

Множественность генов липоксигеназ в растительных геномах

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

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

* yanchens@yandex.ru

Ключевые слова: оксипирины; липоксигеназа; рекомбинантный фермент; субстратная специфичность; региоспецифичность

Мотивация и цель: Основным источником оксипиринов у растений является липоксигеназный каскад, который начинается с образования гидроперекисей при участии липоксигеназ (ЛОГ). Липоксигеназы представляют собой негемовые железо- или марганец-содержащие ферменты, которые катализируют регио- и стереоспецифическое перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот, содержащих (1Z,4Z)-пентадиеновую систему, в соответствующие гидроперекиси. Липоксигеназы обнаружены у животных, растений, грибов и бактерий, водорослей и цианобактерий. Типичными субстратами растительных липоксигеназ являются линолевая и α -линоленовая кислоты. Продукты ЛОГ являются субстратами для ряда ферментов, среди которых редуктазы, пероксигеназы, а также цитохромы P450 семейства CYP74. При этом существует очевидный парадокс, поскольку ферментов дальнейшего превращения гидроперекисей, разнообразие которых достигает как минимум семи, в несколько раз меньше, чем самих липоксигеназ. Например, у огурца всего четыре фермента CYP74, а липоксигеназ – тридцать. При этом до недавнего времени все разнообразие липоксигеназ сводилось только к выделению 9- и 13-специфичных липоксигеназ, различающихся по атому углерода в составе линолевой или α -линоленовой кислот, который они окисляют. На объяснение этого парадокса и направлено данное исследование.

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

Результаты: Все исследования липоксигеназ, как правило, включают транскриптомные, биоинформатические, филогенетические исследования. Только небольшая часть работ включает исследования каталитических свойств, из них еще меньше проведено на рекомбинантных белках. В виде рекомбинантных белков получают, как правило, липоксигеназы невегетативных органов, таких как корни, клубни, семена.

Липоксигеназы семян сои являются классическими объектами. Липоксигеназа-1 описана как 13-специфичная, липоксигеназа-3 – как 9-специфичная. При этом липоксигеназа-2 аннотирована в базе данных NCBI как 9-специфичная, а все

исследования каталитических свойств описывают фермент как неспецифичный, окисляющий жирные кислоты по положению как 9, так и 13. Более того, в работах указаны разные соотношения образующихся продуктов. Однако ни в одной работе липоксигеназу-2 не получали в виде рекомбинантного белка. Мы получили рекомбинантный фермент. Было показано, что в результате инкубации фермента с линолевой и альфа-линоленовой кислотами образуются 13-гидроперекиси. Превращение других кислот проходит аналогично. Во всех реакциях образуются омегаб-гидроперекиси.

В течение долгого времени исследователи не могли прийти к соглашению о том, каким образом входит субстрат в активный центр фермента. Изменение направленности (вход карбоксильным или метильным концом вперед) предполагается в качестве механизма регуляции для образования 9- или 13-гидроперекисей у неспецифичных липоксигеназ. Так же предполагалось для липоксигеназы-2 сои. Однако поскольку превращение всех жирных кислот протекает стереоспецифически, очевидно, что субстрат входит в активный центр липоксигеназы-2 сои только одним способом.

Автоокисление жирных кислот приводит к введению гидроперекисной группировки в углерод по разным положениям, в том числе по положению 16. При этом 16-гидроперекись альфа-линоленовой кислоты выявляется у разных растений и иногда в значительных количествах. Например, 16-ГПОТ была выявлена в разных органах огурца, при этом в цветках и кожуре огурца это была единственная гидроперекись. При этом наличие единственного стереоизомера указывает на ферментативное образование этой гидроперекиси.

Мы провели протеомный анализ разных органов огурца и выявили основные изоформы липоксигеназ. Одна из липоксигеназ присутствует как в листьях, так и в кожуре огурца. Мы клонировали открытую рамку считывания этого гена и получили рекомбинантный белок. Фермент проявляет предпочтение к альфа-линоленовой кислоте, стереоспецифически окисляя ее по углероду в положении 16, т. е. является омега3-специфичной липоксигеназой. Поскольку у линолевой кислоты нет двойной связи в положении омега3, превращение линолевой кислоты протекает неспецифически.

Выявление фермента, катализирующего образование омега3-гидроперекиси, имеет практическое значение, например, при производстве резольвинов, которые являются продуктами превращения 18-гидроперекиси C20 жирных кислот. Ранее эту гидроперекись получали при участии ферментов циклооксигеназы или некоторых цитохромов P450.

Представленные выше результаты указывают как минимум на две причины, почему генов липоксигеназ в геномах растений в несколько раз больше, чем генов ферментов дальнейшего превращения гидроперекисей. Дополнительные причины этого феномена связаны с дупликацией генов липоксигеназ, а также с локализацией и кинетическими параметрами этих ферментов.

Выводы: Таким образом, выявлено несколько причин множественности генов липоксигеназ в геномах растений по сравнению с числом генов ферментов дальнейшего превращения гидроперекисей – продуктов липоксигеназной активности.

Финансирование: Биоинформатический и филогенетический анализ проводили при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра «КазНЦ РАН». Исследования рекомбинантных липоксигеназ поддержаны грантом Российского научного фонда 24-14-00418.

