

На правах рукописи

**Блуфард Александр Сергеевич**

**НОВЫЕ ПРОДУКТЫ ЛИПОКСИГЕНАЗНОГО МЕТАБОЛИЗМА  
В ЛИСТЬЯХ ЛЬНА**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2011

Работа выполнена в лаборатории оксипептинов Учреждения Российской академии наук Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Научный руководитель: доктор химических наук, академик РАН  
Гречкин Александр Николаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
Горшкова Татьяна Анатольевна  
(КИББ КазНЦ РАН, Казань)

доктор биологических наук  
Соловченко Алексей Евгеньевич  
(МГУ им. М.В. Ломоносова)

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук  
Институт биологии моря им. А.В.  
Жирмунского ДВО РАН

Защита состоится \_\_\_\_\_ 2011 года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Учреждении Российской академии наук Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я 30, тел/факс (843)2927347

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

А.Б. Иванова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Постановка проблемы и ее актуальность.** Оксипирины – оксигенированные производные непредельных жирных кислот – играют важную роль в клеточной сигнализации, а также механизмах защиты растений. Исследование этих процессов имеет существенное теоретическое и практическое значение. Липоксигеназный каскад, источник оксипиринов, контролируется липоксигеназами и ферментами метаболизма гидроперекисей жирных кислот. Ключевыми ферментами липоксигеназного пути являются липоксигеназы (ЛОГ), включая 13(*S*)-липоксигеназу (ЕС 1.13.11.12) и 9(*S*)-липоксигеназу (ЕС 1.13.11.58). Липоксигеназы животных, водорослей, грибов и микроорганизмов используют в качестве субстрата  $C_{20}$ -жирные кислоты (например, арахидоновую кислоту), в то время как липоксигеназы растений катализируют превращение  $C_{18}$ -жирных кислот (линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислоты). Продукты первичного действия липоксигеназы – гидроперекиси жирных кислот – являются предшественниками таких важных биорегуляторов, как жасмоновая кислота в растениях [Blee, 2002] и лейкотриены у млекопитающих [Samuelsson, 1997].

К ферментам липоксигеназного пути, утилизирующим гидроперекиси жирных кислот, относятся гидропероксидлиаза (ГПЛ), алленоксидсинтаза (АОС) и дивинилэфирсинтаза (ДЭС). Многие продукты действия этих ферментов являются значимыми биорегуляторами. В частности, достаточно хорошо изучена 12-оксо-ФДК – предшественник 7-изожаасмоновой кислоты, а также собственно 7-изо-жаасмоновая кислота и родственные соединения, «жаасмонаты». Эта группа физиологически активных веществ составляет новый класс фитогормонов и играет важную роль в сигнализации, регуляции экспрессии генов и в синтезе «жаасмонат-индуцируемых белков» (в том числе ингибиторов протеиназ), регуляции роста и старения [Mathew et al., 1977; Hamberg, Gardner, 1992].

Значение дивиниловых эфиров в эндогенной регуляции у растений не так хорошо изучено, как роль жаасмонатов. Впервые дивиниловые эфиры (8*E*,1'*E*,3'*Z*)-9-(1',3'-нонадиенилокси)-8-ноненая (колнелевая) и (8*E*,1'*E*,3'*Z*,6'*Z*)-9-(1',3',6'-нонатриенилокси)-8-ноненая (колнеленовая) кислоты были открыты Галлиардом с коллегами при экспериментах *in vitro* с клубнями картофеля [Galliard, Phillips, 1972; Galliard, Mathew, 1975]. Известно, что колнелевая и этеролеваая кислоты ингибируют 9- и 13-липоксигеназы, соответственно [Corey et al., 1987; Weber et al., 1999]. Вебер с соавт. наблюдали специфическую экспрессию гена ДЭС и накопление колнелевой и колнеленовой кислот в листьях картофеля, зараженных патогеном *Phytophthora infestans*, и в листьях табака, зараженных вирусом табачной мозаики. Данные об ингибировании роста *P. infestans* колнелевой и колнеленовой кислотами позволили Веберу с соавт. предположить фунгицидную и протекторную роль дивиниловых эфиров и ДЭС [Weber et al., 1999].

До сих пор остается открытым вопрос о биологической роли оксипириносодержащих сложных липидов. Наиболее изученными представителями этой

группы соединений являются арабидопсиды. Они представляют собой моно- или дигалактозилдиацилглицерины, содержащие остатки (15Z)-12-оксо-10,15-фитодиеновой кислоты (12-оксо-ФДК) или динор-12-оксо-ФДК. Обнаружено участие арабидопсидов в механизмах защиты растений от патогенов. Таким образом, сведения о липоксигеназном каскаде в целом и его метаболитах в частности остаются весьма отрывочными. Это касается в первую очередь оксилипинсодержащих сложных липидов, в состав которых входят дивиниловые эфиры.

**Цель и задачи исследования.** Цель данного исследования: изучить липоксигеназный путь в растениях льна.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить и идентифицировать основные метаболиты  $\alpha$ -линоленовой кислоты в растениях льна.
2. Исследовать содержание этерифицированных оксилипинов в липидном составе листьев льна.
3. Изучить состав липидов, образующихся в листьях льна в ответ на действие экстремальных факторов.

**Научная новизна работы.** Полученные результаты расширяют представления о таком малоизученном классе соединений, как сложные оксилипины. Впервые показана активность дивинилэфирсинтазы в листьях льна, выделены и охарактеризованы метаболиты дивинилэфирсинтазного пути – ( $\omega$ 5Z)-этеролева и ( $\omega$ 5Z)-этеролевова кислоты.

Впервые обнаружена новая группа галактолипидов, содержащих этерифицированные остатки ( $\omega$ 5Z)-этеролевова кислоты. Для этой группы соединений предложено тривиальное название линолипины. Были выделены, очищены и охарактеризованы четыре представителя этого семейства - 1-O- $\alpha$ -линоленоил-2-O-( $\omega$ 5Z)-этеролевоил-3-O- $\beta$ -D-галактопиранозил-*sn*-глицерин (линолипин А), 1,2-ди-O-( $\omega$ 5Z)-этеролевоил-3-O- $\beta$ -D-галактопиранозил-*sn*-глицерин (линолипин В), 1-O-этеролевоил-2-O-( $\omega$ 5Z)- $\alpha$ -линоленоил-3-O- $\beta$ -D-дигалактопиранозил-*sn*-глицерин (линолипин С) и 1,2-ди-O-( $\omega$ 5Z)-этеролевоил-3-O- $\beta$ -D-дигалактопиранозил-*sn*-глицерин (линолипин D).

Показано, что содержание линолипинов зависит от возраста растений. Кроме того, состав и содержание линолипинов претерпевает значительные изменения при инфицировании растений фитопатогенной бактерией *Pectobacterium atrosepticum* и замораживании-оттаивании.

**Научно-практическая значимость работы.** Изучение роли окислительного метаболизма C<sub>18</sub>-полиеновых кислот в жизнедеятельности растений имеет большое значение для понимания фундаментальных основ функционирования живых систем, а также для решения многих прикладных вопросов, связанных с использованием физиологически активных метаболитов как ростовых веществ, фунгицидов и др.

Полученные данные вносят вклад в понимание механизмов функционирования одной из ключевых сигнальных систем растения, способствующей его адаптации к неблагоприятным условиям.

Разработан комплекс подходов для выделения и очистки оксипипиносодержащих сложных липидов – потенциальных физиологически-активных веществ. Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в учреждениях медицинского, сельскохозяйственного, биологического и биотехнологического профилей, занимающихся современными проблемами липидологии, изучением защитных и сигнальных систем растений, а также в учебном процессе при чтении курсов лекций по биохимии, физиологии растений и молекулярной биологии в ВУЗах.

**Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования.** Работа проводилась с 2007 по 2010 гг. в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Липоксигеназы и цитохромы семейства CYP74: структура и роль в катализе биосинтеза оксипипинов – эндогенных биорегуляторов растений» (гос. регистрационный номер 01200901959). Исследования автора, как исполнителя данной тематики, поддерживаны грантами РФФИ, программой «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН и ВНШ академика А.Н.Гречкина. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы доложены на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008); на международном симпозиуме «Липиды и оксипипины растений» (Казань, 2008); на Всероссийской научной конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2009); на Международном симпозиуме «Регуляторные оксипипины» (Швейцария, Лозанна, 2009); на III Азиатском симпозиуме по растительным липидам (Япония, Йокогама, 2009); на 13-й международной Пущинской школе-конференции молодых ученых "Биология - наука XXI века" (Пущино, 2009); на Четвертом съезде ВМСО с международным участием (Москва, 2009); на Третьем Европейском симпозиуме по липидным медиаторам (Париж, 2010); на Третьем Международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2011).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 2 статьи в зарубежных рецензируемых изданиях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 219 источников, из них 211 зарубежных. В работе представлено 4 таблицы и 42 рисунка.

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 1.1 Материалы

В исследовании использовали немеченые линолевую и  $\alpha$ -линоленовую кислоты, а также соевую липоксигеназу тип V производства Sigma; боргидрид натрия и силилирующие реагенты производства Fluka (Букс, Швейцария); липазу *Rhizopus arrhizus* производства Boehringer (Мангейм, Германия). (9Z,11E,13S)-13-гидроперокси-9,11-октадекадиеновую кислоту (13-ГПОД) и (9Z,11E,15Z,13S)-13-гидроперокси-3-окса-9,11,15-октадекатриеновую кислоту (3-окса-13-ГПОТ) получали инкубацией линолевой и 3-окса- $\alpha$ -линоленовой кислот, соответственно, с соевой липоксигеназой при 0 °С, pH 9,0, при продолжительном барботировании кислородом, за которым следовали экстракция и очистка методом нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (НФ-ВЭЖХ). Растения льна (*Linum usitatissimum* L., сорт Новоторжский) выращивали в условиях вегетативного опыта в Казани летом 2007 и 2008 года. Для хранения листья льна фиксировали жидким азотом и сохраняли при -85 °С.

### 1.2 Инкубация бесклеточного препарата листьев и корней льна с линолевой кислотой, 13-ГПОД и с 3-окса-13-ГПОТ

Листья и корни 35-дневных растений льна (навеска массой 5г) измельчали в Tris/HCl буфере (pH 7,5) на гомогенизаторе Ultra-Turrax T25 при температуре +4 °С. Полученный гомогенат центрифугировали на 15000g в течение 15 мин. Супернатант декантировали и немедленно использовали в качестве ферментного препарата в инкубации. Ферментный препарат инкубировали с линолевой кислотой, 13-ГПОД или с 3-окса-13-ГПОТ в течение 40 мин при комнатной температуре.

