

ЛИПОКСИГЕНАЗЫ И РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

И. В. ПОКОТИЛО, Я. С. КОЛЕСНИКОВ, М. В. ДЕРЕВЯНЧУК,
А. И. ХАРИТОНЕНКО, В. С. КРАВЕЦ

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев;
e-mail: kravets@bpci.kiev.ua

Липоксигеназы являются широко распространенными энзимами растений, катализирующими пероксидное окисление полиненасыщенных жирных кислот. Эта реакция является ключевой в энзиматическом каскаде образования широкого спектра регуляторов метаболизма растений – оксипиринов. С действием этих биологически активных соединений связывают формирование защитных механизмов при биотическом или абиотическом стрессах, а также регуляцию процессов роста, размножения и старения растительного организма. В обзоре проанализированы современные взгляды на классификацию липоксигеназ, их строение и каталитические свойства. Рассмотрены вопросы регуляции активности энзима на транскрипционном и посттрансляционном уровнях, а также роль липоксигеназного катализа в сигналинге растительной клетки.

Ключевые слова: липоксигеназа, стрессовые реакции, адаптация, оксипирины, жасмоновая кислота, липиды.

Липоксигеназы (ЛОГ, линолеат: кислород оксидоредуктазы) относятся к большому семейству диоксигеназ жирных кислот, содержащих в активном центре негемовое железо. Исключение составляют некоторые ЛОГ патогенных грибов, содержащих марганец [1, 2]. ЛОГ катализируют регио- и стереоспецифическое окисление (присоединение двух атомов кислорода) полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), содержащих (1Z, 4Z)-пентадиеновую систему связей с формированием гидропероксидных производных [3, 4]. В качестве основных субстратов ЛОГ рассматривают, в частности, линолевую, α -линоленовую (у растений) и арахидоновую (у животных) кислоты, которые высвобождаются из состава клеточных липидов при участии ацилгидролаз или фосфолипазы A2 [5]. ЛОГ также способны катализировать окисление этерифицированных ПНЖК в составе липидов [6]. Они широко распространены и содержатся в высших растениях, животных, мхах, водорослях, дрожжах, кораллах, грибах, а также в прокариотах [7, 8]. У растений существуют несколько типов изоэнзимов ЛОГ, различающихся по локализации, субстратной специфичности, а также по стерео- и региоспецифичности формируемых продуктов [3, 8].

ЛОГ являются ключевыми энзимами растений, участвующих в образовании производных окисления ПНЖК – оксипиринов [9], представляющих собой разнородный класс биологически активных метаболитов, к которым относят, в частности, жасмоновую кислоту, бактерицидные и фунгицидные соединения [3, 9]. Многочисленные пути превращения оксипиринов в клетках растений инициируются формированием гидропероксидов жирных кислот – первичных продуктов реакции ЛОГ [10, 11]. Гидропероксиды могут образовываться в клетке также в результате действия диоксигеназ или путем неэнзиматического пероксидного окисления [9]. Большинство оксипиринов формируется в результате дальнейших энзиматических превращений первичных продуктов реакции ЛОГ (рис. 1). Так, реакции, катализируемые гидропероксидлиазами, приводят к формированию короткоцепочечных альдегидов и спиртов (травматин). В свою очередь, реакции, катализируемые алленоксидсинтазами приводят к образованию октадеканойдов, которые метаболизируются специфическими циклазами в жасмоновую кислоту. Другие реакции, катализируемые эпоксиалкогольсинтазами, пероксигеназами, дивинилэфирсинтазами и специфическими ре-

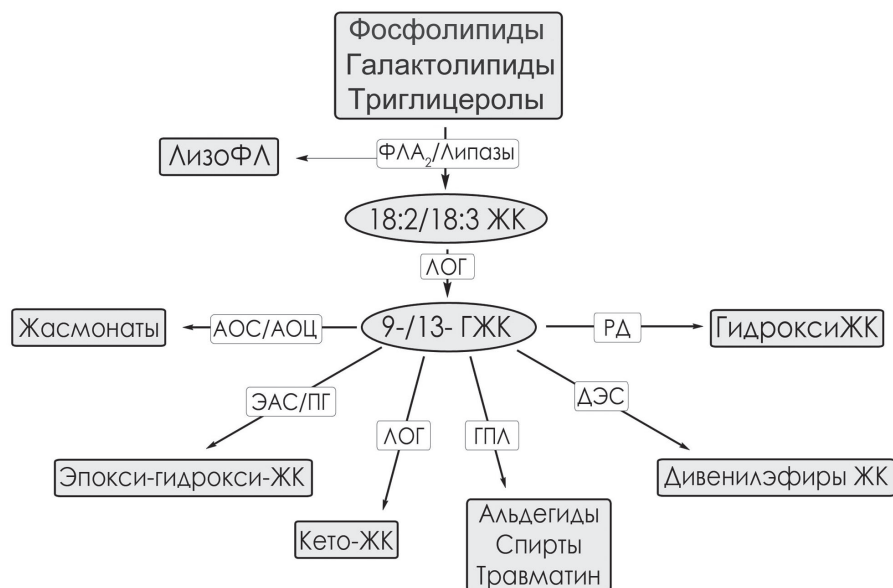


Рис. 1. Схема вовлечения липоксигеназ (ЛОГ) в процессе синтеза оксипинов у растений. АОС – алленоксид синтаза; АОЦ – алленоксид циклаза; ГЖК – гидропероксиды жирных кислот; ГПЛ – гидрокси-пероксид лиаза; ДЭС – дивенилэфир синтаза; ЭАС – эпоксиалкоголь синтаза; ЖК – жирные кислоты; ЛизоФЛ – лизофосфолипиды; ПГ – пероксигеназа; РД – редуктаза, ФЛА₂ – фосфолипаза А₂

дуктазами приводят к формированию эпокси-гидроксиполиненасыщенных жирных кислот, гидроксиполиненасыщенных жирных кислот, а также дивениловых эфиров и кето-производных оксипинов. Высокая физиологическая активность оксипинов обусловлена их ролью в качестве сигнальных молекул в регуляции процессов роста, развития и старения организмов [12], а также в механизмах формирования защитных реакций клеток растений [13, 14].

На сегодняшний день интенсивное развитие исследований, направленных на изучение структуры и функций ЛОГ на генном и клеточном уровнях позволило засвидетельствовать важную функциональную роль ЛОГ у растений.

Классификация и номенклатура липоксигеназ растений

ЛОГ являются гетерогенными и многочисленными ферментами, для классификации которых могут применяться несколько подходов. Предполагается, что построение общей классификации ЛОГ растений возможно на основании учета превалирующего субстрата и продукта реакции, типа изоэнзима, его функциональных свойств (условий каталитической реакции), а также локализации в клетках и тканях. В частности, у растений ЛОГ классифицируются дву-

мя независимыми способами. По локализации в клетке ЛОГ разделяют на два типа: ЛОГ, находящиеся за пределами хлоропластов, обозначают как ЛОГ 1-го типа, тогда как ферменты пластид, содержащие хлоропластный N-терминальный транзитный пептид – ЛОГ 2-го типа [15]. Для растений характерно присутствие обеих форм ЛОГ. Анализ структуры генов ЛОГ огурцов свидетельствует о том, что продукты 9 генов этих ферментов принадлежат к ЛОГ 1-го типа, а продукты других 13 генов кодируют ЛОГ 2-го типа [16]. Однако у *Arabidopsis* имеется лишь одна изоформа ЛОГ (ЛОГ1), которая является экстрапластидной [17].

В свою очередь, в соответствии с региоспецифичностью окисления линолевой кислоты ЛОГ разделяют на 9-ЛОГ (1.13.11.58) и 13-ЛОГ (1.13.11.12). Вследствие этих реакций происходит формирование, соответственно, 9S- и 13S-гидропероксипроизводных линолевой кислоты [3]. У животных ЛОГ классифицируются сходным образом, исходя из позиции окисления углеводородной цепи арахидоновой кислоты (превалирующего субстрата ЛОГ у животных) [18]. Различия в длине углеводородной цепи субстратов ЛОГ у растений (линолевая, линоленовая), содержащих 18 атомов углерода, по сравнению с таковыми у животных (арахидоно-

вая), содержащих 20 атомов углерода, усложняет непосредственное сопоставление ЛОГ разных групп организмов. Необходимо отметить, что 9-ЛОГ растений относятся преимущественно к ЛОГ 1-го типа (цитозольных), тогда как некоторые 13-ЛОГ 1-го типа могут локализоваться в олеосомах [19]. Известно, что у гороха и картофеля существуют ЛОГ двойной специфичности [20, 21], катализирующие формирование смеси продуктов – 9- и 13-гидропероксипроизводных в различном соотношении. ЛОГ животных в сходной ситуации классифицируют по превалирующему продукту ферментативной реакции или обозначают в качестве ЛОГ двойного действия [22].

