

ŽIVOČÍŠNE LIPOXYGENÁZY – ŠTRUKTÚRA, POLOHOVÁ ŠPECIFITA IZOENZÝMOV LIPOXYGENÁZ A ICH VÝZNAM

LÝDIA BEZÁKOVÁ^a, IVANA HOLKOVÁ^a,
ANDREA BALAŽOVÁ^a, MAREK OBLOŽINSKÝ^a
a PETER MIKUŠ^b

^a Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava, ^b Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava
bezakova@fpharm.uniba.sk

Došlo 24.3.17, prijaté 10.4.17.

Kľúčové slová: štruktúra lipoxigenáz, izoenzýmy lipoxigenáz, mutácia génov, polynenasýtené mastné kyseliny, inhibitory lipoxigenáz

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika živočíšnych lipoxigenáz – štruktúrne črty a substrátová špecificita
 - 2.1. Substrátová špecificita lipoxigenáz
 - 2.2. Štruktúra lipoxigenáz
 - 2.3. Interakcia substrátu v aktívnom mieste lipoxigenáz
3. Nomenklatura lipoxigenáz
4. Izoenzýmy lipoxigenáz
 - 4.1. 5-Lipoxigenáza (5-LOX)
 - 4.2. 8-Lipoxigenáza (8-LOX)
 - 4.3. 12-Lipoxigenáza (12-LOX)
 - 4.4. 12/15-Lipoxigenáza (12/15-LOX)
5. Záver

1. Úvod

Lipoxigenázy (LOX, linoleát : O₂ oxidoreduktázy, EC 1.13.11.12) patria do génovej rodiny dioxygenáz, ktoré majú v aktívnom mieste viazaný ión železa. Katalyzujú priestorovo a polohovo špecifickú adíciu molekulového kyslíka na polynenasýtené mastné kyseliny s *cis,cis*-1,4-pentadiénovým zoskupením dvojítých väzieb (ako sú kyselina arachidónová – C20:Δ4, ω-6; linolová – C18: Δ2, ω-6; alebo linolénová – C18: Δ3, ω-3), a tým premenu *cis,cis*-1,4-pentadiénovej štruktúry dvojítých väzieb na príslušné 1,3-*cis,trans*-5-hydroperoxidové deriváty¹. Lipoxigenázy sú kľúčovým enzýmom lipoxigenázovej cesty. Aktívna LOX metabolická cesta vyžaduje uvoľňovanie mastných

kyselín z esterov lipidov lokalizovaných v bunkových membránach. Hydrolytické štiepenie fosfolipidov v membránach katalyzuje cytosolová fosfolipáza A₂ (cit.^{2,3}).

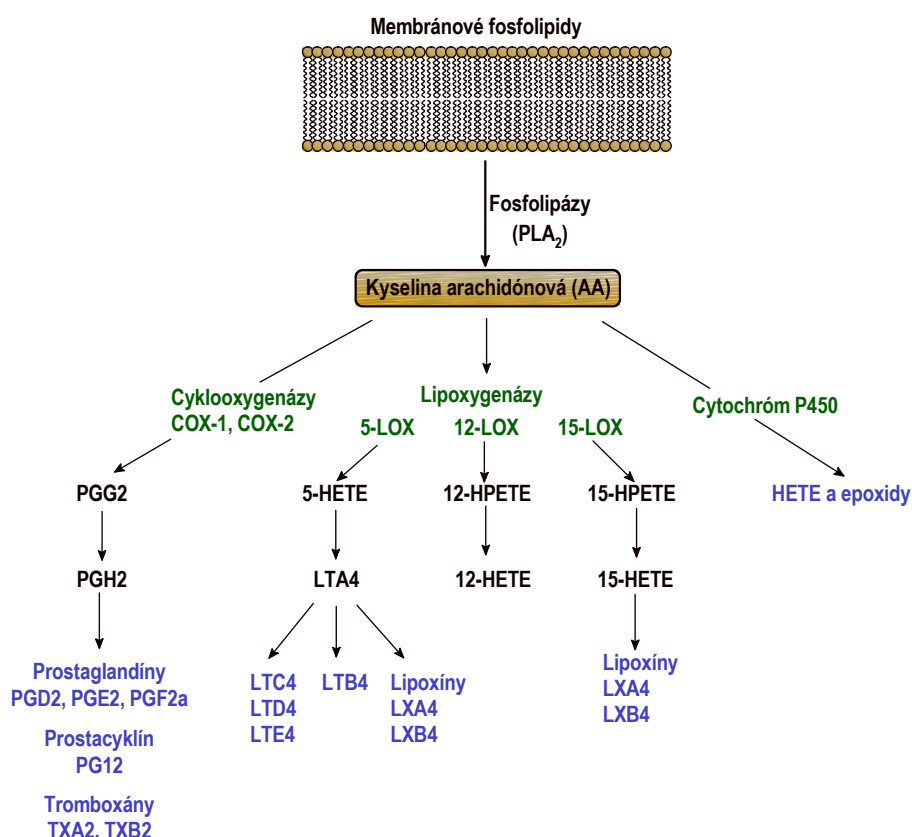
U cicavcov sa LOX vyskytujú v 4 izoformách, a to 5-, 8-, 12- a 15-LOX tvoriacich hydroxyeikosatetraénové kyseliny (HETE). 15-LOX môže byť zaradená do podtriedy retikulocytového typu (Typ 1) alebo epidermálneho typu (Typ 2). Vzhľadom k tomu, že retikulocytový typ 15-LOX je veľmi podobný na leukocytárny typ 12-LOX, tieto enzýmy sú označené ako 12/15-LOX (cit.⁴).