### 1.3 Экстракция, предварительная очистка и дериватизация продуктов инкубации

Инкубационную смесь подкисляли уксусной кислотой до pH 6,0 и трижды экстрагировали смесью гексан – этилацетат 1:1 (по объему). Жирные кислоты выделяли из реакционной смеси и очищали для анализа при помощи LC-NH<sub>2</sub> картриджей Supelclean по методике, описанной ранее [Grechkin *et al.*, 2007], и силикагельного картриджа Supelclean. Продукты метилировали диазометаном CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, а также последовательно подвергали восстановлению боргидридом натрия, метилированию диазометаном и обработке силилирующей смесью, состоящей из пиридина – гексаметилдисилазан – триметилхлоросилана 2:1:2 (по объему).

### 1.4 Анализ и разделение продуктов

Метилвые эфиры продуктов (или восстановленные триметилсилильные производные) после предварительной очистки на картридже и дериватизации исследовали при помощи газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХМС). Также, метилвые эфиры продуктов предварительно разделяли при помощи НФ-ВЭЖХ.

### 1.5 Получение липидного экстракта

Для выделения липидного экстракта листья льна выдерживали в кипящем изопропанол в течение 10 минут. Затем полученный экстракт гомогенизировали.

Гомогенат центрифугировали в течение 5 минут при 8000 об/мин. Осадок повторно подвергали экстракции смесью гексан/изопропанол 1:1 и центрифугированию в тех же условиях. Надосадочную жидкость упаривали на три четверти по объему и отмывали от водорастворимых белков водой в делительной воронке. Отмытый экстракт усушивали и перерастворяли в смеси гексан/изопропанол 1:1.

### **1.6 Фракционирование липидного экстракта методом колоночной хроматографии**

Липидный экстракт разделяли на фракции, соответствующие разным классам сложных липидов, используя колоночную хроматографию. Фосфолипиды элюировали смесью хлороформ/ацетон 9:1, галактолипиды – смесью ацетон/метанол 9:1, нейтральные липиды – этанолом. Для дальнейшего разделения каждую фракцию упаривали на роторном испарителе и перерастворяли в гексане.

### **1.7 Тонкослойная хроматография**

Все фракции, собранные после колоночной хроматографии, прежде чем исследовать при помощи ВЭЖХ, предварительно анализировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Для этого использовали пластинки для ТСХ «Merck» (Германия) 20x20 см с концентрационной линией 2,5x20 см, на которую наносили образец.

### **1.8 Высокоэффективная жидкостная хроматография**

Галактолипидную фракцию экстракта листьев льна разделяли при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ. Собранные после ОФ-ВЭЖХ фракции, соответствующие отдельным пикам продуктов с поглощением  $\lambda_{\max}$  267 нм, повторно очищали при помощи нормально-фазовой ВЭЖХ. УФ-спектры соединений, очищенных с помощью ВЭЖХ, записывали с помощью диодно-матричного детектора SPD-M20A (Shimadzu).

### **1.9 Определение положения заместителей в глицериновом остатке молекул линолипинов**

Для определения положения заместителей в глицериновом остатке молекул линолипинов проводили ферментативный гидролиз липазой *Rhizopus arrhizus*. Реакционную смесь экстрагировали смесью гексан/этилацетат 1:1. Продукты реакции разделяли методом твердофазной экстракции на аминном картридже. Экстракт высушивали, перерастворяли в смеси хлороформ/изопропанол 2:1 и пропускали через картридж, отделяя тем самым фракцию лизолинолипина. Затем смесью этилацетат/уксусная кислота 98:2 с картриджа элюировали жирнокислотную фракцию. Остаток жирной кислоты идентифицировали при помощи газовой хромато-масс-спектрометрии. Лизолинолипин определяли при помощи масс-спектрометрии с ионизацией в электроспрее.

### **1.10 Содержание этерифицированных дивиниловых эфиров (ЭДЭ) в листьях льна в зависимости от возраста растений**

Галактолипиды выделяли из листьев 14-, 23-, 35-, 63- и 76-дневных растений льна, очищали при помощи колоночной хроматографии, как было описано выше, и повторно очищали с использованием ТСХ. Исследовали широкие зоны с  $R_f$  0,2-0,26 и 0,63-0,77,

содержащие дигалактозилдиацилглицерины (ДГДГ) и моногалактозилдиацилглицерины (МГДГ), соответственно. Из силикагеля пластинок липиды элюировали метанолом. УФ-спектры ДГДГ и МГДГ записывали с использованием спектрофотометра Cary 50 Bio. Количество ЭДЭ (галактолипид-связанной ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислоты) оценивалось по поглощению 267 нм.

### **1.11 Инфицирование растений льна фитопатогенной бактерией *Pectobacterium atrosepticum***

Клетки *P. atrosepticum* SCRI1043 культивировали на среде LB [Bell et al., 2004]. Титр культуры  $2 \times 10^9$  КОЕ/мл. Суспензию бактериальных клеток вводили инъекцией в стебель льна (по 10 мкл на стебель) на высоте 6 см от земли. Контрольным растениям вводили питательную среду. Листья собирали через 4 и 24 часа после инфицирования и фиксировали жидким азотом.

### **1.12 Влияние метилового эфира ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислоты и ( $2E$ )-гексенала на прорастание семян льна**

Семена льна стерилизовали 0,05% раствором марганцевокислого калия (30 мин), промывали дистиллированной водой и проращивали в темноте при 23<sup>0</sup>С. Для определения ростовой функции семена проращивали на растворах ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислоты и ( $2E$ )-гексенала в концентрациях 1 нМ и 1 мкМ в течение 20 часов (оптимального интервала времени для регистрации проросших семян). Семена льна проращивали в стерильных чашках Петри по сто семян в каждой. Каждый вариант опыта состоял из трех аналитических повторностей. О прорастании семян судили по проклеиванию. Используемые оксипирины растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) [Takeda et al., 1998]. В контроль добавляли равное опытному варианту количество растворителя.

### **1.13 Выделение гексенала листьями льна**

Для детектирования выделения гексенала листьями льна навеску листьев поместили в грушевидную делительную воронку, расположенную горизонтально. С одной стороны через плотно пришлифованную пробку с отводом в течение 20 минут подавали поток воздуха, с другой стороны все летучие соединения выводились в предварительно подготовленный NH<sub>2</sub>-картридж, на который был нанесен 0,2 мМ О-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)-гидроксиламин (ПФБ). Затем продукты взаимодействия летучих соединений с ПФБ элюировали с картриджа метанолом, экстрагировали гексаном и анализировали при помощи ГХМС.

### **1.14 Спектральные исследования**

УФ-спектры выделенных продуктов записывали на спектрофотометре Perkin Elmer Lambda 25. Также, УФ-спектры оксипиринов записывали с использованием детектора с диодной матрицей SPD-M20A (Shimadzu) в режиме реального времени в ходе разделения на ВЭЖХ. Анализы методом ГХМС проводили при помощи масс-спектрометра Shimadzu QP5050A, соединенного с газовым хроматографом Shimadzu GC-17A. Масс-спектры высокого разрешения очищенных галактолипидов

регистрировали с использованием масс-спектрометра Bruker microTOF-Q с ионизацией в электроспрее (ESI-MS). Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР и 2D-COSY очищенных соединений записывали на ЯМР-спектрометре Bruker Avance 400, 400 MHz, в растворителе  $\text{CD}_3\text{CN}$  при температуре 296 К.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 2.1 Изучение направленности метаболизма линолевой кислоты в листьях льна

Для предварительного исследования липоксигеназного пути, проводили инкубацию супернатанта гомогената листьев льна с линолевой кислотой [Chechetkin *et al.*, 2008]. Продукты инкубации подвергали метилированию, восстановлению водородом и силанизации. ГХМС анализ дериватизированных продуктов показал, что

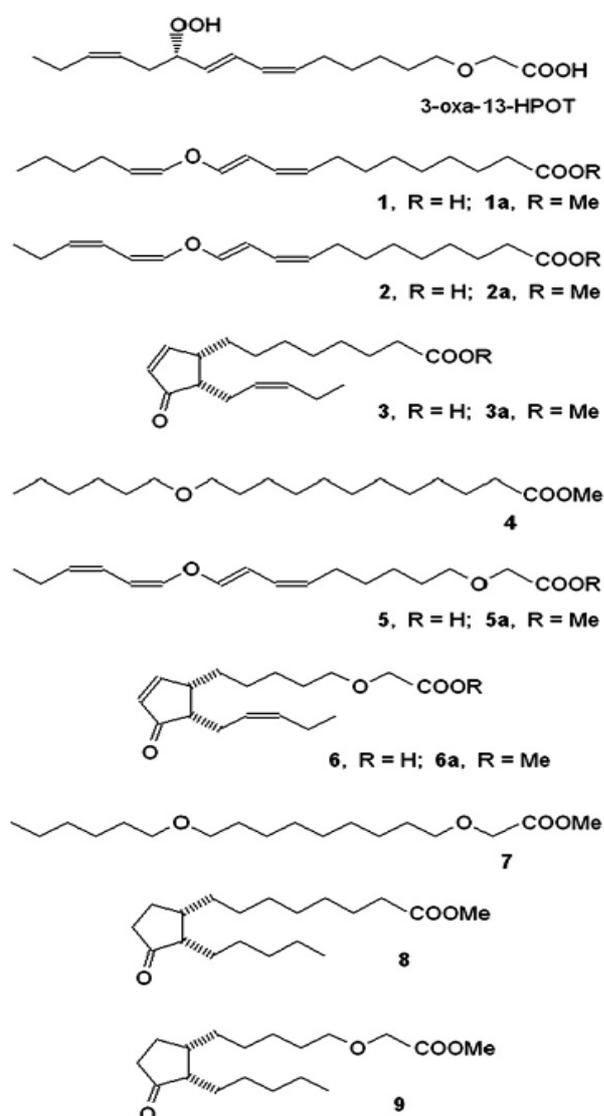


Рис.1. Продукты взаимодействия ДЭС льна с линолевой кислотой, ее 13-гидроперекисью и аналогом  $\alpha$ -линоленовой кислоты – 3-оха- $\alpha$ -линоленовой кислотой

