



УДК 577.151.63

В. М. Копіч, О. В. Харченко

## Каталітичні властивості гідропероксидліази з проростків картоплі

(Представлено академіком НАН України В. П. Кухарем)

Вивчені каталітичні властивості гідропероксидліази (ГПЛ) з проростків картоплі. ГПЛ екстрагували з проростків картоплі та очищали центрифугуванням, солюбілізацією за наявності детергенту, осадженням сульфатом амонію, іонообмінною хроматографією. Значення рН 6,3 і 6,5 були оптимальними для гідролізу субстратів — 9-гідропероксиду лінолевої кислоти і 13-гідропероксиду лінолевої кислоти відповідно. Субстратна специфічність очищеної на DEAE-Toyorearl ГПЛ була визначена шляхом вивчення активності ГПЛ з 9-гідропероксидом лінолевої кислоти, 9-гідропероксидом лінолевого спирту і 13-гідропероксидом лінолевої кислоти. Уявні значення  $K_M$  для 9-гідропероксиду лінолевої кислоти і 13-гідропероксиду лінолевої кислоти становили 3,92 і 6,31 мкМ, відповідні значення  $V_{max}$  — 5,54 і 1,94 мкМ/хв. 9-гідропероксид лінолевого спирту інгібував ГПЛ з  $IC_{50}$  20 мкМ. Фосфатидна кислота пригнічувала ГПЛ на 40% при 50 мкМ, що вказує на роль цього фосфоліпиду в підтриманні внутрішньоклітинного рівня гідропероксидів ліпідів.

**Ключові слова:** гідропероксидліаза, проростки картоплі, 13-гідропероксид лінолевої кислоти, 9-гідропероксид лінолевої кислоти, 9-гідропероксид лінолевого спирту, фосфатидна кислота.

Фітооксиліпіни — біологічно активні речовини рослин, синтезовані за участю ферментів ліпоксигеназного шляху окиснення поліненасичених жирних кислот. Однією з ланок ліпоксигеназної сигнальної системи є гідропероксидліази (ГПЛ) (ЕС 4.1.2.-) — ферменти, що каталізують перетворення первинних продуктів ліпоксигеназних реакцій: 9-гідропероксилінолевої та 9-гідропероксиліноленової кислот у  $C_9$ -альдегіди та  $C_9$ -альдокислоти і 13-гідропероксилінолевої та 13-гідропероксиліноленової кислот у  $C_6$ -альдегіди та  $C_{12}$ -альдокислоти. Продукти гідропероксидліазних реакцій швидше, ніж жасмонова кислота, накопичуються при пораненні, створюючи хімічний захисний бар'єр для проникнення інфекції. Дані щодо фізіологічної дії гідропероксидліазних метаболітів 9-ліпоксигеназного шляху утворення

© В. М. Копіч, О. В. Харченко, 2015

оксиліпінів — С<sub>9</sub>-альдегідів та С<sub>9</sub>-альдокислот і подальші їх перетворення на відміну від біологічної активності С<sub>6</sub>-альдегідів та С<sub>12</sub>-альдокислот на сьогодні практично відсутні. Вважають, що деякі з ліпоксигеназних метаболітів задіяні в захисті рослини від патогенних факторів, виконуючи функції сигнальних молекул та вторинних месенджерів [1]. Стимулювання 9-ліпоксигеназного шляху при біотичних стресах пов'язують з участю даного ліпоксигеназного шляху в адаптації рослинної клітини до дії стресових чинників [2, 3]. Навпаки, комахи провокують селективне пригнічення гідропероксидліазної ланки оксиліпінового шляху [4, 5].