Multiplicity of lipoxygenase genes in plant genomes

Toporkova Y.*, Gorina S., Smirnova E., Lantsova N., Ilyina T.,
Egorova A., Grechkin A.

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics – a separate structural unit of the Federal Research
Center Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia*

* yanchens@yandex.ru

Key words: oxylipins; lipoxygenase; recombinant enzyme; substrate specificity; regiospecificity

Motivation and Aim: The main source of oxylipins in plants is the lipoxygenase cascade, which begins with the formation of hydroperoxides by lipoxygenases (LOXs). Lipoxygenases are non-heme iron- or manganese-containing enzymes that catalyze the regio- and stereospecific peroxidation of unsaturated fatty acids containing the (1Z,4Z)-pentadiene system resulting in the formation of the corresponding hydroperoxides. Lipoxygenases were found in animals, plants, fungi and bacteria, algae, and cyanobacteria. Typical substrates of plant lipoxygenases are linoleic and α -linolenic acids. LOX products, fatty acid hydroperoxides, are substrates for a number of enzymes, including reductases, peroxygenases, and cytochromes P450 of the CYP74 family. In this case, there is an obvious paradox, that there are several times fewer enzymes for the further conversion of hydroperoxides, the diversity of which reaches at least seven, than the lipoxygenases themselves. For example, cucumber has only four CYP74 enzymes and thirty lipoxygenases. Moreover, until recently, the entire variety of lipoxygenases was reduced only to 9- and 13-specific lipoxygenases, differing in the carbon atom within linoleic or α -linolenic acids, which they oxidize. This study is aimed at explaining this paradox.

Methods and Algorithms: The open reading frames of the target genes were cloned into pET system vectors for expressing proteins. Recombinant proteins were purified by anion exchange chromatography. Products (hydroperoxides) purified by HPLC were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and NMR, including ^1H -NMR, 2D-COSY, HSQC, and HMBC.

Results: All studies of lipoxygenases, as a rule, include transcriptomic, bioinformatics, and phylogenetic studies. Only a small part of the work includes studies of catalytic properties, of which even less has been obtained as recombinant proteins. As a rule, lipoxygenases from non-vegetative organs, such as roots, tubers, and seeds, were obtained as recombinant proteins.

Soybean seed lipoxygenases are classical objects. Lipoxygenase-1 was described as 13-specific enzyme, lipoxygenase-3 was described as 9-specific one. At the same time, lipoxygenase-2 was annotated in the NCBI database as 9-specific enzyme, and all studies of catalytic properties described the enzyme as non-specific one, oxidizing fatty acids both at C9 and C13 positions. Moreover, different reports described different ratios of the products formed. However, no one report contained data obtained with lipoxygenase-2 as a recombinant protein. We have obtained a recombinant lipoxygenase-2. It was shown that as a result of incubation of the enzyme with linoleic and α -linolenic acids, 13-hydroperoxides were formed. The transformation of other acids was similar. All reactions produced ω -6 hydroperoxides.

For a long time, researchers could not agree on how the substrate enters the active site of the enzyme. Reversal of directionality (entry by carboxyl or methyl end first) was

proposed as a regulatory mechanism for the formation of 9- or 13-hydroperoxides in nonspecific lipoxygenases. The same mechanism was assumed for soybean lipoxygenase-2. However, since the conversion of all fatty acids occurs stereospecifically, it is obvious that the substrate enters the active site of soybean lipoxygenase-2 in only one way.

Autoxidation of fatty acids leads to the introduction of a hydroperoxide group into carbon at various positions, including position 16. In this case, 16-hydroperoxide of alpha-linolenic acid is detected in different plants and sometimes in significant quantities. For example, 16-HPOT was detected in various organs of cucumber. Moreover, in flowers and cucumber peel it was the only isomer. And the presence of a single stereoisomer indicates the enzymatic formation of this hydroperoxide.

We conducted a proteomic analysis of different cucumber organs and identified the main isoforms of lipoxygenases. One of the lipoxygenases is present in both the leaves and peel. We cloned the open reading frame of this gene and obtained a recombinant protein. The enzyme shows preference for alpha-linolenic acid, stereospecifically oxidizing it at carbon at position 16, so it is an omega3-specific lipoxygenase. Since linoleic acid does not have a double bond at the omega3 position, the conversion of linoleic acid occurs nonspecifically.

Identification of the enzyme that catalyzes the formation of omega3-hydroperoxide is of practical importance, for example, in the production of resolvins, which are products of the conversion of 18-hydroperoxide of C20 fatty acids. Previously, this hydroperoxide was obtained by cyclooxygenases or some P450 cytochromes.

The results presented above indicate at least two reasons why there are several times more genes for lipoxygenases in plant genomes than genes for enzymes for further conversion of hydroperoxides. Additional reasons for this phenomenon are associated with duplication of lipoxygenase genes, as well as the localization and kinetic parameters of these enzymes.

Conclusion: Thus, several reasons have been identified for the multiplicity of lipoxygenase genes in plant genomes in comparison with the number of genes for enzymes for the further conversion of hydroperoxides, products of lipoxygenase activity.

Funding: Bioinformatic and phylogenetic analyses were carried out with financial support from the state assignment of the Federal Research Center “KazSC of RAS”. Studies of the recombinant LOXs were supported by grant 24-14-00418 from the Russian Science Foundation.