2. Charakteristika živočíšnych lipoxigenáz – štruktúrne črty a substrátová špecificita

2.1. Substrátová špecificita lipoxigenáz

Lipoxigenázy sa zaraďujú medzi lipidy peroxidujúce enzýmy schopné oxygenácie polynenasýtených mastných kyselín na zodpovedajúce hydroperoxidové deriváty. Sú to dioxygenázy, t.j. katalyzujú adíciu molekulového kyslíka na voľné mastné kyseliny (MK) alebo esterikované polynenasýtené mastné kyseliny obsahujúce minimálne dve izolované *cis*-dvojité väzby za formovania príslušných hydroperoxidových derivátov. V bunkách cicavcov sú substrátmi LOX najmä polynenasýtené mastné kyseliny (PNMK) – kyselina linolová (LA, C18:2) a kyselina arachidónová (AA, C20:4)⁷. Obidve slúžia ako substráty pre polohovo špecifické formy LOX. Vo všeobecnosti LOX cicavcov uprednostňujú ako substrát voľnú mastnú kyselinu pred mastnou kyselinou viazanou v esteroch lipidov. Nakoľko je koncentrácia voľných PNMK v bunke nízka, aktivácia lipoxigenázovej metabolickej cesty vyžaduje uvoľnenie substrátu – mastnej kyseliny (MK) z esterov lipidov lokalizovaných v membráne bunky. Po hydrolytickom štiepení membránových lipidov za katalýzy fosfolipázou A₂ sú uvoľnené MK hlavne kyselina arachidónová (AA), kyselina eikozapentaénová (EPA) a kyselina doko-sahexaénová (DHA) oxygenované cyklooxygenázami (COX) na prostaglandíny, prostacyklíny a tromboxány, alebo lipoxigenázami (LOX) za vzniku hydroperoxy derivátov PNMK. Podobnú funkciu má aj cytochróm P-450 oxygenáza (CYP) pri premene AA na hydroperoxydy². Primárne produkty LOX metabolickej cesty sa následne menia na rôzne biologicky aktívne lipidové mediátory, ako sú leukotriény, lipoxíny, hepxilíny, eoxíny, resolvíny, protektíny a iné^{8,9} (obr. 1).

LOX môžu oxidovať aj PNMK, ktoré sú viazané v štruktúre fosfolipidov alebo esterov cholesterolu¹⁰. Vzniknutá hydrofilná peroxidová skupina MK môže meniť fyzikálno-chemické vlastnosti lipidov a oxidované lipidy



Obr. 1. **Metabolické cesty premeny kyseliny arachidónovej.** Kyselina arachidónová po uvoľnení z membrán účinkom fosfolipázy A₂ môže byť metabolizovaná cyklooxygenázami, lipoxygenázami a cytochróm P-450 oxygenázami⁸

v lipidovej dvojvrstve biologickej membrány strácajú ochrannú úlohu¹¹. LOX je tiež kľúčovým enzýmom pre tvorbu prooxidačných faktorov. Lipoxygenázami katalyzovaná tvorba peroxidov lipidov ovplyvňuje aj aktivitu redoxne závislej transkripcie a translácie, čo vedie k tzv. up-regulácii alebo down-regulácii expresie génov citlivých na redoxnú rovnováhu v bunke¹².

LOX patria medzi ubikvitárne enzýmy, rozšírené tak v rastlinnej, ako i živočíšnej ríši. Ich prítomnosť bola dokázaná a preskúmaná tiež u baktérií, húb, jednobunkových rias, a tiež nižších tried morských živočíchov⁸. LOX nie sú prítomné v genóme kvasiniek (*Saccharomyces cerevisiae*) z dôvodu neprítomnosti desaturáz potrebných na syntézu substrátu¹³.

Z hľadiska lokalizácie na subcelulárnej úrovni sú lipoxygenázy prítomné najmä v cytoplazme v solubilizovanej forme, ale nachádzajú sa tiež v cytoplazmatickej membráne, mitochondriách, mikrozómoch, matrixe a membráne chloroplastov, vo vakuolách a lipidových telieskach¹⁴.

2.2. Štruktúra lipoxygenáz

Zo štruktúrneho hľadiska je LOX monomérny enzým, ktorý v aktívnom centre obsahuje ión železa v nehémovej forme. Keďže LOX sú členmi multigénovej rodiny, dĺžka ich polypeptidového reťazca je variabilná. U cicavcov predstavuje 662–711 aminokyselín (AK) s molekulovou hmotnosťou 75 až 80 kDa. U rastlín je tvorený 838–923 AK s molekulovou hmotnosťou 94 až 104 kDa (cit.¹⁵). Aminokyselinové sekvencie rastlinných a cicavčích lipoxygenáz vykazujú signifikantnú homológiu. Izoenzýmy LOX zo sójových bôbov, LOX-1 a LOX-3, sú vo svojich sekvenciách aminokyselín identické na 72 %, ale zdieľajú iba 25% zhodu v sekvencii k akejkoľvek cicavčej 15-LOX. LOX u cicavcov sú o 165–261 AK kratšie ako LOX rastlín^{16,17}.

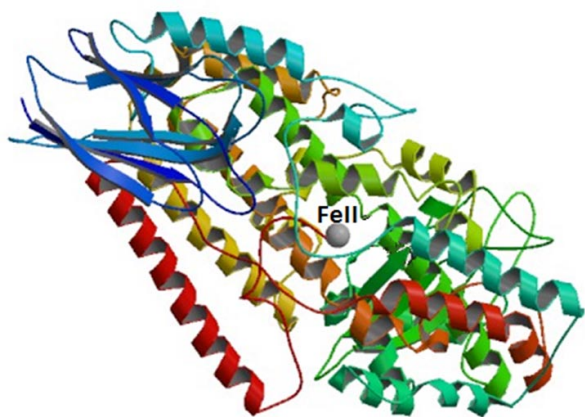
Súčasná poznávanie štruktúry LOX je založené na rozriešení kryštálovej štruktúry sójovej lipoxygenázy. Hoci sójová lipoxygenáza LOX-1 bola kryštalizovaná už v roku 1947, až v roku 1993 sa pomocou röntgenových difrakčných metód detailnejšie odhalila kryštálová štruktúra izoenzymov sójovej lipoxygenázy LOX-1 a LOX-3 izolovaných z *Glycine max*¹⁸. Postupne bolo popísané i priestorové usporiadanie AK cicavčej 15-LOX (cit.¹⁹), uskutočnila

sa kryštalizácia králičej retikulocytovej 15-LOX a neskôr bola vyriešená jej 3D-štruktúra²⁰.