Необхідність з'ясування фізіологічної ролі 9-гідропероксидліазних метаболітів в умовах адаптації рослинної клітини до дії стресових чинників обумовлює інтерес до отримання цих сполук в напівпрепаративних кількостях ферментативно з використанням 9-ГПЛ для подальшого дослідження їх впливу на функціонування рослинної клітини. Встановлено, що серед продуктів трансформації 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти безклітинними екстрактами з бульб картоплі є як 9-, так і 13-гідропероксидліазні продукти [6]. На відміну від бульб у листі картоплі виявляють лише 13-гідропероксидліазну активність, рівень якої може змінюватися в умовах дії стресових чинників [7, 8]. З метою пошуку збагаченого гідропероксидліазною активністю джерела для отримання ферменту, що буде використаний в розробці способів ферментативного синтезу 9-гідропероксидліазних метаболітів, необхідно було провести порівняльне дослідження активності ферменту в бульбах та проростках картоплі за умов її зберігання, визначити оптимальні умови та кінетичні характеристики гідропероксидліазної реакції трансформації 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти. З огляду на те, що ГПЛ є мембраноасоційованими ферментами, цікавим було встановити вплив фосфатидної кислоти як ліпідного компонента мембран живої клітини на перебіг гідропероксидліазної реакції.

В роботі були використані лінолева кислота, лінолевий спирт, неіонний детергент Lubrol PX, аніонний детергент Brij-99, ліпоксигеназа із сої, фосфатидна кислота ("Sigma", США), С18-картриджі (Burdick&Jackson, Inc.), ДЕАЕ-Toyopearl ("Toyo-Soda", Японія). Біологічний об'єкт — проростки картоплі сорту "Луговська" на стадії ініціації проростання (45–60 діб терміну зберігання бульб).

Синтез 9-гідропероксидів лінолевої кислоти та спирту проводили з використанням ліпоксигенази з бульб картоплі, а 13-гідропероксиду лінолевої кислоти — за наявності ліпоксигенази із сої з наступним очищенням на С18-мікроколони (октадецил (С18) картридж) [6, 9]. Контроль чистоти отриманих гідропероксидів (вище 95%) проводили методом обернено фазової високоефективної рідинної хроматографії на колонці LiChrosorb RP-18 (Merk) з використанням рефрактометричного детектора та рухомої фази — метанол : вода = 9 : 1 (0,1% Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub>, v/v).

Основним ліпоксигеназним метаболітом у бульбах картоплі є 9(S)-гідропероксид лінолевої кислоти [10], кількість якого значно зростає в період між 45-ю і 60-добою зберігання бульб картоплі (стадія ініціації проростання). В серії експериментів по вивченню гідропероксидліазної активності за умов зберігання бульб картоплі встановлено, що на стадії ініціації проростання (45–60 діб) в проростках спостерігається максимальна активність ГПЛ. На стадії апікального домінування (15–45 діб) активність ферменту практично відсутня, а на стадії дочірніх бульб (210 діб) — зменшується в 2–3 рази порівняно з активністю на стадії ініціації проростання. Такі коливання активності ферменту можуть бути свідченням його участі в процесах активних метаболічних змін, що забезпечують перехід рослинної клітини із стану спокою у функціонально активний стан, і пов'язані як з міграцією і розпадом ліпідів, так і