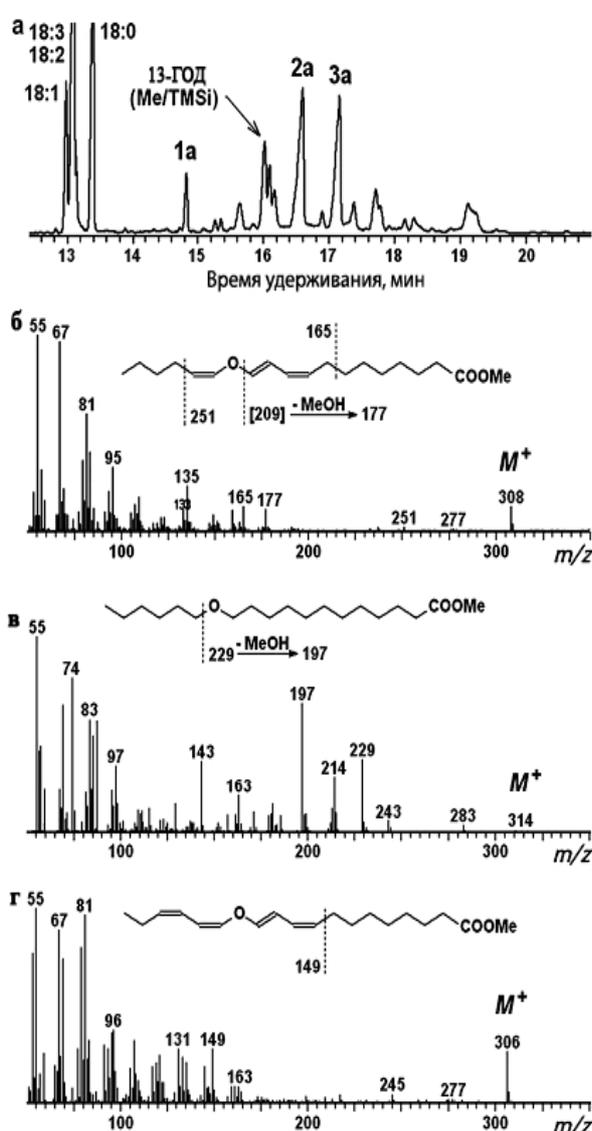


Рис.2. ГХМС анализ оксипинов, выделенных после инкубации 13-ГПОД с супернатантом гомогената листьев льна. (а) Хроматограмма по полному ионному току; (б), (в), (г) – масс-спектры и схемы фрагментаций соединений 1а, 4 и 2а, соответственно

преобладающей гидроксикислотой была 13-гидроксистеариновая кислота. Это говорит о том, что основным продуктом липоксигеназного окисления была 13-гидроперекись линолевой кислоты (13-ГПОД). Таким образом, в листьях льна преобладает 13-липоксигеназная активность. Наряду с гидроперекисями жирных кислот, в ходе ГХМС анализа выделенных оксипинов обнаружены соединения **1a**, **2a** и **3a** (Рис.1).

Для дальнейшего изучения путей метаболизма проводили инкубацию 13-ГПОД с супернатантом гомогената листьев льна. В результате ГХМС анализа триметилсилильных метиловых эфиров продуктов инкубации обнаружены оксипины **1a**, **2a** и **3a**.

## 2.2 Идентификация соединения 1

Соединение **1a** (Рис.2а) являлось основным продуктом превращения линолевой кислоты *in vitro*. Для изучения его структуры регистрировали масс-спектр электронного удара. Картина масс-спектрометрической фрагментации продукта **1a** (Рис.2б) оказалась идентична описанным ранее фрагментациям дивиниловых эфиров (9*Z*,11*E*,1'*E*)-12-(1'-гексенилокси)-9,11-додекадиеновой (этеролевой) [Grechkin *et al.*, 1997] и ( $\omega$ 5*Z*)-этеролевой кислот [Hamberg,1998].

Каталитическое восстановление водородом соединения **1a** привело к образованию продукта **4** с характерической фрагментацией (Рис. 2в). Эти данные позволили идентифицировать соединение **4** как 13-окса-нонадекановую кислоту.

Очищенное соединение **1a** обладает специфическим поглощением в УФ-диапазоне с максимумом при 250 нм, что характерно для этеролевой кислоты [Grechkin *et al.*, 1995; Hamberg; 1998]. Для окончательной идентификации и определения геометрии двойных связей продукта **1a** регистрировали спектры <sup>1</sup>H-ЯМР и 2D-COSY. Данные демонстрируют, что в структуре присутствуют три двойные связи с конфигурацией (1*Z*,3*E*,1'*Z*). Значение константы спин-спинового взаимодействия (6 Гц) показывает, что 1'-двойная связь имеет цис-конфигурацию. На основе полученных данных сделан вывод, что соединение **1** является (9*Z*,11*E*,1'*Z*)-12-(1'-гексенилокси)-9,11-додекадиеновой, то есть ( $\omega$ 5*Z*)-этеролевой кислотой.

## 2.3 Идентификация соединения 2

Соединение **2** поглощает в УФ-диапазоне с максимумом при 267 нм. Масс-спектр электронного удара метилового эфира продукта **2** показал молекулярный ион с *m/z* 306 (Рис.2г) и картину фрагментации, схожую с фрагментацией метиловых эфиров этероленовой [Grechkin *et al.*, 1997] и ( $\omega$ 5*Z*)-этероленовой кислот [Hamberg, 1998]. Каталитическое восстановление соединения **2a** привело к образованию уже описанной выше 13-окса-нонадекановой кислоты. Таким образом, исходя из разницы масс молекулярных ионов соединений **4** и **2a**, сделан вывод, что последнее имеет четыре двойные связи. Их положение и геометрию устанавливали на основании спектров <sup>1</sup>H-ЯМР и 2D-COSY (Рис.3d). На основании полученных данных сделан вывод, что соединение **2** является (9*Z*,11*E*,1'*Z*,3'*Z*)-12-(1',3'-гексадиенилокси)-9,11-додекадиеновой, то есть ( $\omega$ 5*Z*)-этероленовой, кислотой. Для дальнейшего подтверждения активности

ДЭС *in vitro* и биосинтеза ( $\omega$ 5Z)-этеролоеновой кислоты в листьях льна провели инкубацию гомогената листьев льна с 13-гидроперекисью 3-окса- $\alpha$ -линоленовой кислоты. 3-Окса- $\alpha$ -линоленовая кислота – это недавно синтезированный и охарактеризованный аналог  $\alpha$ -линоленовой кислоты, используемый в качестве метки для изучения биосинтеза оксипинов.

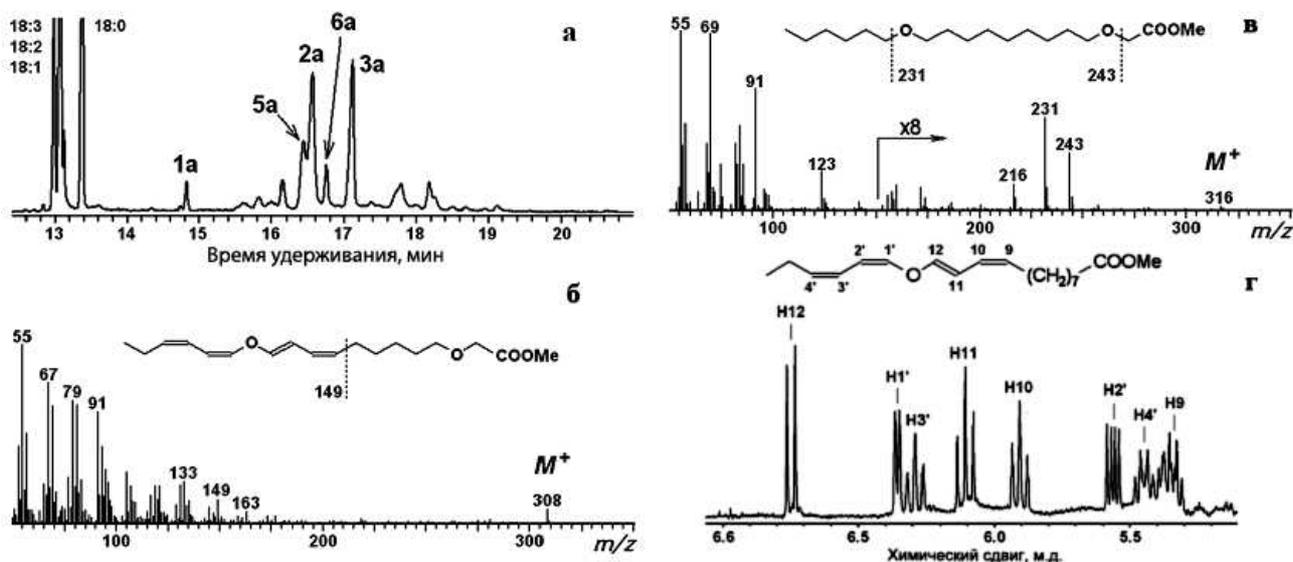


Рис.3. Анализ оксипинов, выделенных после инкубации 3-окса-13-ГПОТ с супернатантом 15000 г гомогената листьев льна. (а) Хроматограммы продуктов по полному ионному току; (б), (в) – масс-спектры и схемы фрагментации соединений **5a** и **7**, соответственно; (г) данные  $^1\text{H}$  ЯМР для соединения **2a** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , 298 K)

Провели инкубацию супернатанта гомогената с 3-окса-13-ГПОТ. Анализ метиловых эфиров продуктов инкубации методом ГХМС позволил обнаружить (наряду с эндогенным метиловым эфиром ( $\omega$ 5Z)-этеролоеновой кислоты) присутствие новых продуктов **5** и **6** в виде их метиловых эфиров **5a** и **6a** (Рис.3). По данным масс-спектра электронного удара соединения **5a** предложена схема его фрагментации, изображенная на Рис.3б. Каталитическое восстановление соединения **5a** привело к образованию продукта **7**, по масс-спектрометрической фрагментации которого установили, что это 3,13-диокса-нонадекановая кислота. Полученные результаты подтверждают идентификацию соединения **5** как 3-окса-( $\omega$ 5Z)-этеролоеновую кислоту.

Эксперимент с 3-окса-13-ГПОТ подтверждает присутствие активности ДЭС и эндогенной ( $\omega$ 5Z)-этеролоеновой кислоты в листьях льна. Сравнение хроматограмм по полному ионному току показало, что содержание эндогенной ( $\omega$ 5Z)-этеролоеновой кислоты в листьях достигает 10% от общего количества свободных жирных кислот.

## 2.4 Идентификация соединения **3**

Масс-спектр метилового эфира соединения **3** выявил характеристическую картину фрагментации, идентичную описанной для метилового эфира *cis*-12-оксо-10,15-фитодиеновой кислоты (12-оксо-ФДК) [Hamberg, 1998]. Каталитическое восстановление над платиной привело к образованию соединения **8**. Его масс-фрагментация (Рис. 4в) свидетельствовала о том, что соединение **8** представляет собой 12-оксо-фитоновую кислоту – полностью восстановленный аналог 12-оксо-ФДК. Таким

образом, полученные данные показали, что соединение **3a** является метиловым эфиром *цис*-12-оксо-ФДК.