Особые подходы к классификации могут применяться к некоторым ЛОГ растений, которые в условиях *in vitro* способны катализировать окисление жирных кислот животного происхождения. У картофеля известны ЛОГ, которые проявляют активность 5-липоксигеназы при окислении арахидоновой кислоты *in vitro* [23]. Способность окислять арахидоновую кислоту *in vitro* была также показана для ЛОГ сои [24], мхов [25] и водорослей [26].

Для некоторых ЛОГ растений характерны те или иные особенности их структуры и функций, затрудняющие общепринятую классификацию. В частности, один из 23 генов ЛОГ огурцов не принадлежит ни к 9-, ни к 13-ЛОГ [16]. Также известно, что ЛОГ6 кукурузы и некоторые ЛОГ мхов обладают активностью гидропероксидлиазы жирных кислот [25, 27], а ЛОГ2 у *Arabidopsis* катализирует формирование арабидопсидов – окисленных галактолипидов (моно- и дигалактозилдиацилглицеролов) [28].

В последнее время повсеместно применяется классификация ЛОГ растений, основанная на привязке к отдельным генам ЛОГ, кодирующих соответствующие изоэнзимы в клетках растений. Таким образом, классифицируются ЛОГ *Arabidopsis*, риса и многих других видов растений. Это позволяет непосредственно связать функции ЛОГ с механизмами регуляции их активности на транскрипционном и посттрансляционном уровнях. Также было предложено классифицировать ЛОГ на основе их первичной структуры [29].

Особенности структурной организации липоксигеназ

ЛОГ клеток растений являются мономерными протеинами с молекулярной массой 95–100 кДа (около 900 аминокислотных остатков), состоящими из двух структурных доменов. N-терминальный домен (25–30 кДа), также известный как домен PLAT (Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha Toxin), представлен преимущественно β-складчатыми структурами [15], содержит подвижные петли [30], и является родственным по организации к домену С2. У вегетативных ЛОГ (ВЛГ) сои (которые в большом количестве накапливаются в вегетативных тканях растения) он представлен последовательностью аминокислот 1–172 [30]. Подвижность этого домена может обеспечивать экспонирование аминокислотных остатков, необходимых для связывания с мембранами [31], а также для связывания, высвобождения и транспорта субстратов и продуктов ферментативной реакции [32]. Более емкий С-терминальный глобулярный каталитический домен (55–65 кДа) состоит преимущественно из α-спиралей [30] и содержит активный центр ЛОГ [18].

ЛОГ характеризуются консервативной третиной структурой. В центральной части молекулы ЛОГ содержится один атом железа [33]. Известно, что атомы азота имидазольного кольца трех гистидинов, а также атомы кислорода С-терминального изолейцина, молекула воды и боковая цепь аспарагина формируют координационную сферу, имеющую форму октаэдра, и играют роль лигандов атома железа [30]. В структуре ЛОГ1 *Arabidopsis* их роль выполняют аминокислотные остатки Asn⁷¹⁵, His⁷¹¹, His⁵¹⁹, His⁵²⁴, а также Fe⁸⁵⁹ (рис. 2). Кроме того, у ВЛГ-Б и ВЛГ-Д сои была обнаружена вторая сфера координации железа, состоящая из водородных связей, сформированных боковыми цепями двух консервативных остатков глутамин, двумя остатками гистидина и карбонильным кислородом остатка лизина. Роль водородных связей, образованных указанными аминокислотами, состоит в обеспечении оптимального расположения субстрата или создания его необходимой конформации [30].

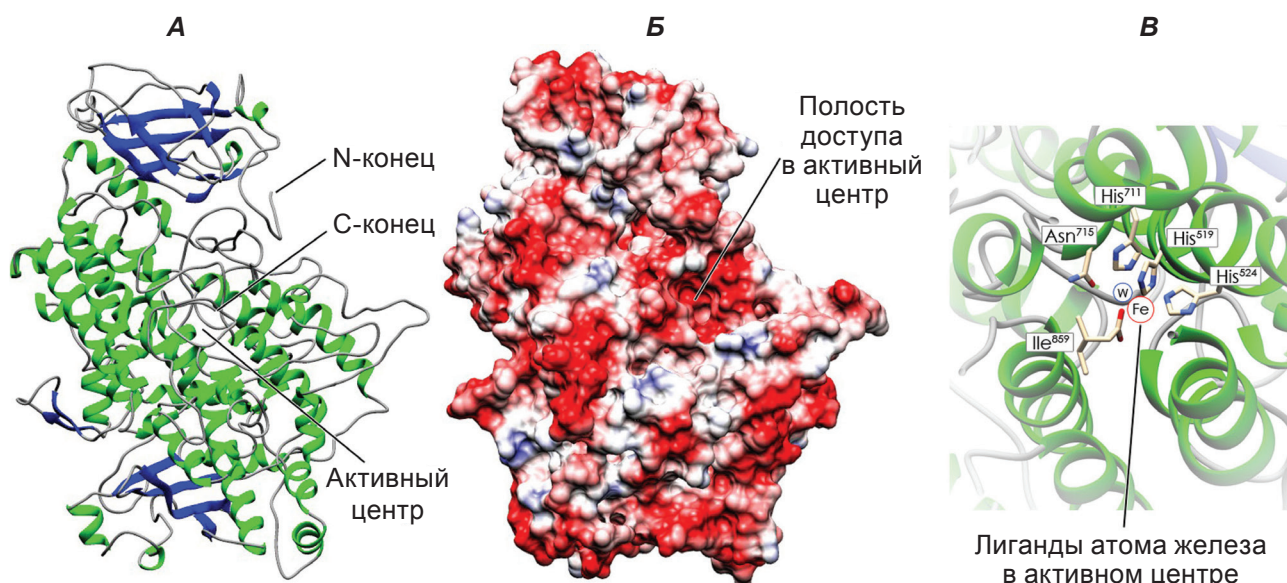


Рис. 2. Пространственная структура липоксигеназы 1 *Arabidopsis*. Показано общую модель протеина (А), значения электростатического потенциала поверхности протеина (Б), а также взаимное расположение аминокислотных остатков, выступающих в роли лигандов атома железа в активном центре протеина (В). Значение электростатического потенциала обозначается в промежутках от -5 (красный) до +5 (синий) $k_B T/e$ (T – температура; k_B – константа Больцмана; e – заряд электрона). W – молекула воды

Канал доступа кислорода в активный центр 9-ЛОГ сои локализован с противоположной стороны от сайта связывания железа и субстрата [34]. Он представляет собой узкий гидрофобный туннель, проходящий рядом с остатками гистидина (лигандами атома железа) и обеспечивает специфичность ЛОГ катализа и высокоаффинный доступ кислорода в процессе ферментативской реакции.

Полиненасыщенная жирная кислота (субстрат) попадает в активный центр фермента через полость, обогащенную остатками гидрофобных аминокислот (около 50). Вход в эту полость на поверхности соевой ЛОГ1 находится между Trh²⁵⁹ и Leu⁵⁴¹ и направлен в сторону С-терминального изолейцина и лигандов железа (гистидинов) [30, 35]. Эта объемная полость формирует два изгиба: один возле атома железа, другой – в конце полости. Применение методов точечного мутагенеза позволило показать, что молекула субстрата фиксируется в полости соевой ЛОГ1 в основном за счет электростатических связей между аминокислотной группой Arg⁷⁰⁷ и карбоксильной группой полиненасыщенной жирной кислоты, гидрофобных связей, а также π - π взаимодей-

ствий пентадиеновой системы субстрата с ароматическим кольцом Trp⁵⁰⁰. Поскольку Arg⁷⁰⁷ находится в глубине полости фермента, исследователи пришли к выводу, что полиненасыщенная жирная кислота входит в активный центр соевой ЛОГ1, начиная с карбоксильной группы «carboxylate-end first» [36]. В свою очередь, транслокация Phe²⁷⁷ и Tyr²⁸⁰, локализованных возле входа в активный центр фермента, обеспечивает доступ субстрата к каталитическому центру ЛОГ1 маслин [37].

