Chem. Listy *101*, 384–390 (2007) Referát

RASTLINNÉ LIPOXYGENÁZY – ŠTRUKTÚRA A MECHANIZMUS BIOKATALÝZY

MARIÁN VANKO, IVANA HOLKOVÁ, MAREK OBLOŽINSKÝ, FRANTIŠEK BILKA a LÝDIA BEZÁKOVÁ

Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava
vanko@fpharm.uniba.sk

Došlo 10.11.05, prepracované 27.3.06, prijaté 30.3.06.

Kľúčové slová: lipoxygenázy, lipoxygenázová metabolická cesta, dioxygenácia mastných kyselín, peroxidácia lipidov, oxylipíny

Obsah

1. Úvod
2. Všeobecná charakteristika LOX
3. Klasifikácia a nomenklatúra rastlinných LOX
4. Substrátová špecifita rastlinných LOX
5. Subcelulárna lokalizácia LOX
6. Štruktúra lipoxygenáz
7. Polohová špecifita produktov v LOX reakcii
8. Kinetický model katalýzy
9. Záver

1. Úvod

U rastlín je prakticky každá somatická bunka kompetentná pre aktiváciu obrannej reakcie, ktorej podstatou je aktivácia transkripcie špecifických génov. Obranná reakcia je časovo a priestorovo koordinovaný komplexný systém signálov, vedúci k expresii génov defenzívnej reakcie. Povaha environmentálneho stresového faktora a vlastnosti patogénom, resp. parazitom kódovanej molekuly – elicitora – sú dve premenné, ktoré modulujú expresiu obranných génov po kvalitatívnej i kvantitatívnej stránke.

Výskum v oblasti signalizácie a metabolizmu rastlín za posledné desaťročia priniesol detailnejší pohľad na regulačné procesy prebiehajúce v rastline na úrovni bunky. Identifikácia ako aj biochemická a molekulárno-biologická charakterizácia enzýmov pôsobiacich v jednotlivých stupňoch biosyntézy signálnych molekúl viedla k uceleniu pohľadu na tieto metabolické dráhy. Výskum v oblasti signalizácie v procesoch defenzívnych reakcií rastliny a procesov rastu a vývinu je už od začiatku spojený s lipoxygenázami.

