

Fyziologické aspekty lipoxygenázy v signálních systémech rastlín

Časť I. Oktadekánová cesta

Physiological aspects of lipoxygenase in plant signaling systems Part I. Octadecanoid pathway

Renáta Kollárová • Marek Obložinský • Veronika Kováčiková

Došlo 5. februára 2013 / Prijato 20. februára 2013

Súhrn

Lipoxygenázy (LOX, *linoleate: oxygen oxidoreductases*, EC 1.13.11.12) tvoria rodinu dioxygenáz, ktoré obsahujú nehémové, nesulfidové železo. Vyskytujú sa nielen u živočíchov, ale aj u rastlín. Ich prítomnosť bola dokázaná aj v koraloch, machu, hubách a v niektorých baktériách. LOX katalyzujú polohovo- a stereo- špecifickú inzerciu molekuly kyslíka do molekuly nenasýtenej mastnej kyseliny s *cis,cis*-1,4-pentadiénovým systémom za vzniku príslušných hydroperoxidových derivátov. Tento krok dioxygenácie vyúsťuje do kaskády reakcií, ktoré sa označujú ako lipoxygenázová (oktadekánová) cesta. Koncové produkty tejto cesty (nazývané oxylipíny) zohrávajú u rastlín významnú úlohu ako signálne molekuly pri hojení rán a pri obranných procesoch. V živočíšnych organizmoch sú zase zapojené do procesov zápalových reakcií, astmy a ochorení srdca.

Kľúčové slová: signálny systém • lipoxygenáza • oktadekánová cesta • oxylipíny

Summary

Lipoxygenases (LOX, *linoleate: oxygen oxidoreductases*, EC 1.13.11.12) constitute a family of dioxygenases, which contain non-heme, non-sulfide iron. These enzymes occur not only in animals, but in plants as well. They have been detected in coral, moss, fungi and also in some bacteria. LOXs catalyse the regiospecific and stereospecific insertion of molecular oxygen into the molecule of polyunsaturated fatty acid with the *cis,cis*-1,4-pentadiene system to yield the corresponding hydroperoxides. This step of dioxygenation leads to a cascade of reactions called the lipoxygenase

(octadecanoid) pathway. The products of this pathway (called oxylipins) play an important role as signal molecules in wound healing and defence processes in plants. In animals they are involved in inflammation, asthma and heart diseases.

Keywords: signal system • lipoxygenase • octadecanoid pathway • oxylipins

Úvod – enzýmy signálnych systémov rastlín

Bunky všetkých živých organizmov neustále prijímajú signály z vonkajšieho prostredia. Za účelom rozpoznania a translácie (prekladu) týchto informácií do primeranej odpovede, musí bunka neustále monitorovať svoje vonkajšie prostredie.

Vo všeobecnosti sú externé signály zachytené na povrchu bunky pomocou proteínových receptorov, ktoré transdukujú informácie cez plazmatickú membránu do vnútra bunky a následne aktivujú špecifický sled reakcií. Transmembránová signalizácia môže prebiehať cez iónové kanály, receptorové kinázy alebo receptormi aktivované efektory, ktoré sa zúčastňujú na tvorbe intracelulárnych sekundárnych poslov. V bunke títo poslovia posúvajú informáciu na ďalšie ciele, ktorými môžu byť kinázy na začiatku signálnej kaskády. Kaskáda potom môže aktivovať transkripčné faktory a syntézu proteínov. Výsledkom je odpoveď bunky na vonkajšie podnety, ktorá môže zahŕňať diferenciáciu bunky alebo aktiváciu transkripcie génov¹⁾.

Všeobecná charakteristika

Fosfolipidy sú zložené lipidy prítomné vo všetkých živých organizmoch. Spolu s glykolipidmi sú dôležitým stavebným prvkom biologických membrán eukaryotov²⁾. Membránová dvojvrstva je tvorená prevažne štruktúrnymi lipidmi, ako sú fosfatidylcholín alebo fosfatidyletanolamín. Okrem nich sú v membráne prítomné aj prechodne, prípadne v menšej miere sa vyskytujúce lipidy s regulačnými funkciami odvodené od fosfatidylinozitolu – fosfoinozítidy³⁾.

Súčasná vedecká poznatky poukazujú nielen na stavebnú funkciu fosfolipidov, ale čoraz intenzívnejšie sa

PharmDr. Renáta Kollárová (✉) • M. Obložinský • V. Kováčiková
Univerzity Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra
bunkovej a molekulárnej biológie liečiv
Kalinčiaková 8, 832 32 Bratislava, Slovenská republika
e-mail: kollarova@fpharm.uniba.sk

vyzdvihuje ich úloha v komunikácii bunky s vonkajším prostredím, a v regulácii signálnych dráh. Dôležité signálne molekuly vznikajú modifikáciou štruktúry fosfolipidu na rôznych miestach aktivitou lipidových kináz alebo fosfolipáz, ako pohotovú odpoveď organizmu na rozličné bunkové stimuly – elicitory biotického a abiotického pôvodu (obr. 1)⁴⁾.