Катализ окисления ненасыщенных кислот в составе фосфолипидов характеризуется меньшей скоростью и сродством к субстрату, однако возможность таких превращений подтверждает вовлечение липоксигеназ в регуляцию клеточных реакций [38]. Возможность окисления жирных кислот в составе липидов показана для ферментов, в активном центре которых субстрат размещается, начиная с метильной группы («methyl-end first»). Также для ЛОГ характерно окисление некоторых «неклассических» субстратов, которое может происходить в присутствии синтетических или природных активаторов. Так 9-ЛОГ из клубней картофеля в

присутствии додецилсульфата натрия катализирует окисление линолевого спирта [39] и монолинолеилглицерола *in vitro* [40].

Третичная структура ЛОГ является одним из факторов, определяющих стерео- и региоспецифичность этих энзимов. Так, энзим зеленого горошка ЛОГ_{N2} содержит две делеции на С-конце и последовательность аргинин/треонин-тирозин в сайте, обеспечивающем специфичность связывания с субстратами [41]. Различные изоэнзимы ЛОГ сои также различаются по заряду и форме аминокислотных остатков, локализованных у входа в активный центр. В частности, у ЛОГ₁ сои в этом сайте обнаружена сеть водородных связей между боковыми цепями остатков His²⁴⁸, Glu²⁵⁶ и Asn⁵³⁴ [42]. У ВЛГ-Б, ВЛГ-Д и ЛОГ₃ сои замена глутаминовой кислоты на более короткоцепочечные аланин или треонин приводит к нарушению сети гидрофобных связей и формированию более открытого входа в активный центр данных энзимов. Более того, в структуре ЛОГ₁ сои вокруг входа в активный центр обнаружены ароматические аминокислотные остатки, которые могут способствовать оптимальному положению двойной связи жирной кислоты в активном центре [30]. Предполагается, что одним из возможных механизмов, позволяющих линолевой кислоте войти в активный центр ЛОГ-1, является подвижность боковых цепей Thr²⁵⁹ и Leu⁵⁴¹, локализованных на альфа-спиралях 2 и 11 соответственно [43].

Таким образом, вышеуказанные особенности структуры липоксигеназ определяют стерео- и региоспецифичность энзима, что играет важную роль в регуляции метаболизма растений путем продукции определенного спектра оксипинов.

Механизм действия липоксигеназ

ЛОГ катализируют окисление соединений, содержащих как минимум один 1,4-*цис,цис*-пентадиеновый фрагмент. Это окисление происходит в результате редокс цикла железа (Fe²⁺/Fe³⁺) в активном центре ЛОГ. Первый этап катализа – депротонирование пентадиенильного фрагмента полиненасыщенной жирной кислоты – является этапом, лимитирующим скорость липоксигеназного катализа [44]. Отрыв водорода может происходить стереоспецифически в R- или S-положении. Большинство энзимов растений и животных осуществляет отрыв (S)-

водорода [45]. Однако у растений также были обнаружены отдельные ЛОГ, проявляющие (R)-специфичность [46]. Показано, что стереоспецифичность депротонирования двойной связи зависит от одного аминокислотного остатка в активном центре – Ala для S-липоксигеназ и Gly, в том же положении, для R-липоксигеназ [47]. Интересно, что липоксигеназный катализ может включать три последовательных процесса: реакцию диоксигенации, которая приводит к образованию гидропероксиэйкозапентаеновых кислот; последующее окисление первичного продукта до гидроксиэйкозапентаеновых кислот – гидропероксидазную реакцию [48] и A4-лейкотриенсинтазную реакцию (у животных).

Существуют две модели депротонирования субстрата липоксигеназой. Согласно свободно-радикальной теории в результате отрыва атома водорода образуется пентадиенильный радикальный интермедиат и происходит восстановление металла в активном центре энзима [49]. Последующее стерео- и региоспецифическое присоединение молекулярного кислорода приводит к образованию пероксильного радикала, восстанавливающегося до продукта реакции – гидропероксида жирной кислоты, одновременно окисляя металл до каталитически активного состояния. Альтернативная модель ЛОГ катализа исключает образование промежуточных свободных радикалов. Постулируется, что депротонирование и электрофильное присоединение металла к 1,4-пентадиеновой системе субстрата приводит к образованию интермедиата, взаимодействие которого с кислородом формирует продукт реакции [50].

Регуляция активности липоксигеназ растений

Изменение активности ЛОГ наблюдается не только на определенных этапах развития растений [3, 51], но и при действии стрессов [52], что указывает на существование тонких механизмов регуляции активности ЛОГ *in planta*. Показано, что активность ЛОГ регулируется как при помощи посттрансляционных механизмов, так и на уровне транскрипции. К примеру, значительные изменения экспрессии генов липоксигеназ огурца наблюдались при действии гормонов, стрессов, а также на разных этапах развития растения [16]. В свою очередь, механизмы аллостерической регуляции липоксигеназ были изу-

чены у животных [53] и включают действие АТР, ионов Ca^{2+} , фосфолипидов и активирующих протеинов. Структурно ЛОГ растений и животных подобны, что позволяет предположить существование схожих механизмов регуляции их активности.

ЛОГ являются растворимыми протеинами, которые находятся в строме хлоропластов, вакуолях, цитозоле, митохондриях или липидных везикулах (олеосомах). В противовес этому, субстраты ЛОГ являются плохо растворимыми в водной среде при физиологическом значении рН. Предполагается, что возможным механизмом активации растворимых ЛОГ является их факультативная Ca^{2+} -зависимая ассоциация с клеточными мембранами, где локализованы гидрофобные субстраты ЛОГ. У отдельных изоэнзимов ЛОГ сои в структуре домена PLAT был обнаружен слабо консервативный сайт связывания ионов кальция. Пространственно он локализован возле входа в активный центр энзима, где аспарагиновые и глутаминовые кислоты, в качестве возможных координаторов кальция, окружены гидрофобными остатками [30]. У кукурузы кальций опосредовал связывание ZmЛОГ1 с мембранами хлоропластов на уровне аминокислотных остатков Asp³⁸, Glu¹²⁷ и Glu²⁰¹ в домене PLAT [54]. Однако некоторые данные относительно роли PLAT домена в процессах связывания ЛОГ с мембранами противоречивы [32]. Так липоксигеназа ЛОГ1 сои, лишенная N-концевого домена, увеличивала свою каталитическую активность и сохраняла способность к ассоциации с мембранами [55].

Представляется вероятным то, что активность ЛОГ также может регулироваться путем фосфорилирования. Было показано, что остаток Ser⁶⁰⁰ в составе С-терминального домена ЛОГ2 *Arabidopsis* дефосфорилировался в условиях воздействия элиситоров (слюнных выделений) вредителей [56]. Методом масс-спектрометрического анализа пептидных фрагментов два сайта фосфорилирования Y⁸⁶⁰ и S⁸⁶⁵ были обнаружены в последовательности протеина ЛОГ4 *Arabidopsis* [57]. Сайты фосфорилирования также были обнаружены в ЛОГ2 (S⁴⁸⁸) и в ЛОГ5 (S⁴⁰²) [58]. В последовательности ЛОГ5 также был обнаружен окисленный остаток M³⁹², что может указывать на возможную роль редокс-статуса клетки в регуляции энзиматической активности ЛОГ.

Протеин–протеиновое взаимодействие также можно рассматривать в качестве механизма регуляции активности и функций обоих протеинов-партнеров. Показано, что ЛОГ2 *Arabidopsis* прямо взаимодействует с фактором инициации трансляции 4E пшеницы [59]. Было также показано взаимодействие 13-липоксигеназы ЛОГ2 ячменя с 14-3-3 адаптерными протеинами [60].

Особые регуляторные свойства могут присутствовать у так называемых гетеродимеризованных ЛОГ (fusion proteins) низших организмов [61]. Интересен также механизм необратимой самоинактивации ЛОГ гидропероксидными продуктами, которые могут окислять серосодержащие аминокислоты активного центра [19]. Данный механизм может препятствовать возникновению окислительного повреждения клетки в результате гиперактивации ЛОГ [19].

