

СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ ЛИПОКСИГЕНАЗ: НАСТОЯЩЕЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

И.В. Иванов^{1,2,*}, научный сотрудник, Н.В. Гроза², ассистент,

Г.И. Мягкова², ведущий научный сотрудник, Х. Кюн³, профессор

¹Институт токсикологии и фармакологии, Медицинский университет г. Ростока,

Росток, D-18057 Германия

²кафедра Химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского

МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия

³Институт биохимии, Медицинский университет Шарите,

Берлин, D-10115 Германия

*Автор для переписки, e-mail: igor_ivanov@gmx.de

Липоксигеназы (LOX) – ферменты перекисного окисления липидов – вовлечены в патогенез воспалительных и гиперпролиферативных реакций организма. Несмотря на то, что первая липоксигеназа растительного происхождения (LOX1 сои) была обнаружена более 60 лет назад, структурная биология этой группы ферментов не изучалась вплоть до середины 1990-ых годов. Данный обзор посвящен новейшим аспектам в области изучения молекулярной энзимологии липоксигеназ и обобщает существующие в настоящее время представления о структурных основах катализа с их участием. В обзоре рассмотрены различные гипотезы, объясняющие реакционную специфичность LOX, а также подведен промежуточный итог в области знания об эволюционном развитии этого класса ферментов в различных организмах. Несмотря на то, что биологическая роль LOX в низших организмах далеко не ясна, наличие в их ДНК последовательности LOX позволяет предположить, что семейство этих ферментов могло возникнуть сразу после появления атмосферного кислорода на Земле.

Ключевые слова: липоксигеназа, структура, катализ, полиненасыщенные жирные кислоты, окисление.

1. Введение

Липоксигеназы (LOX) – ферменты перекисного окисления липидов – являются диоксигеназами, содержащими негемовое железо [1–3]. Они катализируют стереоспецифическое перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), содержащих по крайней мере одно 1Z,4Z-пентадиеновое звено. Процесс окисления жирных кислот при участии LOX обычно включает четыре стадии: отщепление водорода, радикальную перегруппировку, введение кислорода и восстановление перокси-радикала, протекающие со строго контролируемой стереохимией (схема). Отщепление водорода является лимитирующей стадией [4], контролируемой законами квантовой механики [5]. Перенос водорода сопровождается переносом электрона и протона, при этом электрон не локализуется на протоне, а переносится непосредственно от субстрата к Fe^{3+} [6, 7]. В переходном состоянии соединенный ковалентной связью мостик $Fe-(OH)-C$ понижает энергетический барьер реакции и обеспечивает наиболее эффективный путь для ее протекания [6].

Хотя некоторые из изоформ LOX и способны окислять полиненасыщенные жирные кислоты в составе липидов, расположенных в биомембранах и липопротеинах [8–10], для большинства LOX субстратами являются исключительно свободные жирные кислоты, что предусматривает необходимость их высвобождения из состава липидов при помощи ферментов, гидролизующих сложные эфиры [11]. Общепринятая

номенклатура классифицирует LOX млекопитающих по их позиционной специфичности (положению введения кислорода в молекулу арахидоновой кислоты) как 5-LOX, 8-LOX, 11-LOX, 12-LOX или 15-LOX, а также на основе конфигурации асимметрического гидроксильного центра в образовавшемся продукте как S- или R-LOX. Подобная классификация не идеальна по ряду причин: арахидоновая кислота не является оптимальным субстратом для большинства LOX млекопитающих; ПНЖК состава C_{18} с меньшей степенью ненасыщенности, такие как линолевая и линоленовая кислоты, также являются субстратами этих ферментов, по отношению к которым реакционная специфичность LOX может сильно различаться. В отличие от LOX с низкой степенью филогенетического родства, даже эволюционно-родственные изоформы LOX могут проявлять различные ферментативные свойства. Возрастающее число обнаруженных геномных последовательностей, кодирующих LOX, а также попытки предсказать специфику окисления арахидоновой кислоты исключительно на основе первичной структуры белка приводит к запутанной ситуации, вследствие чего большинство изоформ LOX не могут быть классифицированы в соответствии с номенклатурой, основанной на позиционной специфичности фермента. Напротив, классификация, в основе которой лежит филогенетическая связь различных групп LOX, является наиболее подходящей. К сожалению, до настоящего времени не было предложено ни

одной простой и объединяющей номенклатуры LOX, которая бы учитывала вышеупомянутые проблемы.

Другой проблемой, которая выделяет исследования LOX в молекулярной энзимологии, является наличие нескольких изоформ в пределах одного вида, а также функциональная гетерогенность этих изоферментов. Так, в сое

было идентифицировано 13 различных изоформ LOX; геном риса содержит более чем 20 генов различных LOX. Человеческий геном включает 6 функциональных генов LOX, тогда как геном мыши – 7 (ген 12S-LOX эпидермиса мыши является не функциональным по сравнению с псевдогеном кластера LOX человеческого гена).

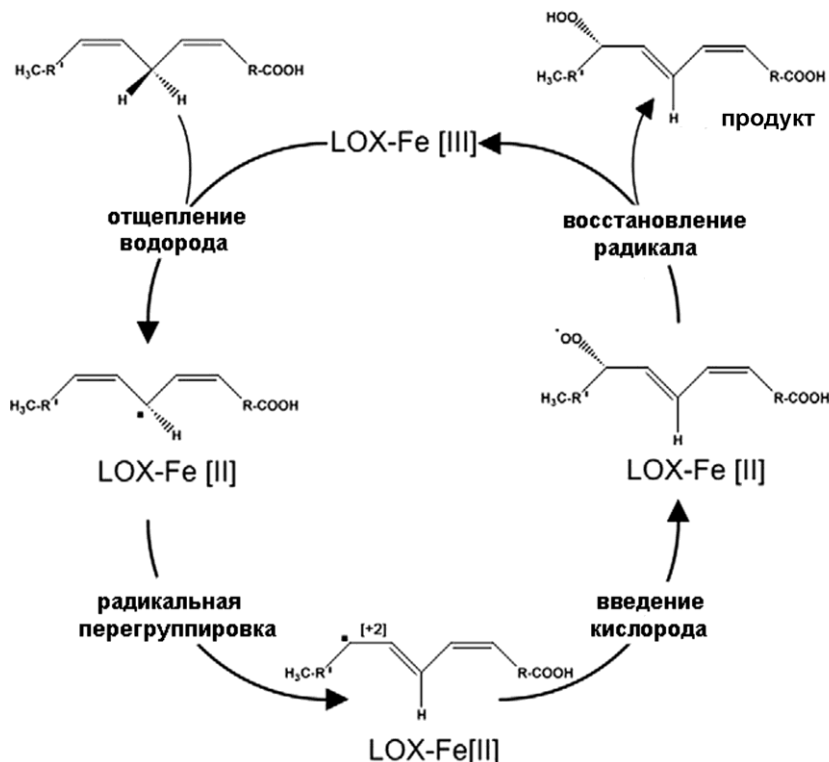


Схема. Механизм окисления ПНЖК, катализируемого LOX:

- 1) стереоселективное отщепление водорода сопровождается восстановлением каталитически активной Fe^{3+} -ОН-формы фермента в каталитически не активную Fe^{2+} -LOX;
- 2) радиальная перегруппировка, при которой электрон жирнокислотного радикала смещается либо в $+[2]$, либо $-[2]$ положение по отношению к карбоксильной группе субстрата;
- 3) антароповерхностное присоединение кислорода; 4) восстановление перокси-радикала посредством переноса электрона от Fe^{2+} -LOX с образованием окисленной формы фермента.

Таким образом, основным тематическим акцентом настоящего обзора является обсуждение новых структурных и эволюционных аспектов в области изучения липоксигеназ. Прочие аспекты из биологии и патофизиологии LOX – роль в процессах канцерогенеза [12, 13], патологии сосудистых заболеваний [14, 15] и воспалительных реакций организма [16, 17] – обсуждались в опубликованных ранее обзорах.

2. Структурные основы катализа LOX

2.1. Липоксигеназы млекопитающих представляют собой единую полипептидную цепь, которая организована в виде двухдоменной структуры; в низших организмах встречаются гибридные белки. На основании анализа структур ряда LOX растительного и животного происхождения и их комплексов с лигандом в кристалле (таблица), можно заклю-

чить, что большинство изоформ LOX состоят из одной полипептидной цепи, которая организована в виде двухдоменной структуры: малого N-терминального β -складчатого домена и большого α -спирального каталитического домена (рис. 1).

12/15-LOX кролика имеет форму цилиндра высотой 10 нм с эллиптическим основанием (большой радиус 3.05 нм, малый радиус 2.25 нм). 8R-LOX кораллов, которая по своей структуре довольно близка к ферменту кролика, напоминает цилиндр с радиусом основания 3 нм и высотой 10 нм [35], тогда как 11R-LOX кораллов [40], несмотря на общее структурное сходство, отличается в организации внешних α -спиралей каталитического домена. В то же время растительная LOX1 сои имеет форму эллипсоида (9×6.5×6 нм) [24].

Структурные данные LOX, опубликованные в банке данных белков (PDB)

Липоксигеназа	Лиганд / комментарии	Разрешение, Å	PDB-код	Лит. источник
Мутантные формы LOX1 сои:				[18–20]
LOX1 соевых бобов	лиганд отсутствует	2.60	2SBL	[21]
	лиганд отсутствует	1.40	1YGE	[22]
	уточнение 1YGE	1.40	1F8N	[19]
LOX3 соевых бобов	лиганд отсутствует	2.60	1LNH	[23]
	при температуре окружающей среды	2.0	1RRH	[24]
	при 93 K	2.0	1RRL	[24]
VLX-B соевых бобов		2.4	2IUJ	[25]
VLX-D соевых бобов		2.4	2IUK	[25]
LOX3 соевых бобов	лиганд: 4-гидроперокси-2-метоксифенол	2.2	1HU9	[26]
	лиганд: 13(S)-HpODE*	2.0	1IK3	[27]
	лиганд: протокатехуровая кислота	2.1	1N8Q	[28]
	лиганд: эпигаллокатехин галлат	2.1	1JNQ	[29]
	лиганд: 4-нитрокатехол	2.15	1NO3	[30]
			(1BYT)	[31]
12/15-LOX кролика	лиганд: ингибитор RS7	2.40	1LOX	[32]
	повторный анализ структуры	2.40	2P0M	[33]
	1LOX, димер с ингибитором RS7			
15-LOX-2 человека	лиганд: 3,6,9,12-тетраокса-эйкозanol-1	2.63	4NRE	[34]
8R-LOX кораллов		3.2	2FNQ	[35]
		1.85	3FG1	[36]
8R-LOX-fusion protein <i>Plexaura homomalla</i>		3.5	3DY5	[37]
12-LOX тромбоцитов человека	неполная структура	2.6	3D3L	[38]
5-LOX человека	модифицированная структура	2.4	3O8Y	[39]
11R-LOX <i>Gersemia fruticosa</i>		2.7	3VF1	[40]
12-LOX лейкоцитов свиньи	катал. домен; лиганд: ингибитор 4-(2-оксапентадека-4-ин)фенилпропионовая кислота	1.9	3RDE	[41]

* 13(S)-гидроперокси-(9Z,12Z)-октадекадиеновая кислота

В низших организмах LOX встречаются в виде гибридных белков, в которых липоксигеназный домен связан с другим каталитическим доменом, играющим роль во вторичном метаболизме гидропероксидов жирных кислот. Первый гибридный белок LOX был обнаружен в кораллах *Plexaura homomalla* [42]. В нем LOX-домен связан с гемсодержащим доменом пероксидазы, метаболизирующей пероксиды жирных кислот в аллен-оксиды с последующим образованием эйкозаноидов циклопентенонового ряда. Гибрид этого белка был клонирован, и обе единицы гибрида были выделены и охарактеризованы индивидуально [43, 44]. Также были идентифицированы их кристаллические структуры [35, 36, 45]. Хотя степень сохранения аминокислотной последовательности (АКП)

LOX-домена этого гибридного белка по отношению к АКП 12/15-LOX кролика была достаточно низка (30%), трехмерные структуры двух изоформ LOX довольно схожи друг с другом. Структура низкого разрешения гибридного белка указывала на то, что домен алленоксид-синтазы нековалентно связан с субдоменом LOX, в то время как предполагаемые сайты связывания ионов кальция и остатки Trp, участвующие во взаимодействии с липидными мембранами, экспонированы на поверхности фермента [37]. При этом мембранное связывание гибридного белка приводит к изменениям пространственной ориентации субдоменов по отношению друг к другу и, как следствие, появлению нового сайта протеолитического расщепления [37]. Другой гибридный белок LOX, облада-

ющий 84%-ой идентичностью последовательности с АКП LOX *Plexaura homomalla*, был обнаружен в коралле *Gersemia fruticosa* [46], что предполагает наличие этих ферментов в октокораллах. Кроме того, гибриды алленоксид-синтазы и LOX были обнаружены в цианобактериях *Anabaena* PCC 7120 и *Acaryochloris marina* [47, 48]. В отличие от ферментов кораллов, в которых гибриды содержат завершённые последовательности липоксигеназ, в изоформах цианобактерий отсутствует N-терминальный домен. При этом усечённый каталитический домен LOX сохраняет свою каталитическую активность.

Хотя биологическая роль гибридных белков не ясна, они участвуют в биосинтезе сигнальных молекул липидной природы [42, 49]. Во всех гибридных белках домены LOX связаны с C-концевым остатком нелипоксигеназной единицы. Таким образом, C-терминальная аминокислота, которая представляет собой один из пяти непосредственных лигандов железа, остаётся свободной. Этот факт имеет функциональное значение, так как ранее проведенные исследования мутагенеза показали, что усечение молекулы LOX по C-концу приводит к нарушениям свойств этих ферментов.