Napriek rozdielnej AK sekvencii, 3D štruktúry rastlinných a cicavčích LOX sa vyznačujú vysokou mierou podobnosti. Všetky izoformy LOX sú zložené z jediného polypeptidového reťazca tvoriaceho dve hlavné domény. Rastlinné i cicavčie enzýmy majú N-terminálnu doménu zloženú z ôsmich antiparalelných β -barelov. U králičej 15-LOX je zakomponovaných 110 AK, avšak v prípade sójovej lipoxigenázy je táto doména výrazne väčšia ako u králičieho enzýmu^{17,21}.

C-terminálna doména je centrom katalytických dejov enzýmu, je zložená z 18 špirál prerušených antiparalelným β -barelom, formuje aktívne miesto, kde sa nachádza jeden atóm železa. Takmer vo všetkých lipoxigenázach je v aktívnom mieste nehemovo viazaný ión železa s výnimkou húb, u ktorých sa vyskytuje mangán. Helikálna doména navyše ohraničuje dve vnútorné dutiny. Prvá z nich má rúrkovitý tvar, vykazuje dioxygenázovú aktivitu a zároveň zabezpečuje kyslíku a mastným kyselinám prístup k atómu železa¹⁷.

Centrom C-terminálnej domény sú dva veľké helixy obsahujúce histidinové ligandy iónu železa. Ten je viazaný v oktaedrickej koordinačnej sfére pozostávajúcej z His365, His540, His544 a molekuly vody vytvárajúcej rohy oktaédrového štvorca a His360 s C-terminálnym Ile662 tvoriacich vertikálnu os. Sekvenčné analýzy odhalili vysokú konzervovanosť ligandov s výnimkou jedného histidinu¹³. U živočíchov sú teda štyri ligandy tvorené aminokyselinou histidín. Piatym ligandom je atóm kyslíka resp. molekula vody pochádzajúca z koncovej karboxylovej skupiny izoleucínu stabilizovaná vodíkovou väzbou. Posledným, šiestym ligandom môže byť serín, asparagín i histidín^{17,22–24}. Trojrozmerná štruktúra králičej 15-LOX bola stanovená na základe röntgenovej štruktúrnej analýzy⁴⁶. Schématický pohľad na štruktúru LOX je znázornený na obr. 2.



Obr. 2. Trojrozmerná štruktúra králičej 15-LOX s obsahom nehemového iónu železa v C-katalytickej doméne^{46,52}

2.3. Interakcia substrátu v aktívnom mieste lipoxigenáz

Na základe röntgenovej kryštalografickej analýzy je predpokladaná substrát-viažúca dutina „vrecúško“ králičej retikulocytovej 15-LOX definovaná nasledovne: „dno“ tvoria postranné reťazce Phe353, Met419, Ile418 a Ile593; „steny“ substrát viažúcej dutiny tvoria hydrofóbne AK zvyšky s výnimkou dvoch polárnych zvyškov – Glu357 a Gln548 – hraničiacich s iónom železa v aktívnom centre; „vchod“ dutiny vystiela bočný reťazec Arg403, ktorému sa pripisuje interakcia s karboxylovou skupinou substrátu^{25,26}. Predpokladá sa, že hydrofóbne vnútro dutiny spolu s nabitým bočným reťazcom arginínu na ústi dutiny usmerňujú vstup a uloženie kyseliny arachidónovej v dutine vo vhodnej polohe pre 5-, 8-, 12-, alebo 15-oxygenáciu. Podľa súčasných znalostí sa uplatňujú tri typy väzbových interakcií:

- hydrofóbne interakcie metylového konca substrátu s AK zvyškami tvoriacimi dno substrát viažúcej dutiny,
- π -elektrónové interakcie medzi násobnými väzbami substrátu a aromatickými postrannými reťazcami AK tvoriacich „steny“ dutiny,
- iónové interakcie koncovej karboxylovej skupiny substrátu a kladne nabitým AK zvyškom Arg403.

Pre polohovú špecifitu LOX je dôležitá samotná hĺbka dutiny a jej objem. Hĺbka dutiny je daná trojicou AK tvoriacich dno dutiny (tzv. koncepcia triád). Mutagénne zmeny týchto AK na AK s menšími bočnými reťazcami viedli k zmene 12/15-LOX na 12-LOX a preferenčnú tvorbu 12-HETE (cit.^{13,20}) (obr. 3).