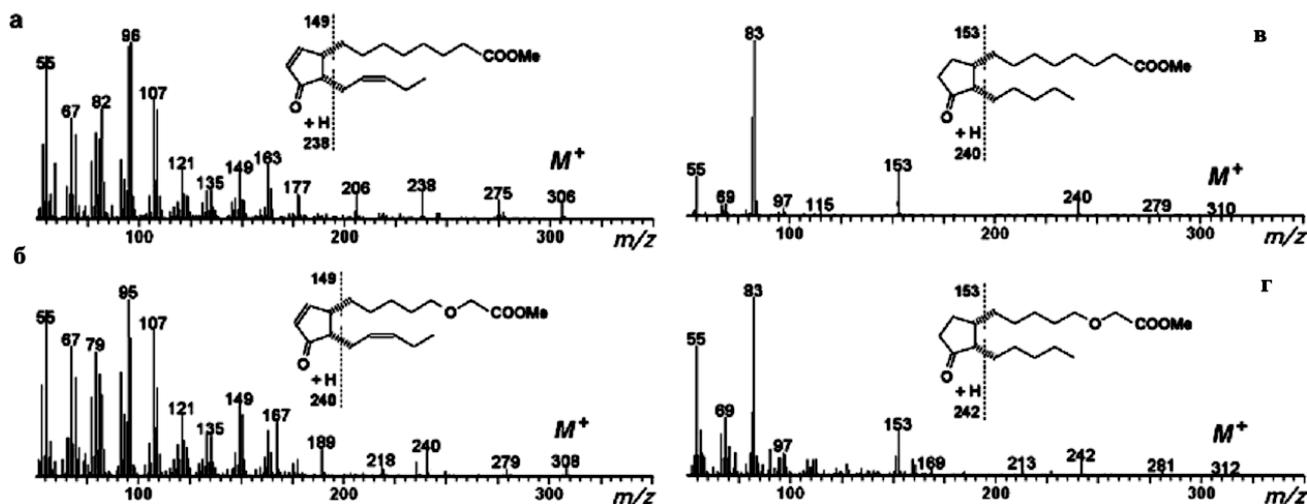


Рис.4. Масс-спектры и схемы фрагментации для соединений **3a** (а); **6a** (б); **8** (в) и **9** (г). Соединения **8** и **9** являются продуктами каталитического восстановления соединений **3a** и **6a**, соответственно

В результате инкубации супернатанта гомогената листьев льна с 3-окса-13-ГПОТ наряду с соединением **3** и дивиниловыми эфирами образовался продукт **6**, масс-спектр метилового эфира которого и схема фрагментации представлены на Рис. 4.

Полученные данные позволили установить, что соединение **6** является 3-окса-12-оксо-ФДК, то есть производным 12-оксо-ФДК, полученным в результате ферментативного превращения 3-окса-13-ГПОТ. Каталитическое восстановление соединения **6a** привело к образованию соединения **9**, масс-спектр и схема фрагментации которого позволили идентифицировать вещество как 3-окса-12-оксо-фитоновую кислоту. Полученные данные показывают, что добавленная экзогенно 3-окса-13-ГПОТ послужила предшественником циклопентенона **6**, 3-окса-12-оксо-ФДК.

## 2.5 Биосинтез оксипинов *in vitro* в гомогенате корней льна

Проводили инкубацию супернатанта гомогената корней льна с линолевой кислотой. ГХМС анализ триметилсилильных производных метиловых эфиров продуктов инкубации показал присутствие  $\alpha$ -кетона как основного продукта и небольшое количество метилового эфира 12-оксо-ФДК. По характеристической картине фрагментации  $\alpha$ -кетона установлена его структура – (9*Z*)-12-оксо-13-гидрокси-9-октадеценовая кислота. Дивиниловые эфиры в корнях не обнаружены.

## 2.6 Изучение состава липидного экстракта листьев льна

Липидный экстракт листьев 35-дневных растений льна разделяли на классы при помощи колоночной хроматографии на силикагеле: нейтральные липиды, галактолипиды, фосфолипиды [Chechetkin *et al.*, 2009]. УФ-спектр фосфолипидной фракции не показал присутствия этерифицированных 12-оксо-ФДК ( $\lambda_{\max}$  221 нм) и ( $\omega$ 5*Z*)-этеролоеновой кислоты ( $\lambda_{\max}$  267 нм).

Моногалактозилдиацилглицерин (МГДГ) и дигалактозилдиацилглицерин (ДГДГ) выделены из галактолипидной фракции при помощи микропрепаративной тонкослойной

хроматографии. УФ-спектр как МГДГ, так и ДГДГ показал сильное поглощение при 267 нм и отсутствие поглощения с максимумом 221 нм, что позволило предположить присутствие дивинилового эфира ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислоты, связанной с галактолипидами.

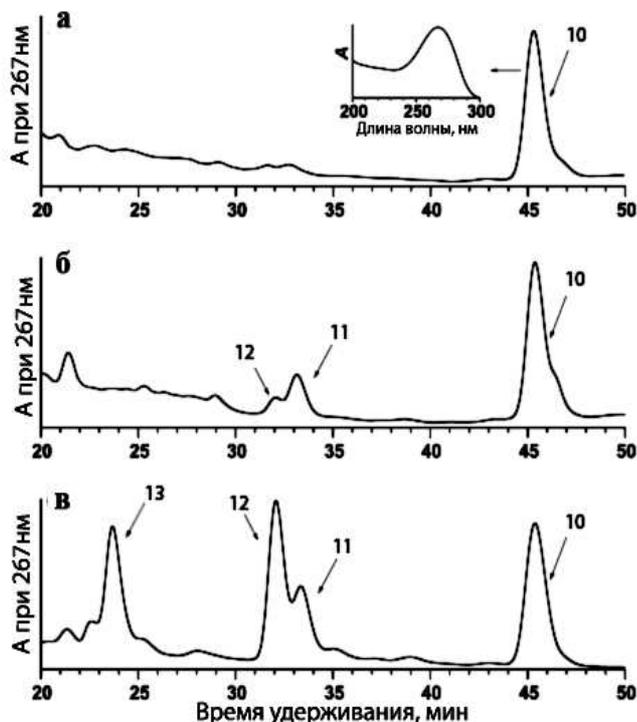


Рис.5. ОФ-ВЭЖХ профиль молекулярных видов галактолипидов листьев льна. А) неинфицированное растение, В) инфицированное растение (через 4 часа после инфицирования), С) инфицированное растение (через 24 часа после инфицирования)

наряду с молекулярными видами **10** и **11**, наблюдали появление соединений **12** и **13**. Все упомянутые продукты обладали сильным поглощением в УФ-диапазоне с максимумом 267 нм, что свидетельствовало об обнаружении этерифицированных дивиниловых эфиров (Рис.5).

Ни в инфицированных растениях, ни в контрольных не наблюдалось присутствие молекулярных видов галактолипидов с максимумом поглощения 221 нм. Это говорит об отсутствии арабидопсидов или схожих галактолипидов, содержащих этерифицированную 12-оксо-ФДК. ГХМС анализ метиловых эфиров жирных кислот, полученных в результате переэтерификации галактолипидов, не показал присутствия 12-оксо-ФДК. Подробнее инфицирование растений льна клетками *Pectobacterium atrosepticum* рассматривается в главе **2.13**.

Для дальнейшего установления структуры при помощи обращено-фазовой ВЭЖХ выделяли соединения **10**, **11**, **12** и **13** и очищали с использованием нормально-фазовой ВЭЖХ.

Для проверки этой гипотезы, разделяли молекулярные виды галактолипидов при помощи обращено-фазовой ВЭЖХ, используя запись УФ-спектра в режиме реального времени с помощью диодно-матричного детектора. В галактолипидной фракции, выделенной из неинфицированных листьев льна, наблюдался только один молекулярный вид, поглощающий при 267 нм. Инфицирование растений клетками фитопатогенной бактерии *Pectobacterium atrosepticum* привело к изменению галактолипидного профиля. Через 4 часа после инфицирования в липидном профиле появились два новых молекулярных вида галактолипидов, а через 24 часа наблюдались более значительные изменения. В частности отмечалась депигментация листьев. Кроме того,

## 2.7 Идентификация соединения 10, линолипина А

УФ-спектр очищенного соединения **10** показал поглощение с максимумом при 267нм и был идентичен вышеописанному дивиниловому эфиру ( $\omega 5Z$ )-этеролоеновой кислоте [Hamberg, 1998].

В результате ГМХС анализа метиловых эфиров жирных кислот – полученных переэтерификацией соединения **10** – были выявлены метиловые эфиры  $\alpha$ -линоленовой и ( $\omega 5Z$ )-этеролоеновой кислот. Чтобы подтвердить структуру ( $\omega 5Z$ )-этеролоеновой кислоты, мы изучили ее масс-спектр. По данным масс-спектрометрии электронного удара, спектр метилового эфира продукта переэтерификации соединения **10** идентичен спектру ранее описанного метилового эфира ( $\omega 5Z$ )-этеролоеновой кислоты. Кроме того, по данным ГХМС анализа, каталитически восстановленные метиловые эфиры жирных кислот после переэтерификации представляли собой метилстеарат и метиловый эфир 13-оксанадекановой кислоты. Образование последнего соединения указывает на присутствие ( $\omega 5Z$ )-этеролоеновой кислоты среди продуктов переэтерификации.

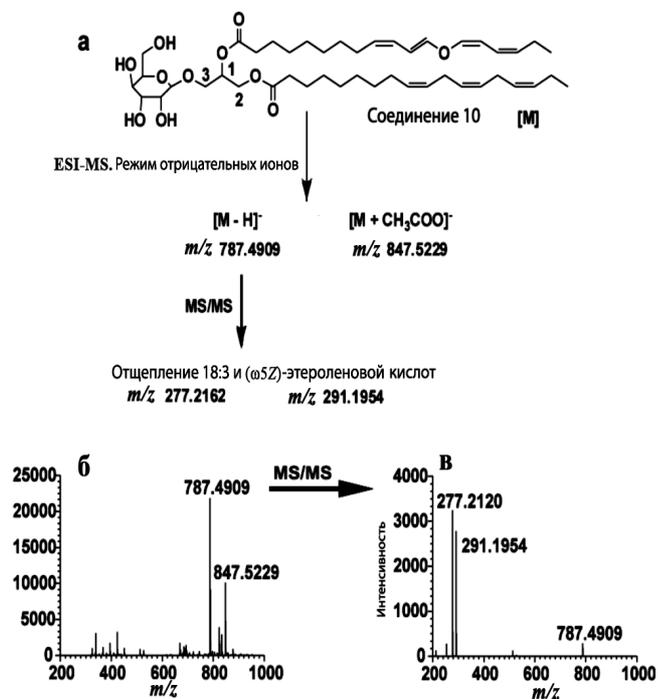


Рис.6. Данные масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электроспреем и MS/MS для соединения **10**. а) Схема фрагментации иона  $[M-H]^-$ ,  $m/z$  787,4909 в режиме отрицательных ионов и MS/MS; б) полный ESI-масс-спектр соединения **10** в режиме отрицательных ионов; в) спектр MS/MS от иона  $m/z$  с 787,4909