2.2. Малый N-терминальный домен LOX является важным структурным элементом, отвечающим за мембранное связывание и каталитическую активность. N-Терминальный (β -складчатый) домен всех LOX, для которых получены кристаллические структуры, состоит, в основном, из антипараллельных β -складок, что напоминает структуру C2-домена липазы поджелудочной железы [50]. У LOX1 сои β -складчатый домен включает первые 146 остатков АКП белка. В случае 12/15-LOX кролика и 8R-LOX кораллов β -складчатые домены образованы первыми 110 и 114 аминокислотными остатками, соответственно. N- и C-концевые домены ковалентно связаны неупорядоченным олигопептидом. Хотя β -складчатые домены изоформ LOX сои существенно больше по размеру, чем таковые у ферментов млекопитающих, их общие структуры обладают высокой степенью схожести (рис. 1). N-Терминальный домен 12/15-LOX кролика образует с C-концевым доменом поверхностный контакт общей площадью $1600 \text{ \AA}^2$ [32]. У LOX1 сои эта поверхность существенно больше по размерам ($2600 \text{ \AA}^2$), что предполагает наличие более сильного междоменного взаимодействия в случае растительных ферментов.

Высокая степень консервативности двухдоменной структуры липоксигеназ свидетельствует о функциональной роли N-терминального β -складчатого домена. Ограниченный протеолиз LOX1 сои приводит к образованию усечен-

ного варианта LOX, в котором отсутствует N-терминальная часть [51]. Эта «мини-LOX» каталитически активна, при этом обладает пониженным сродством к линолевой кислоте ($K_M \sim 24.2 \text{ мкМ}$ для «мини-LOX» против 11.2 мкМ для нативной LOX) и проявляет более высокую активность ($V_{\max} 363 \text{ с}^{-1}$ для «мини-LOX» против 55 с^{-1} для нативного фермента). Эти данные говорят о том, что общая каталитическая эффективность «мини-LOX» (k_{cat}/K_M) повышается в результате протеолиза. Более того, усечение N-терминальной части приводит к структурным изменениям в области субстрат-связывающей полости, так как в отличие от нативного фермента негемовое железо «мини-LOX» может быть обратимо удалено из активного центра [52]. К сожалению, для «мини-LOX» данные о кристаллической структуре отсутствуют, что делает анализ структурных изменений, вызванных усечением N-терминальной части, невозможным. Усечение N-терминального β -складчатого домена 12/15-LOX кролика генно-инженерными методами [53], напротив, приводит к понижению каталитической эффективности (1.43 против 0.14 мкМ/с). Интересно, что усечённый мутант подвергается более быстрой самоинактивации в процессе окисления арахидоновой кислоты. Эти данные свидетельствуют о том, что N-терминальный β -складчатый домен может играть роль в регулировании каталитической функции фермента [54].

Благодаря структурной схожести с β -складчатым доменом липазы человека [32, 55], N-терминальный домен LOX растений и млекопитающих также участвует в процессах ассоциации LOX с липидными мембранами [56, 57]. Действительно, как направленный мутагенез поверхностных остатков триптофана N-терминального домена 8R-LOX коралла и 5-LOX [35, 58], так и усечение β -складчатого домена 12/15-LOX кролика понижает способность связывания этих белков с биологическими мембранами. При этом изолированный каталитический домен 12/15-LOX кролика сохраняет способность вступать в мембранное взаимодействие, хотя и в меньшей степени. Исследования в области направленного мутагенеза показали, что в этом процессе могут участвовать остатки гидрофобных аминокислот обоих доменов, расположенные на поверхности молекулы белка [53, 59]. Протеолитическое отщепление N-терминального β -складчатого домена LOX1 сои, напротив, повышает способность фермента к мембранной ассоциации [51].

Для достижения наивысшей каталитической активности 5-LOX человека необходимо присутствие ионов Ca^{2+} [60, 61]. Хотя в присутствии Ca^{2+} способность 12/15-LOX кролика к мембранному связыванию повышается [59, 62],

анализ поверхности β -складчатого домена фермента кролика не выявил наличия определенных структурных элементов, способных вступать во взаимодействие с ионами Ca^{2+} . Напротив, β -складчатый домен 8R-LOX кораллов содержит остатки Asp39 и Asp45, а также Asp19, Asn44 и Glu47. Эти аминокислотные остатки, находящиеся на поверхности белка, аналогичны соответствующим аминокислотным остаткам 5-LOX человека, которые при взаимодействии с ионами Ca^{2+} способствуют проникновению остатков Trp41 и Trp77 в фосфолипидный слой биомембран [35]. Так как боковые цепи аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии с кальцием, и остатков триптофана находятся на одной стороне от предполагаемого входа в субстрат-связывающий карман, они, по-видимому, изменяют конформацию каталитического домена для облегчения проникновения жирных кислот мембранной фазы в активный центр фермента.

2.3. С-Терминальный домен LOX содержит субстрат-связывающий карман и каталитически активное негемовое железо. Каталитический домен всех известных на сегодняшний день изоформ LOX состоит, главным образом, из α -спиралей и содержит негемовое железо. Девятая спираль LOX1 сои длиной в 65 Å (аминокислотные остатки (а.о.) 473–518) является центральным структурным элементом каталитического домена [22]. Остальные из наиболее длинных спиралей расположены по отношению к ней как параллельно, так и антипараллельно, образуя тем самым ядро домена в виде мультиспирального пучка. В С-доме также представлены две антипараллельные β -складки [36]. В 12/15-LOX кролика каталитический домен (а.о. 114–663) состоит из 21-ой спирали и малого β -складчатого субдомена [32]. Каталитический домен фермента кораллов (а.о. 115–694) содержит 23 спирали. В этом ферменте вторая спираль разбита на две части и расположена под углом к тройной антипараллельной β -складке [36].

Каталитически активное негемовое железо всех LOX-изоформ координируется в форме октаэдрической сферы пятью аминокислотными остатками. Шестым координационным лигандом служит OH^- -анион. В случае LOX1 сои и 8R-LOX коралла лигандами железа являются три остатка His, один Asn и С-терминальный Pe. В кристаллической структуре Asn отдален приблизительно на 3 Å от иона железа и, таким образом, его роль в образовании координационного кластера довольно слаба. Несмотря на это, анализ рентгеновских координат [19] указывает на наличие обширной сети водородных связей между Asn и экваториальным лигандом His499 посредством двух аминокислотных

остатков вторичной координационной сферы железа – Gln495 и Gln697 [63]. В 12/15-LOX кролика железо скоординировано при помощи четырех остатков His и С-терминального Pe [64]. Один из остатков первичной координационной сферы His (His545) соответствует Asn, который является лигандом железа в LOX1 сои. Что касается липоксигеназ растений, их координационные силы стабилизированы при помощи сети водородных связей при участии лигандов вторичной сферы: Glu357 (соответствует Gln495 LOX1 сои) и Gln548 (соответствует Gln697 LOX1 сои) [32]. Исходя из кристаллических структур липоксигеназ млекопитающих, известных на сегодняшний день, можно заключить, что ионное окружение железа 12-LOX лейкоцитарного типа [41] наиболее приближено к шестикординатной геометрии октаэдра по сравнению с 5-LOX человека [39] и 12/15-LOX кролика [43], что, в свою очередь, свидетельствует о более стабильной структуре кластера железа.

2.4. Междоменная подвижность как источник структурной гибкости LOX. Анализ рентгеноструктурных координат LOX1 сои предполагает, что двухдоменная организация белка является весьма устойчивой. Сравнительно большая поверхность междоменного контакта (2600 Å^2) [22] предполагает сильное нековалентное взаимодействие между доменами, что ограничивает подвижность N-терминального β -складчатого домена по отношению к каталитической субъединице. Таким образом, β -складчатый домен может незначительно перемещаться вдоль поверхности контакта с каталитическим доменом, однако его движение перпендикулярно плоскости поверхности маловероятно [65]. Это предположение подтверждается данными, полученными с помощью малоуглового рассеивания рентгеновских лучей (SAXS) – метода, который позволяет характеризовать структуры белков в растворе. Сопоставление структур LOX1 сои в растворе и в кристалле показывает, что N-терминальный β -складчатый домен находится вблизи каталитической субъединицы [65].

12/15-LOX кролика, напротив, обладает высокой степенью структурной подвижности [66], так как имеет меньшую поверхность междоменного контакта по сравнению с LOX1 сои (1600 Å^2). Сравнение структуры 12/15-LOX кролика в растворе в отсутствие лиганда (данные SAXS, концентрация белка $< 1 \text{ мг/мл}$) со структурой в кристалле показало почти идеальное соответствие в области каталитического домена [67]. В то же время в области N-терминального β -складчатого домена были обнаружены значительные расхождения. На основе этих данных можно предположить, что N-терминальный β -

складчатый домен может довольно свободно перемещаться по отношению к каталитической субъединице.

2.5. Связывание лиганда с активным центром 12/15-LOX кролика приводит к конформационным изменениям белковой матрицы. В отсутствие лиганда вход в предполагаемый субстрат-связывающий карман 12/15-LOX кролика имеет форму воронки и обеспечивает прямой доступ субстрата к каталитически активному железу.

В случае, когда молекула белка содержит лиганд, фермент принимает так называемую закрытую конформацию, в которой спираль $\alpha 2$ смещается приблизительно на 12 Å (рис. 2а) по отношению к исходному положению, блокируя вход в субстрат-связывающий карман [33]. Этот процесс сопровождается конформационными изменениями в активном центре, в соответствии с которыми спираль $\alpha 18$, ограничивающая дно субстрат-связывающего кармана, разворачивается, увеличивая его объем. Подобная трансформация является весьма существенной, так как α -атомы углерода в Leu597 в обоих конформерах удаляются друг от друга на расстояние 6 Å [33] (рис. 2б). Сравнение пространственных координат спиралей $\alpha 2$ в двух формах 12/15-LOX кролика с соответствующим структурным элементом 8R-LOX коралла показывает, что два конформера фермента кролика представляют собой противоположные предельные структуры, в то время как 8R-LOX – промежуточное состояние [33]. Подобные конформационные изменения маловероятны во многих растительных LOX вследствие более компактной упаковки белка. Так, в случае LOX3 сои аминокислотный сегмент между Leu331 и Gln341, образующий спираль 4, слегка смещен после проникновения лиганда, но отклонение не превышает величину в 3 Å. Сравнение структур 12/15-LOX кролика и 12-LOX лейкоцитов свиньи [41] обнаруживает значительную схожесть структурных элементов обеих липоксигеназ в области $\alpha 2$ -спирали, тогда как у Ca^{2+} -зависимых 5-LOX человека и 11R-LOX [40] аналогичный структурный элемент представлен в виде нескольких отдельных сегментов [39] (рис. 3).

2.6. Субстрат-связывающий карман LOX является гидрофобной полостью с выходом на поверхность белка. Липофильный характер молекул жирных кислот, природных субстратов LOX, предполагает, что субстрат-связывающий карман образован преимущественно гидрофобными аминокислотными остатками. Отсутствие данных рентгеноструктурного анализа комплексов LOX с их природными субстратами (ПНЖК) создают трудности в изучении механизмов фермент-субстратного связывания.

Рентгеновские данные, характеризующие комплекс LOX3 сои с продуктом 13(S)-HpODE (13(S)-гидроперокси-(9Z,12Z)-октадекадиеновая кислота) [27], также не могут быть использованы для интерпретации и моделирования процессов ферментного связывания с субстратом, так как они могут не отражать структуру каталитически продуктивного ферментного комплекса.

LOX1 сои содержит две основные полости (полость I и II), которые пересекаются друг с другом в области негемового железа [21]. Боковые цепи Arg707 и Val354 разделяют полость II, которая зажата между двумя слоями спиралей ($\alpha 9$, $\alpha 11$ с одной стороны, $\alpha 2$, $\alpha 6$, $\alpha 18$, $\alpha 21$ с другой), на две подполости IIa и IIb. Полость IIa, которая предположительно выполняет роль субстрат-связывающего кармана, пересекается боковым каналом между аминокислотами Ile553 и Trp500, который, как полагают, служит каналом транспорта кислорода в активный центр (рис. 4). На основании исследований LOX1 сои с помощью точечного мутагенеза была выдвинута гипотеза, предполагающая участие остатка Ile553 в ограничении транспорта кислорода [70]. Другие экспериментальные данные, напротив, свидетельствуют лишь в пользу влияния этого остатка на положение и конформацию молекулы жирной кислоты в активном центре [18]. Роль полости IIa в процессах субстратного связывания до настоящего времени остается предметом обсуждений. Для проникновения молекулы жирной кислоты внутрь активного центра фермента необходима переориентация боковых цепей Trp259 и Leu541 (рис. 4) [22]. Так, для ряда изоформ LOX сои (LOX1, LOX3, VLX-B и VLX-D) были обнаружены различия в форме и объеме полости IIa вследствие разной полярности, размера и химической природы аминокислотных остатков, образующих вход в карман [25]. В то время как полость IIa в LOX1 сои является непрерывным каналом, аналогичные структурные элементы, присутствующие в других изоформах LOX сои, имеют барьеры, ограничивающие проникновение субстрата [25].

12/15-LOX кролика является единственным природным (не модифицированным генно-инженерными методами) ферментом млекопитающих, для которого трехмерная структура была получена в виде комплекса с ингибитором (RS7) [32]. В исходной карте распределения электронной плотности несколько структурных элементов белка оставались не разрешенными. Повторный анализ исходных рентгеновских координат [33] позволил выявить наличие смеси двух различных конформеров LOX, один из которых присутствовал в виде комплекса с лигандом, а второй не содержал лиганда.

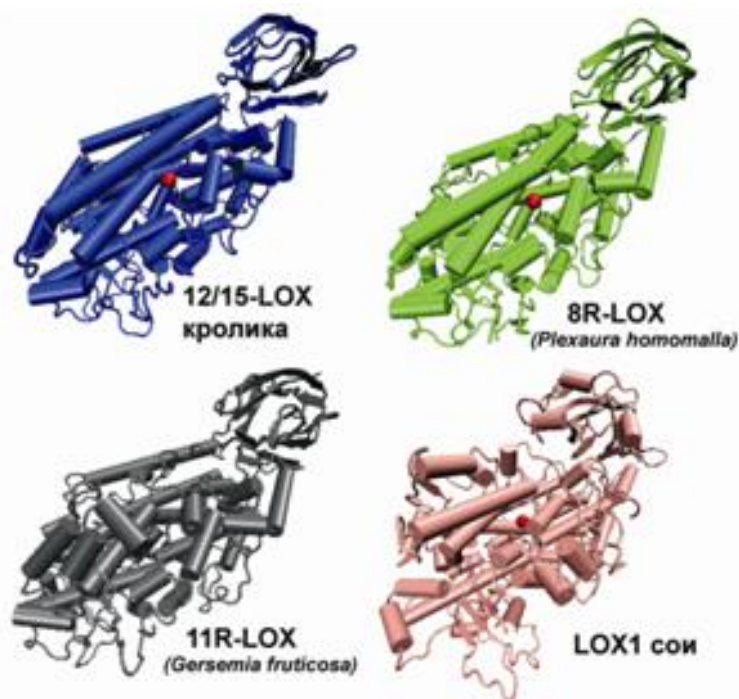


Рис. 1. Изображение структур различных липоксигеназ. Изображения получены с помощью программы VMD и представлены в единой проекции методом наложения структур.