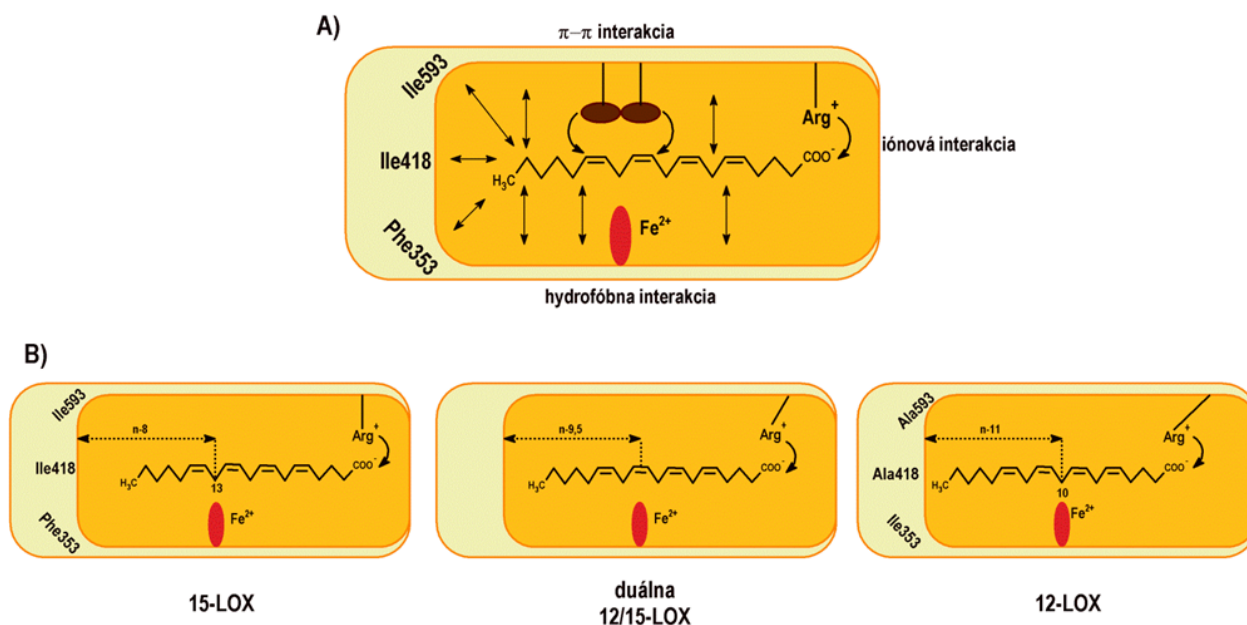
3. Nomenklatúra lipoxigenáz

Keďže LOX tvoria superrodinu enzýmov, systematika názvoslovia vychádza z pomenovania produktu ich metabolickej reakcie, resp. z polohy dioxygenácie na uhlíku ich substrátu, ktorým je u rastlín LA a AA u cicavcov^{17,27}.

LOX premieňa polynenasýtenú MK s obsahom 1,4-pentadienového systému dvojitéch väzieb na príslušné hydroperoxidové deriváty. Atmosferický kyslík slúži ako druhý substrát. Na podklade polohovej špecifity dioxygenácie AA rozlišujeme u cicavcov štyri základné typy izoenzýmov lipoxigenáz^{28–30}.

Sumárne možno LOX klasifikovať podľa polohy dioxygenácie AA, u živočíchov sa vyskytuje 5-, 8-, 12- a 15-LOX (cit.^{31,32}):

- 5-lipoxigenáza (5-LOX, EC 1.13.11.34, arachidonát 5-lipoxigenáza) vnáša molekulu kyslíka na pozíciu C-5 reťazca AA za vzniku (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-(5*S*)-hydroperoxyeikosa-6,8,11,14-tetraénovej kyseliny (5*S*-HpETE);
- 8-lipoxigenáza (8-LOX, EC 1.13.11.40, arachidonát 8-lipoxigenáza) vnáša molekulu kyslíka na pozíciu C-8 do reťazca AA za vzniku (5*Z*,9*E*,11*Z*,15*Z*)-(8*S*)-hydroxyeicosa-5,9,11,15-tetraénovej kyseliny (8*S*-HpETE);



Obr. 3. Interakcia medzi 15-LOX a substrátom – kyselinou arachidónovou (AA). Aktivne miesto LOX je vrecko, ktoré je tvorené bočnými reťazcami hydrofóbných aminokyselín (AK). Polyénové mastné kyseliny (MK) sú orientované metylovou skupinou k AK v aktívnom mieste. Nehémovo viazaný ión železa v aktívnom je znázornený červenou farbou. (A) Medzi MK a AK v aktívnom mieste sa uplatňujú tri typy väzbových síl: (i) hydrofóbné interakcie medzi nepolárnymi reťazcami MK s postrannými reťazcami hydrofóbných AK – dvojité šípky, (ii) iónové interakcie medzi karboxylovou skupinou MK s Arg, (iii) π -elektrónové interakcie aromatických AK s dvojíťmi väzbami MK. (B) Substrát v aktívnom mieste 12- a 15-LOX enzýmov (singulárna polohová špecifita) a substrát v aktívnom mieste 12/15-LOX s duálnou špecifitou^{20,13}

- c) 12-lipoxygenáza (12-LOX, EC 1.13.11.31, arachidonát 12-lipoxygenáza) vnáša molekulu kyslíka na pozíciu C-12 do reťazca AA za vzniku (5Z,8Z,10E,14Z)-12S-hydroperoxyeikosa-5,8,10,14-tetraénovej kyseliny (12S-HpETE);
- d) 15-lipoxygenáza (15-LOX, EC 1.13.11.33, arachidonát 15-lipoxygenáza) vnáša molekulu kyslíka na pozíciu C-15 do reťazca AA za vzniku (5Z,8Z,11Z,13E)-15S-hydroperoxyeikosa-5,8,11,13-tetraénovej kyseliny (15S-HpETE).

Alternatívnym spôsobom klasifikácie je rozdelenie cicavčích LOX na základe fylogenetickú príbuznosti na štyri skupiny: 1) 12S/15S-LOX (zahŕňajúce retikulocytový a leukocytárny typ 12- a 15-LOX s duálnou polohovou špecifitou); 2) doštičkový typ 12S-LOX; 3) 5S-LOX a 4) epidermálny typ LOX (zahŕňa 12R-LOX, 15-LOX-2, 8S-LOX a typ LOX-3)^{33,34}.