Fosfolipázy sú všadeprítomné enzýmy, ktoré katalyzujú hydrolytické štiepenie diacylglycerolfosfolipidov. Tieto sú derivátmi *sn*-glycerol-3-fosfátu. Podľa typu esterovej väzby, ktorú fosfolipázy štiepia vo fosfolipidoch ich klasifikujeme do niekoľkých skupín. Medzi acylhydrolázy, ktoré uvoľňujú acylový reťazec v polohe *sn*-1 resp. *sn*-2, zaraďujeme **fosfolipázu A₁** (*sn*-1, PLA₁, EC 3.1.1.32) resp. **fosfolipázu A₂** (*sn*-2, PLA₂, EC 3.1.1.4). Enzýmy schopné uvoľniť obe acylové skupiny sa nazývajú **fosfolipázy B** (PLB, EC 3.1.1.5). Medzi fosfodiesterázy patrí **fosfolipáza C** (PLC, EC 3.1.4.3), ktorá štiepi fosfodiesterovú väzbu fosfolipidu za vzniku diacylglycerolu a fosforylovaného alkoholu, a **fosfolipáza D** (PLD, EC 3.1.4.4), ktorá uvoľňuje kyselinu fosfatidovú a alkohol⁵⁾.

Fosforyláciou inozitolového kruhu fosfatidylinozitolu (PI) vznikajú fosfoinozitidy⁴⁾. Reakcia je katalyzovaná **fosfatidylinozitol-kinázami** (PI-kinázy: PI-3-kináza, EC 2.7.1.137; PI-4-kináza 2.7.1.67), pričom fosfatidylinozitol-monofosfáty (PI-3-P, PI-4-P) vznikajúce ich aktivitou slúžia ako substráty pre ďalšiu fosforyláciu **fosfatidylinozitol-monofosfát-kinázami** (PIP-kinázy, EC 2.7.1.68)³⁾.

Na rozdiel od dobre preskúmanej fosfolipidovej signalizácie v živočíšnych systémoch, mechanizmy, ktorými rastliny transdukujú extracelulárne stimuly do bunkovej odpovede sú oveľa menej objasnené. Vzhľadom na všeobecné princípy signalizácie však nie je prekvapujúce, že väčšina živočíšnych mechanizmov je prítomná aj v rastlinách, hoci dôkazy o nich sú často roztrieštené a neúplné.

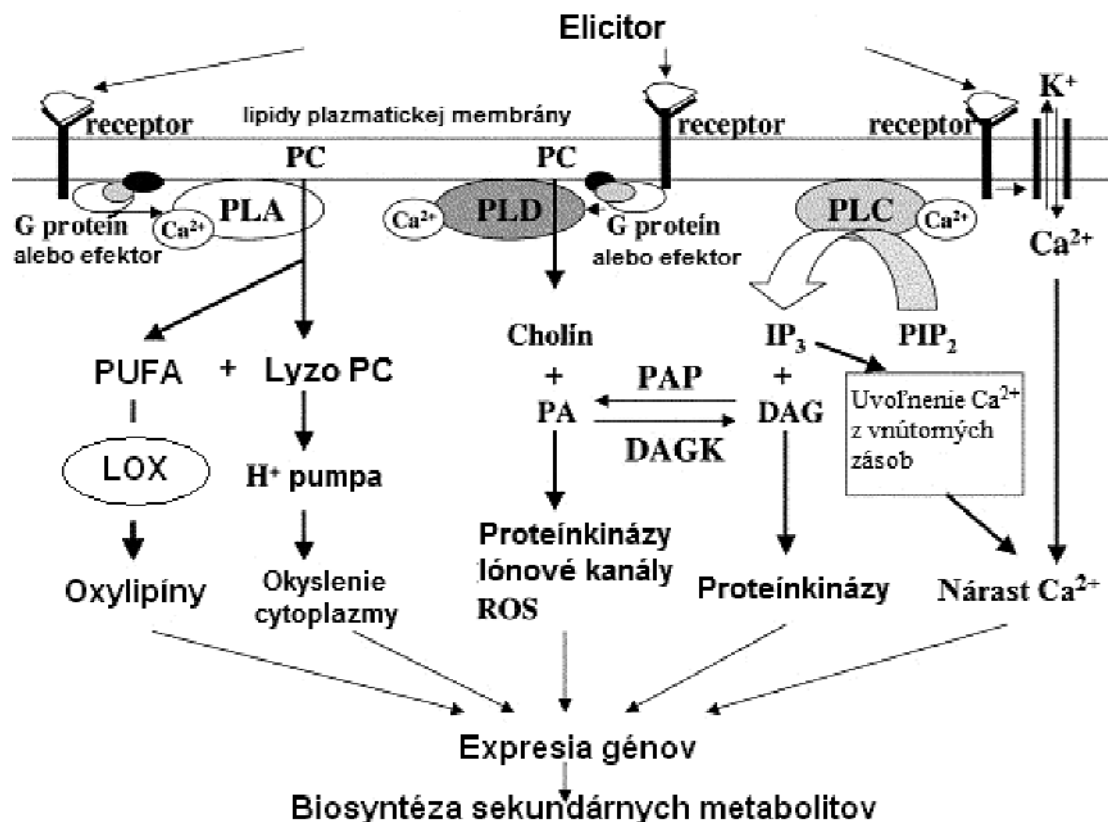
PLC v živočíšnych bunkách „premieňa“ signály z tyrozínkinázového receptora a receptora spriahnutého s G-proteínom na konkrétny efekt v raste, proliferácii, metabolizme, sekrécii a kontrakcii.