Локализация липоксигеназ в тканях растений

ЛОГ являются повсеместно распространенными протеинами растений, а общая активность ЛОГ регистрируется в большинстве их тканей и органов. Отдельные изоэнзимы ЛОГ закодированы в геномах растений широким набором генов, в основе эволюции которых лежат tandemные дупликации и полиплоидия [62]. Результаты анализов экспрессии отдельных изогенов ЛОГ показали выраженные особенности их распространения в растениях. У огурца, экспрессия ЛОГ1, ЛОГ2, ЛОГ4, ЛОГ9 и ЛОГ10 (относится к 9-ЛОГ) обнаружена практически во всех исследованных вегетативных и генеративных органах [16]. В то же время изоген ЛОГ16 огурца экспрессировался исключительно в цветках [62]. Большое количество транскриптов различных изогенов ЛОГ также обнаруживалось в плодовых оболочках и мякоти плодов огурца, что свидетельствует об их возможной роли в процессе развития плодов и биосинтезе защитных соединений для борьбы с патогенными грибами и вредителями [16]. У кукурузы, экспрессия гена ЛОГ10 (13-ЛОГ) преимущественно локализовалась в молодых и старых листьях, тогда как транскрипты ЛОГ11 обнаруживались преимущественно в початках [15]. В соответствии с этим, протеин ЛОГ10, в отличие от ЛОГ11, аккумулялировался на высоком уровне в хлоропластах мезофилла листьев [63]. Также было установлено, что экспрессия ЛОГ4 кукурузы превалирует

в меристемах побегов и корней, тогда как такая у ЛОГ5 – в тканях большинства надземных органов [64].

Среди шести генов ЛОГ *Arabidopsis*, выраженная экспрессия ЛОГ3 и ЛОГ4 была обнаружена в раненых корнях, в то время как ген ЛОГ2 экспрессировался преимущественно в листьях [65]. Несколько генов, кодирующие 13-ЛОГ *Arabidopsis* (ЛОГ2, ЛОГ3 и ЛОГ4), экспрессировались в клетках мезофилла, тогда как ЛОГ1 (9-ЛОГ) и ЛОГ6 – экспрессировались исключительно в клетках устьиц [66].

Спектр различных изоэнзимов ЛОГ был обнаружен в результате анализа протеома тканей прорастающих семян сои [67]. У картофеля результаты иммуногистологического анализа свидетельствуют о локализации 13-ЛОГ в апексах и вдоль главной оси столонов с преимущественной локализацией в клетках паренхимы [68]. В свою очередь, анализ протеинов, полученных в результате проведения SDS-PAGE, указывает на локализацию нескольких изоформ липоксигеназ в клубнях картофеля [69].

Таким образом, специфические изоэнзимы ЛОГ обладают сложным характером локализации в различных тканях и органах растений. Это может быть связано с индивидуальной биологической ролью изоэнзимов ЛОГ в качестве агентов регуляции как процессов роста и развития, так и стрессовых и гормональных реакций растений.

Роль липоксигеназ в процессах регуляции метаболизма растений

Исследования физиологической роли ЛОГ в регуляции роста и развития растений были проведены на различных уровнях у широкого спектра растений. Было установлено роль первичных продуктов ЛОГ в процессах регуляции функций устьиц [66] или повышения стойкости растений к бактериям [70]. На уровне регуляции экспрессии генов было показано, что ЛОГ2 *Arabidopsis* играет ключевую роль в биосинтезе предшественника жасмоновой кислоты [71], тогда как ЛОГ3 и ЛОГ4 обеспечивают развитие растений *Arabidopsis* по мужскому типу и принимают участие в развитии цветков [72]. Уровни транскриптов *ZmЛОГ10* кукурузы четко регулируются циркадной ритмикой с максимумом в период наиболее высокой фотосинтетической активности. Это связано с наличием в про-

торе указанного гена элемента ответа на условия освещенности [15]. У томатов изоэнзимы *TomloxA*, *TomloxB* и *TomloxE* экспрессируются в формирующихся плодах [73]. В свою очередь экспрессия изоэнзима *TomloxC* не обнаруживается до момента начала созревания и играет роль специфического изоэнзима, функционирующего на дальнейших этапах развития плода по пути биосинтеза производных жирных кислот с ароматическими свойствами [73]. Результаты исследований роли различных генов ЛОГ картофеля свидетельствуют о том, что ЛОГ играет важную роль в процессе развития клубней [74] и принимает участие в генерации летучих соединений для защиты растений, а также контроле экспрессии защитного гена ингибитора протеиназ 2 [75]. Экспрессия шести различных генов ЛОГ киви – *AdLox1*, *AdLox2*, *AdLox3*, *AdLox4*, *AdLox5* и *AdLox6* – индивидуально регулируется в процессе созревания плодов [76]. Это указывает на роль липоксигеназ в реализации ростовых реакций растений.

Экзогенные и эндогенные стимулы внешней среды, в том числе фитогормоны, также играют важную роль в регуляции уровня экспрессии генов ЛОГ (рис. 3). В качестве примера, экспрессия генов ЛОГ в плодах огурцов изменяется в ответ на действие ряда фитогормонов – жасмоновой кислоты, абсцизовой кислоты и этилена [16]. Экспрессия генов *AdLox1* и *AdLox5* киви также стимулировалась под влиянием этилена [77]. У *Arabidopsis* экспрессия *AtLOX1* и *AtLOX2* повышалась в ответ на действие жасмонатов [78], а экспрессия *ZmЛОГ11* кукурузы – при действии абсцизовой кислоты [15]. Кроме вышеуказанных гормонов, экспрессия гена ЛОГ1 перца (*CaЛОГ1*) дополнительно стимулировалась действием салициловой кислоты (СК). Более того, результаты генетических манипуляций указывают на позитивную роль *CaЛОГ1* в реакциях стойкости растений к бактериям и патогенным грибам которые опосредованы СК [79].

Функциональная ассоциация ЛОГ с реакцией клеток на действие салициловой кислоты может опосредоваться на уровне специфических транскрипционных факторов. Было показано, что протеин NPR1 (транскрипционный регулятор клеточного ответа на действие СК) способен негативно регулировать экспрессию некоторых генов ЛОГ [80]. В свою очередь фактор транскрипции WRKY62, который также во-

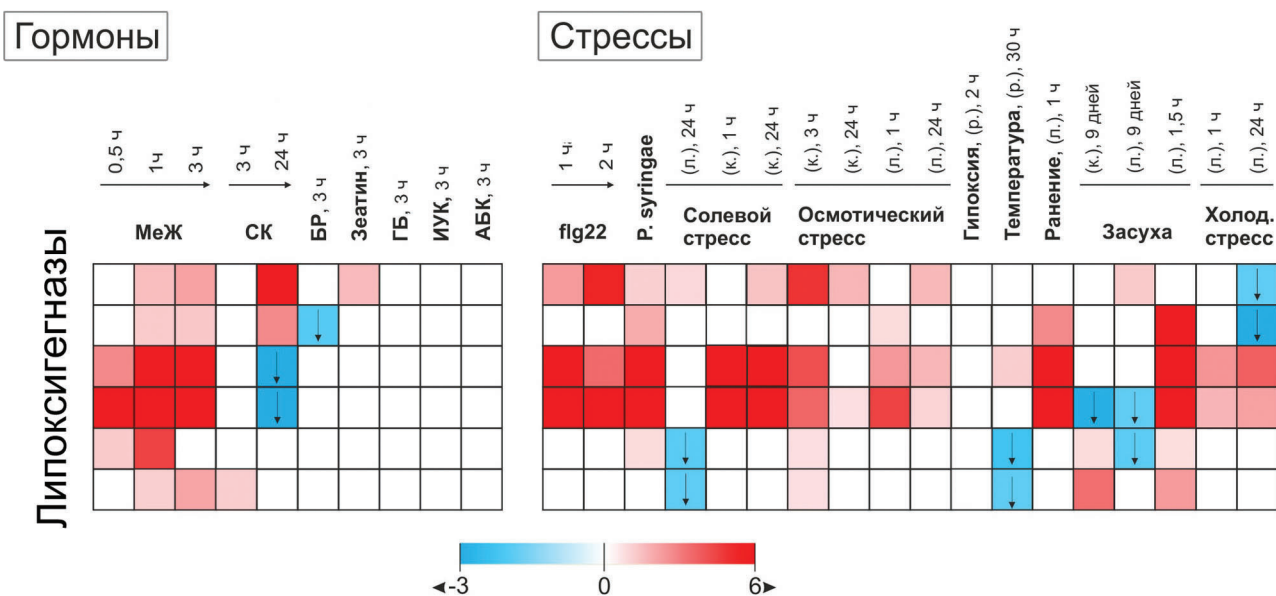


Рис. 3. Экспрессии генов липоксигеназ (ЛОГ) *Arabidopsis* в ответ на действие стрессорных факторов или обработку фитогормонами *in silico*. Цветами обозначено увеличение (красный) или снижение (синий) экспрессии генов ЛОГ. Идентификаторы GEO (gene expression omnibus) экспериментов по определению экспрессии генов в базе данных Genevestigator: AT-00120, AT-00262, AT-00520, AT-00493, AT-00387, AT-00626, AT-00637, AT-00392, AT-00406, AT-00110, AT-00113, AT-00320. МеЖ – метилжасмонат; СК – салициловая кислота; БР – брассинолид; ГБ – гибберелловая кислота; ИУК – индолилуксусная кислота; flg22 – биологически активный полипептид флагеллина; АБК – абсцизовая кислота; к – корни; л – листья

