibícia prostredníctvom dietylдитиокарбамátu sodného spočívala v premene 13-HPOT (produkty reakcie katalyzovanej LOX) na 13-HOT, ktoré už nie sú intermediátmi v biosyntéze JA. Salicylát sodný blokoval oktadekánovú cestu na úrovni allenoxidsyntázy⁵³. Efekty týchto inhibítorov sa zhodujú s hypotézou, že molekuly primárnych signálov vytvorené pri poranení aktivujú expresiu obranných génov cez oktadekánovú dráhu. Táto dráha je tiež pozitívne alebo negatívne regulovaná kyselinou abscisovou a kyselinou indolactovou⁵⁴. V listoch ryže bola potvrdená recipročná regulácia oktadekánovej cesty kyselinou jasmónovou a kyselinou salicylovou pri odpovedi rastlín na poranenie⁵⁵.

Kyselina jasmónová je významným sekundárnym poslom aktivujúcim transkripciu génov a následne syntézu obranných sekundárných metabolitov a proteínov. Dovo-

šiaľ bolo získaných len veľmi málo poznatkov týkajúcich sa mechanizmu génovej aktivácie v odpovedi na poranenie. Analýzou 5' regulačných oblastí génov, ktoré sú aktivované JA, bola zistená prítomnosť konsenzus sekvencií, o ktorých sa predpokladá, že sa zúčastňujú v regulácii génovej exprese touto molekulou^{56,57}. Štúdiu zapojenia JA a jej derivátov v procesoch odpovede rastlín na poranenie bola venovaná veľká pozornosť, avšak nielen JA, ale aj jej deriváty napr. metyljasmonát a aj iné produkty oktadekánovej cesty sú syntetizované pri poranení a zúčastňujú sa v týchto procesoch⁴³.

Potvrdená bola tiež úloha kyseliny 12-oxo-fyto-diénovej (OPDA, prekursor kyseliny jasmónovej) ako signálnej molekuly⁵⁹. OPDA je dokonca výraznejším aktivátorom exprese génov ako samotná JA. V súčasnosti je OPDA považovaná za hlavnú signálnu molekulu vo väčšine rastlinných druhov, zatiaľ čo JA zostáva aktívnym metabolitom svojho prekursora. Experimentálne sa však dokázalo, že JA na rozdiel od OPDA je sekretovaná z buniek do extracelulárneho média, čo naznačuje funkciu JA aj ako medzibunkovej signálnej molekuly⁶⁰. JA je mobilným sekundárnym signálom, podobne ako systemín, prenáša signál z miesta poškodenia aj do iných častí rastlinného organizmu, avšak menšia a rozpustnejšia kyselina jasmónová umožňuje prenos signálu na väčšie vzdialenosti³⁴.

Ďalšími oxylipínmi s funkciou v obranných procesoch rastlín sú produkty HPL vetvy oktadekánovej cesty: C12-oxokyseliny (traumatín), C6 aldehydy a alkoholy. Tieto látky sú syntetizované pri poranení a slúžia tiež ako signálne molekuly. U *Arabidopsis* 2(E)-hexenal indukuje skupinu obranných génov⁶¹. K vyššej produkcii prchavých látok uvoľňovaných rastlinou dochádza najmä pri ataku rastlín hmyzom. Tieto látky majú iné zloženie ako látky uvoľňované nepoškodenými rastlinami⁶². Niektoré pôsobia ako atraktanty prirodzených predátorov hmyzu, ktorý napadol rastlinu⁶³. V obranných reakciách sa zúčastňujú aj produkty peroxygenázovej a divinylétersyntázovej vetvy lipoxygenázovej cesty^{20,64}.

Odpoveď rastlín na poranenie, atak hmyzom alebo patogénmi si vyžaduje aktiváciu zložitej siete vzájomne regulovaných signalizačných kaskád, v ktorých sa významným spôsobom zúčastňujú aj od lipidov odvodené oxylipíny^{34,65,66}. LOX sa svojím postavením na počiatku lipoxygenázovej cesty biosyntézy týchto látok zapája do obranných procesov rastlín. Potvrdením boli aj experimentálne výsledky získané Arimurou a spol. (2000)⁶², ktorí dokázali, že inhibícia tohto enzýmu vedie k blokovaniu exprese jasmonátmi aktivovaných obranných génov. V odpovedi rastlín na poranenie bola potvrdená účasť chloroplastovej izoenzymovej formy LOX u arabkovky (*Atlox2*)¹⁵, zemiakov (*H3*)⁶⁷ a v listoch rajčín⁵ a mučenky⁶⁸. Na základe toho možno konštatovať, že syntéza jasmonátov je iniciovaná v chloroplastoch. Dôkazom bolo aj zistenie, že pri poranení dochádza k zníženiu obsahu monogalaktozyl-diacylglycerolov v membráne chloroplastov, o ktorých sa predpokladá, že sú zdrojom kyseliny linolénovej pre biosyntézu jasmonátov⁶⁹. Porta a spol. (1999)⁷⁰ experimentálne potvrdili, že k aktivácii LOX

dochádza aj po exogénnej aplikácii JA, čo predpokladá tzv. feed-back mechanizmus regulácie oktaedánovej cesty.