PLD a kyselina fosfatidová sú u živočíchov zapojené napr. do regulácie proteínkináz, PIP-5-kinázy, GTP-viažuceho proteínu, mitogenézy, sekrécie, zhromažďovania aktínu a oxidatívneho vzplanutia v neutrofiloch.

Väčšina komponentov PLC- a PLD-signalizácie má štruktúrne alebo funkčné ekvivalenty aj v rastlinách. PLD sa tak zúčastňuje mnohých fyziologických procesov, ako je starnutie, dozrievanie plodov, stresové odpovede, zranenie, alebo napadnutie rastliny patogénmi¹⁾.

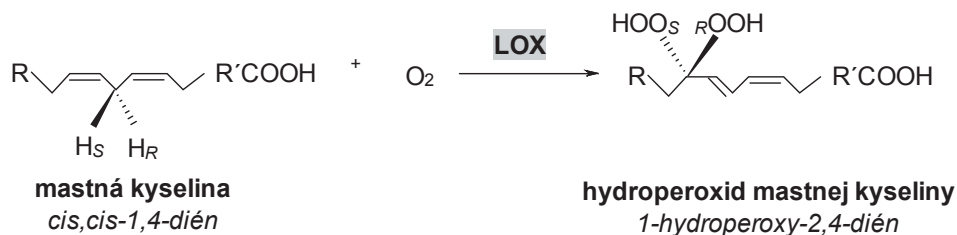
PLA₂ katalyzuje hydrolyzu esterovej väzby v *sn*-2 pozícii glycerofosfolipidu, čo vedie k tvorbe lyzofosfolipidu a voľnej mastnej kyseliny (MK)⁶⁾.

V živočíšnych organizmoch je PLA₂ aktivovaná v rôznych typoch buniek v rámci ich odpovede na pôsobenie hormónov a rastových faktorov. Kyselina arachidónová (AA) ako najčastejšie uvoľňovaná MK je oxidatívne transformovaná na bioaktívne molekuly, tzv.



Obr. 1. (Fosfo)lipidová signalizácia v rastlinách

(DAG – diacylglycerol, DAGK – diacylglycerolkináza, IP₃ – inozitol-1,4,5-trifosfát, LOX – lipoxygenáza, PA – kyselina fosfatidová, PAP – fosfatáza kyseliny fosfatidovej, PC – fosfatidylcholín, PIP₂ – fosfatidylinozitol-4,5-difosfát, PLA – fosfolipáza A, PLC – fosfolipáza C, PLD – fosfolipáza D, PUFA – polynenasýtené mastné kyseliny, ROS – „reactive oxygen species“= reaktívne formy kyseliny) (upravené podľa ³⁸⁾)



Obr. 2. Hydroperoxidácia (1Z,4Z)-penta-1,4-diénovej štruktúrálnej jednotky v alifatickom reťazci MK (R,R' – alifatický zvyšok, _{SR} – stereošpecifické označenie)

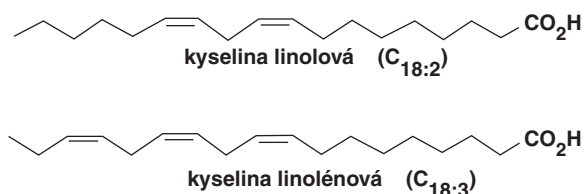
eikozanoidy. Eikozanoidy – prostaglandíny a leukotriény vznikajúce aktivitou cyklooxygenázy, resp. lipoxygenázy sú zapojené do zápalových a alergických reakcií v organizme⁷⁾. Lyzofosfolipidy môžu slúžiť ako prekursor pre faktor aktivujúci trombocyty (platelet-activating factor, PAF) – fosfoglycerid, ktorý nemá len patologický význam, ale je dôležitý aj pre fyziologické stavy organizmu, ako je reprodukcia a regulácia krvného tlaku¹⁾.

Aktivita PLA₂ bola preukázaná aj v bunkových procesoch prebiehajúcich v rastlinách, konkrétne pri raste a vývoji rastliny, stresových odpovediach a v obrannej signalizácii⁸⁾. PLA₂ uvoľňuje v rastlinách kyselinu linolovú (LA) (C18:2) a kyselinu linolénovú (LeA) (C18:3), ktoré sú enzýmami lipidového metabolizmu v rámci lipoxygenázovej cesty konvertované na rastové regulátory, antimikrobiálne a antifungálne zlúčeniny, aromatické látky a signálne molekuly⁹⁾.

Lipoxygenázy (LOX, *linoleate: oxygen oxidoreductase*, EC 1.13.11.12) tvoria rodinu dioxygenáz, ktoré obsahujú v aktívnom mieste nehémové a nesulfidové železo. Tieto enzýmy katalyzujú polohovošpecifickú a stereošpecifickú inzerciu molekulového kyslíka do polynenasýtenej mastnej kyseliny (PUFA) s (1Z,4Z)-pentadiénovým systémom za vzniku príslušných hydroperoxidových derivátov (obr. 2)¹⁰⁾.