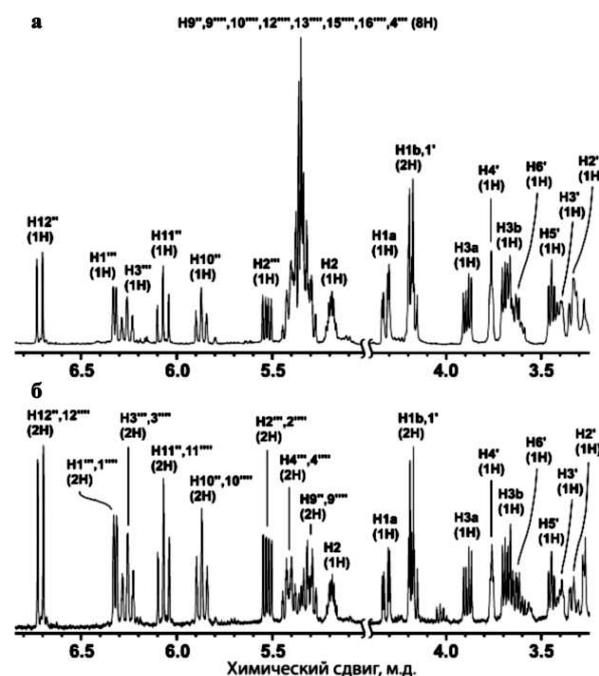


Рис.7. Область низких полей спектра  $^1H$  ЯМР линолипинов. Частичный спектр для а) линолипина А и б) линолипина В. Сигналы выше 5,25 м.д. принадлежат олефиновым протонам, а ниже 5,25 м.д. – протонам глицеринового и галактозилыного остатков. Отнесение всех сигналов было установлено по данным 2D-COSY

Масс-спектр соединения **10** с ионизацией в электроспрее в режиме отрицательных ионов (Рис.6) дал квазимолекулярный ион  $[M-H]^-$  с  $m/z$  787,4909 ( $C_{45}H_{71}O_{11}$ ) и аддукт  $[M+CH_3COO]^-$  с  $m/z$  847,5229 ( $C_{47}H_{75}O_{13}$ ). MS/MS спектр от иона с  $m/z$  787,4909 показал ионы с  $m/z$  291,1954 ( $C_{18}H_{27}O_3$ , анион ( $\omega 5Z$ )-этеролоеновой кислоты) и с  $m/z$  277,2120 ( $C_{18}H_{29}O_2$ , анион  $\alpha$ -линоленовой кислоты). В результате съемки в режиме

положительных ионов был обнаружен ион  $[M+NH_4]^+$  с  $m/z$  806,5418 ( $C_{45}H_{76}O_{11}N$ ). MS/MS от иона с  $m/z$  806,5418 привела к образованию характеристического фрагмента с  $m/z$  529,3287 ( $C_{27}H_{47}O_9N$ , потеря остатка  $\alpha$ -линоленовой кислоты).

В результате обработки данных МС и ЯМР (Рис.7а) установлено, что соединение **10** представляет собой моногалактозилдиацилглицерин (МГДГ) с брутто-формулой  $C_{45}H_{72}O_{11}$ , содержащий один остаток  $\alpha$ -линоленовой кислоты и один – ( $\omega 5Z$ )-этеролоеновой. Однако, ни данные МС, ни ЯМР не позволяют установить точное положение остатков  $\alpha$ -линоленовой и ( $\omega 5Z$ )-этеролоеновой кислот в молекуле глицерина.

С тем, чтобы уточнить их расположение, проводили региоспецифичный гидролиз с использованием *sn*-1-специфичной липазы *Rhizopus arrhizus*. По данным ГХМС анализа, в результате действия липазы отщеплялась только  $\alpha$ -линоленовая кислота. В то же время, при обработке соединения **10** неспецифичной липазой *Mucor javanicus* высвобождались обе жирные кислоты, и  $\alpha$ -линоленовая, и ( $\omega 5Z$ )-этеролоеновая. Полученные данные демонстрируют, что остатки  $\alpha$ -линоленовой и ( $\omega 5Z$ )-этеролоеновой кислот этерифицированы в положениях *sn*-1 и *sn*-2, соответственно. Полученные для соединения **10** результаты, показывают, что вещество представляет собой 1-*O*- $\alpha$ -линоленоил-2-*O*-( $\omega 5Z$ )-этеролоеноил-3-*O*- $\beta$ -D-галактопиранозил-*sn*-глицерин. Это первый представитель нового семейства сложных оксипинов – галактолипидов, содержащих этерифицированные дивиниловые эфиры. Нами предложено тривиальное название линолипин А для соединения **10** и общее название линолипины для этого нового семейства сложных оксипинов.

## 2.8 Идентификация соединения **12**, линолипина В

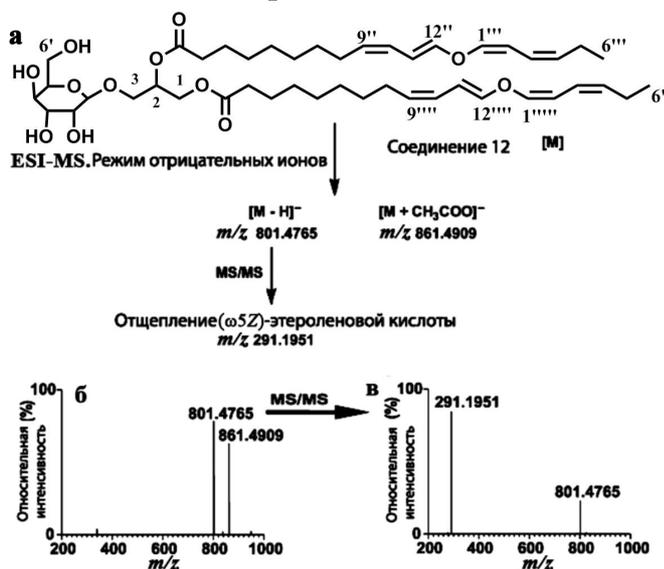


Рис.8. Данные масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией в электроспрее и MS/MS для соединения **12**. а) Схема фрагментации иона  $[M-H]^-$ ,  $m/z$  801,4765 в режиме отрицательных ионов и MS/MS; б) полный ESI-масс-спектр соединения **12** в режиме отрицательных ионов; в) спектр MS/MS от иона  $m/z$  с 801,4765

Соединение **12** имело спектр УФ поглощения, идентичный спектру соединения **10**. Однако, в отличие от линолипина А, в результате переэтерификации соединения **12**, наблюдался только один продукт, а именно метиловый эфир ( $\omega 5Z$ )-этеролоеновой кислоты. Его идентификация подтверждена образованием 13-окса-нонадекановой кислоты в результате каталитического восстановления продукта переэтерификации. Масс-спектр соединения **12** (электроспрей) в режиме отрицательных ионов (Рис.8) дал квазимолекулярный ион  $[M-H]^-$  с  $m/z$  801,4765 ( $C_{45}H_{69}O_{12}$ ) и ион аддукта  $[M+CH_3COO]^-$  с  $m/z$  861,4909

(C<sub>47</sub>H<sub>73</sub>O<sub>14</sub>). В режиме MS/MS квазимолекулярный ион  $m/z$  801,4765 диссоциировал с образованием иона при  $m/z$  291,1951 (C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>O<sub>3</sub>, анион ( $\omega$ 5Z)-этероленовой кислоты). При съемке в режиме положительных ионов наблюдался ион [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> с  $m/z$  820,5231 (C<sub>45</sub>H<sub>76</sub>O<sub>11</sub>N). По результатам полученных данных масс-спектрометрии высокого разрешения, а также данных MS и MS/MS, соединение **12** представляет собой моногалактозилдиацилглицерин с брутто-формулой C<sub>45</sub>H<sub>70</sub>O<sub>12</sub>, в структуре которого содержится два остатка ( $\omega$ 5Z)-этероленовой кислоты.

Данные <sup>1</sup>H ЯМР и 2D-COSY для соединения **12** оказались весьма схожими с таковыми для линолипина А (Рис.7б). Во-первых, в спектре присутствовали идентичные сигналы глицерина и  $\beta$ -D-галактопиранозильного остатка. Во-вторых, присутствовали те же восемь сигналов олефиновых протонов остатка ( $\omega$ 5Z)-этероленовой кислоты в области 5,25 – 5,80 м.д. Однако, наблюдались значительные отличия. В частности, в спектре соединения **12** отсутствовал мультиплетный сигнал олефиновых протонов  $\alpha$ -линоленовой кислоты. Это указывает на отсутствие  $\alpha$ -линолената в составе соединения **12**, что полностью согласуется с данными MS и MS/MS. Кроме того, интегральная интенсивность олефиновых сигналов в спектре соединения **12** вдвое выше интенсивности сигналов тех же протонов соединения **10**. Это говорит о том, что соединение **12** содержит два остатка ( $\omega$ 5Z)-этероленовой кислоты этерифицированных в положениях *sn*-1 и *sn*-2 остатка глицерина.

По результатам полученных данных установлено, что соединение **12** представляет собой МГДГ, содержащий два остатка ( $\omega$ 5Z)-этероленовой кислоты, то есть 1,2-ди-*O*-( $\omega$ 5Z)-этероленоил-3-*O*- $\beta$ -D-галактопиранозил-*sn*-глицерин. Мы предложили для этого соединения тривиальное название линолипин В.

## 2.9 Идентификация соединения **11**, линолипина С

Как и первые два линолипина, соединение **11** поглощает в УФ-диапазоне с  $\lambda_{\max}$  267 нм. ГХМС анализ метиловых эфиров продуктов переэтерификации показал наличие в структуре соединения **11** и  $\alpha$ -линоленовой, и ( $\omega$ 5Z)-этероленовой кислот.

Масс-спектр соединения **11** с ионизацией в электроспрее в режиме положительных ионов показал пик аддукта молекулярного иона с аммонием (Рис.9) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> с  $m/z$  968,6018 (C<sub>51</sub>H<sub>86</sub>O<sub>16</sub>N). По данным <sup>1</sup>H ЯМР и 2D-COSY это соединение сходно с линолипином А и имеет идентичные сигналы протонов  $\alpha$ -линоленовой и ( $\omega$ 5Z)-этероленовой кислот, однако дополнительные сигналы протонов в области от 2,8 до 4,7 м.д. говорят о наличии второго остатка галактозы в молекуле линолипина.

На рис.10 приведены спектры <sup>1</sup>H ЯМР линолипинов А и С. Хорошо виден характерный пик сигнала протона при первом атоме углерода второго остатка галактозы H1''''(4,84 м.д.). Сигналы остальных протонов, относящиеся ко второму остатку галактозы, перекрываются с сигналами протонов глицерина и первого остатка галактозы. Благодаря отнесению кросс-пиков спектра 2D-COSY и данных одномерного ЯМР удалось расшифровать этот фрагмент спектра. Пики протонов жирнокислотной части соединения **11** идентичны аналогичным пикам линолипина А.