8. Úloha LOX v programovanej smrti rastlinných buniek

Lipoxygenázou katalyzovaná oxidácia lipidov sa zúčastňuje degradácie membrán pri tzv. hypersenzitívnej odpovedi rastlinných buniek na atak patogénov, pri ktorej dochádza k smrti rastlinných buniek v mieste infekcie⁷¹. Hypersenzitívna odpoveď je charakterizovaná stratou integrity membrán a je spojená s tvorbou peroxidov lipidov a kyslíkových radikálov. Experimentálne výsledky poukazujú najmä na peroxid vodíka, ktorého aj malé množstvá viedli k aktivácii hypersenzitívnej odpovede v bunkách sóje. Indukcia hypersenzitívnej odpovede a následnej bunkovej smrti bola spojená s aktiváciou LOX⁷². Podobné výsledky boli pozorované aj na listoch fazule⁷³, papriky⁷⁴ a tabaku⁷¹ po infikovaní patogénmi. Zistilo sa tiež, že produkty LOX reakcie 9- alebo 13-hydroperoxydov polynenasýtených mastných kyselín, ako aj ich redukované formy, boli schopné indukovať fragmentáciu DNA a bunkovú smrť. Pri použití inhibítorov LOX alebo inhibičných anti-LOX monoklonálnych protilátok, ktoré blokovali aktivitu LOX bez ovplyvnenia oxidačného stavu bunky, nedošlo k oxidačným stresom indukovanej smrti buniek⁷⁵. Uvedené experimenty poskytli dôkaz o účasti lipoxygenáz v procesoch indukcie programovanej smrti rastlinných buniek.

9. Záver

Lipoxygenázy sú v živočíšnych aj v rastlinných organizmoch na počiatku metabolických dráh, ktorých produkty majú viaceré dôležité biologické funkcie. Predovšetkým je významné zapojenie LOX do transdukcie signálov a bunkových regulačných procesov. LOX svojim postavením na počiatku týchto metabolických ciest ovplyvňuje dostupnosť substrátov pre enzýmy v jej ďalších vetvách a stáva sa tak významným miestom regulácie. Výskum v tejto oblasti priniesol v posledných rokoch viac poznatkov vedúcich k lepšiemu poznaniu a pochopeniu lipoxygenázovej cesty a jej významu aj v rastlinách. Prvou preskúmanou skupinou látok, ktoré sa vytvárajú v jednej zo siedmych doposiaľ popísaných vetiev lipoxygenázovej cesty, boli jasmonáty – dôležité v signálne transdukčných procesoch rastlín. Avšak aj produkty tvoriace sa v ďalších vetvách lipoxygenázovej cesty majú významnú biologickú funkciu. V poslednom období narastajú poznatky o subcelulárnej lokalizácii, štruktúre, mechanizme katalýzy rastlinných lipoxygenáz. Klonovanie, expresia a funkčná analýza génov kódujúcich jednotlivé izoenzymové formy lipoxygenáz, ako aj snahy o kryštalizáciu purifikovaných enzýmov prispievajú k získaniu nových poznatkov o úlohe lipoxygenáz v rastlinách.