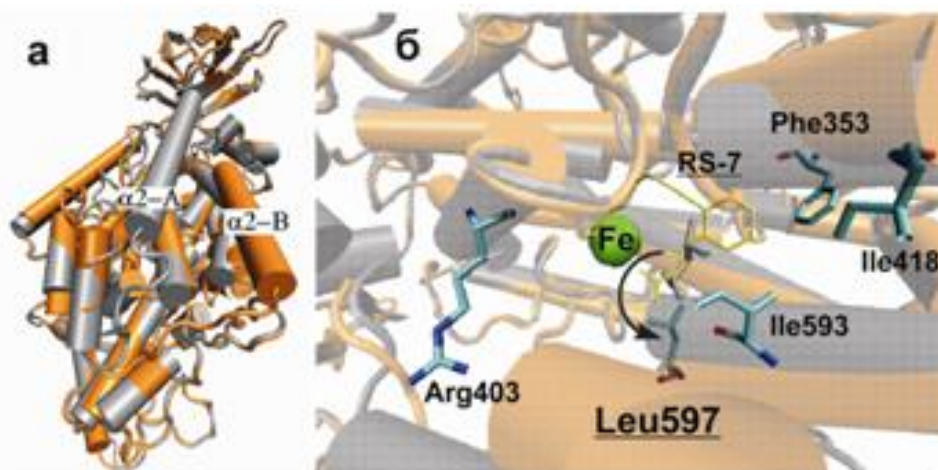


Рис. 2. Сравнение структур 12/15-LOX кролика, свободной от лиганда и содержащей лиганд: (а) в результате взаимодействия фермента с лигандом $\alpha 2$ -спираль 12/15-LOX кролика ($\alpha 2$ -А) перемещается на 12 Å ($\alpha 2$ -В); (б) структура субстрат-связывающего кармана, содержащего ингибитор RS7. Субстрат-связывающая полость увеличивается в объеме за счет перемещения Leu597 на 6 Å в результате взаимодействия фермента с лигандом. Аминокислотные остатки Phe353, Ile418 и Ile593 представляют собой триаду детерминант позиционной специфичности фермента [68, 69].

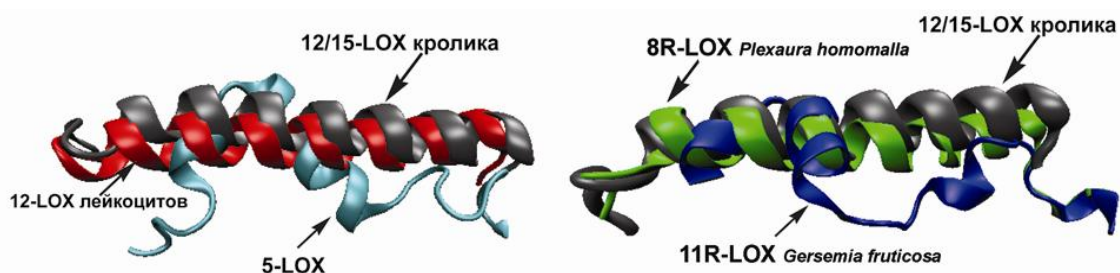


Рис. 3. Сопоставление структуры $\alpha 2$ -спирали 12/15-LOX кролика в конформации, свободной от лиганда, и соответствующих аналогичных элементов других липоксигеназ (12-LOX лейкоцитов свиньи, 5-LOX человека, 8R-LOX *Plexaura homomalla* и 11R-LOX *Gersemia fruticosa*).

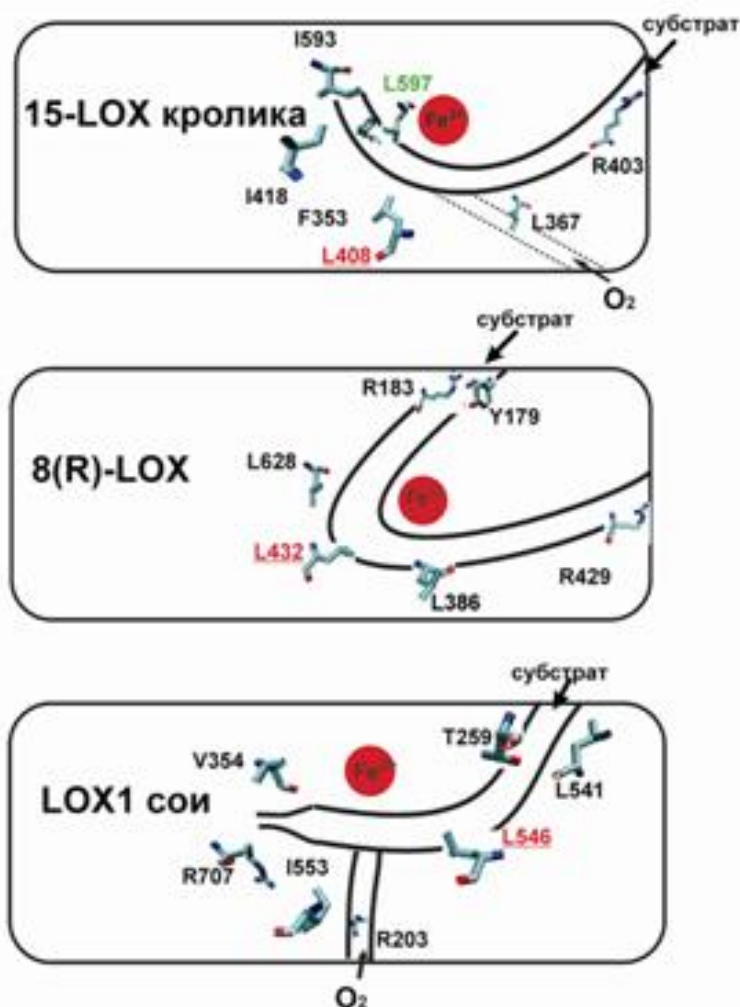


Рис. 4. Схематическое изображение субстрат-связывающих карманов различных LOX и положение ключевых аминокислотных остатков, ограничивающих его полость. Проекция, представленная на рисунке, получена наложением структур с использованием программы VMD.

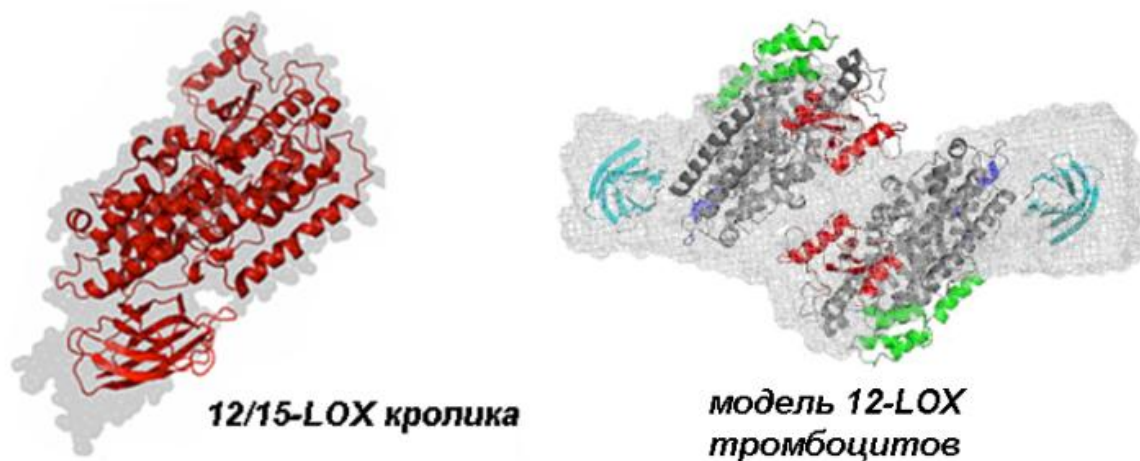


Рис. 7. Структуры низкого разрешения 12/15-LOX кролика и 12-LOX тромбоцитов человека в растворе. На рисунке представлено сопоставление структур низкого разрешения 12/15-LOX кролика (30 Å) и 12-LOX тромбоцитов (16 Å), полученных методом SAXS, со структурой 12/15-LOX в кристалле и гомологической моделью 12-LOX тромбоцитов, соответственно.

Сопоставление обеих структур свидетельствует о значительной структурной модификации, которой подвергается фермент в процессе проникновения лиганда в активный центр (см. рис. 2). В форме, свободной от лиганда (открытая структура), предполагаемая полость субстратного кармана имеет форму воронки с выходом на поверхность белка около остатка Arg403. В другой форме, содержащей лиганд (закрытая структура), субстрат-связывающий карман является более глубоким и изогнут за счет боковой цепи Leu408 (см. рис. 4). Стенки кармана образованы боковыми цепями 23-х преимущественно гидрофобных аминокислотных остатков шести различных спиралей ($\alpha 2$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\alpha 16$ и $\alpha 18$) и петли, соединяющей $\alpha 9$ и $\alpha 10$. Вход в субстрат-связывающий карман в этой конформации оказывается закрытым. Кроме того, остаток Leu597 восемнадцатой спирали ($\alpha 18$) контролирует глубину полости (рис. 2б и 4). В форме, свободной от лиганда, боковая цепь Leu597 образует дно кармана, ограничивая таким образом его глубину и объем. В процессе присоединения лиганда, спираль $\alpha 18$ перемещается примерно на 6 Å по отношению к ее исходному положению, в результате чего внутреннее пространство связывающего кармана становится свободным для доступа субстрата. К сожалению, функциональная роль остатков Leu408 и Leu597 в процессе окисления жирных кислот не была исследована экспериментально.

Свободная от лиганда 8R-LOX коралла содержит две внутренних полости, формирующие U-образный канал, который позволяет обеспечить доступ субстрата к негемовому железу с противоположных сторон поверхности белка (рис. 4). Для образования непрерывного канала необходимо изменение положения ротамера Leu386 и сдвиг остатка Leu628 [33, 35] при одновременном вращении плоскости ароматического кольца Tyr179. Leu628 в 8R-LOX кораллов, который соответствует Leu597 в 12/15-LOX кролика, разделяет канал на две смежные подполости. Положительно заряженные остатки Arg расположены на входе и выходе U-образного туннеля (Arg183 и Arg429) и могут взаимодействовать с карбоксильной группой жирной кислоты во время ее проникновения в активный центр. Arg429 образует солевой мостик с остатком Glu394, закрывая вход для субстрата с одной стороны. Напротив, противоположный вход вблизи Arg183 в соответствии с позиционной специфичностью этой изоформы, скорее всего, является функциональным. В то время как в кристаллической структуре ни один из выходов не является открытым, структурная гибкость 12/15-LOX кролика предполагает, что отсутствие очевидного «отверстия» не исклю-

чает возможности проникновения жирной кислоты в активный центр. Исследования функциональной роли остатков Arg183 и Arg429 (8R-LOX кораллов) с помощью точечного мутагенеза предоставили бы ценную информацию о механизме взаимодействия 8R-LOX кораллов с субстратом, однако такие эксперименты не были проведены.

2.7. Молекулярный кислород проникает в активный центр LOX посредством строго контролируемых механизмов. Как и другие диоксигеназы, LOX катализируют бимолекулярные реакции, используя атмосферный кислород в качестве субстрата. В течение долго времени считалось, что кислород может свободно диффундировать в молекуле белка. Последние данные, однако, указывают на наличие асимметричного распределения концентрации этого газа в молекуле белка. Так, для LOX 1 сои была впервые выдвинута гипотеза о наличии особых каналов транспорта кислорода [71–73]. Предполагаемый субстрат-связывающий карман LOX1 сои (полость IIa) пересекается с боковым каналом, который граничит с Ile553 и выходит на поверхность белка в области Arg203 [22] (рис. 4). Структурное моделирование комплекса фермент-субстрат показывает, что пространство в области Ile553 может быть занято субстратом – линолевой кислотой, в которой в процессе ферментативной реакции образуется радикал при C13 во время отщепления водорода. Таким образом, если бы эта полость выполняла роль потенциального канала для диффузии, молекулы кислорода непосредственно направились бы из раствора в реакционный сайт каталитического домена. При замене Ile553 на более объемный остаток Phe наблюдалось 20-кратное уменьшение эффективности окисления субстрата [70, 74]. Ile553 LOX сои соответствует Val439 8R-LOX коралла [36]. Этот аминокислотный остаток расположен в C-концевой части «арки», которая ограничивает полость U-образного субстрат-связывающего канала. Хотя участок U-образной полости в области Arg429, как предполагалось изначально, играет роль альтернативного канала связывания жирной кислоты в активном центре, возможность того, что он может функционировать одновременно в качестве канала для доступа кислорода, не исключена.

Анализ кристаллической структуры 12/15-LOX кролика показывает, что канал доступа кислорода, постулированный для LOX сои, в этом ферменте отсутствует. Для возможности выявления других потенциальных путей контролируемой диффузии кислорода была создана расчетная трехмерная карта распределения свободной энергии [74]. Глобальный минимум распределения энергии (область высокого сродства

к кислороду) находится в непосредственной близости от C15-атома углерода молекулы арахидоновой кислоты в модели фермент-субстратного комплекса и, таким образом, совпадает с областью фермента, где во время катализа утилизируется кислород. Фактически, моделирование показывает, что степень вероятности нахождения кислорода в пределах 4 Å от C15-атома молекулы арахидоновой кислоты в 7 раз превышает вероятность его нахождения вблизи C11-атома. Таким образом, введение кислорода преимущественно в положение C15 согласуется с позиционной специфичностью этого фермента.