Postavenie LOX v oktadekánovej signálnej ceste

Metabolická cesta PUFA prebiehajúca cez LOX katalyzovanú reakciu ako aj následné reakcie v tejto ceste sa označuje ako oxylipínová cesta: v rastlinách ide o oktadekánovú cestu, v živočíšnych systémoch o eikozanoidnú cestu¹¹⁾. Lipoxygenáza je v rastlinách významným enzýmom, ktorý má dôležité postavenie v transformácii PUFA. Pre ústredné postavenie LOX na začiatku oktadekánovej (lipoxygenázovej) cesty predstavuje tento enzým dôležité miesto regulácie a ovplyvňuje tvorbu produktov tejto cesty¹²⁾. K najvýznamnejším substrátom LOX v rastlinách patrí LA (C18:2) a LeA (C18:3) (obr. 3), ktoré sú hlavnými PUFA rastlinných



Obr. 3. Substráty rastlinnej LOX: kyselina linolová a kyselina linolénová

membránových fosfolipidov⁹⁾. Dlhé obdobie sa PUFA považovali za jediné substráty LOX, ktoré podliehali dioxygenačným reakciám. Avšak štúdie potvrdili, že niektoré LOX sú schopné katalyzovať oxygenáciu esterifikovaných MK, ako sú fosfolipidy a galaktolipidy¹³⁾, triacylglyceroly¹⁴⁾ alebo estery cholesterolu¹⁵⁾.

Snaha objasniť signalizačný proces u rastlín vychádza z predpokladanej podobnosti signalizačných procesov živočíšnych a rastlinných buniek. To už viedlo k identifikácii niektorých rastlinných génov so značnou sekvenčnou a funkčnou homológiou s podobnými génmi živočíšnych buniek. Tento prístup viedol k zisteniu, že rastlinné bunky často používajú veľmi podobné signalizačné prvky ako živočíšne bunky.

G-proteín

Na základe poznatkov zo živočíšnych systémov je známe, že mnohé receptory na povrchu bunky odpovedajú na väzbu agonistu aktiváciou G-proteínu. Aktivácia G-proteínu zahŕňa výmenu guanozindifosfátu (GDP) za guanozíntrifosfát (GTP) na α -podjednotke a rozlíšenie od $\beta\gamma$ -diméru. Obe podjednotky (α - aj $\beta\gamma$ -) môžu následne modulovať rôzne cieľové efekty zahŕňajúc PLC, PLD, PLA₂, PI-3-kinázy, adenylcyklázu a iónové kanály, ktoré sú závislé od špecifickej podjednotky. Aktivácia G-proteínu poskytuje dôležitý mechanizmus transdukcie informácií do bunky a ich nasmerovanie do špecifických signálnych dráh¹⁾.

Napriek tomu, že sa G-proteíny vyskytujú v rastlinách aj u živočíchov, existujú medzi nimi značné rozdiely. Štúdie zamerané na rastlinné G-proteíny z *Arabidopsis thaliana* a ryže zistili, že rastlinné G-proteíny majú len jednu α -, jednu β -podjednotku a dve γ -podjednotky. V prípade sóje sa identifikovali štyri α -, štyri β -podjednotky a dve γ -podjednotky. Na druhej strane, u živočíšnych proteínov je každá podjednotka reprezentovaná viacnásobnými proteínmi, napr. u ľudí sa vyskytuje 23 α -, 5 β -podjednotiek a 12 γ -podjednotiek¹⁶⁾.

Proteínkinázy a fosfoproteínfosfatázy

V membránovej dvojvrstve sú prítomné aj lipidy s dôležitými regulačnými funkciami, a to fosfoinozitidy. Namiesto štruktúrálnych úloh sú zapojené do rôznych bunkových procesov, ako je kontrola membránových komunikačných sietí, remodelácia cytoskeletu, transport iónov a signálna transdukcia³⁾.

Fosfoinozitidy môžu byť fosforylované na fosfatidylinozitol-4-fosfát (PI-4-P) aktivitou **PI-4-kinázy** (EC 2.7.1.67) alebo na fosfatidylinozitol-3-fosfát (PI-3-P) prostredníctvom **PI-3-kinázy** (EC 2.7.1.137)¹⁷⁾. Prítom-

nosť enzýmu, ktorý by katalyzoval syntézu PI-5-P, sa zatiaľ v rastlinách nepotvrdila, takže PI-5-P pravdepodobne vzniká defosforyláciou PI-bisfosfátov⁴⁾. PI-4-P aj PI-3-P slúžia ako substráty pre ďalšiu fosforyláciu rôznymi typmi *fosfatidylinozitol-monofosfát-kinázy* (PIP-kináza, EC 2.7.1.68)¹⁷⁾.