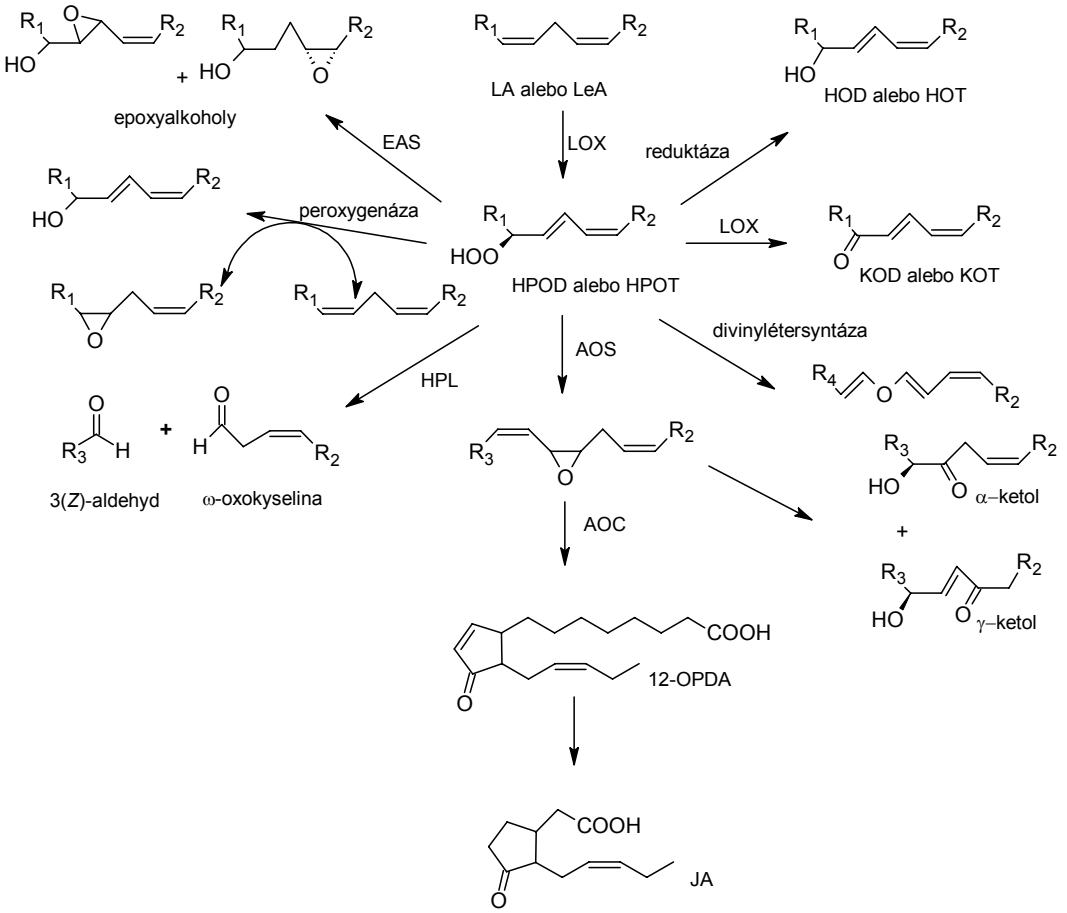
2. Všeobecná charakteristika LOX

Lipoxygenázy (LOX; linoleát : oxygen oxidoreduktázy, EC 1.13.11.12) sú rodinou dioxygenáz obsahujúcich nehémové, nesulfidové železo. Tieto enzýmy sú rozšírené v ríši rastlín i živočíchov. Katalyzujú polohovo- a stereošpecifickú inzerciu molekulového kyslíka do molekuly nenasýtenej mastnej kyseliny za tvorby príslušných hydroperoxidov. Lipoxygenázy majú významné postavenie v metabolizme polynenasýtených mastných kyselín. Sú zapojené nielen do ich katabolizmu, ale aj do signalizačných procesov prostredníctvom účasti na tvorbe signálnych molekúl (kyselina jasmónová a jej deriváty). Enzýmy nadväzujúce na lipoxygenázu premieňajú hydroperoxidy mastných kyselín na zlúčeniny s rozdielnou biologickou aktivitou. V súvislosti s produkciou hydroperoxidov mastných kyselín s následným poškodzovaním bunkových štruktúr končiacim programovanou smrťou bunky majú lipoxygenázy úlohu aj v oxidačnom strese.

Kvôli svojej pozícii na začiatku komplexnej metabolickej dráhy, označovanej ako lipoxygenázová dráha (obr. 1), lipoxygenázy limitujú dostupnosť substrátov pre enzýmy v nasledujúcich vetvách. V tomto zmysle sa stáva zaujímavým objektom štúdia pre objasnenie procesov, ktoré sú závislé od jej zapojenia do metabolizmu lipidov. Hromadia sa dôkazy naznačujúce existenciu prepojenia medzi signalizáciou jasmonátmi a biosyntézou sekundárnych metabolitov, konkrétne alkaloidov[1,2]. Účasť lipoxygenáz v signalizačných procesoch a ich funkcie v súvislosti s oxidačným stresom a programovanou bunkovou smrťou posúva význam poznatkov o tejto enzýmovej rodine z teoretickej oblasti do roviny praktického využitia aplikácie poznatkov v medicíne a farmácii.