Три основных канала, связывающих поверхность белка с областью высокого сродства к кислороду, были идентифицированы с применением моделирования молекулярной динамики для свободной от лиганда молекулы фермента [75]. Так, первый канал начинается у основания субстрат-связывающего кармана, внутренняя часть которого соответствует кислородному каналу, предложенному для LOX1 сои. Этот канал полностью закрыт в комплексе фермент-субстрат. Второй канал совпадает с полостью субстрат-связывающего кармана и, как следствие, заблокирован на стадии связывания субстрата. Третий канал соединяет противоположную сторону молекулы белка с активным центром (см. рис. 4). В случае, когда в системе присутствует арахидоновая кислота, положение общего минимума энергии и возможность проникновения кислорода через канал 3 остаются неизменными, что дает основание предполагать, что только он является функциональным как в случае свободного фермента, так и его комплекса с субстратом [75].

2.8. Первичная структура LOX играет ключевую роль в реакционной специфичности окисления жирных кислот. Реакционная специфичность LOX по отношению к взаимодействию с полиеновыми жирными кислотами лежит в основе традиционной номенклатуры LOX. Для LOX млекопитающих арахидоновая кислота используется в качестве образцового субстрата, тогда как LOX растений обычно классифицируются согласно их специфичности

по отношению к линолевой кислоте. Хотя молекулярные основы реакционной специфичности различных LOX интенсивно исследовались в прошлом, общие основополагающие принципы, объединяющие все липоксигеназы, не выявлены до настоящего времени. Полиеновые жирные кислоты представляют собой гибкие «микромолекулярные» структуры с высокой степенью конформационной подвижности углеродородной цепи. Таким образом, конформацию, которую они принимают в процессе связывания с активным центром, предсказать трудно. Эксперименты с изомерами синтетических жирных кислот показывают, что для LOX1 сои [76] и 12/15-LOX кролика [77] расстояние, на котором находится бис-аллильная метиленовая группа, служащая донором водорода, от метильного конца субстрата, имеет большое значение. Основываясь на ранних исследованиях LOX сои, была разработана топологическая модель процесса связывания молекул субстрата (жирной кислоты) с активным центром фермента [78], согласно которой метильный конец субстрата проникает в гидрофобный субстрат-связывающий карман (модель «хвостом вперед»). При этом γ -S-атом водорода при C13-атоме углерода в молекуле ПНЖК находится в непосредственной близости от гидроксигруппы, связанной с негемовым железом (акцептором водорода). Связывание молекулы свободной жирной кислоты с активным центром фермента контролируется посредством гидрофобного, π -электронного и ионного типов взаимодействия (рис. 5).

Модифицированные субстраты, такие как 15(S)-HETE (15(S)-гидрокси-5Z,8Z,11Z,14Z-эйкозатетраеновая кислота) или ее метиловый эфир, могут связываться с ферментом в противоположной ориентации таким образом, что карбоксильная группа ПНЖК проникает в субстрат-связывающий карман. Подобная ориентация субстрата «головой вперед» потребует наличия положительно заряженного аминокислотного остатка в гидрофобном окружении субстрат-связывающего кармана [79, 80].

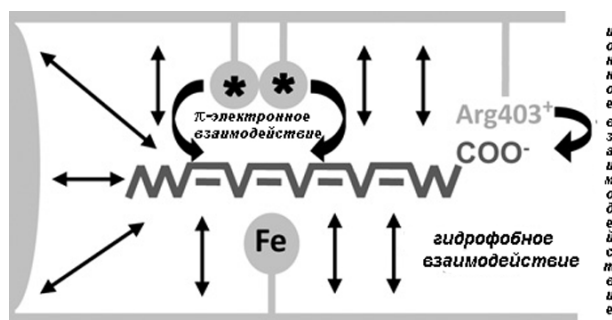


Рис. 5. Расположение молекулы ПНЖК в активном центре 12/15-LOX и движущие силы фермент-субстратного связывания.

С другой стороны, полученные рентгено-структурные данные комплекса LOX3 сои с 13(S)-HpODE [27] показывают принципиальную возможность присоединения субстрата «головой вперед», при котором карбоксильная группа является лигандом положительно заряженного остатка Arg726. В большинстве LOX растительного происхождения этот аргинин законсервирован, тогда как в ферментах млекопитающих на его месте присутствуют незаряженные аминокислотные остатки. Дополнительные доказательства функциональной роли Arg726 были получены с помощью исследований в области мутагенеза 13S-LOX огурца [81].

Подытоживая результаты исследований, полученные на настоящий день, оба варианта субстратного связывания как «хвостом вперед», так и «головой вперед» представляются возможными. В случае 13S-LOX огурца, по-видимому, существует равновесие между процессами связывания «хвостом вперед» и «головой вперед», которое определяется как природой субстрата, так и условиями реакции [82–84].

Недавно был предложен альтернативный сценарий связывания субстрата с активным

центром 8R-LOX кораллов. Для этого фермента был описан U-образный субстрат-связывающий карман, который выходит на поверхность белка обоими концами [36] (см. рис. 4). Предполагается, что жирные кислоты могут проникать в активный центр «хвостом вперед», путем использования одного из этих двух входов. В обоих случаях карбоксильная группа остается на поверхности белка. К сожалению, экспериментальные данные, подтверждающие функциональность одного или другого входа в активный центр этой LOX, отсутствуют.

2.9. Антароповерхностный характер и стереоконтроль липоксигеназной реакции. Отщепление атома водорода бис-аллильной метиленовой группы и введение кислорода в радикал жирной кислоты представляют собой две последовательные стадии катализа LOX (см. схему). Эти процессы происходят с противоположных сторон плоскости пентадиенового радикала, в котором электрон делокализован в системе двух двойных связей [5, 85] (рис. 6). Подобная антароповерхностная стереохимия предполагает, что отщепление водорода и присоединение кислорода взаимосвязаны друг с другом.

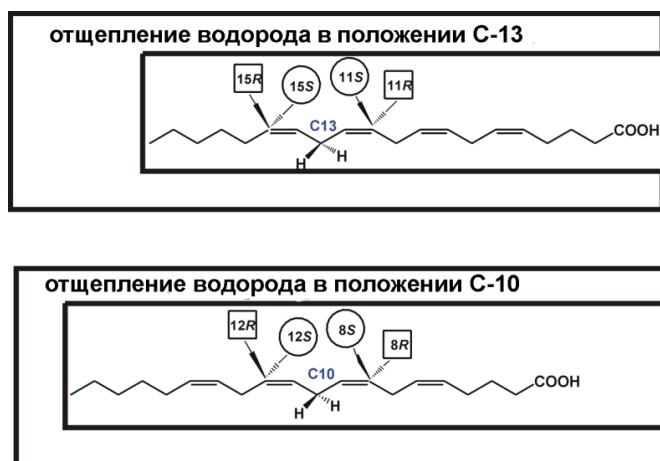


Рис. 6. Стереохимия липоксигеназной реакции. Pro-S-водород при C13-атоме углерода субстрата находится перед плоскостью пентадиеновой системы. При его отщеплении введение кислорода происходит с противоположной стороны либо в [+2]-положении с образованием 15(S)-HpETE, либо [-2]-положении, приводя к образованию 11(R)-HpETE (верхняя панель).

В случае как 15(S)-HpETE, так и 11(R)-HpETE кислород вводится в молекулу субстрата с одной и той же стороны. Различия в конфигурации их хиральной группы определяется изменением старшинства лигандов при асимметрическом центре. Аналогичным образом происходит образование 8(R)- и 12(S)-липоксигеназных продуктов (нижняя панель).

Анализ аминокислотной последовательности LOX с известной реакционной специфичностью указывает на то, что большинство S-липоксигеназ содержит остаток аланина в положении 404 (номенклатура 12/15-LOX кролика), тогда как в R-липоксигеназах вместо Ala присутствует Gly [3, 86, 87]. Замена Gly428 в 8R-LOX коралла на Ala с помощью точечного мутагенеза приводила к образованию основного продукта окисления (12-HpETE) преимущест-

венно в S-конфигурации асимметрического центра. Подобные наблюдения были сделаны для 12R-LOX человека [86] и мыши [85], однако для фермента мыши доля продукта окисления в S-конфигурации (8(S)-HpETE) составляла только 40% [85]. При использовании обратной стратегии (замена Ala416 на Gly) в применении к 15S-LOX2 человека, как основной продукт реакции была идентифицирована 11(R)-HpETE (70%). Частичные изменения в энантио-

селективности также наблюдались в случае введения аналогичной мутации в 8S-LOX мыши [86], LOX1 сои [88], LOX *Arabidopsis thaliana* и LOX томатов [89]. На примере 12/15-LOX кролика наблюдались лишь частичные изменения в реакционной специфичности. Фактически, главным продуктом окисления арахидоновой кислоты мутантом Ala404Gly оставалась 15(S)-HpETE, тогда как на 11(R)-HpETE приходилось не более 20% от доли общего продукта.

Для объяснения полученных данных была предложена механистическая модель [36], предполагающая пространственные затруднения при взаимодействии кислорода с радикалом жирной кислоты. В случае отщепления про-S-атома водорода при C13-атоме молекулы арахидоновой кислоты, антароповерхностный характер реакции LOX не допускает введение кислорода в 15R- и 11S-положения (рис. 6). Напротив, кислород может быть введен либо в 15S-, либо в 11R-положения, расположенные с противоположных сторон молекулы жирной кислоты. Боковая цепь Ala в 15S-LOX экранирует 11R-положение, способствуя тем самым 15S-окислению. В случае замены Ala на меньший по размеру Gly, это препятствие исчезает. К сожалению, данная гипотеза не объясняет, почему замена Ala на Gly понижает долю продуктов 15S-окисления. В качестве возможного объяснения было выдвинуто предположение об экранировании кислорода как в 12S-, так и в 8R-положениях в зависимости от пространственной ориентации боковой цепи остатка Leu432 8R-LOX кораллов (рис. 6) [36]. В ферменте дикого типа боковая цепь Leu432 блокирует только 12S-положение. При замене Gly428 на Ala, метильная группа Ala сдвигает боковую цепь Leu432 таким образом, что 8R-положение становится затрудненным, при этом стерические препятствия для 12S-окисления исчезают. Для подтверждения этой гипотезы Leu432 8R-LOX коралла замещали как на меньший по размеру Ala, так и на более объемный Phe [36]. К сожалению, полученные мутанты обладали довольно низкой каталитической активностью, создавая трудности при интерпретации полученных результатов. Боковая цепь Leu432 играет важную роль в позиционировании молекулы жирной кислоты в активном центре, так что практически невозможно определить, какой из двух эффектов (расположение жирной кислоты или экранирование кислорода) доминирует. Принципиальная проблема данной рабочей гипотезы заключалась в том, что замена Ala на Gly не предоставляет дополнительного свободного пространства. Фактически, объем Ван-дер-Ваальса одной отдельно взятой молекулы кис-

лорода составляет $50 \text{ \AA}^3$, тогда как на одну метильную группу (различие между Ala и Gly) приходится около $20 \text{ \AA}^3$. Можно также предположить, что если Ala препятствует доступу кислорода, его замена на Gly обеспечивает беспрепятственное проникновение молекул кислорода в реакционный центр. Благодаря наличию структуры высокого разрешения 8R-LOX коралла, расчеты внутримолекулярного распределения кислорода [72] могли бы стать подходящим методом для косвенной проверки этой гипотезы. Предпочтение одного положения для введения кислорода перед другим могло бы быть связано с пространственным искажением плоской части пентадиенового радикала и смещением электронной плотности в сторону одного определенного атома углерода. К сожалению, непосредственные экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу подобной делокализации электронной плотности в процессе LOX-реакции, отсутствуют.

Для LOX1 сои, которая окисляет линолевую кислоту исключительно с образованием 13(S)-HpODE, замена Ala542 на Gly приводит к образованию приблизительно 40% 9(R)-HpODE. Фермент дикого типа и мутант Ala542Gly отщепляют один и тот же атом водорода, при этом жирная кислота находится в субстрат-связывающем центре фермента в одной и той же ориентации [83]. Так как в обоих случаях кислород вводится в молекулу субстрата с одной стороны ее плоскости, различие в структуре продуктов является простым результатом инверсии перераспределения радикальной плотности со сдвигом [+2] для фермента дикого типа и [-2] для мутанта Ala542Gly (рис. 6) и, как следствие, изменения приоритетности заместителей при асимметрическом атоме углерода, а не инверсии ориентации субстрата в активном центре.

2.10. Геометрия трех ключевых аминокислот определяет позиционную специфичность 12/15-липоксигеназ (концепция триады).

Для 12/15-LOX концепция триады дает возможность достаточно простого объяснения их реакционной специфичности. Первоначально эта гипотеза была предложена для 12/15-LOX кролика [68] и предполагает, что полиеновые жирные кислоты располагаются в субстрат-связывающем кармане по принципу «хвостом вперед» (рис. 5) и карбоксильной группой снаружи в области Arg403. Основание субстрат-связывающего кармана фермента, содержащего лиганд, ограничено триадой аминокислот Phe353, Ile418 и Ile593, при этом геометрия их боковых цепей определяет положение молекулы жирной кислоты в активном центре. В случае, когда аминокислотные остатки в этих

положениях имеют небольшие по объему боковые цепи, жирная кислота способна проникать глубже в субстрат-связывающий карман, при этом отщепление водорода в положении C10 является предпочтительным (12-липоксигеназа). Напротив, если боковые цепи аминокислотных остатков триады достаточно объемны, водород отщепляется преимущественно в положении C13 (15-липоксигеназное окисление) (рис. 6).

Исследования в области направленного мутагенеза подтверждают правомерность применения гипотезы триад к 12/15-LOX человека [90, 91], 12/15-LOX кролика [90, 69], 12/15-LOX обезьяны [92], 12/15-LOX орангутанга [92], 12/15-LOX мыши [93], 12/15-LOX крысы [94] и 12/15-LOX свиньи [95]. Вклад в позиционную специфичность каждой из компонент триады непостоянен и изменяется в зависимости от типа фермента. Для человека и орангутанга Phe353 и Ile418 (нумерация 12/15-LOX кролика) принадлежат к группе детерминант первого порядка, так как они оказывают наибольшее влияние на процессы позиционирования субстрата в активном центре. Их замена на аминокислотные остатки с менее объемными боковыми группами превращает 15-LOX исключительно в 12-липоксигеназу. Для 12/15-LOX мыши отдельные мутации компонентов триады вызывают, напротив, лишь незначительные изменения позиционной специфичности, при этом одновременное введение нескольких мутаций вызывает наибольший эффект [92]. Исследования 5-LOX человека показали, что одновременное введение нескольких мутаций по положению компонентов триады увеличивало долю 15S-окисления. Так, для комплексного мутанта F359W+A424I+N425M+A603I в качестве доминирующего продукта окисления была идентифицирована 15(S)-HpETE [96]. Хотя природа изменений, происходящих в геометрии активного центра, неизвестна, полученные данные свидетельствуют о том, что 5-LOX может быть превращена в 15-липоксигенирующий фермент при уменьшении объема субстрат-связывающего кармана [96].