S prihliadnutím na stereošpecifitu sa rozlišujú *S*-, resp. *R*-LOX (napr. 12S-LOX a 12R-LOX)^{33,34}. Priestorová špecifita je daná prítomnosťou unikátneho AK zvyšku na protihľej strane voči nehémovo-viazanému atómu železa. V prípade, že substrát viažuce miesto je tvorené glycinom, vznikajú produkty s pravotočivou (*R*) konfiguráciou. Ak sa v tomto mieste vyskytuje alanín, je uprednostnená syntéza produktov s ľavotočivou (*S*) konfiguráciou. Polohová špecifita nie je absolútnou vlastnosťou enzýmu, ale vo veľkej miere závisí od substrátu a jeho štruktúry. Vstupom MK

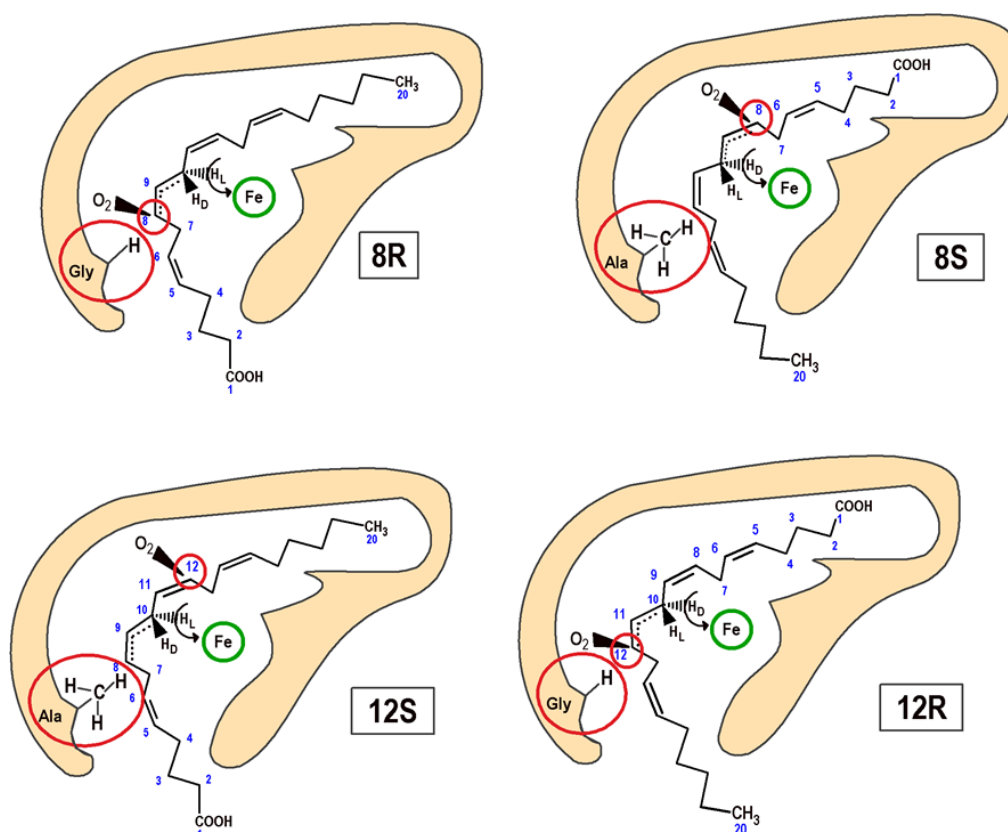
do aktívneho miesta metylovým koncom („tail-first“ orientácia), dochádza k oxygenácii v polohe C-8. Ak MK vstupuje do aktívneho miesta enzýmu karboxylovým koncom, s orientáciou „end-first“, nastáva oxygenácia v polohe C-12 (cit.^{13,35,36}) (obr. 4).

Ľudský genóm obsahuje šesť funkčných génov LOX (*ALOX5*, *ALOX15*, *ALOX15B*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOXE3*), ktoré kódujú šesť rôznych LOX izoform. S výnimkou *ALOX5* génu, ktorý bol mapovaný na chromozóme 10, všetky ostatné LOX gény sú lokalizované na chromozóme 17. Zodpovedajúce gény myši boli detekované na chromozómoch 6 a 11 (cit.³⁷).

4. Izoenzýmy lipoxygenáz

4.1. 5-Lipoxygenáza (5-LOX)

Cicavčia 5-LOX je najlepšie charakterizovaným izoenzýmom s molekulovou hmotnosťou 78 kDa. Je distribuovaná najmä v bunkách imunitného systému, od monocytov, makrofágov, mastocytov, bazofilov, eozinofilov a neutrofilov³⁸, cez dendrické a penové bunky aterosklerotického tkaniva, až po žirné bunky a B-lymfocyty³⁰. Za fyziologických podmienok sa 5-LOX vyskytuje v inaktivovanej forme s viazaným kationom železa Fe²⁺. Konverzia 5-LOX na aktívnu Fe³⁺ formu vyžaduje prítom-



Obr. 4. Tvorba *R*-, resp. *S*-enantiomérov v aktívnom mieste 8-LOX alebo 12-LOX. Tvorba *R*- alebo *S*-enantiomérov v aktívnom mieste LOX je ovplyvnená prítomnosťou rôznych aminokyselín v substrát viažúcom vrecku LOX (cit. ³⁵)

nosť ATP, Ca^{2+} , 5-LOX aktivujúceho proteinu (FLAP) a hydroperoxidov. Práve potreba aktivácie a schopnosť asociácie s jadrovou membránou odlišuje 5-LOX od ostatných izoenzýmov. Napokon sa aktivovaná 5-LOX presúva z jadra do jadrovej membrány, resp. z cytozolu do cytoplazmatickej membrány. Konečným dôsledkom je produkcia leukotriénov – prozápalovo pôsobiach lipidových mediátorov. Spoločne s 15-LOX však na druhej strane zabezpečuje aj syntézu protizápalovo pôsobiach lipoxínov³⁹.