Vnútro bunkové signálne molekuly

Ca²⁺ je významným sekundárnym poslom v rastlinných bunkách a mnoho enzýmov, ktoré sú regulované práve prostredníctvom Ca²⁺, sú zapojené do rozličných procesov v rastlinnej bunke. Intracelulárna koncentrácia Ca²⁺ sa zvyšuje pôsobením červeného svetla, fungálneho elicitora, fytohormónov a chladom¹⁾. V rastlinách boli identifikované aj Ca²⁺-kanály, ktoré sú zodpovedné za rýchly a prechodný vzostup hladiny Ca²⁺ v intracelulárnom priestore. Za spätné vyrovnanie koncentrácie a návrat intracelulárnej hladiny Ca²⁺ k fyziologickým hodnotám sú zodpovedné ATP-zavislé Ca²⁺-pumpy a H⁺/Ca²⁺-antiportné systémy¹⁸⁾.

Fyziologická úloha LOX v rastlinných systémoch

Lipoxygenázová cesta

V rastlinách sú v lipoxygenázovej (oktadekánovej) ceste PUFA metabolizované na hydroperoxidové deriváty za katalytického pôsobenia LOX a následne podliehajú tieto metabolity prostredníctvom ďalších enzýmov degradácii za vzniku aktívnych zlúčenín označovaných ako oxylipíny¹⁹⁾. Lipoxygenázová cesta má v rastlinách významné postavenie z hľadiska regulácie viacerých biologických procesov od metabolizmu, reprodukcie cez

odpoveď na biotický a abiotický stres až po reguláciu transkripcie génov¹¹⁾.

Biosyntéza oxylipínov je iniciovaná pôsobením lipázy na membránové lipidy, čo vedie k uvoľňovaniu PUFA. Následne dochádza k inzercii molekulového kyslíka do PUFA za katalytického pôsobenia LOX a k vzniku príslušných hydroperoxidových derivátov. V rastlinách sú oxylipíny odvodené z produktov oxidácie LeA a LA¹¹⁾. Hydroperoxy PUFA sú nakoniec sledom reakcií transformované cez sedem vetiev lipoxygenázovej cesty na významné produkty – oxylipíny. Takto vzniknuté oxylipíny zahŕňajú hydroperoxy MK, hydroxy-, oxo-, epoxy- alebo keto- zlúčeniny MK, ďalej divinylétery, aldehydy alebo rastlinné hormóny, ako je kyselina jasmónová (JA)²⁰⁾. Tieto zlúčeniny vznikajúce v jednotlivých vetvách lipoxygenázovej cesty sú významné antimikrobiálne a antifungálne látky (aldehydy). Taktiež pôsobia ako signálne molekuly v bunke, ako napríklad JA a od nej odvodené zlúčeniny⁹⁾.

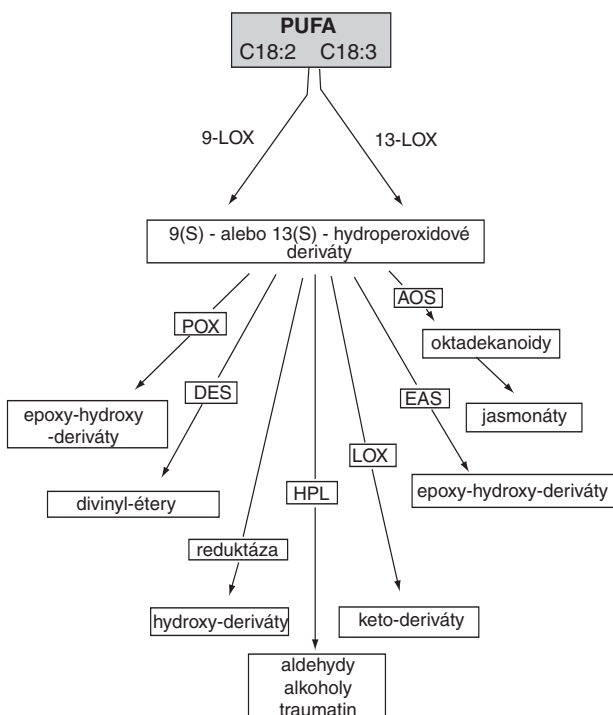
V rastlinách sú hydroperoxidové deriváty PUFA metabolizované v lipoxygenázovej ceste cez sedem vetiev, ktoré sú pomenované podľa enzýmu zahajujúceho danú vetvu lipoxygenázovej cesty (obr. 4)²⁰⁾.

Štyri enzýmy lipoxygenázovej cesty zaraďujeme k atypickej rodine monoxygenáz cytochrómu P450, ktoré sú označované ako CYP74 enzýmy. Enzýmy patriace do tejto rodiny sú allenoxidsyntáza (AOS), hydroperoxidlyáza (HPL), divinylétersyntáza (DES) a epoxyalkoholsyntáza (EAS)²¹⁾. AOS je klasifikovaná do podrodiny CYP74A alebo CYP74C, HPL sa zaraďuje do podrodiny CYP74B alebo CYP74C, a DES patrí do CYP74D podrodiny. V porovnaní s cytochrómom P450, proteíny z rodiny CYP74 nevyžadujú molekulový kyslík ani NAD(P)H-závislú cytochróm P450-reduktázu ako kofaktor, ale ako substrát a donor kyslíka využívajú hydroperoxy MK²²⁾. CYP74 sa vyznačujú redukovanou afinitou k oxidu uhoľnatému, čím sú podobné ku katalytickým vlastnostiam ostatných P450 ako prostacyklínsyntáza a tromboxánsyntáza v kaskáde AA v živočíšnych systémoch²³⁾.