Данные исследований в области мутагенеза компонентов триад 12R-LOX мыши [85] и 15-LOX2 человека [92], напротив, не поддерживают эту концепцию, показывая тем самым, что она не отражает свойства LOX эпидермального типа. Компьютерная модель комплекса LOX1 сои с линолевой кислотой [88] предполагает, что метильный конец жирной кислоты проникает вглубь субстрат-связывающего кармана, вступая в контакт с Phe557, который соответствует второй компоненте триады (Met419) фермента кролика и пред-

ставлен в 13-липоксигеназах растительного происхождения объемным остатком Phe. Напротив, в 9-LOX его место занимает меньший по размерам остаток Val. Исследования в области направленного мутагенеза на примере 13S-LOX огурца подтверждают роль вышеуказанного аминокислотного остатка в позиционной специфичности LOX [78, 97].

Основываясь на квантово-механических расчетах электронной структуры и моделировании молекулярной динамики, была создана улучшенная модель комплекса 12/15-LOX с ПНЖК [98, 99]. Результаты расчетов показали наличие свободного пространства в активном центре фермента, которое обеспечивает вариабельность конформации молекул жирной кислоты, в особенности по отношению к положению системы двойных связей. Согласно этой модели, арахидоновая кислота расположена в активном центре таким образом, что рго-S-атом водорода при C10 локализован ближе к акцептору протона фермента ($\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$), чем рго-S-атом водорода при C13. Хотя в процессе окисления арахидоновой кислоты отщепление рго-S-водорода от C13 является предпочтительным, авторы работы предполагают, что это происходит вследствие энергетических и стерических затруднений в положении C10. На основе расчетов квантовой и молекулярной механики, а также с помощью методов молекулярной динамики для 12/15-LOX кролика было показано, что присоединение кислорода в положении [+2] (при C13-атоме углерода линолевой кислоты) имеет более низкий энергетический барьер, чем в положении [-2] (при C7) благодаря стерическим затруднениям, создаваемым остатками Leu597 и Glu548.

2.11. Реакционная специфичность 15-LOX2 человека и ее ортолога (8S-LOX мыши) не может быть объяснена концепцией триады. Несмотря на тот факт, что 15-LOX2 человека и 8S-LOX мыши обладают различной позиционной специфичностью, они являются ферментами-ортологами с высокой степенью идентичности аминокислотной последовательности (78%). Два аминокислотных остатка, Asp602 и Val603 в 15-LOX2 человека (Tyr603 и His604 в 8S-LOX мыши) были идентифицированы как основные детерминанты, определяющие позиционную специфичность этих ферментов [100]. Напротив, мутации аминокислот, входящих в триаду, оказывают незначительное влияние на реакционную особенность изоформ LOX эпидермального типа [92]. Различия между 15-LOX2 человека и 8S-LOX мыши можно объяснить, если предположить противоположную ориентацию субстрата в активном центре [82, 100]. 15-LOX2 человека связывает арахидоновую кислоту по принципу

«хвостом вперед», при этом водород отщепляется от C13-атома углерода, что в условиях [+2]-радикальной перегруппировки приводит к введению кислорода в положение C15 (рис. 6). Напротив, 8S-LOX мыши связывает арахидоновую кислоту «головой вперед», при этом отщепление водорода происходит при C10-атоме и сопровождается [-2]-радикальной перегруппировкой с присоединением кислорода в положении C8. Остаток His604, который расположен в области основания субстрат-связывающего кармана, обеспечивает взаимодействие с карбоксильной группой жирной кислоты и необходим для обратной ориентации субстрата [100, 104].

2.12. Реакционная специфичность изоформ LOX зависит от экспериментальных условий. Изменение pH буфера, выбранного для проведения ферментативной реакции, оказывает сильное влияние на позиционную специфичность LOX растений [82, 101, 102]. Несмотря на то, что колебания величины pH часто происходят *in vivo*, об их влиянии на специфичность LOX животных на физиологическом уровне известно не так много. Исследование зависимости профиля продуктов окисления ПНЖК рядом LOX позвоночных от значения pH показало его относительную стабильность в диапазоне pH, близком к физиологическому [83]. Структурные изменения в результате точечного мутагенеза, а также изменения концентрации субстрата, наоборот, могут вызывать pH-зависимость специфичности ферментативной реакции некоторых изоформ LOX. Так, для мутанта Val603His 15-LOX2 человека 8S-липоксигенирование является доминирующим (65%) при $\text{pH} < 7$, тогда как 15(S)-HpETE образуется, главным образом, при $\text{pH} \geq 8$. Аналогичным образом, структура продуктов 8S-LOX мыши дикого типа не изменяется в близком физиологическом диапазоне значений pH, тогда как замена His604 на Phe вызывает pH-зависимое изменение позиционной специфичности. Эти вместе взятые данные свидетельствуют о том, что специфичность LOX определяется условиями среды протекания ферментативной реакции, однако с биологической точки зрения роль этого явления остается неизученной.

2.13. Аллостерический характер LOX. Относительно недавно возможность аллостерической регуляции ферментативной активности в присутствии АТФ и ионов Ca^{2+} была показана для 5-LOX человека [103]. Исследования в области кинетики окисления синтетических сульфатов жирных кислот 12/15-LOX человека также показывают возможность аллостерической регуляции активности этой группы ферментов [104], при которой активатор не

является лигандом активного центра фермента. Присутствие эндогенных ферментативных продуктов липоксигеназного окисления линолевой (ЛК) и арахидоновой кислот (АК), 12-HpETE и/или 13-HpODE, также влияют на каталитическую эффективность процесса окисления АК (k_{cat}/K_M) в случае как 15-LOX1, так и 15-LOX2 человека, увеличивая не только каталитическую эффективность окисления арахидоновой кислоты по сравнению с линолевой кислотой [$(k_{\text{cat}}/K_M) \text{ АК}/(k_{\text{cat}}/K_M) \text{ ЛК}$], но и сродство к кислороду 15-LOX1 при окислении арахидоновой кислоты [105, 106]. Напротив, в случае окисления линолевой кислоты сродство фермента к кислороду понижается [105]. Таким образом, в клеточной системе, где присутствуют обе жирные кислоты, присутствие аллостерических эффекторов может изменять субстратную специфичность фермента в сторону окисления арахидоновой кислоты. Интересно отметить, что присутствие как 15-HEETE, так и 13-HODE не влияет на каталитическую активность LOX1 *сои* [107]. Присутствие ингибиторов окисления ПНЖК, таких как сульфаты олеиновой и пальмитиновой кислот, не только понижает каталитическую активность LOX1, но и изменяет специфичность фермента по отношению к арахидоновой кислоте. Эти данные показывают, что как 15-LOX1, так и LOX1 *сои* подвергаются аллостерическому контролю, однако молекулярный механизм этого процесса до настоящего времени недостаточно изучен. Также остается неизвестным нахождение центра связывания с аллостерическим регулятором и природа структурных изменений в молекуле фермента, происходящих в присутствии лиганда.

2.14. Структура LOX в растворе. Данные исследований структур 12/15-LOX кролика [67] и LOX1 *сои* [65] методом малоуглового рассеивания рентгеновских лучей (SAXS) свидетельствуют о том, что оба этих фермента в условиях низкой концентрации белка находятся в растворе, главным образом, в виде гидратированных мономеров (< 1 мг/мл) с присутствием незначительной доли димерной фракции. Эти данные подтверждаются результатами электрофореза в неденатурирующих условиях, гель-фильтрации и масс-спектрометрии. При более высоких концентрациях белка, которые выходят далеко за рамки физиологических условий, для фермента кролика наблюдается необратимая агрегация. В присутствии лиганда активного центра (активатора) – 13(S)-HPODE – равновесие мономер–димер сдвигается в сторону димера [108], что, по-видимому, лежит в основе аллостерической регуляции 12/15-LOX кролика.

Структура низкого разрешения, полученная для 12-LOX тромбоцитов человека методом

SAXS, показывает, что этот фермент может присутствовать в водном растворе в виде димера и обладает тенденцией к агрегации в крупные олигомеры [109]. Детальное исследование механизмов олигомеризации свидетельствует о том, что этот процесс происходит за счет образования межмолекулярных дисульфидных связей, неустойчивых в восстанавливающем окружении. Напротив, димеры 12-LOX тромбоцитов человека стабильны в восстанавливающей среде, что исключает потенциальное участие дисульфидных связей в процессе олигомеризации [109]. Масс-спектрометрический анализ фермента в водном растворе позволяет обнаружить белок с молекулярной массой в 77 кДа, что характерно для мономерной фракции фермента (рис. 7). Подобное противоречие между данными SAXS и масс-спектрометрии свидетельствуют в пользу образования нековалентных димерных комплексов, неустойчивых в условиях анализа. 5-LOX человека, напротив, может образовывать димеры и/или более крупные олигомеры посредством образования межмолекулярных дисульфидных мостиков с участием остатков Cys159, Cys300, Cys416 и Cys418. При этом сайты связывания с АТФ находятся в непосредственной близости от поверхности междоменного контакта [110].

3. Эволюция LOX

3.1. Гены, кодирующие последовательность липоксигеназ, обнаружены в эукариотах и бактериях, но не найдены в археях. LOX обнаружены в растениях [11, 111], животных [1, 92], включая ряд морских организмов [112, 113]. Недавно изоформы LOX были также обнаружены в различных прокариотах [114–116]. Для получения более подробной информации об эволюции LOX был проведен поиск специфичных для LOX последовательностей ДНК с использованием баз данных GenBank, Refseq, Uniprot, Ensembl на предмет наличия гомологии. Семейство LOX является структурно гетерогенной группой в силу того, что последовательности как ДНК, так и белка известных на сегодняшний день изоформ LOX не содержат отличительных признаков, характерных для всех LOX одновременно. В качестве ключевого элемента поиска были использованы фрагменты ДНК, кодирующие непосредственные лиганды железа и их ближайшее окружение. Результаты проведенного поиска сгруппированы по доменам клеточных форм жизни (рис. 8). Последо-

вательности LOX были найдены как у эукариотов, так и у прокариотов. В археях, напротив, липоксигеназы не были обнаружены, что неудивительно, принимая во внимание исключительную среду их обитания. Для большинства архей субстрат LOX – молекулярный кислород – является токсичным.

В процессе эволюционного развития LOX появились у ряда прокариотов (цианобактерии и протеобактерии), в простейших одноклеточных организмах (красные и зеленые морские водоросли), амёбе (*Dictyostelium discoideum*), грибах, растениях (мхах и цветущих растениях) и животных (рис. 8). У животных последовательности LOX встречаются во множестве видов, начиная с пластинчатых *Trichoplax adhaerens* до приматов, включая кораллы, клеща, желудевого червя, рыб, лягушек, летучую мышь, ежа, мышь, дельфина, слона, обезьяну и человека.

Многие виды, содержащие LOX, служат в качестве «модельных организмов», характеризующих определенные стадии развития эукариотов. *Volvox carteri* является одним из древних многоклеточных организмов, который существует до настоящего времени; *Trichoplax adhaerens* представляет собой одного из самых простых эуметазоев (лат. *Eumetazoa*), родственных кишечнополостным (лат. *Cnidaria*) [117]. Другими «модельными организмами», содержащими последовательности LOX, являются амёба *Dictyostelium discoideum* (образцовая модель исследования дифференцировки клеток, хемотаксиса и апоптоза), асцидия *Ciona intestinalis* (считается ближайшим к человеку беспозвоночным и содержит около 80% генов человека), ланцетник *Branchiostoma floridae* (наиболее тесно связан с первыми позвоночными), а также рыба фугу *Tetraodon nigro-viridis* (имеет самый малый из известных геном позвоночных, 340 миллионов пар оснований). *Danio rerio*, часто используемый в исследованиях развития позвоночных и изучении функции генов, содержит несколько последовательностей LOX, некоторые из которых классифицированы как 12- и 5-LOX. В геноме других модельных организмов, таких как *Sacharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster* последовательности LOX не было обнаружено.

