

Открытие новой ветви липоксигеназного каскада

Горина С.*, Ланцова Н., Ильина Т., Егорова А., Топоркова Я., Гречкин А.

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение
ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

*gsvetlana87@gmail.com

Ключевые слова: оксипирины; липоксигеназа; гидропероксидлиаза; *Cucumis sativus* L.

Мотивация и цель: Растительный липоксигеназный каскад является источником различных регуляторных оксипиринов, которые участвуют в передаче сигналов, адаптации к стрессовым факторам и защитных реакциях [1, 2]. Регио- и стереоспецифическая диоксигенация жирных кислот при участии липоксигеназ (ЛОГ) во многом определяет направления превращений гидроперекисей жирных кислот в различные оксипирины. Хорошо известно, что растительные ЛОГ окисляют линолевую и α -линоленовую кислоты до 9- и 13-гидроперекисей [2]. При изучении профилей оксипиринов растений огурца мы обнаружили значительное содержание 16-гидроперекиси α -линоленовой кислоты (16-ГПОТ), а также продуктов ее превращения, таких как 15-гидрокси-9,12-пентадекадиеновая кислота. Это соединение является продуктом восстановления 15-оксо-9,12-пентадекадиеновой кислоты, образованной при участии гидропероксидлиазы (ГПЛ).

ГПЛ принадлежит к неклассическим цитохромам P450 семейства CYP74, которые, в отличие от большинства монооксигеназ P450, для своей каталитической активности не нуждаются в молекулярном кислороде и окислительно-восстановительных партнерах. Субстраты – гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот – являются донорами кислорода и электронов. ГПЛ и ЛОГ образуют ГПЛ-ветвь ЛОГ пути, приводящую к образованию C6 и C9 альдегидов и спиртов, а также ω -оксокислот [3]. Эти соединения играют важную роль во взаимодействиях растение-растение и растение-травоядные, выполняя сигнальную роль в активации защитных систем растения, и участвуют непосредственно в защите растений, проявляя антимикробную и фунгицидную активность [4, 5]. Некоторые из этих соединений получили специальное название «летучие вещества зеленых листьев». Они вызывают характерный запах, который возникает, когда происходит повреждение листьев. Это ценные химические соединения, которые используются в пищевой и парфюмерной промышленности. Таким образом, целью нашей работы было выявление ферментов биосинтеза 16-ГПОТ и образующихся из нее оксипиринов.

Методы и алгоритмы: Открытые рамки считывания целевых генов были клонированы в векторах для экспрессии белков системы pET. Рекомбинантные белки очищали методами металлоаффинной и анионообменной хроматографии. Продукты (оксипирины), очищенные с помощью ВЭЖХ, идентифицировали с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) и ЯМР, включая ^1H -ЯМР, 2D-COSY, HSQC и HMBC.

Результаты: Профилирование эндогенных оксипиринов листьев, цветков и кожуры плодов огурца (*Cucumis sativus* L.) методом ГХ-МС выявило значительное

содержание 16-гидрокси-9,12,14-октадекатриеновой кислоты (16-ГОТ). При инкубации гомогенатов этих органов с α -линоленовой кислотой преобладающим продуктом была 16(S)-ГПОТ. Целенаправленный протеомный анализ этих тканей выявил наличие нескольких высокомолекулярных изоформ предполагаемой «9S-ЛОГ тип 6». Один из этих изоферментов (CsLOX3, полипептид длиной 877 аминокислотных остатков) был получен в гетерологической системе экспрессии с использованием клеток *E. coli* и проявлял 16(S)- и 13(S)-липоксигеназную активность по отношению к α -линоленовой и линолевой кислотам соответственно. При этом α -линоленовая кислота была предпочтительным субстратом. Молекулярные структуры 16(S)-ГОТ и 16(S)-ГПОТ (Me или Me/TMC) были подтверждены данными масс-спектров ^1H -ЯМР, $2\text{D}^1\text{H}$ - ^1H -COSY, TOCSY, HMBC и HSQC, а также методом хирально-фазовой ВЭЖХ. Таким образом, липоксигеназа CsLOX3, катализирующая образование 16(S)-ГПОТ, является первой обнаруженной 16(S)-ЛОГ (ω 3-ЛОГ) [6].