Таким образом, исследуемое соединение представляет собой дигалактозилдиацилглицерин, у которого один заместитель –  $\alpha$ -линоленовая кислота, а другой – ( $\omega$ 5Z)-этеролоновая. Для того чтобы установить положение заместителей в молекуле глицерина, проводился ферментативный гидролиз соединения **11** специфичной липазой *Rhizopus arrhizus*. В результате ГХМС анализа метиловых эфиров

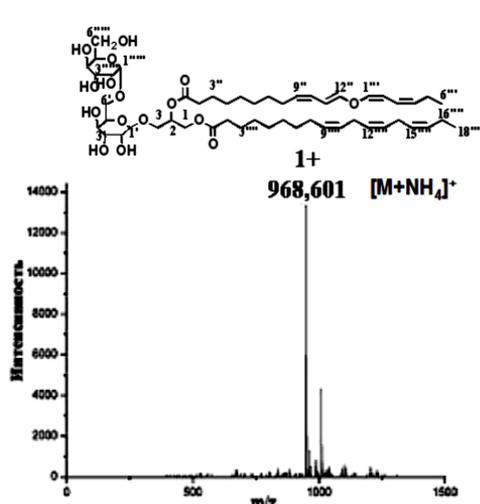


Рис.9. Данные масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией в электроспрее для соединения **11**

жирных кислот – продуктов гидролиза – установлено, что из *sn*-1 положения гидролизуется ( $\omega$ 5Z)-этеролоновая кислота. Таким образом, соединение **11** представляет собой 1-*O*-( $\omega$ 5Z)-этеролоноил-2-*O*- $\alpha$ -линоленоил-3-*O*- $\beta$ -D-дигалактопиранозил-*sn*-глицерин.

## 2.9 Идентификация соединения **13**, линолипина D

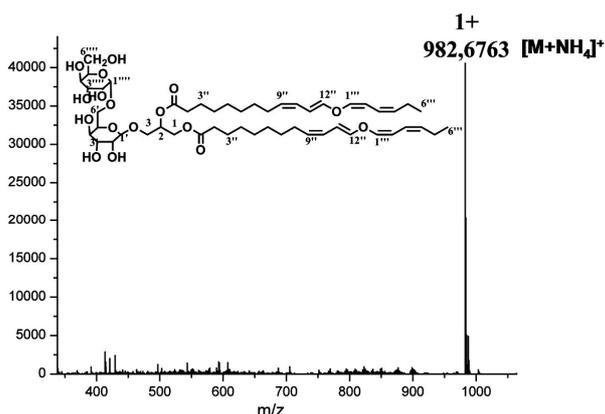


Рис.11. Данные масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией в электроспрее для соединения **13**

же области спектра ЯМР для линолипина В. Интенсивность сигналов протонов ( $\omega$ 5Z)-этеролоновой, а также отсутствие сигналов  $\alpha$ -линоленовой кислот в области спектра, характерной для олефинов, указывает на присутствие двух остатков ( $\omega$ 5Z)-

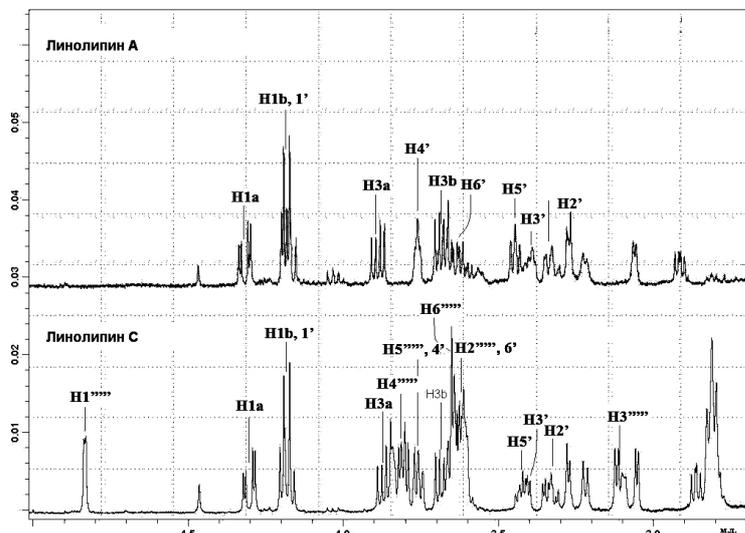


Рис.10. Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР линолипинов А (сверху) и С (снизу)

Соединение **13**, как и три предыдущих, показало в УФ-спектре максимум поглощения при 267нм. ESI-масс-спектр соединения **13** дал аддукт  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  с  $m/z$  982,6. По данным масс-спектрометрии высокого разрешения (Рис.11) точная масса иона  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  составила 982,6763, что соответствует брутто-формуле  $\text{C}_{51}\text{H}_{84}\text{O}_{17}\text{N}$ . Таким образом, молекулярный ион соединения **13** имеет брутто-формулу  $\text{C}_{51}\text{H}_{80}\text{O}_{17}$ . Олефиновая часть  $^1\text{H}$  ЯМР спектра соединения **13** (Рис. 12) подобна той же

области спектра ЯМР для линолипина В. Интенсивность сигналов протонов ( $\omega$ 5Z)-этеролоновой, а также отсутствие сигналов  $\alpha$ -линоленовой кислот в области спектра, характерной для олефинов, указывает на присутствие двух остатков ( $\omega$ 5Z)-

этероленовой кислоты. Часть спектра, характерная для сигналов протонов галактозы,

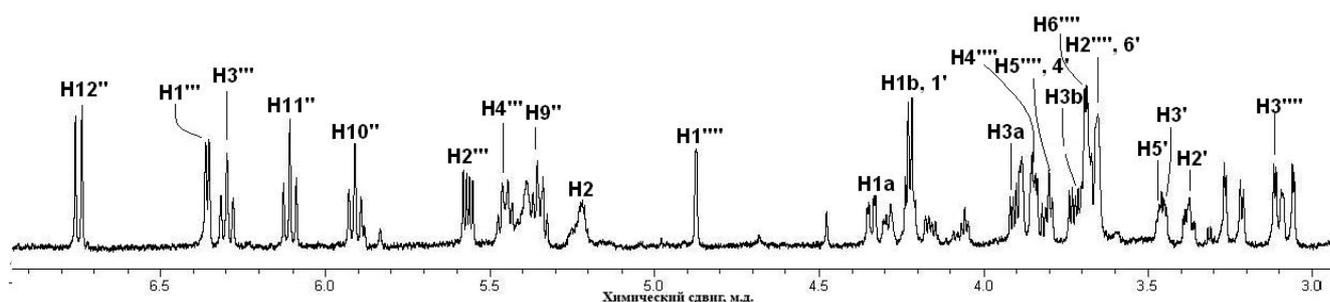


Рис.12.  $^1\text{H}$  ЯМР спектр соединения **13**

показывает, что в структуре соединения **13** присутствует два остатка галактозы. В частности, четко виден пик сигнала протона при первом атоме углерода второго остатка галактозы 4,83 м.д. Идентификация сигналов протонов подтверждается данными спектра 2D-COSY. Таким образом, соединение **13** представляет собой дигалактозилдиацилглицерин, содержащий два остатка ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислоты, то есть 1,2-ди-*O*-( $\omega 5Z$ )-этероленоил-3-*O*- $\beta$ -D-дигалактопиранозил-*sn*-глицерин.

## 2.10 Изменение галактолипидного профиля в результате повреждения листьев льна однократным циклом замораживания–оттаивания

По данным литературы [Andersson et al., 2006], образование новых сложных оксипинов, ацилированных по галактозе, происходит в ответ на реакцию сверхчувствительности, вызванной распознаванием  $\alpha\text{v}\gamma$ -белков микробного происхождения. При этом авторы отмечали, что в их биосинтезе принимает участие фермент МГДГ-ацилтрансфераза. Ранее считалось, что этот фермент не имеет физиологического значения, поскольку он активируется при нефизиологических условиях, такие как низкий pH и незабуференная система. В нашем случае быстрое замораживание в жидком азоте с последующим оттаиванием в течение 30 минут при температуре  $23^\circ\text{C}$  позволяет моделировать процесс клеточного повреждения

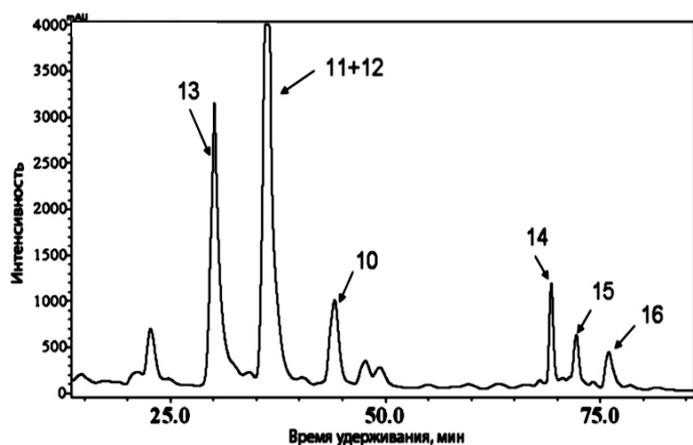


Рис.13. Галактолипидный профиль экстракта листьев льна после однократного цикла замораживания-оттаивания

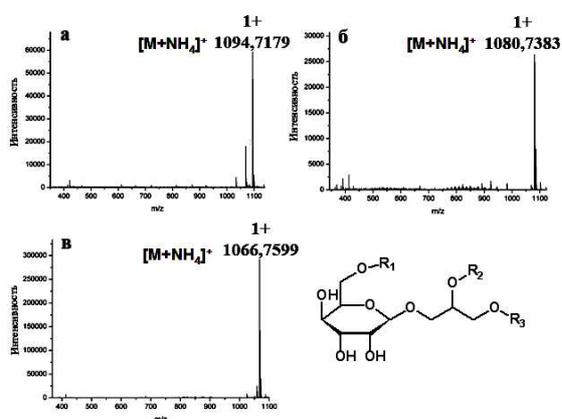


Рис.14. Масс-спектры высокого разрешения соединений **14** (а), **15** (б) и **16** (в).  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  – остатки  $\alpha$ -линоленовой или ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислот.

[Angersbach *et al.*, 2002]. Проведенный нами ВЭЖХ анализ показал, что в результате повреждения листьев льна в этих условиях происходит как образование уже описанных линолипинов А, В, С и D, так и появление в галактолипидном профиле новых, менее полярных соединений **14**, **15** и **16** (Рис.13).

Все эти соединения имеют максимум поглощения в УФ-диапазоне при 267 нм, что говорит о присутствии, по крайней мере, одного остатка ( $\omega$ 5Z)-этеролоеновой кислоты в их структуре. При помощи масс-спектрометрии высокого разрешения (Рис.14) установлены точные массы этих соединений. На основании данных хроматографии, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии выдвинуто предположение, что соединения **14**, **15** и **16** являются ацилированными по галактозе моногалактозилдиацилглицеринами, имеющими в своей структуре три, два и один остатка ( $\omega$ 5Z)-этеролоеновой кислоты, соответственно.