Vetvy lipoxygenázovej cesty

Allenoxidsyntázová vetva

Allenoxidsyntáza (AOS), pôvodne označovaná ako hydroperoxid-dehydratáza, je v rastlinách membránovo-viazaný enzým, ktorý premieňa hydroperoxy MK na nestabilné epoxy MK²⁰⁾. Tieto molekuly následne podliehajú neenzýmovej hydrolýze za vzniku α - a γ -ketolov, alebo sú v chloroplastoch allenoxidcyklázou cyklizované na kyselinu 12-oxofytodiénovú (OPDA). OPDA je následne transportovaná do peroxizómov, kde je jej cyklopentenónový kruh redukovaný enzýmom OPDA-reduktáza na kyselinu 3-oxopentenyl-cyklopentan-1-oktánovú (OPC), ktorá po troch cykloch β -oxidácie vytvára konečný produkt tejto vetvy – JA. Tieto metabolity, označované aj ako jasmonáty, sa podieľajú na programovanej bunkovej smrti v mieste poranenia, regulácii rastu a vývoja rastliny, starnutí, expresii génov a zohrávajú úlohu aj v obrane rastliny pred hmyzom a patogénmi^{11, 24)}. JA sa využíva aj v ochrane rastlín proti škodcom, nakoľko stimuluje prirodzenú ochranu



Obr. 4. Lipoxygenázová (oktadekánová) cesta (PUFA – polynenasýtené masné kyseliny, POX – peroxygenáza, DES – divinylétersyntáza, HPL – hydroperoxidlyáza, LOX – lipoxygenáza, EAS – epoxyalkoholsyntáza, AOS – allenoxidsyntáza)

proti škodcom v rastlinách bez inhibície rastu samotnej rastliny²⁴).

Hydroperoxidlyázová vetva

Hydroperoxidlyáza (HPL), pôvodne označovaná ako hydroperoxid-izomeráza, katalyzuje oxidatívne štiepenie uhľovodíkového reťazca hydroperoxidov MK²¹). Dochádza k vzniku aldehydov s krátkym reťazcom (C₆- alebo C₉-) a C₁₂- alebo C₉-oxo-MK. V zelených rastlinách sú aldehydy zapojené do viacerých procesov, ako je obrana rastliny proti hmyzu, vábenie opeľovačov, komunikácia rastlina – rastlina, interakcia medzi patogénom a rastlinou, odstránenie reaktívneho kyslíka a adaptácia rastliny na environmentálny stres²⁴). Taktiež sú tieto aldehydy a príslušné deriváty alkoholu zodpovedné za vôňu zelených listov, ovocia a zeleniny²²). Niektoré štúdie potvrdili prítomnosť HPL ako aj AOS v chloroplastoch listov²⁵).

Divinylétersyntázová vetva

Divinylétersyntáza (DES) katalyzuje premenu hydroperoxidov MK na divinylétery MK²⁰). Oxylipíny získané touto vetvou lipoxygénazovej cesty majú dôležité postavenie v obrane rastliny pred patogénmi²⁶). V rajčiakoch, zemiakoch a tabaku DES uprednostňuje 9-hydroperoxydy ako substrát, avšak v cesnaku je DES vysokošpecifická pre 13-hydroperoxidové deriváty²⁵). Zatiaľ čo AOS a HPL sa javia ako všadeprítomné enzýmy v rastlinách, výskyt DES sa potvrdil len v niektorých rastlinných druhoch ako napr. cesnak a semená ľanu, a v čeladiach *Solanaceae* a *Ranunculaceae*²⁰).

Epoxyalkoholsyntázová vetva

Za katalytického pôsobenia epoxyalkoholsyntázy (EAS) nastáva intramolekulové preskupenie hydroperoxidov MK a vznikajú epoxy-hydroxyderiváty MK²⁷). Produkty tejto vetvy sú identické s produktmi POX vetvy, odlišujú sa od seba len stereochemicky. EAS vetva LOX cesty bola zatiaľ identifikovaná len v čeladi *Solanaceae* a predpokladá sa účasť produktov tejto vetvy v obranných procesoch rastliny voči patogénom²⁸).

Peroxygenázová vetva

Enzým peroxygenáza (POX alebo PXG) nazývaný aj hydroperoxid-izomeráza sa zúčastňuje premeny hydroperoxidov MK na epoxy- alebo dihydrodiol polyénové MK prostredníctvom intramolekulového prenosu kyslíka²⁹). POX je membránovo-viazaný proteín, ktorý obsahuje hém b ako prostetickú skupinu. Napriek tomu, že tento enzým obsahuje hémovú skupinu, nezaraďuje sa do rodiny enzýmov CYP74³⁰). POX sa zúčastňuje na obranných reakciách rastlín pred vplyvom patogénov²³).