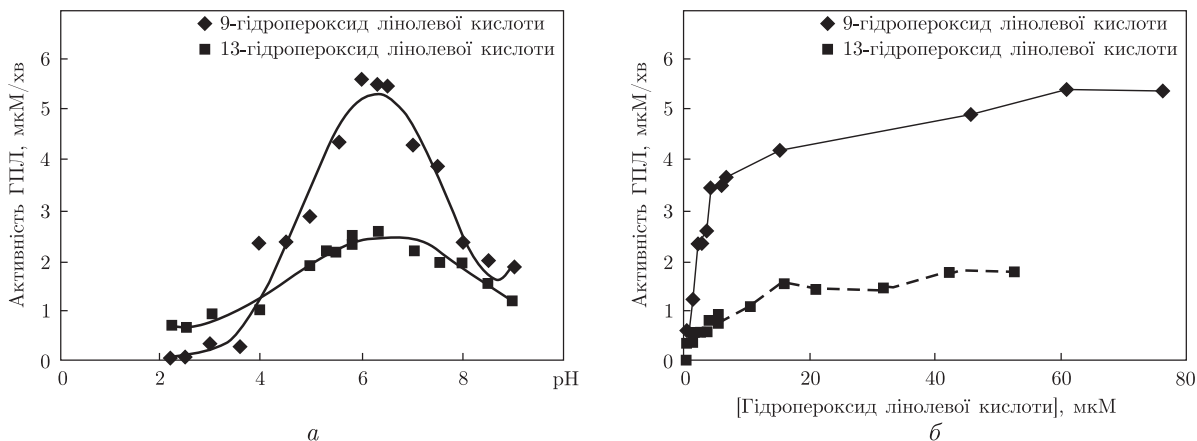


Рис. 1. Залежності активності ГПЛ від рН реакційного середовища (а) та кількості субстрату гідропероксидліази (б)

з утилізацією їх за участю ліпоксигеназ та ГПЛ. Для виділення ферменту використовували проростки картоплі, як рослинний матеріал з найвищою гідропероксидліазною активністю. Очищення препаратів ГПЛ з проростків картоплі проводили за схемою, що складалася з екстракції за наявності 0,01% Brij-99, висолонання 25–50% сульфатом амонію, діалізу та хроматографії на ДЕАЕ-Тоуорепарл (0,025 М трис-НСl, рН 7,5; градієнт 0–0,2 М NaCl). Пік елюції гідропероксидліазної активності спостерігався в інтервалі 0,055–0,065 М NaCl. Визначали активність ГПЛ спектрофотометрично (спектрофотометр Spесord M-40, “Carl Zeiss”, Німеччина), реєструючи зменшення з часом оптичної густини реакційної суміші при  $\lambda = 234$  нм, що відповідає максимальному поглинанню спряженого дієнового хромофору в молекулі гідропероксиду (молярний коефіцієнт екстинкції  $23000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Було досліджено вплив на перебіг гідропероксидліазної реакції рН реакційного середовища. Залежності стаціонарної швидкості гідропероксидліазної реакції розщеплення 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти від рН реакційного середовища наведені на рис. 1. Дзвоникоподібна форма кривих вказує на участь в реакції двох іоногенних груп ферменту з удаваними значеннями рК, які наведені в табл. 1. Розрахунок проведено у відповідності з (f<sup>-</sup>) рН-функцією Міхаеліса за рівнянням  $V_{st} = V_{opt} / (1 + [\text{H}^+] / K_1 + K_2 / [\text{H}^+] + c)$ , де  $V_{st}$  — стаціонарна швидкість реакції,  $V_{opt}$  — стаціонарна швидкість реакції при оптимальному значенні рН,  $K_1$  і  $K_2$  — константи дисоціації іоногенних груп ферменту,  $c$  — експериментальна константа. Оптимальні для перебігу гідропероксидліазної реакції трансформації 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти значення рН становили 6,3 та 6,5 відповідно. На рис. 1, б зображені залежності гідропероксидліазної активності від концентрації субстра-

Таблиця 1. Значення  $pK_1$ ,  $pK_2$ ,  $V_{opt}$  для гідропероксидліази з проростків картоплі

Параметр	Субстрат гідропероксидліази	
	9-гідропероксид лінолевої кислоти	13-гідропероксид лінолевої кислоти
$pK_1$	$8,03 \pm 0,14$	$8,51 \pm 0,13$
$pK_2$	$4,61 \pm 0,16$	$4,49 \pm 0,18$
$V_{opt}$ , $\mu\text{M}/\text{хв}$	$5,27 \pm 0,36$	$1,80 \pm 0,11$
$c$ , $\mu\text{M}/\text{хв}$	—	$0,61 \pm 0,10$