влечен в пути передачи регуляторного сигнала СК, угнетает экспрессию гена ЛОГ2 у растений *Arabidopsis* [81]. Кроме того, промотор гена ЛОГ1 хлопка (*GhЛОГ1*) содержит последовательности – элементы ответа на жасмоновую и салициловую кислоту, что играет важную роль в накоплении протеинов ЛОГ и усилении активности ЛОГ в процессе реакции гиперчувствительности на действие патогенных бактерий [82]. Важно отметить, что реакция отдельных изогенов ЛОГ на действие гормональных сигналов является в высокой степени специфичной. В этой связи было показано, что экспрессия *ZmЛОГ6* стимулировалась жасмоновой кислотой, но угнеталась действием таких гормонов, как абсцизовая и салициловая кислоты, а также этилена [27].

Экспрессия генов ЛОГ также изменяется в результате действия стрессорных факторов. У винограда, гены *VvLOXA*, *VvLOXC*, *VvLOXD* и *VvLOXO* стимулируются в ягодах в ответ на инфекцию [83], а *LoxH3* картофеля и *TomloxD* помидоров – под влиянием ранения [84, 85]. У

кукурузы ген *ZmЛОГ10* стимулируется как биотическим, так и абиотическими (ранение, холод) стрессами [15]. В свою очередь, ген *TomloxF* у томатов, который кодирует 13-ЛОГ, стимулируется непатогенной ризобактерией *Pseudomonas putida* [86]. Быстрое повышение уровня протеина ЛОГ2 в проростках риса в ответ на действие солевого стресса [87] также указывает на возможную роль ЛОГ на начальных этапах реакции клеток на действие экзогенных стимулов.

Роль липоксигеназ в сигнальных каскадах клеток растений

Регуляторная роль ЛОГ в клетках растений может опосредоваться на уровне формирования сигнальных каскадов. Четким аргументом в пользу этого является быстрое накопление продуктов ЛОГ при действии на растения брассиностероидов [88], ранения [52], а также элиситоров [26]. Изменения уровня ионов кальция в клетках, связывание с мембранами [54], адапторными протеинами [60], а также процессы фосфорилирования/дефосфорилирования [56]

могут играть непосредственную роль в быстрой модуляции активности ЛОГ в процессе клеточного сигналинга.

Изоэнзимы 13-ЛОГ *Arabidopsis* – ЛОГ2, ЛОГ3, ЛОГ4 и ЛОГ6 – обеспечивают быстрое (в течение секунд) формирование жасмоновой кислоты в раненых листьях. ЛОГ6 дополнительно обеспечивает формирование жасмонатов в клетках ксилемы отдаленных листьев [52], и играет роль в быстром формировании жасмонатов и в ответ на ранение корней [65]. Сходная кинетика быстрого окисления линоленоил-глутаминовой кислоты (элиситора насекомых) была обнаружена в листьях дикого табака. Эта реакция катализируется *NaЛОГ2* и *NaЛОГ3*, а сформированный гидропероксидный продукт играет важную роль в индукции синтеза жасмоновой кислоты и развития защитных реакций [89]. Роль *NaЛОГ2* в быстром накоплении травматаина также была установлена в листьях *Nicotiana attenuata* [90].

Гормон 24-эпибрассинолид в течение 20 минут вызывает резкое накопление 9-гидропероксилинолеата (первичного продукта ЛОГ) в листьях гороха [88]. У мутантов растений *Arabidopsis* по гену ЛОГ1 выявлено повышение чувствительности к абсцизовой кислоте [91], угнетение сигналинга этилена под влиянием продукта 9-ЛОГ [70], а также накопление жасмоновой кислоты в ответ на действие солевого стресса [51], пептида системина и олигогалактуронидов [92]. С другой стороны, действие холодного стресса вызывает резкое снижение активности ЛОГ в проростках турецкого гороха [93].

Способность ЛОГ растений окислять фосфолипиды [94] указывает на возможность взаимодействия реакций ЛОГ с другими сигнальными системами клеток растений. В частности, высокий уровень общности липидных субстратов указывает на тесные функциональные связи между ЛОГ и фосфолипазами [6]. В качестве примера было показано что активация транскрипции *AtLOX2* в ответ на действие патогенных грибов и бактерий опосредована фосфолипазой Dβ1 [78]. Кроме того, роль фосфолипидов с окисленными остатками жирных кислот (в качестве возможных продуктов активности ЛОГ) была изучена у растений *Arabidopsis* в условиях ранения и действия патогенов [95].

ЛОГ и их продукты также способны косвенно модулировать экспрессию генов защитного ответа [96], вызывать изменения конфигу-

рации и мембранного потенциала митохондрий [97]. Эти данные также указывают на возможную роль ЛОГ в процессе передачи сигналов у растений.

Сигнальная роль оксипинов в качестве продуктов каскада ЛОГ, изучена достаточно широко. Известно, что оксипины как электрофильные соединения могут формировать конъюгаты с клеточными нуклеофилами, включая тиолы и аминогруппы нуклеиновых кислот, протеинов и пептидов, что было показано для глутатиона [98] и протеинового компонента светособирательного комплекса фотосистемы II [99]. Это может играть важную роль в защитных реакциях растений – реакциях гиперчувствительности, реакции на действие элиситоров и при фотоингибировании.

Инактивация ЛОГ продуктами реакции, а также расщепление оксипинов в глиоксисомах с образованием насыщенных короткоцепочечных ацил-КоА [100] может быть одним из механизмов завершения сигнального каскада ЛОГ.

Таким образом, результаты анализа литературы свидетельствуют о вовлечении ЛОГ в регуляцию метаболизма клеток растений и указывают на ЛОГ как мишень взаимодействия регуляторного влияния как ростовых реакций, так и факторов гормональной и стрессовой природы. ЛОГ являются распространенными белками растений и закодированны в геномах растений множественными генами. Регуляторные функции ЛОГ реализуются на уровне продукции биологически активных оксипинов. Данные исследований ЛОГ растений свидетельствуют о сложности и специфичности различных механизмов регуляции их активности которые осуществляются на уровне изменений экспрессии генов, при участии посттрансляционных механизмов (включая фосфорилирование, Ca²⁺-зависимое связывание с мембранами и ковалентные модификации протеина) или путем прямых протеин–протеиновых взаимодействий. Важным для клеточной регуляции являются также субстратная специфичность изоэнзимов ЛОГ и особенности механизмов протекания ЛОГ катализа. Все эти факторы обуславливают позиционирование ЛОГ в путях реализации программ роста, морфогенеза и устойчивости растений. В свою очередь, детальный механизм быстрой активации ЛОГ, а также вовлечение продуктов ЛОГ в сигнальные системы клеток растений

остаються слабо изученными и являются предметом дальнейших исследований. Важным вопросом остается формирование номенклатуры и функционального сопоставления липоксигеназ растений и животных, а также поиск совместимых субстратов ЛОГ у растений, животных, а также у других групп организмов. Перспективным также остаются исследования взаимосвязей ген–функция в регуляторном каскаде ЛОГ и поиск новых протеиновых мишеней оксипинов.