Lipoxigenázová vetva

Ako už bolo spomínané, v rastlinách majú LOX významné postavenie v lipoxygénazovej ceste a katalyzujú polohovo- a stereo- špecifickú inzerciu molekulo- vého kyslíka do PUFA¹). Avšak za určitých podmienok (napr. nízky tlak kyslíka) je LOX schopná katalyzovať homolytické štiepenie O-O väzby za tvorby alkoxido- vých radikálov, z ktorých následne vznikajú ketodiény³¹). Napriek tomu, že ich endogénny výskyt bol popísaný,

fyziologická úloha ketodiérov nie je doteraz objasnená²³).

Reduktázová vetva

V reduktázovej vetve dochádza k POX-independetnej redukcii hydroperoxidov MK na príslušné hydroxy-deriváty. Mechanizmus tejto redukcii nie je doteraz úplne objasnený, avšak v reakcii sa predpokladá zapojenie glutatiónu²³).

Regulácia lipoxigenázovej cesty

Oxylipíny sú lipoxigenázovou cestou produkované zo substrátov ako LA a LeA cez sedem vetiev tejto cesty, pričom ústredné postavenie na začiatku lipoxigenázovej cesty má LOX. Práve LOX, ktorá katalyzuje tvorbu 9- a 13- hydroperoxidových derivátov, je hlavným miestom regulácie tejto metabolickej cesty. Rôzna substrátová špecifita, intracelulárna lokalizácia, pH optimum, aktivácia trankskripcie a pletivová špecifita môže ovplyvniť aktiváciu niektorej zo siedmich vetiev lipoxigenázovej cesty²³).

Najlepšie preštudovanou vetvou je allenoxidsyntázová vetva vedúca k biosyntéze JA. Väčšina génov, ktoré kódujú enzýmy tejto vetvy, sú regulované procesom poranenia alebo pôsobením jasmonátov. Napríklad v listoch *Arabidopsis thaliana* je mRNA AOS a allenoxidcykláza (AOC) indukovaná práve poranením³²). Podobne aj v listoch rajčiaka a zemiaka dochádza k akumulácii mRNA 13-LOX, 13-AOS a AOC³³).

Novšie štúdie považujú za kľúčový aspekt dostupnosť substrátu, ktorá je významným regulačným aspektom v lipoxigenázovej ceste. Zvýšené hodnoty JA sa zistili pri poranení a pôsobením 13(S)-hydroperoxidu LeA cez 13-AOS vetvu (v tabaku) a cez AOC vetvu (v rajčiaku).

Biosyntéza a pôsobenie JA je regulované niekoľkými faktormi: 1. dostupnosťou substrátu na základe vplyvu vonkajších faktorov, 2. intracelulárnym nedostatkom JA, 3. pletivovo-špecifickou tvorbou a akumuláciou JA, 4. metabolickou transformáciou JA na jej metylester alebo na prchavý degradačný produkt *cis*-jasmón²³).

Hydroperoxidlyázová vetva je pravdepodobne taktiež regulovaná dostupnosťou substrátu³⁴), pričom orgánovo-špecifická a poranením indukovaná aktivácia transkripcie je navzájom prepojená³⁵).

O regulácii ostatných vetiev lipoxigenázovej cesty nie je dostatok informácií a nie sú dostatočne objasnené regulačné mechanizmy. Predpokladá sa, že sú regulované fosforyláciou/defosforyláciou enzýmov³⁶) alebo degradáciou enzýmu ubikvitináciou³⁷).

Skratky

AA	kyselina arachidónová
AOC	allenoxidcykláza
AOS	allenoxidsyntáza
DES	divinylétersyntáza
EAS	epoxyalkoholsyntáza
GDP	guanozín difosfát
GTP	guanozín trifosfát
HPL	hydroperoxidlyáza
JA	kyselina jasmónová
LA	kyselina linolová

LeA	kyselina linolénová
LOX	lipoxygenáza
MK	mastná kyselina
OPC	kyselina 3-oxopentenyl-cyklopentan-1-oktánová
OPDA	kyselina 12-oxofytodiénná
PAF	faktor aktivující trombocyty (platelet-activating factor)
PI	fosfatidylinozitol
PI-3-kináza	fosfatidylinozitol-3-kináza
PI-4-kináza	fosfatidylinozitol-4-kináza
PI-3-P	fosfatidylinozitol-3-fosfát
PI-4-P	fosfatidylinozitol-4-fosfát
PI-5-P	fosfatidylinozitol-5-fosfát
PIP-kinázy	fosfatidylinozitol-monofosfát-kináza
PLA ₁	fosfolipáza A ₁
PLA ₂	fosfolipáza A ₂
PLB	fosfolipáza B
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D
POX (PXG)	peroxygenáza
PUFA	polynenasýtená mastná kyselina

Konflikt záujmov: žádné.