4.2. 8-Lipoxigenáza (8-LOX)

Existencia 8-LOX, ako jedného z LOX izoenzýmov, bola dokázaná v tkanivách potkanov a myši, u ktorých dochádza k expresii 8S-LOX, za vzniku 8S-HpETE. Prítom ľudský a hovädzí homológ tohto enzýmu sú schopné oxygenácie AA len na pozícii C-15, avšak 8-HETE vystupuje vo funkcii substrátu. 8S-HETE sa špecificky viaže a aktivuje receptory v bunkovom jadre PPAR- α (peroxisome proliferator-activated receptor α), následne aktivuje transkripciu a transláciu, výsledkom je stimulácia diferenciácie keratinocytov⁴⁰.

Hoci indukovateľná myšacia 8S-LOX a jej ľudský homológ, 15S-LOX-2, zdieľajú 78% zhodu v aminokyselinovej sekvencii, ich polohová špecifita je odlišná. Výskum bol zameraný na determinanty polohovej špecifity s použitím riadenej mutagenézy. Výmenou tretiny C-terminálnej domény 8-LOX s odpovedajúcou časťou 15-LOX-2 sa získal chimerický enzým s výhradne 15S-lipoxigenázou aktivitou⁴¹.

4.3. 12-Lipoxigenáza (12-LOX)

V súčasnosti poznáme tri typy 12-lipoxigenáz, ktoré sa diferencujú na základe substrátovej špecifickosti, odlišnej imunologickej a biochemickej odpovede a podľa výskytu v v určitom type tkaniva. Prvé dva typy boli izolované z ľudských buniek, ide o epidermálnu a trombocytovú 12-LOX. Prítomnosť leukocytovej 12-LOX bola zistená u ošípaných⁴².

Nárast aktivity 12-lipoxigenáz je spájaný najmä s výskytom imunodeficientných porúch a malígnych nádorov, predovšetkým rakovinou prsníka⁴³. Samotná 12-LOX a produkty jej metabolickej premeny 12(S)-HETE vedú k zvýšeniu tvorby vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora (VEGF) v matrixe nádoru³⁸.

4.4. 15-Lipoxigenáza (15-LOX)

Izoenzýmy 15-LOX sa vyskytujú v dvoch formách, 15-LOX-1 a 15-LOX-2. 15-LOX-1 katalyzuje premenu LA na nestabilnú racemickú zmes 13-hydroperoxy-9Z,11E-oktadekadiénovej kyseliny (13-HpODE). Substrátom 15-LOX-2 je AA a konečným produktom oxygenácie je 15-hydroperoxyeikosatetraénová kyselina (15-HpETE)³⁸.

15-LOX bola popísaná v králičích retikulocytoch a je schopná oxidovať aj fosfolipidy biologických membrán¹⁰. Tento enzým bol purifikovaný do homogenity z králičích retikulocytov a biochemicky charakterizovaný⁴⁴. Neskôr bol podobný enzým izolovaný z ľudských eozinofilov⁴⁵. Porovnanie kinetických parametrov viedlo k záveru, že tento enzým, resp. *ALOX15* gén je ľudský ortológ kráľicej 15-LOX. 15-LOX retikulocytov u iných druhov cicavcov nebola popísaná. Avšak u myši, ošipaných a potkana bol identifikovaný leukocytový typ 12-LOX, a tento je považovaný za funkčný ekvivalent retikulocytového typu 15-LOX u týchto druhov⁴⁶. Retikulocytové ľudské a králičie 15-LOX zdieľajú vysoký stupeň fylogenetической príbuznosti s leukocytovým typom 12-LOX z prasat'a, potkanov a myši⁴⁶. Medzi leukocytovým typom 12-LOX a ďalšími 12-LOX izoformami je však iba nízky stupeň zhodnosti sekvencie. Ľudská retikulocytová 15-LOX a myšia leukocytová 12-LOX zdieľajú podobné mechanizmy regulácie cytokínov a expresiu génu. V ľudskom genóme neexistuje žiadny samostatný gén kódujúci leukocytový typ 12-LOX a u myši nie je ani žiadny dôkaz o gène pre 15-LOX retikulocytového typu. Avšak u kráľika sú samostatné gény pre retikulocytový typ 15-LOX a leukocytový typ 12-LOX. Vysoký stupeň (> 99 %) zachovania sekvencie medzi týmito izoformami môže pochádzať z génovej duplikácie⁴⁷. Tieto enzýmy boli označené 12/15-LOX a oxygenáciou AA produkujú aktívne metabolity lipidov, ktorých expresia sa vyskytuje v mnohých chorobných stavoch⁴⁸.

4.5. 12/15-Lipoxigenáza (12/15-LOX)

Ortológy *ALOX15* sa vyskytujú u väčšiny cicavcov a môžeme ich klasifikovať na základe polohovo špecifickej oxygenácie AA na 12- a 15-LOX (cit.¹³). 12-LOX katalyzuje vznik 12-HpETE produktov a je typická pre myši, ošipané a dobytok. U človeka, orangutána a šimpanza však prevláda ortológ *ALOX15* formujúci 15-HpETE produkty^{49,50}. Výnimkou je králik, u ktorého je exprimovaná izoforma 12-LOX súčasne s 15-LOX v závislosti od typu tkaniva⁵⁰. V nedozretých červených krvinkách prevláda 15-LOX izoforma, zatiaľ čo v monocytoch 12-LOX. Zaujímavosťou je prítomnosť jediného génu v genóme kráľika kódujúceho oba typy LOX izoformami. Sekvencia DNA pre králičí enzým katalyzujúci vznik 15-HpETE naznačuje prítomnosť AK zvyškov s priestorovo objemnejším bočným reťazcom v aktívnom centre LOX. V polohe 353 je to fenylyalanín a v polohách 418 a 593 izoleucín. Ide o pozície determinujúce polohovú špecifitu LOX (cit.¹³). Avšak cDNA pre *ALOX15* izolovaná z monocytov

kráľika obsahuje na pozícii 353 leucín. Proteín, ktorý bol exprimovaný v *E.coli*, katalyzoval tvorbu produktov typu 12-HpETE (cit.⁵¹).