### 2.11 Возрастная зависимость содержания линолипинов в листьях льна

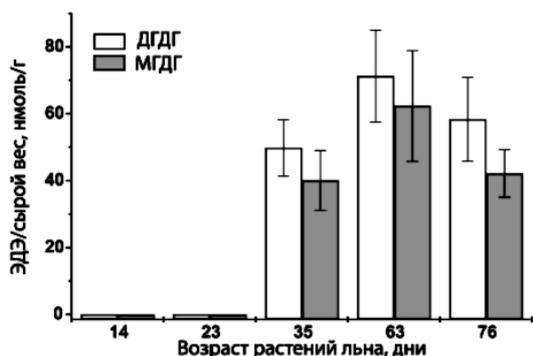


Рис.15. Содержание линолипинов в листьях льна. Содержание ЭДЭ оценивалось по УФ-поглощению фракций МГДГ и ДГДГ с  $\lambda_{\text{max}}$  267 нм

До сих пор малоизученным остается вопрос о физиологической роли сложных оксипинов, особенно их участие в онтогенезе. Мы изучили содержание линолипинов в листьях льна на различных стадиях развития растения (Рис.15).

В молодых листьях льна (14- и 23-дневных) не наблюдалось присутствие этерифицированных дивиниловых эфиров. Однако, линолипины были обнаружены в листьях льна на более поздних стадиях онтогенеза, включая период быстрого роста (35 дней), бутонизацию (63 дня) и цветение (76 дней). Содержание этерифицированных дивиниловых эфиров (ЭДЭ) в листьях на этих стадиях развития растений составляло 50-71 нмоль на грамм сырого веса.

Отсутствие ЭДЭ в молодых листьях согласуется с отсутствием свободной ( $\omega$ 5Z)-этеролоеновой кислоты. В связи с этой зависимостью содержания ЭДЭ и активности ДЭС нам представлялось интересным изучить влияние метилового эфира ( $\omega$ 5Z)-этеролоеновой кислоты и (2E)-гексенала (продукт деградации ( $\omega$ 5Z)-этеролоеновой кислоты) на прорастание семян льна.

### 2.12 Влияние метилового эфира ( $\omega$ 5Z)-этеролоеновой кислоты и (2E)-гексенала на прорастание семян льна

Степень прорастания семян, замоченных на 20 часов в присутствии метилового эфира ( $\omega$ 5Z)-этеролоеновой кислоты (1нМ и 1мкМ), уменьшалась вдвое по сравнению с контролем (Рис.16). (2E)-гексеналь (1нМ и 1мкМ) вызывал 49 и 100% ингибирование прорастания семян, соответственно. Эффекты ингибирования были статистически

достоверными ( $P < 0.05$ ). Таким образом, взаимосвязь между онтогенезом и содержанием линолипинов представляется неслучайной.

### 2.13 Влияние инфицирования на содержание линолипинов

По данным литературы известно, что уровень содержания арабидопсидов увеличивается при инфицировании или поранении растения [Andesson *et al.*, 2006]. Это побудило нас исследовать влияние инфицирования на содержание линолипинов в листьях льна. Показано, что инфицирование растений льна бактерией *Pectobacterium atrosepticum* индуцирует накопление ЭДЭ в листьях.

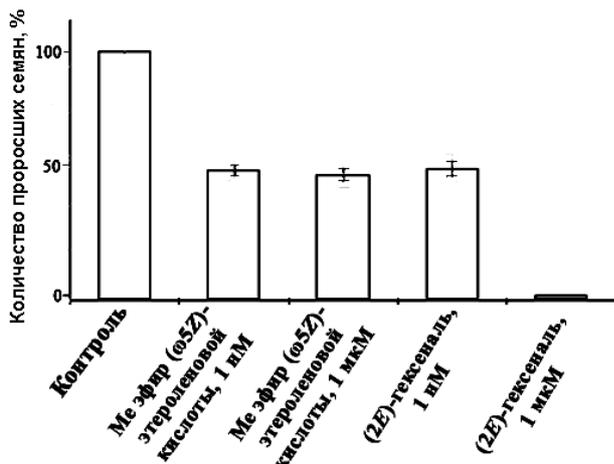


Рис.16. Процент прорастания семян льна в зависимости от воздействия (ω5Z)-этероленовой кислоты и (2E)-гексеняля.

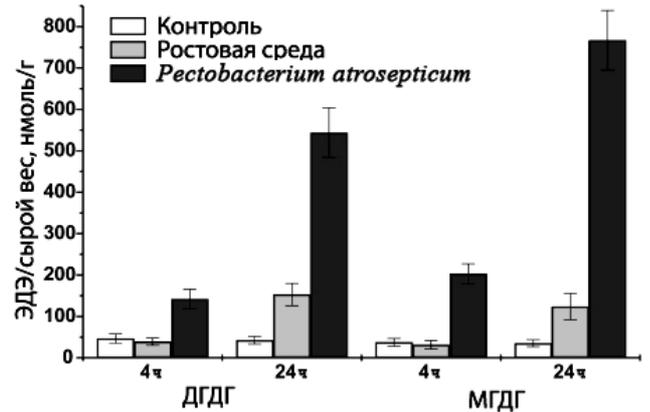


Рис.17. Влияние инфицирования растений льна бактерией *P. atrosepticum* на содержание линолипинов в листьях. Черные столбцы – инфицированные растения; белые столбцы – контрольные (необработанные) растения; светло-серые столбцы – второй контроль – растения, которым ввели питательную среду.

Через четыре часа после инфицирования, уровень содержания ДГДГ и МГДГ увеличился в 3 и 5,5 раз, соответственно. Через 24 часа после инфицирования содержание ЭДЭ значительно выросло (Рис.17), свыше 800 нмоль на грамм сырого веса. Накопление линолипинов достоверно ( $P \leq 0,01$ ) в отношении двух контролей: а) необработанных растений и б) растений, которым введена среда, не содержащая бактериальные клетки. (Рис.17).

### 2.14 Деградация (ω5Z)- этероленовой кислоты и линолипинов

Ранее было показано, что дивиниловые эфиры неустойчивы в кислотной области рН (Galliard *et al.*, 1974). Нами проведён сравнительный анализ степени распада при рН 5,5 линолипинов А и В, (ω5Z)-этероленовой кислоты и ее метилового эфира.

Степень деградации оценивалась при помощи спектрофотометрии при 267 нм, что соответствует максимуму поглощению (ω5Z)-этероленовой кислоты. Показано, что этерификация карбоксильной группы стабилизирует (ω5Z)-этероленовую кислоту. Исходя из этих соображений, можно предположить, что линолипины более стабильны,

чем ( $\omega 5Z$ )-этероленовая кислота. Однако показано, что линолипин А за 7 минут распадается примерно на 45%, а линолипин В на 80% (Рис.18).

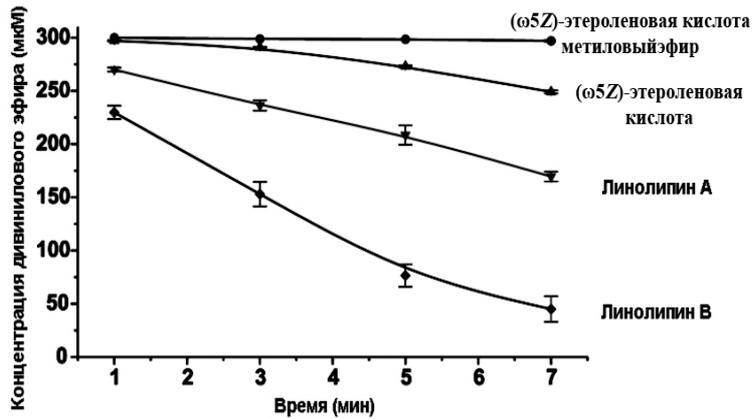


Рис.18. Деградация линолипинов А и В, ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислоты и ее метилового эфира при pH 5,5

Таким образом, можно предположить, что стерическая загруженность окружения ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислоты оказывает влияние на стабильность соединения. Установление точного механизма деградации требует проведения дальнейших исследований.

На основании полученных данных предложена гипотетическая схема катаболизма линолипинов (Рис.19). Мы предполагаем два варианта катаболизма линолипинов в живом растении: во-первых, ферментативное отщепление ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислоты, выступающей в роли антипатогена; во-вторых, спонтанный гидролиз распад этерифицированной ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислоты с образованием ( $2E$ )-гексеняля и этерифицированного остатка травматина.

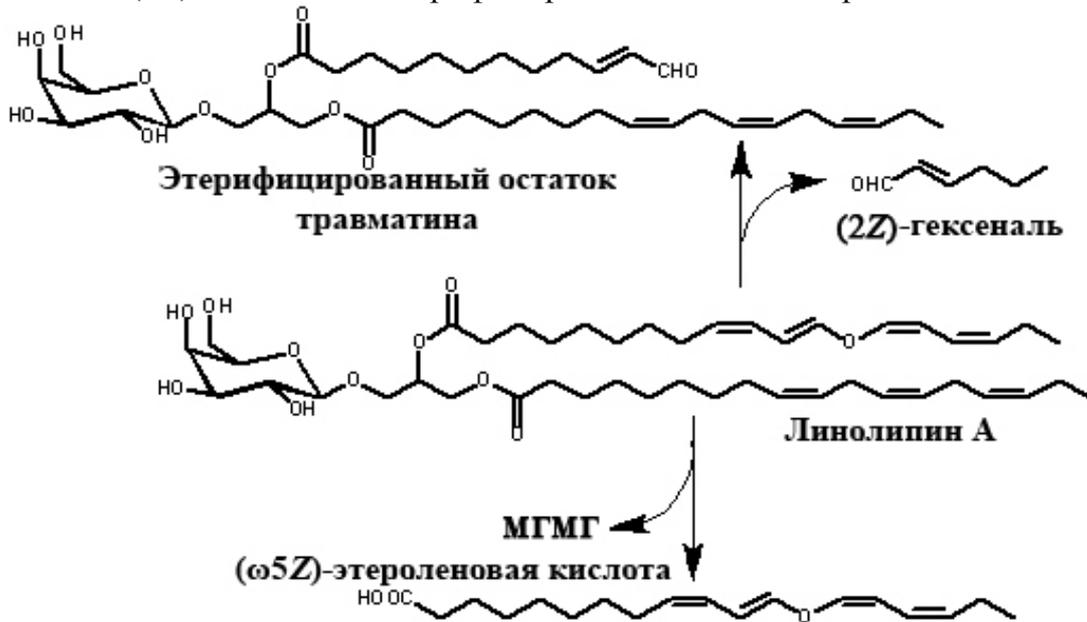


Рис.19. Гипотетическая схема катаболизма линолипинов на примере линолипина А

Таким образом, в результате деградации по второму пути образуется сразу два физиологически активных агента – ( $2E$ )-гексеняль и этерифицированный травматин. В пользу последнего предположения говорит то, что в отсутствие гидропероксидлиазной активности мы установили выделение гексеняля листьями льна. Кроме того, по спектру  $^1H$  ЯМР продуктов деградации линолипина D можно сказать, что в результате катаболизма линолипинов происходит отщепление  $C_6$  фрагмента от остатка ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислоты. На рис.20 видно, что в результате деградации линолипина D полностью исчезают сигналы протонов  $H1'''$ ,  $H2'''$ ,  $H3'''$ ,  $H4'''$ .