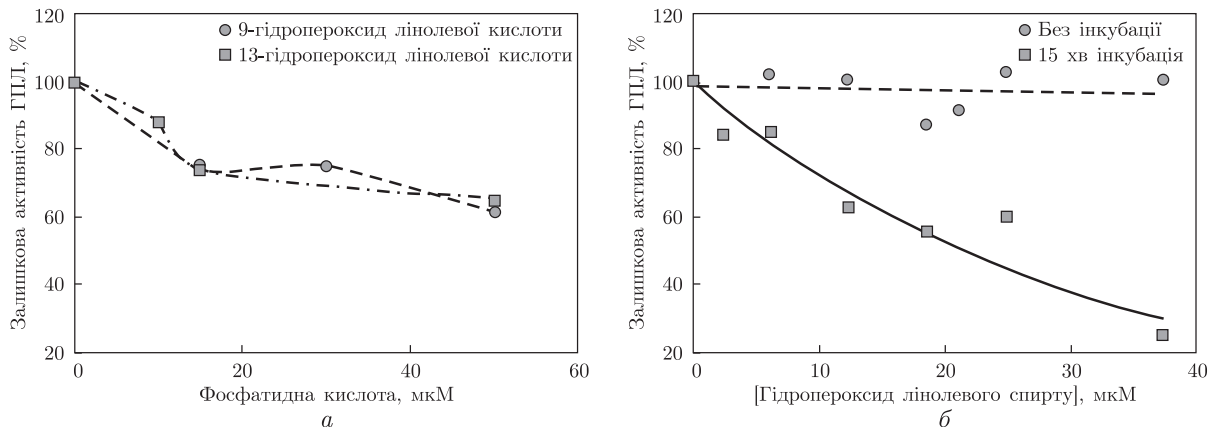


Рис. 2. Залежності активності ГПЛ від концентрації фосфатидної кислоти (а) та гідропероксиду лінолевого спирту (б)

тів — 13- та 9-гідропероксидів лінолевої кислоти в реакційних сумішах, що містили: 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 6,3 та 6,5 відповідно для 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти), 0,02% Lubrol PX, 10–70 мкМ гідропероксиди лінолевої кислоти.

Результати розрахунку уявних констант Міхаеліса ( $K_M$ ) та максимальної швидкості реакції ( $V_{max}$ ) у відповідності до рівняння Міхаеліса–Ментен наведені в табл. 2. Порівняння отриманих нами кінетичних параметрів гідропероксидліазної реакції гідролізу 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти узгоджуються з літературними даними для ГПЛ з проростків гороху та листя *Solanum tuberosum* [11, 12]. Так, значення уявних  $K_M$  у випадку 9- та 13-гідропероксидів лінолевої кислоти в реакціях, що каталізувались ГПЛ з проростків гороху, становили 4,5 та 11,1 мкМ відповідно [11]. Даних щодо регуляторів активності ГПЛ в літературі на сьогодні небагато. Так, відомо, що хлорид калію значно стабілізує ГПЛ в екстракті з листя м'яти [13], високоочищена ГПЛ з листя амаранту чутлива до дії нордигідрогуарамової кислоти, 2(Е)-гексеналу та  $HgCl_2$  [14] і переважно трансформує 13-гідропероксид ліноленової кислоти з  $K_M$  62,7 мкМ. Встановлено, що 2(Е)-гексенал значно інгібує ГПЛ амаранту та виявляє комплексну дію при взаємодії рослина–патоген, відновлюючи стійкість рослини до патогенної інфекції. Про високу специфічність до субстратів реакції, притаманну ГПЛ, свідчить встановлений нами факт неможливості гідролізу 9-гідропероксиду лінолевого спирту за наявності ферменту, що вказує на необхідність для перебігу гідропероксидліазного каталізу наявності в структурі субстрату карбоксильної групи.