3.2. Существует ли общий прототип LOX? За исключением цианобактерии *Acarzochloris marina*, у которой было обнаружено 5 различных последовательностей, кодирующих LOX, одноклеточные организмы

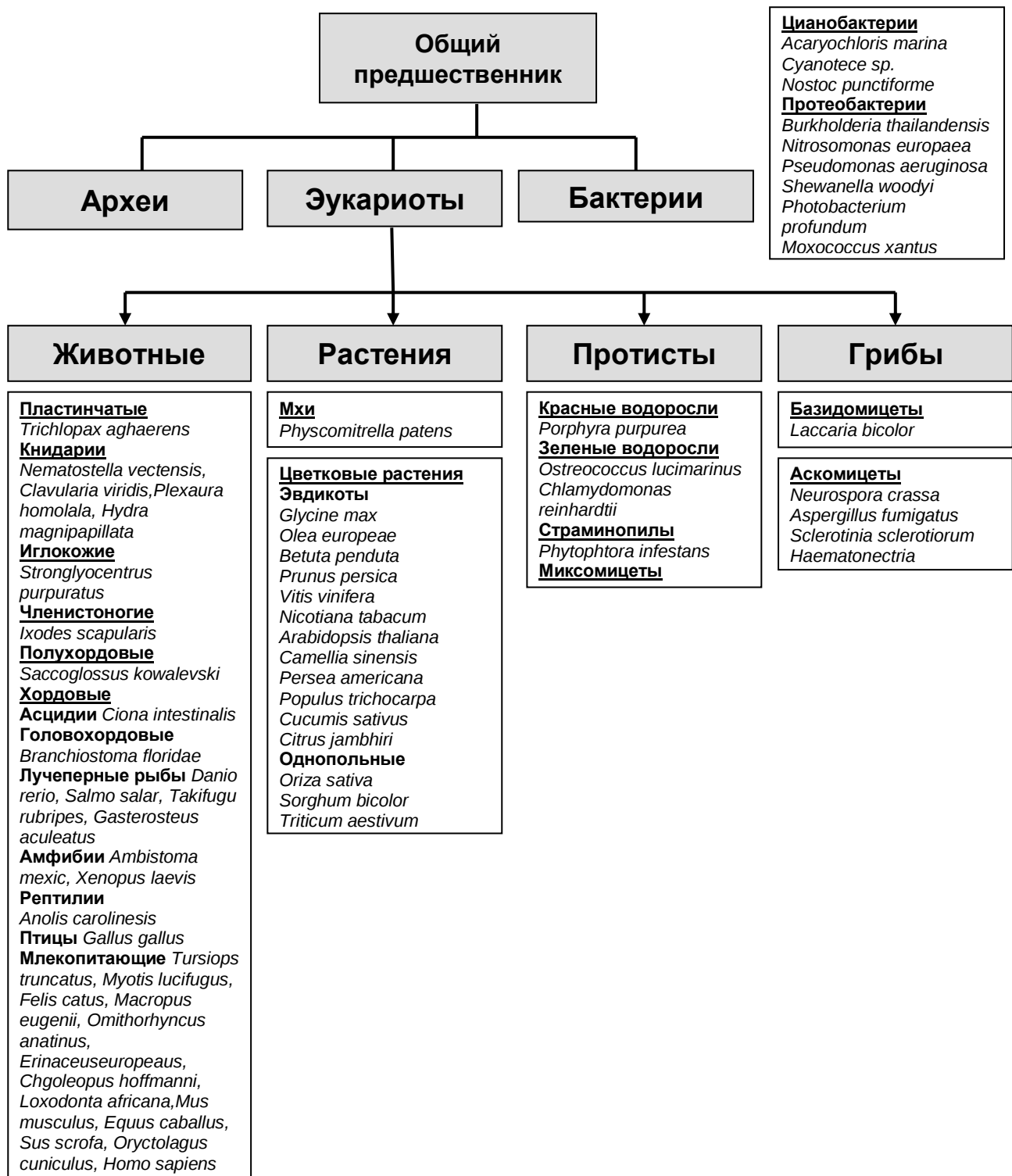


Рис. 8. Наличие липоксигеназной последовательности в ДНК живых организмов.

содержат, главным образом, одну или две LOX. Напротив, у мыши найдено 7 функциональных генов LOX, при этом наличие сплайсинговых вариантов увеличивает общее число экспрессируемых LOX. *Arabidopsis thaliana*, который используется как «модельный организм» высших растений, содержит 6 генов LOX [118]. У некоторых растений найдено более чем 15 различных последовательностей ДНК, кодирующих LOX. Сравнение последовательностей

ДНК данных видов предполагает, что некоторые из них могли возникнуть в процессе эволюции вследствие дупликации генов [119, 120]. Вопрос о существовании древнего предшественника LOX и то, какая из обнаруженных на сегодняшний день изоформ является наиболее тесно связанной с этой гипотетической формой, остается не выясненным.

Присутствие LOX в бактериях породило различного рода дискуссии о возможности

горизонтального переноса генов [114]. Хотя многие из одноклеточных организмов являются патогенами или симбионтами и, таким образом, входят в тесный контакт с растениями и животными, количество и гетерогенность изоформ LOX в низших организмах свидетельствует о том, что горизонтальный перенос генов, возможно, является не единственным объяснением присутствия LOX у прокариотов. Наиболее вероятно, что как у прокариотов, так и эукариотов LOX эволюционировали исходя из общего древнего предшественника.

Цианобактерии являются одной из самых древних форм жизни на Земле. Они, как полагают, ответственны за преобразование древней атмосферы Земли в окислительную среду благодаря их способности осуществлять фотосинтез и высвобождать молекулярный кислород. LOX встречается в цианобактериях разного порядка [47, 48, 115, 122–124], что указывает на ранние стадии образования этих ферментов в процессе эволюции. Таким образом, вполне возможно, что экспрессия первых генов LOX наблюдалась у цианобактерий. Согласно эндосимбиотической теории, цианобактерии происходят от хлоропластов [125, 126]. В условиях переноса пластидных генов в ядерный геном [127–131] LOX могли зародиться в растениях, так как изоформы LOX из современных растений локализованы в пластидной последовательности митохондриального генома. Недавно были найдены LOX и в других пластидах, включая хромопласты зрелых томатов [132].

Еще одним аспектом более поздней эволюции LOX является предположение о том, что только 12/15-LOX гоминидов (человек, шимпанзе, орангутанг или горилла) является разновидностью «истинной 15-LOX». Хотя позиционная специфичность LOX шимпанзе и гориллы не исследована экспериментально, сравнительный анализ последовательности белка в области компонент триады предполагает окисление арахидоновой кислоты по 15-му положению. Напротив, у других млекопитающих, таких как *Macaca mulatta*, свинья, мышь и крыса наблюдается экспрессия группы изоформ 12/15-LOX [92, 133–136], для которых окисление субстрата по 12-му положению является предпочтительным. Единственным исключением из этого правила является кролик, у которого обнаружены гены, кодирующие как 12-, так и 15-LOX [137]. Имеет ли этот сдвиг в сторону 15-липоксигеназного окисления арахидоновой кислоты в процессе эволюции LOX млекопитающих какое-либо функциональное значение, еще предстоит изучить.

3.3. Биологическая роль изоформ LOX.

Биологическая функция LOX млекопитающих была исследована методом нокаута соответ-

ствующих генов. Мыши, у которых удален ген 12/15-LOX [138], ген 5-LOX [139] или ген 12-LOX тромбоцитарного типа [140], являются жизнеспособными и нормально развиваются. Подобное наблюдается и при двойном нокауте генов 12/15-LOX+5-LOX [141]. В растениях LOX вовлечены в многочисленные процессы, включая биосинтез фитогормонов [142], прорастание семян [143], старение листьев [144, 145] и развитие аромата [146, 147]. Однако, остается неясным, почему определенные представители растений экспрессируют различные изоформы LOX.

В низших организмах биологическая роль LOX подробно не изучалась. В кораллах *Plexaura homomalla* этот фермент участвует в процессах биосинтеза простагландинов [147], которые составляют 2-3% от сухого веса организма. К сожалению, биологическая роль производных простагландинов в физиологии кораллов до сих пор не ясна. При поражении цианобактерий ультразвуком наблюдается сдвиг в сторону увеличения образования эндогенных продуктов LOX [121]. В других низших организмах изоформы LOX могут играть важную роль в защитных механизмах клетки, таких как реакции на стресс, процессах дифференцировки и созревания.

4. Будущее и перспективы развития исследований в области структурной биологии LOX

За последние 20 лет были получены рентгеноструктурные данные для целого ряда LOX животного и растительного происхождения (таблица). Эти данные представляют собой основу для моделирования трехмерных структур менее изученных LOX, подобно тому, как это было сделано для 5-LOX картофеля [149]. Использование данного подхода представляет собой большую опасность, так как моделирование, основанное лишь на сходстве аминокислотной последовательности белка, может привести к получению ложных выводов о конструктивных деталях и функциональных особенностях в условиях отсутствия функциональных данных.

Отличительной чертой в области исследований структурной биологии последних обнаруженных LOX явился повторный анализ рентгеновских координат, полученных в 1997 году для комплекса 12/15-LOX кролика с ингибитором [39]. Его результаты отчетливо демонстрируют, что LOX являются динамическими структурами, которые подвергаются конформационным изменениям в процессе взаимодействия с лигандом. Подобные структурные пертурбации довольно внушительны, так как происходят не только в области субстрат-связывающего кармана, но и на поверхности белка. Так, в

релаксированной структуре компоненты триады не являются частью субстрат-связывающего кармана из-за помех со стороны остатка Leu597. Напротив, в закрытой структуре, содержащей лиганд, Leu597 смещен так, что открывает дно кармана для проникновения жирной кислоты в активный центр таким образом, что ее «хвост» может вступать в контакт с компонентами триады [68, 69]. Подобный динамичный характер фермента кролика подтверждается данными малоуглового рассеивания рентгеновских лучей и динамической флуоресценции, однако остается неясным, проявляют ли другие изоформы LOX подобную степень структурной гибкости. Для решения этих вопросов необходимо изучение динамики структурных изменений других изоформ LOX.

Другим открытым вопросом структурной биологии LOX является биологическая роль N-терминального β -складчатого домена. Мута-

генез и ограниченный протеолиз показали, что этот домен участвует в мембранном связывании и регулировании ферментативной активности. Хотя каталитический домен LOX является структурно устойчивой единицей в составе молекулы белка, не исключено, что усечение N-терминального домена приводит к изменениям в каталитическом домене [150, 151].

Биологическая роль изоформ LOX в высших растениях и животных являлась темой многочисленных дискуссий в течение последних десятилетий. Использование нокаута гена LOX значительно продвинуло исследования в этом направлении. Несмотря на этот прогресс, остается множество нерешенных вопросов, связанных с биологической ролью ряда изоформ LOX. Фактически, за исключением редких случаев, не ясно, реализуется ли генетическая информация, обнаруженная на уровне последовательности ДНК, в виде функционального фермента.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES:

1. Brash A.R. Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 23679–23682.
2. Kuhn H., Saam J., Eibach S., Holzthutter H.G., Ivanov I., Walther M. Structural biology of mammalian lipoxygenases: Enzymatic consequences of targeted alterations of the protein structure // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 338. P. 93–101.
3. Schneider C., Pratt D.A., Porter N.A., Brash A.R. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis // *Chem. Biol.* 2007. V. 14. P. 473–488.
4. Glickman M.H., Klinman J.P. Nature of rate-limiting steps in the soybean lipoxygenase-1 reaction // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 14077–14092.
5. Rickert K.W., Klinman J.P. Nature of hydrogen transfer in soybean lipoxygenase 1: Separation of primary and secondary isotope effects // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 12218–12228.
6. Lehnert N., Solomon E.I. Density-functional investigation on the mechanism of H-atom abstraction by lipoxygenase // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2003. V. 8. P. 294–305.
7. Hatcher E., Soudackov A.V., Hammes-Schiffer S. Proton-coupled electron transfer in soybean lipoxygenase // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 5763–5775.
8. Upston J.M., Neuzil J., Witting P.K., Alleva R., Stocker R. Oxidation of free fatty acids in low density lipoprotein by 15-lipoxygenase stimulates nonenzymic, alpha-tocopherol-mediated peroxidation of cholesteryl esters // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 30067–30074.
9. Takahashi Y., Glasgow W.C., Suzuki H., Taketani Y., Yamamoto S., Anton M., Kuhn H., Brash A.R. Investigation of the oxygenation of phospholipids by the porcine leukocyte and human platelet arachidonate 12-lipoxygenases // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 218. P. 165–171.
10. Schewe T., Halangk W., Hiebsch C., Rapoport S.M. A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria // *FEBS Lett.* 1975. V. 60. P. 149–152.
11. Andreou A., Feussner I. Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism // *Phytochemistry.* 2009. V. 70. P. 1504–1510.
12. Bhattacharya S., Mathew G., Jayne D.G., Pelengaris S., Khan M. 15-Lipoxygenase-1 in colorectal cancer: a review // *Tumour Biol.* 2009. V. 30. P. 185–199.
13. Pidgeon G.P., Lysaght J., Krishnamoorthy S., Reynolds J.V., O'Byrne K., Nie D., Honn K.V. Lipoxygenase metabolism: Roles in tumor progression and survival // *Cancer Metastasis Rev.* 2007. V. 26. P. 503–524.
14. Chawengsub Y., Gauthier K.M., Campbell W.B. Role of arachidonic acid lipoxygenase metabolites in the regulation of vascular tone // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009. V. 297. P. 495–507.
15. Mochizuki N., Kwon Y.G. 15-Lipoxygenase-1 in the vasculature: Expanding roles in angiogenesis // *Circ. Res.* 2008. V. 102. P. 143–145.
16. Duroudier N.P., Tulah A.S., Sayers I. Leukotriene pathway genetics and pharmacogenetics in allergy // *Allergy.* 2009. V. 64. P. 823–839.
17. Hersberger M. Potential role of the lipoxygenase derived lipid mediators in atherosclerosis: Leukotrienes, lipoxins and resolvins. // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2010. V. 12. P. 1063–1073.