ЛІПОКСИГЕНАЗИ І РЕГУЛЯЦІЯ МЕТАБОЛІЗМУ КЛІТИН РОСЛИН

*I. V. Pokotylo, Y. S. Kolesnikov,
M. V. Derevyanchuk, G. I. Kharitonenko,
V. S. Kravets*

Інститут біоорганічної хімії
та нафтохімії НАН України, Київ;
e-mail: kravets@bpci.kiev.ua

Ліпоксигенази є поширеними ензимами рослин, які каталізують пероксидне окислення поліненасичених жирних кислот. Ця реакція є ключовою в ензиматичному каскаді формування широкого спектра регуляторів метаболізму рослин – оксиліпінів. З дією цих біологічно активних сполук пов'язують формування захисних механізмів за умов біотичних та абіотичних стресів, а також регуляцію процесів росту, розмноження та старіння рослинних організмів. В огляді підсумовано сучасні погляди на класифікацію липоксигеназ, їхню структуру та каталітичні властивості. Розглянуто особливості регуляції активності ензиму на транскрипційному та посттрансляційному рівнях, а також місце ліпоксигеназного каталізу в сигналінгу клітин рослин.

Ключові слова: ліпоксигеназа, стресові реакції, адаптація, оксиліпіни, жасмонова кислота, ліпіди.

LIPOXYGENASES AND PLANT CELL METABOLISM REGULATION

*I. V. Pokotylo, Y. S. Kolesnikov,
M. V. Derevyanchuk, A. I. Kharitonenko,
V. S. Kravets*

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kravets@bpci.kiev.ua

Lipoxygenases are widespread plant enzymes that catalyze the peroxidation of polyunsaturated fatty acids. This reaction is pivotal in the enzymatic cascade that leads to production of numerous metabolism regulators named oxylipins. The activity of these biologically active substances is directly associated with defence reactions in conditions of biotic and abiotic stresses as well as with the regulation of plant growth, propagation and senescence. In this review the contemporary notions about lipoxygenases classification, structure and catalytic properties are summarized. The features of enzyme activity regulation by transcriptional and posttranslational mechanisms in addition to the role of lipoxygenase catalysis in plant cell signalling are discussed.

Key words: lipoxygenase, stress reactions, adaptation, oxylipins, jasmonic acid, lipids.

References

1. Wennman A., Oliw E. H. Secretion of two novel enzymes, manganese 9S-lipoxygenase and epoxy alcohol synthase, by the rice pathogen *Magnaporthe salvinii*. *J. Lipid Res.* 2013;54(3):762-775.
2. Heshof R., Jylhä S., Haarmann T., Jørgensen A., Dalsgaard T., de Graaff L. A novel class of fungal lipoxygenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014;98(3):1261-1270.
3. Chechetkin I. R., Osipova E. V., Tarasova N. B., Mukhitova F. K., Hamberg M., Gogolev Y. V., Grechkin A. N. Specificity of oxidation of linoleic acid homologs by plant lipoxygenases. *Biochemistry (Moscow)*. 2009;74(8):855-861.

4. Kim K.-R., Seo M.-H., Park J.-B., Oh D.-K. Stereospecific production of 9R-hydroxy-10E,12Z-octadecadienoic acid from linoleic acid by recombinant *Escherichia coli* cells expressing 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. SAG 25.82. *J. Mol. Catalysis. B: Enzymatic*. 2014;104:56-63.
5. Löhelaid H., Järving R., Valmsen K., Varvas K., Kreen M., Järving I., Samel N. Identification of a functional allene oxide synthase–lipoxygenase fusion protein in the soft coral *Gersemia fruticosa* suggests the generality of this pathway in octocorals. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008;1780(2):315-321.
6. Ruelland E., Kravets V., Derevyanchuk M., Martinec J., Zachowski A., Pokotylo I. Role of phospholipid signalling in plant environmental responses. *Environ. Exp. Bot.* 2014. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.08.009.
7. Iny D., Grossman S., Pinsky A. Lipoxygenase of the thermophilic bacteria *Thermoactinomyces vulgaris* - properties and study on the active site. *Int. J. Biochem.* 1993;25(9):1325-1330.
8. Liavonchanka A., Feussner I. Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *J. Plant Physiol.* 2006;163(3):348-357.
9. Mosblech A., Feussner I., Heilmann I. Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol. Biochem.* 2009;47(6):511-517.
10. Andreou A., Feussner I. Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry*. 2009;70(13-14):1504-1510.
11. Liptáková E., Huttová J., Mistrík I., Tamás L. Enhanced lipoxygenase activity is involved in the stress response but not in the harmful lipid peroxidation and cell death of short-term cadmium-treated barley root tip. *J. Plant Physiol.* 2013;170(7):646-652.
12. Chechetkin I. R., Osipova E. V., Antsygina L. L., Gogolev Y. V., Grechkin A. N. Oxidation of glycerolipids by maize 9-lipoxygenase and its A562G mutan. *Chem. Physics Lipids*. 2011;164(3):216-220.
13. Grebner W., Stingl N. E., Oenel A., Mueller M. J., Berger S. lipoxygenase6–dependent oxylin synthesis in roots is required for abiotic and biotic stress resistance of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2013;161(4):2159-2170.
14. Savchenko T., Kolla V. A., Wang C.-Q., Nasafi Z., Hicks D. R., Phadungchob B., Chehab W. E., Brandizzi F., Froehlich J., Dehesh K. functional convergence of oxylin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought. *Plant Physiol.* 2014;164(3):1151-1160.
15. Nemchenko A., Kunze S., Feussner I., Kolomiets M. Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. *J. Exp. Bot.* 2006;57(14):3767-3779.
16. Yang X.-Y., Jiang W.-J., Yu H.-J. The expression profiling of the lipoxygenase (LOX) family genes during fruit development, abiotic stress and hormonal treatments in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13(2):2481-2500.
17. Keunen E., Remans T., Opdenakker K., Jozefczak M., Gielen H., Guisez Y., Vangronsveld J., Cuypers A. A mutant of the *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase1 gene shows altered signalling and oxidative stress related responses after cadmium exposure. *Plant Physiol. Biochem.* 2013;63:272-280.
18. Schneider C., Pratt D. A., Porter N. A., Brash A. R. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem. Biol.* 2007;14(5):473-488.
19. Ivanov I., Heydeck D., Hofheinz K., Roffeis J., O'Donnell V. B., Kuhn H., Walther M. Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.* 2010;503(2):161-174.
20. Hughes R. K., Lawson D. M., Hornostaj A. R., Fairhurst S. A., Casey R. Mutagenesis and modelling of linoleate–binding to pea seed lipoxygenase. *Eur. J. Biochem.* 2001;268(4):1030-1040.
21. Hughes R. K., West S. I., Hornostaj A. R., Lawson D. M., Fairhurst S. A., Sanchez R. O., Hough P., Robinson B. H., Casey R. Probing a novel potato lipoxygenase with dual positional specificity reveals primary determinants of substrate binding and requirements for a surface hydrophobic loop and has implications for the role of lipoxygenases in tubers. *Biochem. J.* 2001;353(2):345-355.
22. Yamamoto S., Suzuki H., Ueda N. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Progress Lipid Res.* 1997;36(1):23-41.
23. Wisastra R., Ghizzoni M., Boltjes A., Haisma H. J., Dekker F. J. Anacardic acid derived salicylates are inhibitors or activators of lipoxygenases. *Bioorg. Med. Chem.* 2012;20(16):5027-5032.