3. Klasifikácia a nomenklatúra rastlinných LOX

U rastlín boli identifikované 2 typy lipoxygenáz, líšiace sa polohovou izomériou tvorených produktov, ktoré sú označované ako 9-LOX a 13-LOX. Napriek tomu, že profil produktov reakcie vykazuje majoritné zastúpenie konkrétneho polohového izoméru (≈ 95–98 %), polohová špecifita rastlinných lipoxygenáz nie je absolútna a v niektorých prípadoch je pomer oboch polohových izomérov takmer ekvimolárny. Klasifikácia na 9-LOX a 13-LOX vychádza teda podobne ako u živočíšnych lipoxygenáz z polohovej špecifity hydroperoxidových produktov. Lipoxygenázy živočíchov sú klasifikované s ohľadom na polohovú špecifitu produktov dioxygenácie kyseliny arachidónovej[3,4]. Keďže kyselina arachidónová nepredstavuje dominantnú zložku rastlinných lipidov, resp. nie je



Obr. 1. **Lipoxygenázová metabolická cesta;** LA – kyselina linolová, LeA – kyselina linolénová, HOD/HOT – kyselina hydroxyoktadekadiénová/hydroxyoktadekatriénová, KOD/KOT – kyselina ketooktadekadiénová/ ketooktadekatiénová, HPOD/HPOT – kyselina hydroperoxyoktadekadiénová/ hydroperoxyoktadekatriénová, EAS – epoxyalkoholsyntáza, LOX – lipoxygenáza, AOS – allenoxidsyntáza, 12-OPDA – kyselina 12-oxofytodiénová, JA – kyselina jasmónová

prirodzeným substrátom rastlinných lipoxygenáz, sú rastlinné LOX klasifikované na 9- a 13-LOX, s ohľadom na polohovú izoméria produktov dioxygenácie kyseliny linolovej[5]. Najnovšie a zároveň komplexnejšie klasifikácie lipoxygenáz vychádzajú z komparačných analýz primárnej štruktúry lipoxygenáz[6]. Rastlinné LOX možno na základe všeobecnej sekvenčnej podobnosti rozdeliť do rodín, v rámci ktorých existujú medzidruhové rozdiely, odrážajúce evolučné vzťahy týchto molekúl. Molekulové rodiny zahŕňajú okrem uvedených rozdielov i rozdiely v subcelulárnej lokalizácii enzýmov a polohovej špecifite produktov, ktoré sú odrazom ich štrukturálnych vlastností.

Na základe sekvenčnej homológie sú v súčasnosti rastlinné LOX zatriedované do dvoch typov – LOX-1 a LOX-2. Typ LOX-1 sa vyznačuje viac ako 75% sekvenčnou podobnosťou, pričom v ich štruktúre absentuje tzv. tranzitný peptid, ktorý je charakteristický pre typ LOX-2. Táto sekvencia aminokyselín je zodpovedná za translokáciu LOX do plastidov. Typ LOX-2, ktorý disponuje tranzitným peptidom vo svojej štruktúre, vykazuje homológiu primárnej štruktúry na úrovni 35 % (cit.[6]).

4. Substrátová špecifita rastlinných LOX

Lipoxygenázy katalyzujú dioxygenáciu polynenasýtených mastných kyselín s (1*Z*, 4*Z*)-pentadiénovým zoskupením. Nízka rozpustnosť kyseliny linolénovej vo vode obmedzuje jej využitie ako substrátu solubilných lipoxygenáz[7]. Je teda pravdepodobné, že iniciálnym substrátom v biosyntéze oktadekanoidov sú bunkových lipidy membrán, ktoré sú atakované lipoxygenázami asociovanými s biologickými membránami[8]. Na druhej strane, zvýšená aktivita fosfolipázy A_2 pozorovaná pri elicitácii bunkových kultúr a poranení intaktných rastlín naznačuje analógiu so signalizačnými kaskádami u živočíchov, kde sub-