Для подтверждения предположения о катализируемом гидропероксидлиазой превращении 16(S)-ГПОТ, 16(S)-ГПОТ инкубировали с рекомбинантной ГПЛ огурца (CYP74B6). CYP74B6 обладал высокой активностью по отношению к 16-ГПОТ. Продукт восстановления NaBH_4 (Me/TMC) был идентифицирован как 15-гидрокси-9,12-пентадекадиеновая кислота. Таким образом, рекомбинантная ГПЛ огурца (CYP74B6) обладает беспрецедентной активностью 16-ГПЛ, расщепляя 16-ГПОТ на фрагмент C15, 15-оксо-9,12-пентадекадиеновую кислоту и комплементарный летучий фрагмент C3, пропионовый альдегид. Кроме того, эти соединения были выявлены и при профилировании оксипинов листьев и кожуры плодов огурца.

Выводы: Нами обнаружена новая ветвь метаболизма α -линоленовой кислоты, а именно 16-ЛОГ/ГПЛ ветвь. Растения огурца, а также рекомбинантная гидропероксидлиаза CYP74B6 огурца обладали беспрецедентной 16-ГПЛ активностью. 16-ЛОГ/ГПЛ путь биосинтеза оксипинов представляет собой новую ветвь растительного липоксигеназного каскада.

Финансирование: Биоинформатический анализ проводился при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра «КазНЦ РАН». Исследования рекомбинантных ферментов поддерживаются грантами РНФ 23-14-00350 (ГПЛ) и 24-14-00418 (ЛОГ).

Discovery of 16(S)-lipoxygenase/16-hydroperoxide lyase pathway in green tissues of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants

Gorina S.*, Lantsova N., Iljina T., Egorova A., Toporkova Y., Grechkin A.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics – Subdivision of the Federal State Budgetary Institution of Science “Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, Kazan, Russia

*gsvetlana87@gmail.com

Key words: oxylipins; lipoxygenase; hydroperoxide lyase; *Cucumis sativus* L.

Motivation and Aim: The plant lipoxygenase cascade is a source of various regulatory oxylipins that play a role in cell signaling, stress adaptation, and immune response [1, 2]. Regio- and stereospecific dioxygenation of fatty acids by lipoxygenases (LOXs) largely

determine the directions of conversion of fatty acid hydroperoxides to various oxylipins. Plant LOXs are well known to oxidize linoleic and α -linolenic acids to 9- and 13-hydroperoxides [2]. When studying the oxylipin profiles in cucumber plants, we found a significant content of 16-hydroperoxide of α -linolenic acid (16-HPOT), as well as its conversion products, such as 15-hydroxy-9,12-pentadecadienoic acid. This compound is a product of the reduction of 15-oxo-9,12-pentadecadienoic acid, formed by hydroperoxide lyase (HPL).

HPL belongs to the non-classical cytochromes P450 of the CYP74 family, which, unlike most P450 monooxygenases, do not require molecular oxygen and redox partners for their catalytic activities. Substrates, hydroperoxides of polyunsaturated fatty acids, act as donors of oxygen and electrons. HPL and LOX form the HPL-branch of the LOX pathway, leading to the formation of C6 and C9 aldehydes and alcohols, as well as ω -oxoacids [3]. These compounds play important roles in plant-plant and plant-herbivore interactions, function as signals activating systemic defense, and are involved directly in plant defense as antimicrobials and fungicides [4, 5]. A number of these compounds are specifically named Green Leaf Volatiles (GLVs). They cause a characteristic odor that occurs when leaves are crushed or otherwise injured. They are valuable chemicals that are used in the food and perfume industries.

Thus, the purpose of our work was to identify enzymes for the biosynthesis of 16-HPOT and the oxylipins formed from it.