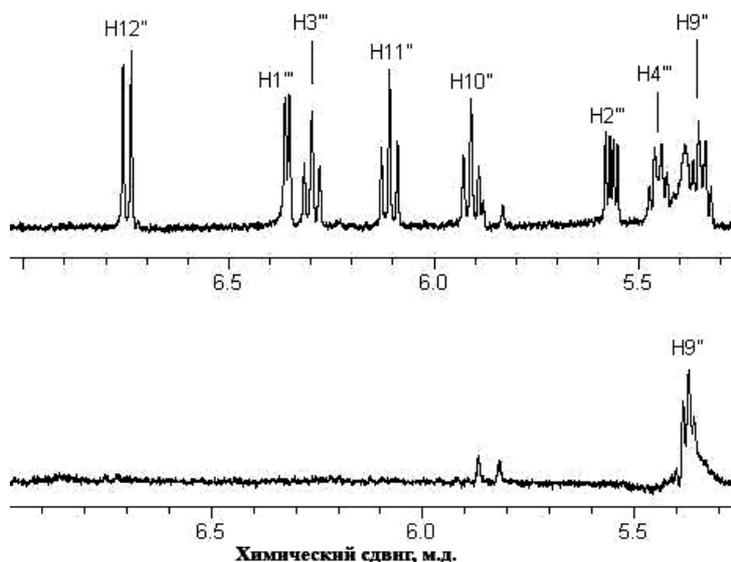


Рис.20. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР линолипина D (сверху) и продуктов его деградации (снизу)

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые обнаружен метаболический путь, контролируемый 13-липоксигеназой и дивинилэфирсинтазой, в листьях льна. Основным продуктом нового пути является дивиниловый эфир ( $\omega 5Z$ )-этероленовая кислота. Кроме того, в составе сложных липидов была выявлена этерифицированная ( $\omega 5Z$ )-этероленовая кислота. Обнаружена новая группа сложных оксипинов – моно- или дигалактозилдиацилглицеринов, содержащих один или два остатка ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислоты. Для этих соединений предложено тривиальное название линолипины. Нами полностью охарактеризованы четыре представителя этой группы сложных оксипинов – линолипины А, В, С и D.

Содержание линолипинов в листьях льна зависит от возраста растения. Линолипины накапливаются только во взрослых растениях, но не в проростках. Следовательно, их биосинтез и превращение зависит от онтогенеза. Наши данные показывают, что ( $\omega 5Z$ )-этероленовая кислота ингибирует прорастание семян льна и развитие корня.

Наблюдалось образование трех новых, не описанных ранее, соединений при повреждении листьев льна однократным циклом замораживания-оттаивания. На основании данных хроматографии, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения выдвинуто предположение, что эти соединения представляют собой моногалактозилтриацилглицерины, у которых один из жирнокислотных остатков имеет сложноэфирную связь с остатком галактозы.

Уровень линолипинов в листьях льна значительно увеличивается при инфицировании бактерией *Pectobacterium atrosepticum*. Эти данные показывают, что накопление этерифицированных оксипинов (линолипинов) может представлять новый тип стратегии защиты растений. У льна обнаружена специфическая стратегия: дивинилэфирсинтаза экспрессируется конститутивно, но биосинтез линолипинов

В пользу нашей гипотезы катаболизма линолипинов также свидетельствует исчезновение сигнала протона у двенадцатого атома углерода ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислоты (H12''). Это наблюдение может быть объяснено гидролизом простой эфирной связи дивинилового эфира с образованием альдокислоты (травматина), по-прежнему связанной с глицерином МГДГ и освобождением гексенала.

стимулируется в ответ на инфицирование. Накопление отдельных линолипинов, таких как линолипины В, С и D в ответ на инфицирование особенно велико. Механизм действия линолипинов остается неустановленным. Нами предложена гипотетическая схема катаболизма линолипинов – распад этерифицированной ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислоты с образованием этерифицированной альдокислоты (травматина) и ( $2E$ )-гексенала. Таким образом, в отсутствие гидропероксидлиазной активности линолипины могут служить предшественниками продуктов действия гидропероксидлиазы.

Полученные в нашей работе результаты расширяют современное понимание липоксигеназного пути в растениях, а также открывают новые возможности в изучении роли сложных оксипинов в жизни растений.

### ВЫВОДЫ

1. Установлено, что окислительный метаболизм полиеновых жирных кислот в листьях льна контролируется 13-липоксигеназой. Первичными продуктами являются 13(*S*)-гидроперекиси  $\alpha$ -линоленовой и линолевой кислот.
2. Превращения гидроперекисей жирных кислот в листьях льна происходят по двум преобладающим направлениям. Одно контролируется алленоксидсинтазой и алленоксидциклазой, другое – дивинилэфирсинтазой.
3. Циклопентенон (15*Z*)-12-оксо-10,15-фитодиеновая кислота и дивиниловый эфир ( $\omega 5Z$ )-этероленовая кислота являются основными оксипинами листьев льна.
4. Впервые выделены, очищены и охарактеризованы четыре представителя новой группы сложных липидов, для которой предложено тривиальное название линолипины. Установлена структура линолипинов: 1-*O*- $\alpha$ -линоленоил-2-*O*-( $\omega 5Z$ )-этероленоил-3-*O*- $\beta$ -D-галактопиранозил-*sn*-глицерин (линолипин А), 1,2-ди-*O*-( $\omega 5Z$ )-этероленоил-3-*O*- $\beta$ -D-галактопиранозил-*sn*-глицерин (линолипин В), 1-*O*-этероленоил-2-*O*-( $\omega 5Z$ )- $\alpha$ -линоленоил-3-*O*- $\beta$ -D-дигалактопиранозил-*sn*-глицерин (линолипин С) и 1,2-ди-*O*-( $\omega 5Z$ )-этероленоил-3-*O*- $\beta$ -D-дигалактопиранозил-*sn*-глицерин (линолипин D).
5. В ответ на инфицирование растений льна фитопатогенной бактерией *Pectobacterium atrosepticum* происходит биосинтез новых линолипинов (линолипины В, С и D) и резкое увеличения общего уровня содержания линолипинов.
6. Установлено, что на разных стадиях онтогенеза содержание ЭДЭ в листьях льна неодинаково. У молодых растений льна (14- и 23-дневных) отсутствует липид-связанная ( $\omega 5Z$ )-этероленовая кислота, в то время как на более поздних этапах развития растения (35, 63 и 76 дней) уровень содержания линолипинов весьма высок.
7. Обнаружено три новых галактолипида, содержащих остатки ( $\omega 5Z$ )-этероленовой кислоты. Эти галактолипиды образуются в результате повреждения листьев льна однократным циклом замораживания-оттаивания.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. A lipoxygenase-divinyl ether synthase pathway in flax (*Linum usitatissimum* L.) leaves / Chechetkin I.R., **Blufard A.**, Hamberg M., Grechkin A.N. // *Phytochemistry*. – 2008. – Vol. 69, № 10. – P. 2008-2015.
2. Unprecedented pathogen-inducible complex oxylipins from flax: linolipins A and B. / Chechetkin I.R., Mukhitova F.K., **Blufard A.S.**, Yarin A.Y., Antsygina L.L., Grechkin A.N. // *FEBS J.* – 2009. – Vol. 276, № 16. – P. 4463-4472.

### Работы, опубликованные в материалах конференций

3. Обнаружение активности дивинилэфирсинтазы в листьях льна / Чечеткин И.Р., Ярин А.Ю., **Блуфард А.С.**, Гнездилов О.И., Гречкин А.Н. // Сб. трудов / Изд. Арта. - Новосибирск, 2008. – С. 407.
4. Обнаружение дивинилэфирсинтазной активности и новых оксилипинов в листьях льна (*Linum usitatissimum*) / Чечеткин И.Р., **Блуфард А.С.**, Ярин А.Ю., Анцыгина Л.Л., Мухитова Ф.К. Гнездилов О.И., Хамберг М., Гречкин А.Н. // Сб. тезисов / Изд. КГУ. – Казань, 2008. – С. 67.
5. Масс-спектрометрия новых оксилипинов из листьев льна / Мухитова Ф.К., **Блуфард А.С.**, Чечеткин И.Р., Гречкин А.Н. // Сб. тезисов / Изд. ВМСО. – Москва, 2009. – С. 77.
6. Биосинтез новых оксилипинов в растениях льна при патогенезе / Чечеткин И.Р., **Блуфард А.С.**, Ярин А.Ю., Анцыгина Л.Л., Мухитова Ф.К., Гречкин А.Н. // Сб. материалов / Изд. НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН. – Иркутск, 2009. – С. 519-521.
7. Листья льна – источник нового семейства сложных оксилипинов / **Блуфард А.С.**, Чечеткин И.Р., Мухитова Ф.К., Ярин А.Ю., Анцыгина Л.Л., Гречкин А.Н. // Сб. тезисов / Изд. Пущинского НИЦ РАН. – Пущино, 2009. – С. 62.
8. Linolipins: a new family of complex oxylipins / Chechetkin I.R., **Blufard A.S.**, Mukhitova F.K., Yarin A.Y., Antsygina L.L., Grechkin A.N. // Abstracts / Yokohama (Japan), 2009. – P. 62.
9. Linolipin biosynthesis as a new kind of plant defense strategy / Chechetkin I.R., **Blufard A.S.**, Yarin A.Y., Antsygina L.L., Mukhitova F.K., Grechkin A.N. // Abstracts / Paris (France), 2010. – P. 15.
10. Структура и возможные функции линолипинов – новой группы сложных оксилипинов в листьях льна / **Блуфард А.С.**, Чечеткин И.Р., Мухитова Ф.К., Ярин А.Ю., Анцыгина Л.Л., Гречкин А.Н. // Тез. докл. / Изд. Казанского университета. - Казань, 2010. – С. 14.
11. Новые метаболиты липоксигеназной сигнальной системы / Чечеткин И.Р., **Блуфард А.С.**, Ярин А.Ю., Анцыгина Л.Л., Мухитова Ф.К., Гречкин А.Н. // Тез. докл./ Изд. «ФизтехПресс» КФТИ КазНЦ РАН. – Казань, 2011. – С. 211-212.