Цікавою виявилася здатність 9-гідропероксиду лінолевого спирту істотно блокувати перебіг реакції гідропероксидліазного перетворення гідропероксидів поліненасичених жирних кислот за умов попередньої інкубації з ферментом (рис. 2, б). 9-гідропероксид лінолевого спирту зменшував стаціонарну швидкість гідропероксидліазної реакції вдвічі в концентра-

Таблиця 2. Кінетичні характеристики гідропероксидліази з проростків картоплі

Кінетичний параметр	Субстрат гідропероксидліазної реакції	
	9-гідропероксид лінолевої кислоти	13-гідропероксид лінолевої кислоти
$K_M$ , мкМ	$3,92 \pm 0,38$	$6,31 \pm 0,89$
$V_{max}$ , мкМ/хв	$5,54 \pm 0,16$	$1,94 \pm 0,08$

ції 20 мкМ. Вперше було досліджено і вплив фосфатидної кислоти як сполуки, що входить до мембран живої клітини, на мембраноасоційований фермент — ГПЛ. Додавання в стандартну реакційну суміш фосфатидної кислоти в концентраціях 10–50 мкМ призводило до зменшення активності ГПЛ (див. рис. 2, а).

Отже, фосфатидна кислота здатна інгібувати активність ГПЛ і, таким чином, забезпечувати підтримання необхідного для клітини рівня ліпоксигеназних метаболітів. Необхідно відзначити, що дія фосфатидної кислоти на ключовий фермент ліпоксигеназного шляху утворення оксиліпінів є протилежною, а саме за наявності фосфатидної кислоти істотно збільшується активність ліпоксигенази з бульб картоплі [15].

На підставі результатів дослідження можна стверджувати, що одним з перспективних для отримання ферменту джерел є проростки картоплі. Вперше з проростків картоплі виділена та очищена ГПЛ, що виявляє активність як по відношенню до 9-гідропероксиду лінолевої кислоти, так і до 13-гідропероксиду лінолевої кислоти, визначені кінетичні параметри гідропероксидліазної реакції, знайдені нові інгібітори ферменту — 9-гідропероксид лінолевого спирту та фосфатидна кислота. Отримані нами результати розширюють сучасні уявлення щодо участі фосфатидної кислоти в регуляції гідропероксидліазної ланки ліпоксигеназного шляху утворення оксиліпінів, а також можуть бути використані при розробці способів ферментативного синтезу 9- та 13-гідропероксидліазних метаболітів з метою дослідження їх біологічної активності.

1. *Blée E.* Impact of phyto-oxylipins in plant defense // Trends Plant Sci. – 2002. – **7**, No 7. – P. 315–321.
2. *Gosset V., Harmel N., Göbel C., Francis F., Haubruge E., Wathelet J.-P., Du Jardin P., Feussner I., Fauconnier M.-L.* Attacks by a piercing-sucking insect (*Myzus persicae* Sultzer) or a chewing insect (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) induce differential changes in volatile compound release and oxylipin synthesis // J. Exp. Bot. – 2009. – **60**, No 4. – P. 1231–1240.
3. *León-Morcillo R. J., Ángel J., Vierheilig H., Ocampo J. A., García-Garrido J. M.* Late activation of the 9-oxylipin pathway during arbuscular mycorrhiza formation in tomato and its regulation by jasmonate signalling // J. Exp. Bot. – 2012. – **63**, No 10. – P. 3545–3558.
4. *Savchenko T., Pearse I. S., Ignatia L., Karban R., Dehesh K.* Insect herbivores selectively suppress the HPL branch of the oxylipin pathway in host plants // Plant J. – 2013. – **73**, No 4. – P. 653–662.
5. *Tong X., Qi J., Zhu X., Mao B., Zeng L., Wang B., Li Q., Zhou G., Xu X., Lou Y.* The rice hydroperoxide lyase OsHPL3 functions in defense responses by modulating the oxylipin pathway // Plant J. – 2012. – **71**, No 5. – P. 763–775.
6. *Fauconnier M.-L., Delcarte J., Jaziri M., Jardin P. D. U., Marlier M.* Fatty acid hydroperoxides biotransformation by potato tuber cell-free extracts // J. Plant Physiol. – 2002. – **159**, No 10. – P. 1055–1060.
7. *Vancanneyt G., Sanz C., Farmaki T., Paneque M., Ortego F., Castañera P., Sánchez-Serrano J. J.* Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – **98**, No 14. – P. 8139–8144.
8. *Farmaki T., Sanmartín M., Jiménez P., Paneque M., Sanz C., Vancanneyt G., León J., Sánchez-Serrano J. J.* Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts // J. Exp. Bot. – 2007. – **58**, No 3. – P. 555–568.
9. *Butovich I. A., Lukyanova S. M., Reddy C. C.* Oxidation of linoleyl alcohol by potato tuber lipoxygenase: Possible mechanism and the role of carboxylic group in substrate binding // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1998. – **249**, No 2. – P. 344–349.
10. *Fauconnier M.-L., Welti R., Blée E., Marlier M.* Lipid and oxylipin profiles during aging and sprout development in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) // Biochim. et Biophys. Acta. – 2003. – **1633**, No 2. – P. 118–126.
11. *Hornostaj A. R., Robinson D. S.* Purification of hydroperoxide lyase from pea seeds // Food Chemistry. – 2000. – **71**, No 2. – P. 241–247.
12. *Mu W., Xue Q., Jiang B., Hua Y.* Molecular cloning, expression, and enzymatic characterization of *Solanum tuberosum* hydroperoxide lyase // Eur. Food Res. and Technol. – 2012. – **234**, No 4. – P. 723–731.