Literatura

- Munnik T., Irvine R. F., Musgrave A. Phospholipid signalling in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1389, 222–272.
- De Maria L., Vind J., Oxenboll K. M., Svendsen A., Patkar S. Phospholipases and their industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 74, 290–300.
- Heilmann I. Plant Lipid Biochemistry: Phosphoinositide signaling in plants 2010. <http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/phosphoinositide/index.htm> (28. 1. 2013)
- Meijer H. J. G., Munnik T. Phospholipid-based signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003; 54, 265–306.
- Šimočková M., Griač P. Degradácia fosfolipidov: tvorba nového zo starého. *Chem. Listy* 2009; 103, 704–711.
- Lee H. Y., Bahn S. C., Shin J. S., Hwang I., Back K., Doelling J. H., Ryu S. B. Multiple forms of secretory phospholipase A2 in plants. *Prog. Lipid Res.* 2005; 44, 52–67.
- Murakami M., Kudo I. Secretory phospholipase A2. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; 27, 1158–1164.
- Wang X. Lipid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004; 7, 329–336.
- Holková I., Bezáková L., Vanko M., Bilka F., Obložinský M. Lipoxygenázy a ich význam v biochemických procesoch v rastlinných organizmoch. *Chem. Listy* 2009; 103, 487–495.
- Andreou A., Feussner I. Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* 2009; 70, 1504–1510.
- Chehab E. W., Perea J. V., Gopalan B., Theg S., Dehesh K. Oxylipin pathway in rice and *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* 2007; 49, 43–51.
- Shibata D., Slusarenko A., Casey R., Hildebrand D., Bell E. Lipoxygenases. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1994; 12, 41–42.
- Brash A. R. Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* 1999; 274, 23679–23679.
- Feussner I., Balkenhohl T. J., Porzel A., Kühn H., Wasternack C. Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons – implication of lipid body lipoxygenase in lipid mobilization during germination. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 21635–21641.
- Belkner J., Stender H., Kühn H. The rabbit 15-lipoxygenase preferentially oxygenates LDL cholesterol esters, and this reaction does not require vitamin E. *J. Biol. Chem.* 1998; 273, 23225–23232.
- Pandey S. More (G-proteins) please! Identification of an elaborate network of G-proteins in soybean. *Plant Signal. Behav.* 2011; 66, 780–782.
- Mueller-Roeber B., Pical C. Inositol phospholipid metabolism in *Arabidopsis*. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol.* 2002; 130, 22–46.
- Evans N. H., McAinsh M. R., Hetherington A. M. Calcium oscillations in higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001; 4, 415–420.
- Schaller A., Stintzi A. Enzymes in jasmonate biosynthesis - Structure, function, regulation. *Phytochemistry* 2009; 70, 1532–1538.
- Andreou A., Brodhun F., Feussner I. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog. Lipid Res.* 2009; 48, 148–170.
- Mosblech A., Feussner I., Heilmann I. Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol. Biochem.* 2009; 47, 511–517.
- Gullner G., Künstler A., Király L., Pogány M., Tóbiás I. Up-regulated expression of lipoxygenase and divinyl ether synthase genes in pepper leaves inoculated with Tobamoviruses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2010; 74, 387–393.
- Feussner I., Wasternack C. The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002; 53, 275–297.
- Joo Y.-C., Oh D.-K. Lipoxygenases: Potential starting biocatalysts for the synthesis of signaling compounds. *Biotechnol. Adv.* 2012; 30, 1524–1532.
- Farmaki T., Sanmartin M., Jimenez P., Paneque M., Sanz C., Vancanneyt G., Leon J., Sanchez-Serrano J. J. Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *J. Exp. Bot.* 2007; 58, 555–568.
- Eschen-Lippold L., Rothe G., Stumpe M., Gobel C., Feussner I., Rosahl S. Reduction of divinyl ether-containing polyunsaturated fatty acids in transgenic potato plants. *Phytochemistry* 2007; 68, 797–801.
- Hamberg M. An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylipins in leaves of potato. *Lipids* 1999; 34, 1131–1142.
- Göbel C., Feussner I., Hamberg M., Rosahl S. Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1584, 55–64.
- Blée E. Biosynthesis of phytooxylipins: the Peroxygenase pathway. *Fett/Lipid* 1998; 100, 121–127.
- Hanano A., Burcklen M., Flenet M., Ivancich A., Louwagie M., Garin J., Blée E. Plant seed peroxygenase is an original heme-oxygenase with EF-hand calcium binding motif. *J. Biol. Chem.* 2006; 281, 33140–33151.
- Kühn H., Wiesner R., Rathmann J., Schewe T. Formation of ketodienoic fatty acids by the pure pea lipoxygenase-1. *Eicosanoids* 1991; 4, 9–14.
- Laudert D., Weiler E. W. Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.* 1998; 197, 156–162.
- Sivasankar S., Sheldrick B., Rothstein S. J. Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol.* 2000; 122, 1335–1342.
- Vancanneyt G., Sanz C., Farmaki T., Paneque M., Ortego F., Castanera P., Sanchez-Serrano J. J. Hydroperoxid lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98, 8139–8144.
- Matsui K., Wilkinson J., Hiatt B., Knauf V., Kajiwaru T. Molecular cloning and expression of *Arabidopsis* fatty acid hydroperoxid lyase. *Plant Cell Physiol.* 1999; 40, 477–481.
- Leon J., Rojo E., Sanchez-Serrano J. J. Wound signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 2001; 52, 1–9.
- Xie D. X., Feys B. F., James S., Nietorostro M., Turner J. G. *COII*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 1998; 280, 1091–1094.
- Zhao J., Davis L. C., Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 2005; 23, 283–333.