LITERATÚRA

- Porta H., Rocha-Sosa M.: *Plant Physiol.* 130, 15 (2002).
- Axelrod B., Cheesborough T. M., Laasko S.: *Meth. Enzymol.* 71, 441 (1981).
- Fuller M. A., Weichert H., Fisher A. M., Feussner I., Grimes H. D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 146 (2001).
- Rojas J., Vancanney G., Pérez A. G., Sanz C., Störmann K., Rosahl S. Sanchez-Serrano J. J.: *J. Biol. Chem.* 271, 21012 (1996).
- Heitz T., Bergey D. R., Ryan C. A.: *Plant Physiol.* 114, 1085 (1997).
- Sanz L. C., Perez A. G., Rios J. J., Olias J. M.: *Phytochemistry* 31, 3381 (1992).
- Matsui K., Irie M., Kajiura T., Kakuno T., Hatanaka A.: *Phytochemistry* 32, 1387 (1993).
- Terp N., Brandt A.: *Biochem. Soc. Trans.* 28, 832 (2000).
- Siedow J. N.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 145 (1991).
- Douillard R., Bergeron E.: *Plant Sci. Lett.* 22, 263 (1981).
- Feussner I., Kindl A.: *Planta* 194, 22 (1994).
- Tranbarger T., Franceschi V., Hildebrand D., Grimes H.: *The Plant Cell* 3, 973 (1991).
- Braidot E., Petrusa E., Micolini S., Tubaro F., Vianello A., Macri F.: *J. Exp. Botany* 2004, 2.
- Nellen A., Rojahn B., Kindl H.: *Z. Naturforsch Teil C.* 50, 29 (1995).
- Bell E., Creelman R. A., Mullet J. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8675 (1995).
- Feussner I., Wasternack C., Kindl H., Kühn H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11849 (1995).
- Izumi T., Hoshiko S., Radmark O., Samuelsson S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7477 (1990).
- Vick B. A., Zimmerman D. C.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111, 470 (1983).
- Feussner I., Wasternack C.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 52, 275 (2002).
- Bleé E.: *Fett. Lipid* 100, 121 (1998).
- Grechkin A.: *Prog. Lipid Res.* 37, 317 (1998).
- Hamberg M.: *Lipids* 34, 1131 (1999).
- Matsui K.: *Belg. J. Bot.* 131, 50 (1998).
- Hatanaka A.: *Phytochemistry* 34, 1201 (1993).
- Croft K.P.C., Jüttner F., Slusarenko A. J.: *Plant Physiol.* 101, 13 (1993).
- Hamberg M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156, 543 (1998).
- Weichert H., Stenzel I., Berndt E., Wasternack C., Feussner I.: *FEBS Lett.* 464, 133 (1999).
- Kühn H., Weisner R., Rathmann J., Schewe T.: *Eicosanoids* 4, 9 (1991).
- Vollenweider S., Weber H., Stolz S., Chetelat A., Farmer E. E.: *Plant J.* 24, 467 (2000).
- Göbel C., Feussner I., Schmidt A., Scheel D., Sanchez-Serrano J.: *J. Biol. Chem.* 276, 6276 (2001).

31. Shaller F.: *J. Exp. Bot.* 52, 11 (2001).
32. Howe G. A., Lee G. I., Itoh A., Li L., De Rocher A. E.: *Plant Physiol.* 123, 711 (2000).
33. Laudert D., Weiler E. W.: *Plant J.* 15, 675 (1998).
34. León J., Rojo E., Sánchez-Serrano J. J.: *J. Exp. Bot.* 52, 1 (2001).
35. Xie D. X., Feys B. F., James S., Nietorostro M., Turner J. G.: *Science* 280, 1091 (1998).
36. Burow G. B., Gardner H. W., Keller N. P.: *Plant Mol. Biol.* 42, 689 (2000).
37. Melan M. A., Enriquez A. L. D., Peterman T. K.: *Plant Physiol.* 105, 385 (1994).
38. Kolomiets M. V., Hannapel D. J., Chen H., Tymeson M., Gladon R. J.: *Plant Cell* 13, 613 (2001).
39. Griffiths A., Barry C., Alpuche-Solis A. G., Grierson D.: *J. Exp. Bot.* 50, 793 (1999).
40. Bergey D. R., Howe G. A., Ryan C. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12053 (1996).
41. Yin Y., Wu D., Chory J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 9090 (2002).
42. Doares S. H., Syrovets T., Weiler E. W., Ryan C. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4095 (1995).
43. Farmer E. E., Ryan C. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7713 (1990).
44. Mueller M. J., Gundlach H., Parchmann S.: *Plant Physiol.* 115, 1057 (1997).
45. O'Donnell P. J., Calvert C., Atzorn R., Wasternack C., Leyser H. M. O., Bowles D. J.: *Science* 274, 1914 (1996).
46. Peña-Cortés H., Sánchez-Serrano J. J., Mertens R., Willmitzer L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9851 (1989).
47. Orozco-Cárdenas M. L., Narváez-Vásquez J., Ryan C. A.: *Plant Cell* 13, 179 (2001).
48. Baydoun E. A. H., Fry S. C.: *Planta* 165, 269 (1985).
49. Constabel C. P., Yip L., Ryan C. A.: *Plant Mol. Biol.* 36, 55 (1998).
50. Farmer E. E., Ryan C. A.: *Plant Cell* 4, 129 (1992).
51. Mueller M. J., Brodschelm W., Spannagl E., Zenk M. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 490 (1993).
52. Peña-Cortés H., Fisahn J., Willmitzer L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4106 (1995).
53. Harms K., Ramirez I., Peña-Cortés H.: *Plant Physiol.* 118, 1057 (1998).
54. Kernan A., Thornburg R. W.: *Plant Physiol.* 91, 73 (1989).
55. Lee A., Cho K., Jang S., Rakwal R., Iwahashi H., Agrawal G. K., Shim J., Han O.: *Biochem. Biophys. Res. Com.* 318, 734 (2004).
56. Kim S. R., Choi J. L., Costa M. A., An G.: *Plant Physiol.* 99, 627 (1992).
57. Mason H. S., DeWald D. B., Mullet J. E.: *Plant Cell* 5, 241 (1993).
58. Stratmann J., Scheer J., Ryan C. A.: *PNAS* 97, 8862 (2000).
59. Bleichert S., Brodschelm W., Hölder S., Kammerer L., Kutchan T. M., Xia Z. Q., Zenk M. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4099 (1995).
60. Parchmann S., Gundlach H., Mueller M. J.: *Plant Physiol.* 115, 1057 (1997).
61. Bate N. J., Rothstein S. J.: *Plant J.* 16, 561 (1998).
62. Arimura G., Ozawa R., Shimoda T., Nishioka T., Bolland W., Takabayashi J.: *Nature* 406, 512 (2000).
63. Agrawal A. A.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 329 (2000).
64. Weber H., Chételat A., Caldelari D., Farmer E. E.: *Plant Cell* 11, 485 (1999).
65. Devoto A., Turner J. G.: *Ann. Bot.* 92, 329 (2003).
66. Halitschke R., Baldwin I. T.: *J. Plant Growth Regul.* 23, 238 (2005).
67. Royo J., León J., Vancanneyt G., Albar J. P., Rosahl S., Ortego F., Castañera P., Sánchez-Serrano J. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1146 (1999).
68. Rangel M., Machado O. L. T., Cunha M., Jacinto T.: *Phytochemistry* 60, 619 (2002).
69. Conconi A., Mique I. M., Browse J. A., Ryan C. A.: *Plant Physiol.* 111, 797 (1996).
70. Porta H., Rueda-Benítez P., Campos F., Colmenero-Flores J. M., Colorad J. M., Carmona M. J., Covarrubias A. A., Rocha-Sosa M.: *Plant Cell Physiol.* 40, 850 (1999).
71. Rustérucci C., Montillet J.-L., Agnel J.-P., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bessoule J.-J., Etienne P., Suty L., Blein J.-P.: *J. Biol. Chem.* 274, 36446 (1999).
72. Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C.: *Cell* 79, 583 (1994).
73. Croft K. P. C., Voisey C. R., Slusarenko A. J.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36, 49 (1990).
74. Buonauro R., Servili M.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 54, 155 (1999).
75. Maccarrone M., Van Zadelhoff G., Veldink G. A., Vliegthart J. F. G., Finazzi-Agrò A.: *Eur. J. Biochem.* 267, 5078 (2000).
76. Feussner I., Kühn H., Wasternack C.: *Trends Plant Sci.* 6, 268 (2001).