Koncept triád opisuje možnosť konvertovania 15-LOX, tvoriacej polohovo špecifické produkty 15-HpETE na 12-LOX formujúcej 12-HpETE produkty zmenou jedinej aminokyseliny v polynukleotidovom reťazci LOX (cit.⁴⁸). Ako cieľová AK u 15-LOX človeka (ktorá vedie k zmene polohovej špecifity LOX) môže byť izoleucín 418 a metionín 419, fenylyalanín 353 alebo izoleucín 593 (cit.²⁷). Všetky cieľové AK tvoria dno štrbiny aktívneho centra a determinujú hĺbku, do ktorej substrát môže vojsť⁴⁹. Aplikáciou tejto stratégie Ivanov a spol.¹³ premenili ľudskú 15-LOX na izoformu 12/15-LOX vyskytujúcu sa u hlodavcov a naopak, 12/15-LOX hlodavcov môže byť mutáciou jedinej AK čiastočne konvertovaná na „ľudskú“ 15-LOX. U potkana je však táto zmena možná len po ovplyvnení cieľových AK mutáciou podľa Borngräber I a Borngräber II (cit.⁴). Ľudská 15-LOX-2 tvorí výlučne 15-HpETE produkty. Myši ortológ oxygenuje ten istý typ substrátu za vzniku 8-HpETE produktov. Mutácia dvoch AK nachádzajúcich sa v kritických pozíciách umožňuje tento enzým myši premeniť na 15-LOX-2 podobnú ľudskej^{13,41}. Pekárová a spol. 12/15-LOX potkana exprimovali v *E. coli* a línii eukaryotických buniek N2a. Pripravili 6 typov mutantov typu Borngräber I, Sloane a Borngräber II, kde sa uskutočnila zmena jednej AK. Po stanovení LOX aktivity kontrolného enzýmu a mutovaných enzýmov RP-HPLC metódou sa pozorovala zmena aktivity, polohovej špecifity a preferencia substrátu⁴.

5. Záver

Tento prehľadný článok sa zameriava na objasnenie štruktúry a úlohy lipoxigenáz vo fyziologických i patologických procesoch a naznačuje stratégiu mutagenézy génov kódujúcich LOX s cieľom ovplyvniť polohovú špecifitu týchto enzýmov.

Izoenzýmové formy LOX sú prítomné v multiplných systémoch a orgánoch ľudského tela, zahŕňujúc adipocytové, vaskulárne, imunitné a nervové tkanivá. V dôsledku výraznej zvýšenej expzie izoenzymov LOX (5-, 8-, 12- a 15-LOX) a ich metabolitov v ľudskom organizme bolo zistené zakomponovanie do rôznych zápalových, nádorových a kardiovaskulárných ochorení, diabetes mellitus, ochorení centrálného a periférneho nervového systému.

Množstvo štúdií v ostatných rokoch prispieva k objasneniu úlohy, ktorú lipoxigenázy hrajú v uvedených ochoreniach. Vývoj zvieracích modelov s cieľovými génovými mutáciami ukazuje možnosti k lepšiemu pochopeniu úloh lipoxigenáz. Hľadanie selektívnych inhibítorov lipoxigenáz a jej izoenzymových foriem je aktívna oblasť skúmania a môže byť dôležitým výskumným nástrojom a sľubným cieľom pre liečbu širokého spektra ľudských ochorení.

Práca vznikla v rámci riešenia projektu VEGA 1/0392/14, VEGA 1/0873/15 a projektu APVV-0484-1.