24. Caballero J., Fernández M., Coll D. quantitative structure-activity relationship of organosulphur compounds as soybean 15-lipoxygenase inhibitors using CoMFA and CoMSIA. *Chem. Biol. Drug Design*. 2010;76,(6):511-517.
25. Senger T., Wichard T., Kunze S., Göbel C., Lerchl J., Pohnert G., Feussner I. A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*. *J. Biolog. Chem.* 2005;280(9):7588-7596.
26. Küpper F. C., Gaquerel E., Boneberg E.-M., Morath S., Salaün J.-P., Potin P. Early events in the perception of lipopolysaccharides in the brown alga *Laminaria digitata* include an oxidative burst and activation of fatty acid oxidation cascades. *J. Exp. Bot.* 2006;57(9):1991-1999.
27. Gao X., Stumpe M., Feussner I., Kolomiets M. A novel plastidial lipoxygenase of maize (*Zea mays*) ZmLOX6 encodes for a fatty acid hydroperoxide lyase and is uniquely regulated by phytohormones and pathogen infection. *Planta*. 2008;227(2):491-503.
28. Zoeller M., Stingl N., Krischke M., Fekete A., Waller F., Berger S., Mueller M. J. Lipid profiling of the *Arabidopsis* hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: Biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiol.* 2012;160(1):365-378.
29. Agrawal G. K., Tamogami S., Han O., Iwahashi H., Rakwal R. Rice octadecanoid pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;317(1):1-15.
30. Youn B., Sellhorn G. E., Mirchel R. J., Gaffney B. J., Grimes H. D., Kang C. Crystal structures of vegetative soybean lipoxygenase VLX-B and VLX-D, and comparisons with seed isoforms LOX-1 and LOX-3. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2006;65(4):1008-1020.
31. Hammel M., Walther M., Prassl R., Kuhn H. structural flexibility of the n-terminal β -barrel domain of 15-lipoxygenase-1 probed by small angle X-ray scattering. Functional consequences for activity regulation and membrane binding. *J. Mol. Biol.* 2004;343(4):917-929.
32. May C., Höhne M., Gnau P., Schwennesen K., Kindl H. The N-terminal β -barrel structure of lipid body lipoxygenase mediates its binding to liposomes and lipid bodies. *Eur. J. Biochem.* 2000;267(4):1100-1109.
33. Oliw E. H. Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68-69:313-323.
34. Jang S., Huon T., Kim K., Um E., Han O. regiochemical and stereochemical evidence for enzyme-initiated catalysis in dual positional specific maize lipoxygenase-1. *Org. Lett.* 2007;9(16):3113-3116.
35. Wu F., Gaffney B. J. Dynamic behavior of fatty acid spin labels within a binding site of soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry*. 2006;45(41):12510-12518.
36. Ruddat V. C., Mogul R., Chorny I., Chen C., Perrin N., Whitman S., Kenyon V., Jacobson M. P., Bernasconi C. F., Holman T. R. Tryptophan 500 and arginine 707 define product and substrate active site binding in soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry*. 2004;43(41):13063-13071.
37. Palmieri-Thiers C., Alberti J.-C., Canaan S., Brunini V., Gambotti C., Tomi F., Oliw E.H., Berti L., Maury J. Identification of putative residues involved in the accessibility of the substrate-binding site of lipoxygenase by site-directed mutagenesis studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 2011;509(1):82-89.
38. Feussner I., Wasternack C. Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. *Lipid/Fett*. 1998;100(4-5):146-152.
39. Butovich I. A., Luk'yanova S. M., Reddy C. C. Oxidation of linoleyl alcohol by potato tuber lipoxygenase: kinetics and positional, stereo, and geometrical (cis, trans) specificity of the reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000;378(1):65-77.
40. Butovich I. A., Reddy C. C. Enzym-catalyzed and enzyme-triggered pathways in dioxygenation of 1-monolinoleoyl-rac-glycerol by potato tuber lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*. 2001;1546(2):379-398.
41. Veronico P., Giannino D., Melillo M. T., Leone A., Reyes A., Kennedy M. W., Bleve-Zacheo T. A Novel lipoxygenase in pea roots. Its function in wounding and biotic stress. *Plant Physiol.* 2006;141(3):1045-1055.
42. Skrzypczak-Jankun E., Bross R. A., Carroll R. T., Dunham W. R., Funk M. O. Three-dimensional structure of a purple lipoxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* 2001;123(44):10814-10820.
43. Minor W., Steczko J., Stec B., Otwinowski Z., Bolin J. T., Walter R., Axelrod B. Crystal

- structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochemistry*. 1996;35(33):10687-10701.
44. Knapp M. J., Klinman J. P. Kinetic studies of oxygen reactivity in soybean lipoxygenase-1. *Biochem*. 2003;42(39):11466-11475.
 45. Brash A. R. Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem*. 1999;274(34):23679-23682.
 46. Hamberg M., Gerwick W. H. Biosynthesis of vicinal dihydroxy fatty acids in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: identification of a sodium-dependent 12-lipoxygenase and a hydroperoxide isomerase. *Arch. Biochem. Biophys*. 1993;305(1):115-122.
 47. Coffa G., Brash A. R. A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: Stereocontrol is linked to the position of oxygenation. *PNAS*. 2004;101(44):15579-15584.
 48. Kühn H., Wiesner R., Rathmann J., Schewe T. Formation of ketodienoic fatty acids by the pure pea lipoxygenase-1. *Eicosanoids*. 1991;4(1):9-14.
 49. Lehnert N., Solomon E. Density-functional investigation on the mechanism of H-atom abstraction by lipoxygenase. *J. Biol. Inorg. Chem*. 2003;8(3):294-305.
 50. Jones G. D., Russell L., Darley-Usmar V. M., Stone D., Wilson M. T. role of lipid hydroperoxides in the activation of 15-lipoxygenase. *Biochemistry*. 1996;35(22):7197-7203.
 51. Ghanem M. E., Ghars M. A., Frettinger P., Pérez-Alfocea F., Lutts S., Wathélet J.-P., du Jardin P., Fauconnier M.-L. Organ-dependent oxylipin signature in leaves and roots of salinized tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *J. Plant Physiol*. 2012;169(11):1090-1101.
 52. Chauvin A., Caldelari D., Wolfender J. L., Farmer E. E. Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *New Phytologist*. 2013;197(2):566-575.
 53. Rådmark O., Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *J. Lipid Res*. 2009;50:S40-S45.
 54. Cho K., Han Y., Woo J. C., Baudisch B., Klösgen R. B., Oh S., Han J., Han O. Cellular localization of dual positional specific maize lipoxygenase-1 in transgenic rice and calcium-mediated membrane association. *Plant Sci*. 2011;181(3):242-248.
 55. Maccarrone M., Salucci M. L., van Zadelhoff G., Malatesta F., Veldink G., Vliegenthart J. F. G., Finazzi-Agrò A. Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability. *Biochemistry*. 2001;40(23):6819-6827.
 56. Thivierge K., Prado A., Driscoll B. T., Bonneil É., Thibault P., Bede J. C. Caterpillar- and salivary-specific modification of plant proteins. *J. Proteome Res*. 2010;9(11):5887-5895.
 57. Wang X., Bian Y., Cheng K., Gu L.-F., Ye M., Zou H., Sun S. S.-M., He J.-X. A large-scale protein phosphorylation analysis reveals novel phosphorylation motifs and phosphoregulatory networks in *Arabidopsis*. *J. Proteomics*. 2013;78:486-498.
 58. Engelsberger W. R., Schulze W. X. Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved *Arabidopsis* seedlings. *Plant J*. 2012;69(6):978-995.
 59. Freire M., Tourneur C., Granier F., Camonis J., El Amrani A., Browning K., Robaglia C. Plant lipoxygenase 2 is a translation initiation factor-4E-binding protein. *Plant Mol. Biol*. 2000;44(2):129-140.
 60. Holtman W. L., Roberts M. R., Oppedijk B.J., Testerink C., van Zeijl M. J., Wang M. 14-3-3 proteins interact with a 13-lipoxygenase, but not with a 9-lipoxygenase. *FEBS Letters*. 2000;474(1):48-52.
 61. Fuller M. A., Weichert H., Fischer A. M., Feussner I., Grimes H. D. Activity of soybean lipoxygenase isoforms against esterified fatty acids indicates functional specificity. *Arch. Biochem. Biophys*. 2001;388(1):146-154.
 62. Liu S. Q., Liu L. X., Jiang L. W. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of the lipoxygenase gene family in cucumber. *Genet. Mol. Res*. 2011;10(4):2613-2636.
 63. Majeran W., Cai Y., Sun Q., van Wijk K. J. Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. *Plant Cell Online*. 2005;17(11):3111-3140.
 64. Park Y.-S., Kunze S., Ni X., Feussner I., Kolomiets M. Comparative molecular and biochemical characterization of segmentally duplicated 9-lipoxygenase genes ZmLOX4 and