13. Akacha N. B., Karboune S., Gargouri M., Kermasha S. Activation and stabilization of the hydroperoxide lyase enzymatic extract from mint leaves (*Mentha spicata*) using selected chemical additives // *Appl. Biochem. and Biotechnol.* – 2010. – **160**, No 3. – P. 901–911.
14. Long Z., Kong X., Zhang C., Jiang B., Hua Y. Purification and characterization of hydroperoxide lyase from amaranth tricolor (*Amaranthus mangostanus* L.) leaves // *Eur. Food Res. and Technol.* – 2010. – **231**, No 6. – P. 865–871.
15. Скатерна Т.Д., Харченко О.В. Вплив фосфатидної кислоти на реакцію окислення лінолевої кислоти 5-ліпоксигеназою з бульб картоплі // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – **80**, № 3. – С. 21–30.

## References

1. Blée E. *Trends Plant Sci.*, 2002, **7**, No 7: 315–321.
2. Gosset V., Harmel N., Göbel C., Francis F., Haubruge E., Wathelet J.-P., Du Jardin P., Feussner I., Fauconnier M.-L. *J. Exp. Bot.*, 2009, **60**, No 4: 1231–1240.
3. León-Morcillo R.J., Ángel J., Vierheilig H., Ocampo J.A., García-Garrido J.M. *J. Exp. Bot.*, 2012, **63**, No 10: 3545–3558.
4. Savchenko T., Pearse I.S., Ignatia L., Karban R., Dehesh K. *Plant J.*, 2013, **73**, No 4: 653–662.
5. Tong X., Qi J., Zhu X., Mao B., Zeng L., Wang B., Li Q., Zhou G., Xu X., Lou Y. *Plant J.*, 2012, **71**, No 5: 763–775.
6. Fauconnier M.L., Delcarte J., Jaziri M., Jardin P.D.U., Marlier M. *J. Plant Physiol.*, 2002, **159**, No 10: 1055–1060.
7. Vancanneyt G., Sanz C., Farmaki T., Paneque M., Ortego F., Castañera P., Sánchez-Serrano J. J. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2001, **98**, No 14: 8139–8144.
8. Farmaki T., Sanmartín M., Jiménez P., Paneque M., Sanz C., Vancanneyt G., León J., Sánchez-Serrano J. J. *J. Exp. Bot.*, 2007, **58**, No 3: 555–568.
9. Butovich I. A., Lukyanova S. M., Reddy C. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, **249**, No 2: 344–349.
10. Fauconnier M.-L., Welti R., Blée E., Marlier M. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2003, **1633**, No 2: 118–126.
11. Hornostaj A. R., Robinson D. S. *Food Chemistry*, 2000, **71**, No 2: 241–247.
12. Mu W., Xue Q., Jiang B., Hua Y. *Eur. Food Res. and Technol.*, 2012, **234**, No 4: 723–731.
13. Akacha N. B., Karboune S., Gargouri M., Kermasha S. *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, 2010, **160**, No 3: 901–911.
14. Long Z., Kong X., Zhang C., Jiang B., Hua Y. *Eur. Food Res. and Technol.*, 2010, **231**, No 6: 865–871.
15. Skaterna T. D., Kharchenko O. V. *Ukr. Biokhim. J.*, 2008, **80**, No 3: 21–30.