LITERATÚRA

- Hoffman P., Bezáková L., Holková I., Pekárová M., Obložinský M.: Chem. Listy 106, 639 (2012).
- Tootle T. L.: Int. J. Biochem. Cell Biol. 45, 1629 (2013).
- Zuliani G., Galvani M., Leitersdorf E., Volpato S., Cavalieri M., Fellin R.: Curr. Pharm. Design 15, 4087 (2009).
- Pekárová M., Kühn H., Bezáková L., Ufer C., Heydeck D.: Arch. Biochem. Biophys. 571, 50 (2015).
- Walther M., Hofheinz K., Vogel R., Roffeis J., Kühn H.: Arch. Biochem. Biophys. 516, 1 (2011).
- Kühn H., Banthiya S., Van Leyen K.: Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids 1851, 308 (2015).
- Valentine R. C., Valentine D. L.: Prog. Lipid Res. 43, 383 (2004).
- Funk C. D., Chen X. S., Johnson E. C., Zhao L.: Prostaglandins Other Lipid Mediators 68-69, 303 (2002).
- Andreou A., Feussner I.: Phytochemistry 70, 1504 (2009).
- Belkner J., Wiesner R., Kühn H.: Agents Actions Suppl. 37, 78 (1992).
- Kim G. H., Ryan J. J., Archer S. L.: Antioxid. Redox Signal. 18, 1920 (2013).
- Buelna-Chontal M., Zazueta C.: Cell Signal. 25, 2548 (2013).
- Ivanov I., Heydeck D., Hofheinz K., Roffeis J., O'Donnell V. B., Kühn H., Walter M.: Arch. Biochem. Biophys. 503, 161 (2010).
- Holková I., Bezáková L., Bilka F., Balážová A., Vanko M., Blanáriková V.: Plant Physiol. Biochem. 48, 887 (2010).
- Rapp J.: Dissertation, The University of Toledo, USA 2006.
- Chen X. S., Funk C. D.: J. Biol. Chem. 276, 811 (2001).
- Kühn H., Saam J., Eibach S., Holzhutter H. G., Ivanov I., Walther M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 93 (2005).
- Boyington J. C., Gaffney B. J., Amzel L. M.: Science 260, 1482 (1993).
- Kuban R. J., Wiesner R., Rathman J., Veldink G., Nolting H., Sole V. A., Kühn H.: Biochem. J. 332, 237 (1998).
- Kühn H.: Prostaglandins Other Lipid Mediators 62, 255 (2000).
- Gianguido C., Schneider C., Brash A. R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 87 (2005).
- Segraves E. N., Chruszcz M., Neidig M., Ruddat V., Zhou J., Weeks A. T., Minor W., Solomon E. I., Holman T. R.: Biochemistry 45, 1023 (2006).
- Gillmor S. A., Villasenor A., Fletterick R., Sigal E., Browner M. F.: Nat. Struct. Biol. 4, 1003 (1997).
- Gilbert N. C., Bartlett S. G., Waight M. T., Neau D. B., Boeglin W. E., Brash A. R., Newcomer M. E.: J. Sci. 331, 217 (2011).
- Borngräber S., Kuban R. J., Kühn H.: Adv. Exp. Med. Biol. 469, 91 (1999).
- Cofta G., Schneider C., Brash A. R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 87 (2005).
- Schwarz K., Walter M., Anton M., Gerth C., Feussner I., Kühn H.: J. Biol. Chem. 276, 773 (2001).
- Chidananda C., Sattur A. P.: J. Agric. Food Chem. 55, 2879 (2007).
- Radmark O., Samuelson B.: J. Lipid Res. 50, 40 (2009).
- Aparoy P., Reddy K. K., Reddanna P.: Curr. Med. Chem. 19, 3763 (2012).
- Joo Y. C., Oh D. K.: Biotechnol. Adv. 30, 1524 (2012).
- Marks F., Furstenberger G.: Prostaglandins, Leukotrienes, and Other Eicosanoids: From Biogenesis to Clinical Application. str. 109. Wiley-VCH, Weinheim 1999.
- Horn T., Kakularam K. R., Anton M., Richter C., Reddanna P., Kühn H.: Redox Biol. 1, 566 (2013).
- Jansen C., Hofheinz K., Vogel J., Roffeis M., Anton M., Reddanna P., Kühn H., Walter M.: J. Biol. Chem. 286, 37804 (2011).
- Gianguido C., Schneider C., Brash A. R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 87 (2005).
- Schneider C., Pratt D. A., Porter N. A., Brash A. R.: Chem. Biol. 14, 473 (2007).
- Szefel J.: Curr. Mol. Med. 11, 1 (2011).
- Gilbert N. C., Rui Z., Neau D. B., Waight M. T., Bartlett S. M., Boeglin W. E., Brash A. R., Newcomer M. E.: FASEB J. 26, 3222 (2012).
- Furstenberger G., Marks F., Krieg P.: Prostaglandins Other Lipid Mediators 68-69, 235 (2002).
- Jisaka M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 136 (2005).
- Yeung J., Apola P. J., Vesci J., Stolla M., Rai G., Simeonov A., Jadhav A., Fernandez-Perez P., Maloney D. J., Boutaud O., Holman T. R., Holinstat M.: Thromb. Haemostasis 110, 569 (2013).
- Yeung J., Tourdot B. E., Adili R., Green A. R., Freedman C. J., Fernandez-Perez P., Yu J., Holman T. R., Holinstat M.: Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol. 36, 2068 (2016).
- Kühn H., Brash A. L.: J. Biol. Chem. 265, 1454 (1999).
- Turk R., Maas L., Brash A. L., Roberts J. L., Oates J. A.: J. Biol. Chem. 257, 12 (1988).
- Kühn H.: Prostaglandins Other Lipid Mediators 62, 255 (2000).
- Kühn H., Walter M., Kuban R. J.: Prostaglandins Other Lipid Mediators 68-69, 263 (2002).
- Dobrian A. D., Lieb D. C., Cole B. K., Taylor-Fishwick D. A., Chakrabarti S. K., Nadler J. L.: Prog. Lipid Res. 50, 115 (2011).
- Vogel R., Jansen C., Roffeis J., Reddanna P., Forsell P., Claesson H. E., Kühn H., Walter M.: J. Biol.

- Chem. 285, 5369 (2009).
49. Horn T., Adel S., Schumann R., Sur S., Kakularam K. R., Polamarasetty A., Reddanna P., Kühn H., Heydeck D.: *Prog. Lipid Res.* 57, 13 (2015).
50. Berger M., Schwarz K., Thiele H., Reimann I., Huth A., Borngraber M., Kühn H., Thiele J.: *J. Mol. Biol.* 278, 935 (1998).
51. Sloane D. L., Leung R., Barnett J., Craik C. S., Sigal E.: *Protein Eng.* 8, 275 (1995).
52. Choi J., Chon J. K., Kim S., Shin W.: *Proteins* 70, 1023 (2008).

L. Bezáková^a, I. Holková^a, A. Balažová^a, M. Obložinský^a, and P. Mikuš^b (^a *Department of Cell and Molecular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University*, ^b *Department of Pharmaceutical Analysis and Nuclear Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Comenius University*): **Animal Lipoxygenases – Structure, Positional Specificity of Lipoxygenase Isoenzymes and Their Importance**

Lipoxygenases (LOX) constitute a heterogeneous family of lipid peroxidizing enzymes which catalyze the stereospecific insertion of molecular oxygen into polyunsaturated fatty acids. The primary products of LOX reaction are hydroperoxy fatty acids, which are rapidly reduced to the corresponding hydroxy derivatives. In mammalian organisms, there are 4 main LOX isoforms, 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX, 15-LOX, constituting hydroperoxides with positional and stereo specificity. In the subsequent metabolic processes they provide significant cell signaling molecules and secondary messengers taking part in the development of inflammatory, tumorous and other diseases.

Recent studies clarified the role of lipoxygenases in various diseases. The study of the structure and the active site of enzyme, preparation of recombinant forms with the targeted gene mutations have shown possibilities for better understanding the lipoxygenase role in various pathological processes. Searching for selective inhibitors of LOX isoenzymes is an active area of investigation. They can represent an important research tool or become a promising targeted therapy of a wide range of human diseases.