I. Holková, L. Bezáková, M. Vanko, F. Bilka, and M. Obložinský (*Department of Cell and Molecular Biology of Pharmaceuticals, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava*): **Lipoxygenases and Their Significance in Biochemical Processes in Plant Organisms**

Lipoxygenases (LOX; linoleate:oxygen oxidoreductase, EC 1.13.11.12) are a family of dioxygenases that do not contain hem-bonded iron at the active site. They catalyze peroxidation of polyunsaturated fatty acids, in particular linolic and linolenic acids, which gives hydroperoxy derivatives of (9*S*)- or (13*S*)-polyunsaturated fatty acids (9-LOX or 13-LOX, respectively). Lipid peroxidation is important in plant evolution and for their response to various forms of stress, both of biotic and abiotic origin. LOX is the starting enzyme of the lipoxygenase metabolic pathway producing oxylipins such as signal molecules, antimicrobial and antifungal compounds.



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Česká společnost chemická
Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha

Pořádají ve dnech 11. až 13. listopadu 2009 mezinárodní konferenci

Polysacharidy V.

Místo konání: Novotného lávka 5, Praha 1, Česká republika

Okruhy:

Produkce polysacharidů a jejich derivátů.

Charakterizace a analýza polysacharidů z přírodních zdrojů.

Fyziologické účinky polysacharidů.

Biodegradabilní plasty na bázi polysacharidů.

Plenární přednášky:

Werner Praznik, Renate Loeppert a Anton Huber (Institut of Chemistry, KF-University, Graz, Austria)
Molecular dimension and structure of water soluble polysaccharides by means of adequate chromatographic techniques with different detection systems.

Gianfranco Venora (Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia, Italy) Seeds identification by means of image analysis and linear discriminant analysis: case studies.

Václav Větvíčka (University of Louisville, Department of Pathology, Louisville, Kentucky, USA)
Glucan - magic bullet or big con?

Jazyk: anglický a český

Termín podání abstrakt: 30.6.2009

Termín podání přihlášek: 15.9.2009