Methods and Algorithms: The open reading frames of target genes were cloned into expression vectors of the pET system. Recombinant proteins were purified by immobilized metal-affinity and anion-exchange chromatography. Products (oxylipins) purified by HPLC were identified by GC-MS and NMR data, including $^1\text{H-NMR}$, 2D-COSY, HSQC, and HMBC.

Results: The GC-MS profiling of the endogenous oxylipins (Me/TMS) from cucumber (*Cucumis sativus* L.) leaves, flowers, and fruit peels revealed a remarkable abundance of 16-hydroxy-9,12,14-octadecatrienoic acid (16-HOT). Incubations of homogenates from these organs with α -linolenic acid yielded 16(S)-hydroperoxide (16-HPOT) as a predominant product. Targeted proteomic analyses of these tissues revealed the presence of several highly homologous isoforms of the putative “9S-lipoxygenase type 6”. One of these isoenzymes (CsLOX3, an 877 amino acid polypeptide) was prepared by heterologous expression in *E. coli* and exhibited 16(S)- and 13(S)-lipoxygenase activities toward α -linolenic and linoleic acids, respectively. Furthermore, α -linolenate was a preferred substrate. The molecular structures of 16(S)-HOT and 16(S)-HPOT (Me or Me/TMS) were unequivocally confirmed by the mass spectral data, $^1\text{H-NMR}$, 2D $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, TOCSY, HMBC, and HSQC spectra, as well as enantiomeric HPLC analyses. Thus, the vegetative CsLOX3, biosynthesizing 16(S)-HPOT, is the first 16(S)-LOX and ω 3-LOX ever discovered [6].

To confirm the proposed HPL chain cleavage, the 16(S)-HPOT was prepared and incubated with the recombinant cucumber HPL CYP74B6 enzyme. The CYP74B6 possessed high activity towards 16-HPOT. The NaBH_4 -reduced product (Me/TMS) was identified as 15-hydroxy-9,12-pentadecadienoic acid. Thus, the cucumber plants, as well as the recombinant cucumber HPL CYP74B6, possessed unprecedented 16-HPL activity, cleaving 16-HPOT into a C15 fragment, 15-oxo-9,12-pentadecadienoic acid, and a complementary volatile C3 fragment, propionic aldehyde.

Conclusion: We have discovered a new branch of metabolism in the transformation of α -linolenic acid, namely the 16-LOX/HPL branch. The cucumber plants as well as the

recombinant cucumber HPL CYP74B6 possessed unprecedented 16-HPL activity. The 16-LOX/16-HPL route of oxylipin biosynthesis presents a novel facet of the plant LOX pathway.

Funding: Bioinformatic analysis was carried out with financial support from the state assignment of the Federal Research Center “KazSC of RAS”. Studies of the recombinant enzymes were supported by grants 23-14-00350 (HPL) and 24-14-00418 (LOX) from the Russian Science Foundation.

Список литературы/References

1. Mosblech A., Feussner I., Heilmann I. Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol. Biochem.* 2009;47:511-517. doi 10.1016/j.plaphy.2008.12.011
2. Wasternack C., Feussner I. The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2018;69:363-386. doi 10.1146/annurev-arplant-042817-040440
3. Grechkin A.N. Hydroperoxide lyase and divinyl ether synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68-69:457-470. doi 10.1016/s0090-6980(02)00048-5
4. Matsui K. Green leaf volatiles: Hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006;9:274-280. doi 10.1016/j.pbi.2006.03.002
5. Frost C.J., Mescher M.C., Dervinis C., Davis J.M., Carlson J.E., De Moraes C.M. Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile cis-3-hexenyl acetate. *New Phytol.* 2008;180:722-734. doi 10.1111/j.1469-8137.2008.02599.x
6. Gorina S.S., Egorova A.M., Lantsova N.V., Toporkova Y.Y., Grechkin A.N. Discovery of α -Linolenic Acid 16(S)-Lipoxygenase: Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Vegetative Lipoxygenase 3. *J. Mol. Sci.* 2023;24(16):12977. doi 10.3390/ijms241612977