- ZmLOX5 of maize. *Planta*. 2010;231(6):1425-1437.
65. Grebner W., Stingl N., Oenel A., Mueller M.J., Berger S. Lipoxygenase 6-dependent oxylipin synthesis in roots is required for abiotic and biotic stress resistance of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 2013;161(4):2159-2170.
66. Montillet J.-L., Leonhardt N., Mondy S., Tranchimand S., Rumeau D., Boudsocq M., Garcia A. V., Douki T., Bigeard J., Laurière C., Chevalier A., Castresana C., Hirt H. An abscisic acid-independent oxylipin pathway controls stomatal closure and immune defense in *Arabidopsis*. *PLoS Biol*. 2013;11(3):e1001513.
67. Han C., Yin X., He D., Yang P. Analysis of proteome profile in germinating soybean seed, and its comparison with rice showing the styles of reserves mobilization in different crops. *PLoS One*. 2013;8(2):e56947.
68. Cenzano A., Abdala G., Hause B. Cytochemical immuno-localization of allene oxide cyclase, a jasmonic acid biosynthetic enzyme, in developing potato stolons. *J. Plant Physiol*. 2007;164(11):1449-1456.
69. Jørgensen M., Bauw G., Welinder K. G. Molecular properties and activities of tuber proteins from starch potato cv. Kuras. *J. Agric. Food Chem*. 2006;54(25):9389-9397.
70. López M. A., Vicente J., Kulasekaran S., Vellosillo T., Martínez M., Irigoyen M. L., Cascón T., Bannenberg G., Hamberg M., Castresana C. Antagonistic role of 9-lipoxygenase-derived oxylipins and ethylene in the control of oxidative stress, lipid peroxidation and plant defence. *Plant J*. 2011;67(3):447-458.
71. Bell E., Creelman R. A., Mullet J. E. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *PNAS*. 1995;92(19):8675-8679.
72. Caldelari D., Wang G., Farmer E., Dong X. *Arabidopsis* lox3 lox4 double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest. *Plant Mol. Biol*. 2011;75(1-2):25-33.
73. Chen G., Hackett R., Walker D., Taylor A., Lin Z., Grierson D. Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiol*. 2004;136(1):2641-2651.
74. Kolomiets M. V., Hannapel D. J., Chen H., Tymeson M., Gladon R. J. Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell Online*. 2001;13(3):613-626.
75. León J., Royo J., Vancanneyt G., Sanz C., Silkowski H., Griffiths G., Sánchez-Serrano J. J. Lipoxygenase H1 gene silencing reveals a specific role in supplying fatty acid hydroperoxides for aliphatic aldehyde production. *J. Biol. Chem*. 2002;277(1):416-423.
76. Zhang B., Chen K., Bowen J., Allan A., Espley R., Karunaitnam S., Ferguson I. Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit. *J. Exp. Bot*. 2006;57(14):3825-3836.
77. Zhang B., Yin X. R., Li X., Yang S. L., Ferguson I. B., Chen K. S. Lipoxygenase gene expression in ripening kiwifruit in relation to ethylene and aroma production. *J. Agric. Food Chem*. 2009;57(7):2875-2881.
78. Zhao J., Devaiah S.P., Wang C., Li M., Welti R., Wang X. Arabidopsis phospholipase D β 1 modulates defense responses to bacterial and fungal pathogens. *New Phytol*. 2013;199(1):228-240.
79. Hwang I. S., Hwang B. K. The pepper 9-lipoxygenase gene CaLOX1 functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. *Plant Physiol*. 2010;152(2):948-967.
80. Li R., Afsheen S., Xin Z., Han X., Lou Y. OsNPR1 negatively regulates herbivore-induced JA and ethylene signaling and plant resistance to a chewing herbivore in rice. *Physiol. Plantarum*. 2013;147(3):340-351.
81. Mao P., Duan M., Wei C., Li Y. WRKY62 transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression. *Plant Cell Physiol*. 2007;48(6):833-842.
82. Marmey P., Jalloul A., Alhambia M., Assigbetse K., Cacas J. L., Voloudakis A. E., Champion A., Clerivet A., Montillet J.-L., Nicole M. The 9-lipoxygenase GhLOX1 gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiol. Biochem*. 2007;45(8):596-606.
83. Podolyan A., White J., Jordan B., Winefield C. Identification of the lipoxygenase gene family from *Vitis vinifera* and biochemical characterisation of two 13-lipoxygenases expressed in grape berries of Sauvignon Blanc. *Funct. Plant Biol*. 2010;37(8):767-784.

84. Royo J., Vancanneyt G., Pérez A.G., Sanz C., Störmann K., Rosahl S., Sánchez-Serrano J. J. Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J. Biol. Chem.* 1996;271(35):21012-21019.
85. Heitz T., Bergey D.R., Ryan C.A. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 1997;114(3):1085-1093.
86. Mariutto M., Duby F., Adam A., Bureau C., Fauconnier M.-L., Ongena M., Thonart P., Dommes J. The elicitation of a systemic resistance by *Pseudomonas putida* BTP1 in tomato involves the stimulation of two lipoxygenase isoforms. *BMC Plant Biol.* 2011;11(1):1-15.
87. Liu C.-W., Chang T.-S., Hsu Y.-K., Wang A. Z., Yen H.-C., Wu Y.-P., Wang C.-S., Lai C.-C. Comparative proteomic analysis of early salt stress responsive proteins in roots and leaves of rice. *Proteomics.* 2014;14(15):1759-1775.
88. Fedina E. O., Karimova F. G., Chechetkin I. R., Tarchevsky I. A., Khripach V. A. Contribution of lipoxygenase metabolism to the brassinosteroid signaling pathway. *Doklady Biochem. Biophys.* 2004;395(1-6):80-83.
89. VanDoorn A., Kallenbach M., Borquez A., Baldwin I., Bonaventure G. Rapid modification of the insect elicitor N-linolenoyl-glutamate via a lipoxygenase-mediated mechanism on *Nicotiana attenuata* leaves. *BMC Plant Biol.* 2010;10(1):164.
90. Kallenbach M., Gilardoni P. A., Allmann S., Baldwin I. T., Bonaventure G. C12 derivatives of the hydroperoxide lyase pathway are produced by product recycling through lipoxygenase-2 in *Nicotiana attenuata* leaves. *New Phytol.* 2011;191(4):1054-1068.
91. Vicente J., Cascón T., Vicedo B., García-Agustín P., Hamberg M., Castresana C. Role of 9-lipoxygenase and α -dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense. *Mol. Plant.* 2012;5(4):914-928.
92. Li L., Li C., Lee G. I., Howe G. A. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *PNAS.* 2002;99(9):6416-6421.
93. Kazemi-Shahandashti S.-S., Maali-Amiri R., Zeinali H., Khazaei M., Talei A., Ramezanpour S.-S. Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. *J. Plant Physiol.* 2014;171(13):1106-1116.
94. O'Connor Butler E. S., Mazerik J., Cruff J., Sherwani S., Weis B., Marsh C., Raghavanmenon A., Uppu R., Schmid H. O., Parinandi N. Free radicals and antioxidant protocols. New York: Humana Press, 2010; 387-401 p.
95. Ramirez A., Yang T., Bouwmeester H., Jongsma M. A Trichome-specific linoleate lipoxygenase expressed during pyrethrin biosynthesis in *Pyrethrum*. *Lipids.* 2013;48(10):1005-1015.
96. Cho K., Kim Y. C., Woo J. C., Rakwal R., Agrawal G. K., Yoeun S., Han O. Transgenic expression of dual positional maize lipoxygenase-1 leads to the regulation of defense-related signaling molecules and activation of the antioxidative enzyme system in rice. *Plant Sci.* 2012;185-186:238-245.
97. Vellosillo T., Aguilera V., Marcos R., Bartsch M., Vicente J., Cascón T., Hamberg M., Castresana C. Defense activated by 9-Lipoxygenase-derived oxylipins requires specific mitochondrial proteins. *Plant Physiol.* 2013;161(2):617-627.
98. Davoine C., Falletti O., Douki T., Iacazio G., Ennar N., Montillet J.-L., Triantaphylidès C. Adducts of oxylipin electrophiles to glutathione reflect a 13 specificity of the downstream lipoxygenase pathway in the tobacco hypersensitive response. *Plant Physiol.* 2006;140(4):1484-1493.
99. Chan T., Shimizu Y., Pospíšil P., Nijo N., Fujiwara A., Taninaka Y., Ishikawa T., Hori H., Nanba D., Imai A., Morita N., Yoshioka-Nishimura M., Izumi Y., Yamamoto Y., Kobayashi H., Mizusawa N., Wada H., Yamamoto Y. Quality Control of photosystem II: Lipid peroxidation accelerates photoinhibition under excessive illumination. *PLoS ONE.* 2012;7(12):e52100.
100. Meyer D., Herrfurth C., Brodhun F. and Feussner I. Degradation of lipoxygenase-derived oxylipins by glyoxysomes from sunflower and cucumber cotyledons. *BMC Plant Biol.* 2013;13:177.

Получено 16.10.2014