18. Meyer M.P., Tomchick D.R., Klinman J.P. Enzyme structure and dynamics affect hydrogen tunneling: The impact of a remote side chain (I553) in soybean lipoxygenase-1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 1146–1151.
19. Tomchick D.R., Phan P., Cymborowski M., Minor W., Holman T.R. Structural and functional characterization of second-coordination sphere mutants of soybean lipoxygenase-1 // *Biochemistry*. 2001. V. 40. P. 7509–7517.
20. Minor W., Solomon E.I., Holman T.R. Kinetic, spectroscopic, and structural investigations of the soybean lipoxygenase-1 first-coordination sphere mutant, Asn694Gly // *Biochemistry*. 2006. V. 45. P. 10233–10242.
21. Boyington J.C., Gaffney B.J., Amzel L.M. Structure of soybean lipoxygenase-I // *Biochem. Soc. Trans.* 1993. V. 21. P. 744–748.
22. Minor W., Steczko J., Stec B., Otwinowski Z., Bolin J.T., Walter R., Axelrod B. Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 10687–10701.
23. Skrzypczak-Jankun E., Amzel L.M., Kroa B.A., Funk Jr. M.O. Structure of soybean lipoxygenase L3 and a comparison with its L1 isoenzyme // *Proteins*. 1997. V. 29. P. 15–31.
24. Skrzypczak-Jankun E., Borbulevych O.Y., Zavodszky M.I., Baranski M.R., Padmanabhan K., Petricek V., Jankun J. Effect of crystal freezing and small-molecule binding on internal cavity size in a large protein: X-ray and docking studies of lipoxygenase at ambient and low temperature at 2.0 Å resolution // *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 2006. V. 62. P. 766–775.
25. Youn B., Sellhorn G.E., Mirchel R.J., Gaffney B.J., Grimes H.D., Kang C. Crystal structures of vegetative soybean lipoxygenase VLX-B and VLX-D, and comparisons with seed isoforms LOX-1 and LOX-3 // *Proteins*. 2006. V. 65. P. 1008–1020.
26. Skrzypczak-Jankun E., Zhou K., McCabe N.P., Selman S.H., Jankun J. Structure of curcumin in complex with lipoxygenase and its significance in cancer // *Int. J. Mol. Med.* 2003. V. 12. P. 17–24.
27. Skrzypczak-Jankun E., Bross R.A., Carroll R.T., Dunham W.R., Funk Jr. M.O. Three dimensional structure of a purple lipoxygenase // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. P. 10814–10820.
28. Borbulevych O.Y., Jankun J., Selman S.H., Skrzypczak-Jankun E. Lipoxygenase interactions with natural flavonoid, quercetin, reveal a complex with protocatechuic acid in its X-ray structure at 2.1 Å resolution // *Proteins*. 2004. V. 54. P. 13–19.
29. Skrzypczak-Jankun E., Zhou K., Jankun J. Inhibition of lipoxygenase by (–)-epigallocatechin gallate: X-ray analysis at 2.1 Å reveals degradation of EGCG and shows soybean LOX-3 complex with EGC instead // *Int. J. Mol. Med.* 2003. V. 12. P. 415–420.
30. Skrzypczak-Jankun E., Borbulevych O.Y., Jankun J. Soybean lipoxygenase-3 in complex with 4-nitrocatechol // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2004. V. 60. P. 613–615.
31. Pham C., Jankun J., Skrzypczak-Jankun E., Flowers 2nd R.A., Funk Jr. M.O. Structural and thermochemical characterization of lipoxygenase catechol complexes // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 17952–17957.
32. Gillmor S.A., Villasenor A., Fletterick R., Sigal E., Browner M.F. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity // *Nat. Struct. Biol.* 1997. V. 4. P. 1003–1009.
33. Choi J., Chon J.K., Kim S., Shin W. Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data // *Proteins*. 2008. V. 70. P. 1023–1032.
34. Kobe M.J., Neau D.B., Mitchell C.E., Bartlett S.G., Newcomer M.E. The structure of human 15-lipoxygenase-2 with a substrate mimic // *J. Biol. Chem.* 2014. [Epub ahead of print].
35. Oldham M.L., Brash A.R., Newcomer M.E. Insights from the X-ray crystal structure of coral 8R-lipoxygenase: Calcium activation via a C2-like domain and a structural basis of product chirality // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 39545–39552.
36. Neau D.B., Gilbert N.C., Bartlett S.G., Boeglin W., Brash A.R., Newcomer M.E. The 1.85 Å structure of an 8R-lipoxygenase suggests a general model for lipoxygenase product specificity // *Biochemistry*. 2009. V. 48. P. 7906–7915.
37. Gilbert N.C., Niebuhr M., Tsuruta H., Bordelon T., Ridderbusch O., Dassey A., Brash A.R., Bartlett S.G., Newcomer M.E. A covalent linker allows for membrane targeting of an oxylipin biosynthetic complex // *Biochemistry*. 2008. V. 47. P. 10665–10676.
38. Tresaugues L., Moshe M., Arrowsmith C.H. [et al.] Crystal structure of the lipoxygenase domain of human arachidonate 12-lipoxygenase, 12s-type /PDB Deposition Date: 2008/5/12 (unpublished data).
39. Gilbert N.C., Bartlett S.G., Waight M.T., Neau D.B., Boeglin W.E., Brash A.R., Newcomer M.E. The structure of human 5-lipoxygenase // *Science*. 2011. V. 331. P. 217–219.
40. Eek P., Järving R., Järving I., Gilbert N.C., Newcomer M.E., Samel N. Structure of a calcium-dependent 11R-lipoxygenase suggests a mechanism for Ca²⁺ regulation // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 22377–22386.
41. Xu S., Mueser T.C., Marnett L.J., Funk Jr. M.O. Crystal structure of 12-lipoxygenase catalytic-

- domain-inhibitor complex identifies a substrate-binding channel for catalysis // *Structure*. 2012. V. 20. P. 1490–1497.
42. Koljak R., Boutaud O., Shieh B.H., Samel N., Brash A.R. Identification of a naturally occurring peroxidase-lipoxygenase fusion protein // *Science*. 1997. V. 277. P. 1994–1996.
 43. Boutaud O., Brash A.R. Purification and catalytic activities of the two domains of the allene oxide synthase-lipoxygenase fusion protein of the coral *Plexaura homomalla* // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 33764–33770.
 44. Abraham B.D., Sono M., Boutaud O., Shriner A., Dawson J.H., Brash A.R., Gaffney B.J. Characterization of the coral allene oxide synthase active site with UV-visible absorption, magnetic circular dichroism, and electron paramagnetic resonance spectroscopy: Evidence for tyrosinate ligation to the ferric enzyme heme iron // *Biochemistry*. 2001. V. 40. P. 2251–2259.
 45. Oldham M.L., Brash A.R., Newcomer M.E. The structure of coral allene oxide synthase reveals a catalase adapted for metabolism of a fatty acid hydroperoxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 297–302.
 46. Lohelaid H., Jarving R., Valmsen K., Varvas K., Kreen M., Jarving I., Samel N. Identification of a functional allene oxide synthase-lipoxygenase fusion protein in the soft coral *Gersemia fruticosa* suggests the generality of this pathway in octocorals // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1780. P. 315–321.
 47. Zheng Y., Boeglin W.E., Schneider C., Brash A.R. A 49 KD mini-lipoxygenase from *Anabaena* sp. PCC 7120 retains catalytically complete functionality // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 5138–5147.
 48. Schneider C., Niisuke K., Boeglin W.E., Voehler M., Stec D.F., Porter N.A., Brash A.R. Enzymatic synthesis of a bicyclobutane fatty acid by a hemoprotein-lipoxygenase fusion protein from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 18941–18945.
 49. Gao B., Boeglin W.E., Zheng Y., Schneider C., Brash A.R. Evidence for an ionic intermediate in the transformation of fatty acid hydroperoxide by a catalase-related allene oxide synthase from the cyanobacterium *Acaryochloris marina* // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 22087–22098.
 50. Chahinian H., Sias B., Carriere F. The C-terminal domain of pancreatic lipase: Functional and structural analogies with C2 domains // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2000. V. 1. P. 91–103.
 51. Maccarrone M., Salucci M.L. Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability // *Biochemistry*. 2001. V. 40. P. 6819–6827.
 52. Dainese E., Angelucci C.B., Sabatucci A., De Filippis V., Mei G., Maccarrone M. A novel role for iron in modulating the activity and membrane-binding ability of a trimmed soybean lipoxygenase-1 // *FASEB J.* 2010. V. 24. P. 1725–1736.
 53. Walther M., Anton M., Wiedmann M., Fletterick R., Kuhn H. The N-terminal domain of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase is not essential for enzymatic activity but contains determinants for membrane binding // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 27360–27366.
 54. Romanov S., Wiesner R., Myagkova G., Kuhn H., Ivanov I. Affinity labeling of the rabbit 12/15-lipoxygenase using azido derivatives of arachidonic acid // *Biochemistry*. 2006. V. 45. P. 3554–3562.
 55. Winkler F.K., D'Arcy A., Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase // *Nature*. 1990. V. 343. P. 771–774.
 56. May C., Hohne M., Gnau P., Schwennesen K., Kindl H. The N-terminal β -barrel structure of lipid body lipoxygenase mediates its binding to liposomes and lipid bodies // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 1100–1109.
 57. Tatulian S.A., Steczko J., Minor W. Uncovering a calcium-regulated membrane-binding mechanism for soybean lipoxygenase-1 // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 15481–15490.
 58. Kulkarni S., Das S., Funk C.D., Murray D., Cho W. Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 13167–13174.
 59. Walther M., Wiesner R., Kuhn H. Investigations into calcium-dependent membrane association of 15-lipoxygenase-1. Mechanistic roles of surface-exposed hydrophobic amino acids and calcium // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 3717–3725.
 60. Hammarberg T., Provost P., Persson B., Radmark O. The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 38787–38793.
 61. Chen X.S., Funk C.D. The N-terminal “ β -barrel” domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 811–818.
 62. Brinckmann R., Schnurr K., Heydeck D., Rosenbach T., Kolde G., Kuhn H. Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme // *Blood*. 1998. V. 91. P. 64–74.
 63. Schenk G., Neidig M.L., Zhou J., Holman T.R., Solomon E.I. Spectroscopic characterization of soybean lipoxygenase-1 mutants: The role of second coordination sphere residues in the regulation of enzyme activity // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 7294–7302.
 64. Kuban R.J., Wiesner R., Rathman J., Veldink G., Nolting H., Sole V.A., Kuhn H. The iron ligand sphere geometry of mammalian 15-lipoxygenases // *Biochem. J.* 1998. V. 332 (Pt 1). P. 237–242.

65. Dainese E., Sabatucci A., van Zadelhoff G., Angelucci C.B., Vachette P., Veldink G.A., Agrò A.F., Maccarrone M. Structural stability of soybean lipoxygenase-1 in solution as probed by small angle X-ray scattering // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 349. P. 143–152.
66. Mei G., Di Venere A., Nicolai E., Angelucci C.B., Ivanov I., Sabatucci A., Dainese E., Kuhn H., Maccarrone M. Structural properties of plant and mammalian lipoxygenases. Temperature-dependent conformational alterations and membrane binding ability // *Biochemistry*. 2008. V. 47. P. 9234–9242.
67. Hammel M., Walther M., Prassl R., Kuhn H. Structural flexibility of the N-terminal beta-barrel domain of 15-lipoxygenase-1 probed by small angle X-ray scattering. Functional consequences for activity regulation and membrane binding // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 343. P. 917–929.
68. Borngraber S., Browner M., Gillmor S., Gerth C., Anton M., Fletterick R., Kuhn H. Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site. The functional interplay of sequence determinants for the reaction specificity // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 37345–37350.
69. Borngraber S., Kuban R.J., Anton M., Kuhn H. Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 264. P. 1145–1153.
70. Knapp M.J., Klinman J.P. Kinetic studies of oxygen reactivity in soybean lipoxygenase-1 // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 11466–11475.
71. Chu K., Vojtechovsky J., McMahon B.H., Sweet R.M., Berendzen J., Schlichting I. Structure of a ligand-binding intermediate in wild-type carbonmonoxy myoglobin // *Nature*. 2000. V. 403. P. 921–923.
72. Ostermann A., Waschipky R., Parak F.G., Nienhaus G.U. Ligand binding and conformational motions in myoglobin // *Nature*. 2000. V. 404. P. 205–208.
73. Scott E.E., Gibson Q.H. Ligand migration in sperm whale myoglobin // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 11909–11917.
74. Knapp M.J., Seebeck F.P., Klinman J.P. Steric control of oxygenation regiochemistry in soybean lipoxygenase-1 // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. P. 2931–2932.
75. Saam J., Ivanov I., Walther M., Holzhtutter H.G., Kuhn H. Molecular dioxygen enters the active site of 12/15-lipoxygenase via dynamic oxygen access channels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 13319–13324.
76. Hamberg M., Samuelsson B. On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxidase // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. P. 5329–5335.
77. Kuhn H., Sprecher H., Brash A.R. On singular or dual positional specificity of lipoxygenases // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 16300–16305.
78. Kuhn H., Schewe T., Rapoport S.M. The stereochemistry of the reactions of lipoxygenases and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes // *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1986. V. 58. P. 273–311.
79. Browner M., Gillmor S.A., Fletterick R. Burying a charge // *Nat. Struct. Biol.* 1998. V. 5. P. 179.
80. Prigge S.T., Gaffney B.J., Amzel L.M. Relation between positional specificity and chirality in mammalian lipoxygenases // *Nat. Struct. Biol.* 1998. V. 5. P. 178–179.
81. Hornung E., Walther M., Kuhn H., Feussner I. Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 4192–4197.
82. Gardner H.W. Soybean lipoxygenase-1 enzymically forms both (9S)- and (13S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism // *Biochim. Biophys. Acta*. 1989. V. 1001. P. 274–281.
83. Walther M., Roffeis J., Jansen C., Anton M., Ivanov I., Kuhn H. Structural basis for pH-dependent alterations of reaction specificity of vertebrate lipoxygenase isoforms // *Biochim. Biophys. Acta*. 2009. V. 1791. P. 827–835.
84. Walther M., Ivanov I., Myagkova G., Kuhn H. Alterations of lipoxygenase specificity by targeted substrate modification and site-directed mutagenesis // *Chem. Biol.* 2001. V. 8. P. 779–790.
85. Meruvu S., Walther M., Ivanov I., Hammarstrom S., Furstenberger G., Krieg P., Reddanna P., Kuhn H. Sequence determinants for the reaction specificity of murine (12R)-lipoxygenase: Targeted substrate modification and site-directed mutagenesis // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 36633–36641.
86. Coffa G., Brash A.R. A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: Stereocontrol is linked to the position of oxygenation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 15579–15584.
87. Coffa G., Schneider C., Brash A.R. A comprehensive model of positional and stereo control in lipoxygenases // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 338. P. 87–92.
88. Coffa G., Imber A.N., Maguire B.C., Laxmikanthan G., Schneider C., Gaffney B.J., Brash A.R. On the relationships of substrate orientation, hydrogen abstraction, and product stereochemistry in single and double dioxygenations by soybean lipoxygenase-1 and its Ala542Gly mutant // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 38756–38766.
89. Boeglin W.E., Itoh A., Zheng Y., Coffa G., Howe G.A., Brash A.R. Investigation of substrate binding and product stereochemistry issues in two linoleate 9-lipoxygenases // *Lipids*. 2008. V. 43. P. 979–987.