*Інститут біоорганічної хімії  
і нафтохімії НАН України, Київ*

*Надійшло до редакції 26.12.2014*

**В. Н. Копич, О. В. Харченко**

## **Каталитические свойства гидропероксидазы из проростков картофеля**

Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України, Київ

*Изучены каталитические свойства гидропероксидазы (ГПЛ) из проростков картофеля. ГПЛ экстрагировали из проростков картофеля и очищали центрифугированием, солубилизацией в присутствии детергента, осаждением сульфатом аммония, ионообменной хроматографией. Значения рН 6,3 и рН 6,5 были оптимальными для гидролиза субстратов — 9-гидропероксида линолевой кислоты и 13-гидропероксида линолевой кислоты соответственно. Субстратная специфичность очищенной на DEAE-Тоуорearl ГПЛ была определена путем изучения активности ГПЛ по отношению к 9-гидропероксиду линолевой кислоты, 9-гидропероксиду линолевого спирта и 13-гидропероксиду линолевой кислоты. Кажущиеся значения  $K_M$  для 9-гидропероксида линолевой кислоты и 13-гидропероксида линолевой кисло-*

ты составили 3,92 и 6,31 мкМ, соответствующие значения  $V_{\max}$  — 5,54 и 1,94 мкМ/мин. 9-гидропероксид линолевого спирта ингибировал ГПЛ с  $IC_{50}$  20 мкМ. Фосфатидная кислота ингибировала ГПЛ на 40% при 50 мкМ, что свидетельствует о роли этого фосфолипидов в поддержании внутриклеточного уровня гидропероксидов липидов.

**Ключевые слова:** гидропероксидаза, проростки картофеля, 13-гидропероксид линолевой кислоты, 9-гидропероксид линолевой кислоты, 9-гидропероксид линолевого спирта, фосфатидная кислота.

V. M. Kopich, O. V. Kharchenko

## Catalytic properties of hydroperoxide lyase from potato seedlings

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the NAS of Ukraine, Kiev

*Catalytic properties of hydroperoxide lyase (HPL) from potato seedlings are studied. HPL was extracted from potato seedlings and purified by centrifugation, solubilization with detergent, ammonium sulfate precipitation, and ion-exchange chromatography. pH 6.3 and 6.5 were optimum for the lysis of 9-hydroperoxy-linoleic acid and 13-hydroperoxy-linoleic acid substrates, respectively. The substrate specificity of the DEAE-Toyopearl-purified HPL was determined by examining the activities of the HPL with 9-hydroperoxy-linoleic acid, 9-hydroperoxy-linoleic alcohol and 13-hydroperoxy-linoleic acid. Apparent  $K_M$  values for 9-hydroperoxy-linoleic acid and 13-hydroperoxy-linoleic acid were 3.92 and 6.31  $\mu\text{M}$ . Corresponding  $V_{\max}$  values were 5.54 and 1.94  $\mu\text{M}/\text{min}$ . 9-hydroperoxy-linoleic alcohol inhibits HPL with an  $IC_{50}$  of 20  $\mu\text{M}$ . Phosphatidic acid inhibits HPL by about 40% at 50  $\mu\text{M}$ , indicating a role of this phospholipid in the maintenance of cellular levels of lipid hydroperoxides.*

**Keywords:** hydroperoxide lyase, potato seedlings, 13-hydroperoxide of linoleic acid, 9-hydroperoxide of linoleic acid, 9-hydroperoxide of linoleic alcohol, phosphatidic acid.