90. Sloane D.L., Leung R., Barnett J., Craik C.S., Sigal E. Conversion of human 15-lipoxygenase to an efficient 12-lipoxygenase: The side-chain geometry of amino acids 417 and 418 determine positional specificity // *Protein Eng.* 1995. V. 8. P. 275–282.
91. Sloane D.L., Leung R., Craik C.S., Sigal E. A primary determinant for lipoxygenase positional specificity // *Nature*. 1991. V. 354. P. 149–152.
92. Vogel R., Jansen C., Roffeis J., Reddanna P., Forsell P., Claesson H.E., Kuhn H., Walther M. Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 5369–5376.
93. Burger F., Krieg P., Marks F., Furstenberger G. Enzymic characterization of epidermis-derived 12-lipoxygenase isoenzymes // *Biochem. J.* 2000. V. 348 (Pt 2). P. 329–335.
94. Watanabe T., Haeggstrom J.Z. Rat 12-lipoxygenase: Mutations of amino acids implicated in the positional specificity of 15- and 12-lipoxygenases // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. V. 192. P. 1023–1029.
95. Suzuki H., Kishimoto K., Yoshimoto T., Yamamoto S., Kanai F., Ebina Y., Miyatake A., Tanabe T. Site-directed mutagenesis studies on the iron-binding domain and the determinant for the substrate oxygenation site of porcine leukocyte arachidonate 12-lipoxygenase // *Biochim. Biophys. Acta*. 1994. V. 1210. P. 308–316.
96. Schwarz K., Walther M., Anton M., Gerth C., Feussner I., Kuhn H. Structural basis for lipoxygenase specificity. Conversion of the human leukocyte 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenating enzyme species by site-directed mutagenesis // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 773–779.
97. Hornung E., Rosahl S., Kuhn H., Feussner I. Creating lipoxygenases with new positional specificities by site-directed mutagenesis // *Biochem. Soc. Trans.* 2000. V. 28. P. 825–826.
98. Toledo L., Masgrau L., Marechal J.D., Lluch J.M., Gonzalez-Lafont A. Insights into the mechanism of binding of arachidonic acid to mammalian 15-lipoxygenases // *J. Phys. Chem. B*. 2010. V. 114. P. 7037–7046.
99. Toledo L., Masgrau L., Lluch J.M., Gonzalez-Lafont A. Substrate binding to mammalian 15-lipoxygenase // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2011. V. 25. P. 825–835.
100. Jisaka M., Kim R.B., Boeglin W.E., Brash A.R. Identification of amino acid determinants of the positional specificity of mouse 8S-lipoxygenase and human 15S-lipoxygenase-2 // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 1287–1293.
101. Veldink G.A., Garssen G.J., Vliegthart J.F., Boldingh J. Positional specificity of corn germ lipoxygenase as a function of pH // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972. V. 47. P. 22–26.
102. Hornung E., Kunze S., Liavonchanka A., Zimmermann G., Kuhn D., Fritsche K., Renz A., Kuhn H., Feussner I. Identification of an amino acid determinant of pH regiospecificity in a seed lipoxygenase from *Momordica charantia* // *Phytochemistry*. 2008. V. 69. P. 2774–2780.
103. Falgout J.P., Denis D., Macdonald D., Hutchinson J.H., Riendeau D. Characterization of the arachidonate and ATP binding sites of human 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling and enzyme immobilization // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 13603–13611.
104. Mogul R., Johansen E., Holman T.R. Oleyl sulfate reveals allosteric inhibition of soybean lipoxygenase-1 and human 15-lipoxygenase // *Biochemistry*. 2000. V. 39. P. 4801–4807.
105. Weckslar A.T., Jacquot C., van der Donk W.A., Holman T. Mechanistic investigations of human reticulocyte 15- and platelet 12-lipoxygenases with arachidonic acid // *Biochemistry*. 2009. V. 48. P. 6259–6267.
106. Weckslar A.T., Kenyon V., Deschamps J.D., Holman T.R. Substrate specificity changes for human reticulocyte and epithelial 15-lipoxygenases reveal allosteric product regulation // *Biochemistry*. 2008. V. 47. P. 7364–7375.
107. Weckslar A.T., Garcia N.K., Holman T.R. Substrate specificity effects of lipoxygenase products and inhibitors on soybean lipoxygenase-1 // *Bioorg. Med. Chem.* 2009. V. 17. P. 6534–6539.
108. Ivanov I., Shang W., Toledo L., Masgrau L., Svergun D.I., Stehling S., Gomez H., Di Venere A., Mei G., Lluch J.M., Skrzypczak-Jankun E., Gonzalez-Lafont A., Kuhn H. Ligand-induced formation of transient dimers of mammalian 12/15-lipoxygenase: A key to allosteric behavior of this class of enzymes? // *Proteins*. 2012. V. 80. P. 703–712.
109. Aleem A.M., Jankun J., Dignam J.D., Walther M., Kuhn H., Svergun D.I., Skrzypczak-Jankun E. Human platelet 12-lipoxygenase, new findings about its activity, membrane binding and low-resolution structure // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 376. P. 193–209.
110. Häfner A.K., Cernescu M., Hofmann B., Ermisch M., Hörnig M., Metzner J., Schneider G., Brutschy B., Steinhilber D. Dimerization of human 5-lipoxygenase // *Biol. Chem.* 2011. V. 392. P. 1097–1111.
111. Oliw E.H. Plant and fungal lipoxygenases // *Prostaglandins Other Lipid Mediators*. 2002. V. 68–69. P. 313–323.
112. De Petrocellis L., Di Marzo V. Aquatic invertebrates open up new perspectives in eicosanoid research: Biosynthesis and bioactivity // *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 1994. V. 51. P. 215–229.
113. Hawkins D.J., Brash A.R. Eggs of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, contain a prominent (11R) and (12R) lipoxygenase activity // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 7629–7634.

114. Porta H., Rocha-Sosa M. Lipoxygenases in bacteria: Horizontal transfer event? // Microbiology. 2001. V. 147. P. 3199–3200.
115. Vance R.E., Hong S., Gronert K., Serhan C.N., Mekalanos J.J. The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secreted arachidonate 15-lipoxygenase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 2135–2139.
116. Koeduka T., Kajiwaru T., Matsui K. Cloning of lipoxygenase genes from a cyanobacteria, *Nostoc punctiforme*, and its expression in *Escherichia coli* // Curr. Microbiol. 2007. V. 54. P. 315–319.
117. Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam N.H., Hellsten U., Kawashima T., Kuo A., Mitros T., Salamov A., Carpenter M.L., Signorovitch A.Y., Moreno M.A., Kamm K., Grimwood J., Schmutz J., Shapiro H., Grigoriev I.V., Buss L.W., Schierwater B., Dellaporta S.L., Rokhsar D.S. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans // Nature. 2008. V. 454. P. 955–960.
118. Bannenberg G., Martinez M., Hamberg M., Castresana C. Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana* // Lipids. 2009. V. 44. P. 85–95.
119. Toh H., Yokoyama C., Tanabe T., Yoshimoto T., Yamamoto S. Molecular evolution of cyclooxygenase and lipoxygenase // Prostaglandins. 1992. V. 44. P. 291–315.
120. Shin J.H., Van K., Kim D.H., Kim K.D., Jang Y.E., Choi B.S., Kim M.Y., Lee S.H. The lipoxygenase gene family: A genomic fossil of shared polyploidy between *Glycine max* and *Medicago truncatula* // BMC Plant Biol. 2008. V. 8. P. 133.
121. Andreou A.Z., Vanko M., Bezakova L., Feussner I. Properties of a mini 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutant forms // Phytochemistry. 2008. V. 69. P. 1832–1837.
122. Lang I., Feussner I. Oxylipin formation in *Nostoc punctiforme* (PCC73102) // Phytochemistry. 2007. V. 68. P. 1120–1127.
123. Lang I., Gobel C., Porzel A., Heilmann I., Feussner I. A lipoxygenase with linoleate diol synthase activity from *Nostoc* sp. PCC 7120 // Biochem. J. 2008. V. 410. P. 347–357.
124. Andreou A., Gobel C., Hamberg M., Feussner I. A bisallylic mini-lipoxygenase from cyanobacterium *Cyanothece* sp. that has an iron as cofactor // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 14178–14186.
125. Mereschkowski C. Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche // Biol. Centralbl. 1905. B. 25. S. 593–604.
126. Sagan L. On the origin of mitosing cells // J. Theor. Biol. 1967. V. 14. P. 255–274.
127. Huang C.Y., Ayliffe M.A., Timmis J.N. Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus // Nature. 2003. V. 422. P. 72–76.
128. Maliga P. Plant biology: Mobile plastid genes // Nature. 2003. V. 422. P. 31–32.
129. Huang C.Y., Ayliffe M.A., Timmis J.N. Simple and complex nuclear loci created by newly transferred chloroplast DNA in tobacco // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 9710–9715.
130. Timmis J.N., Ayliffe M.A., Huang C.Y., Martin W. Endosymbiotic gene transfer: Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes // Nat. Rev. Genet. 2004. V. 5. P. 123–135.
131. Martin W., Stoebe B., Goremykin V., Hapsmann S., Hasegawa M., Kowallik K.V. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts // Nature. 1998. V. 393. P. 162–165.
132. Barsan C., Sanchez-Bel P., Rombaldi C., Egea I., Rossignol M., Kuntz M., Zouine M., Latche A., Bouzayen M., Pech J.C. Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. P. 2413–2431.
133. Johannesson M., Backman L., Claesson H.E., Forsell P.K. Cloning, purification and characterization of non-human primate 12/15-lipoxygenases // Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids. 2010. V. 82. P. 121–129.
134. Yoshimoto T., Suzuki H., Yamamoto S., Takai T., Yokoyama C., Tanabe T. Cloning and sequence analysis of the cDNA for arachidonate 12-lipoxygenase of porcine leukocytes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 2142–2146.
135. Chen X.S., Kurre U., Jenkins N.A., Copeland N.G., Funk C.D. cDNA cloning, expression, mutagenesis of C-terminal isoleucine, genomic structure, and chromosomal localizations of murine 12-lipoxygenases // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 13979–13987.
136. Watanabe T., Medina J.F., Haeggstrom J.Z., Radmark O., Samuelsson B. Molecular cloning of a 12-lipoxygenase cDNA from rat brain // Eur. J. Biochem. 1993. V. 212. P. 605–612.
137. Berger M., Schwarz K., Thiele H., Reimann I., Huth A., Borngraber S., Kuhn H., Thiele B.J. Simultaneous expression of leukocyte-type 12-lipoxygenase and reticulocyte-type 15-lipoxygenase in rabbits // J. Mol. Biol. 1998. V. 278. P. 935–948.
138. Sun D., Funk C.D. Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 24055–24062.
139. Chen X.S., Sheller J.R., Johnson E.N., Funk C.D. Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene // Nature. 1994. V. 372. P. 179–182.

140. Johnson E.N., Brass L.F., Funk C.D. Increased platelet sensitivity to ADP in mice lacking platelet-type 12-lipoxygenase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 3100–3105.
141. Poeckel D., Zemski Berry K.A., Murphy R.C., Funk C.D. Dual 12/15- and 5-lipoxygenase deficiency in macrophages alters arachidonic acid metabolism and attenuates peritonitis and atherosclerosis in ApoE knock-out mice // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 21077–21089.
142. Porta H., Rocha-Sosa M. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. P. 15–21.
143. Feussner I., Wasternack C., Kindl H., Kuhn H. Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 11849–11853.
144. Bousquet J.F., Thimann K.V. Lipid peroxidation forms ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and may operate in leaf senescence // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. P. 1724–1727.
145. He Y., Fukushige H., Hildebrand D.F., Gan S. Evidence supporting a role of jasmonic acid in arabidopsis leaf senescence // *Plant Physiol.* 2002. V. 128. P. 876–884.
146. Chen G., Hackett R., Walker D., Taylor A., Lin Z., Grierson D. Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds // *Plant Physiol.* 2004. V. 136. P. 2641–2651.
147. Ridolfi M., Terenziani S., Patumi M., Fontanazza G. Characterization of the lipoxygenases in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation // *J. Agric. Food Chem.* 2002. V. 50. P. 835–839.
148. Song W.C., Brash A.R. Investigation of the allene oxide pathway in the coral *Plexaura homomalla*: Formation of novel ketols and isomers of prostaglandin A2 from 15-hydroxyeicosatetraenoic acid // *Arch. Biochem. Biophys.* 1991. V. 290. P. 427–435.
149. Aparoy P., Reddy R.N., Guruprasad L., Reddy M.R., Reddanna P. Homology modeling of 5-lipoxygenase and hints for better inhibitor design // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2008. V. 22. P. 611–619.
150. Di Venere A., Horn T., Stehling S., Mei G., Masgrau L., González-Lafont A., Kühn H., Ivanov I. Role of Arg403 for thermostability and catalytic activity of rabbit 12/15-lipoxygenase // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1831. P. 1079–1088.
151. Di Venere A., Nicolai E., Ivanov I., Dainese E., Adel S., Angelucci B.C., Kuhn H., Maccarrone M., Mei G. Probing conformational changes in lipoxygenases upon membrane binding: Fine-tuning by the active site inhibitor ETYA // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1841. P. 1–10.

STRUCTURAL BIOLOGY OF LIPOXYGENASES: CURRENT KNOWLEDGE AND FURTHER DEVELOPMENT

I.V. Ivanov^{1,2,@}, N.V. Groza², G.I. Myagkova², H. Kühn³

¹Institute of Pharmacology and Toxicology, Medicine University of Rostock, D-18057 Rostock, Germany

²M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, 119571 Russia

³Institute of Biochemistry, Medicine University Berlin-Charité, D-10117 Berlin, Germany

@ Corresponding author e-mail: igor_ivanov@gmx.de

Lipoxygenases (LOX) form a heterogeneous family of lipid peroxidizing enzymes, which have been implicated in the synthesis of inflammatory mediators. The involvement of LOX isoenzymes in regulation of physiological homeostasis and pathogenesis of various diseases with major health and political relevance made them potential targets for pharmacological intervention. Although the first plant lipoxygenase (soybean LOX1) was discovered more than 60 years ago, the structural aspects of these enzymes were not studied until the mid 1990s. For the time being the crystal structures of various lipoxygenase-isoforms have been reported, and X-ray coordinates for numerous enzyme-ligand complexes are also available. This review focuses on recent developments in molecular enzymology of LOX and summarizes our current knowledge on the structural basis of LOX catalysis. Hypotheses explaining the reaction specificity of different isoforms as well as evolutionary aspects are reviewed and discussed. As the review is mainly intended to cover thematic priorities, which have not been reviewed in the past, a detailed discussion of the biological function of LOX goes beyond the scope of this review.

Keywords: lipoxygenase, structure, catalysis, polyunsaturated fatty acids, oxygenation.