strát pre tvorbu prostaglandínov a leukotriénov uvoľnený z lipidov membrán špecifickou fosfolipázou využívajú cyklooxygenázy a lipoxygenázy. U dvoch 13-LOX izolovaných zo sóje (typ LOX-1) a jednej 13-LOX z korienkov uhorky bola preukázaná utilizácia mastných kyselín viazaných vo fosfolipidoch[9,10], čím sa potvrdilo zapojenie LOX do zvyšovania permeability membrán. Dôsledkom zmeny fyzikálno-chemických vlastností membrán vyplývajúcej zo zmeny ich zloženia je zvýšenie toku asimilátov a iónov[11] cez membránové štruktúry. U 13-LOX z lipidových teliesok uhorky, u 13-LOX z klíčnych rastlín jačmeňa a u vegetatívneho zásobného proteínu LOX (VLXD) z listov sóje bola preukázaná aktivita na reťazcoch esterifikovaných mastných kyselín[12,13]. Na základe súčasných poznatkov z experimentov *in vitro* a analýz lipidov zastúpených v membránach nemožno jednoznačne vysloviť záver, či lipoxygenázy preferujú voľné alebo esterovo viazané mastné kyseliny. Dá sa predpokladať, že preferovanie jedného, alebo druhého typu substrátu súvisí s biologickou funkciou konkrétnej izoformy LOX.

5. Subcelulárna lokalizácia LOX

Ukázalo sa, že väčšina rastlinných lipoxygenáz patrí medzi solubilné proteíny[5,8,14]. V rastlinných bunkách bol popísaný viacnásobný výskyt lipoxygenáz vo viacerých subcelulárnych kompartmentoch súčasne. Popri cytosolových lipoxygenázach[15] boli identifikované i LOX vo vonkajšej vrstve lipidových teliesok[16,17], v chloroplastoch[18–20], tiež v mitochondriách[21] a vo vakuolách[22,23]. V klíčnych listoch rôznych rastlín sa popri solubilných LOX našli i membránovo viazané izoformy lokalizované v mikrozómoch[24] a v plazmatickej membráne[25]. Presnejšia subcelulárna lokalizácia v mitochondriách nebola zatiaľ popísaná, pretože po deštrukcii mitochondrií sonikáciou nebolo možné určiť, či enzým pochádza z matrixu alebo z membrány. Zatiaľ nebola popísaná ani štruktúra tohto enzýmu, ktorá by odhalila prítomnosť *N*-terminálnej aminokyselinovej sekvencie charakteristickej pre membránovo asociované lipoxygenázy.

Dôkazy rozdielnej subcelulárnej lokalizácie lipoxygenáz nabádajú k úvahám o zapojení jednotlivých izoenzýmov v konkrétnych oddieloch bunky do procesov tvorby odlišných oxylipínov. Paralelne s objavom enzýmových izoforiem lipoxygenáz vznikla potreba klasifikácie a systematizácie členov tejto veľkej rodiny proteínov.

6. Štruktúra lipoxygenáz

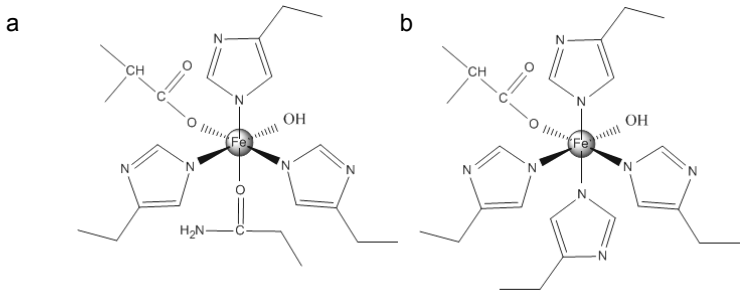
Aminokyselinová sekvencia polypeptidového reťazca LOX bola študovaná vo viacerých biologických zdrojoch. Zatiaľ však boli zdokumentované kryštálové štruktúry proteínov len u dvoch lipoxygenáz – sójovej v ríši rastlín a králičej v ríši živočíchov. Tieto proteíny zdieľajú všeobecný spôsob usporiadania sekundárnej štruktúry a obsahujú veľmi podobné väzbové miesta s nehemovým železom[26–29] (viz obr. 2).

Sójová LOX-1 (m.h. 94,3 kDa) pozostáva zo sekvencie 839 aminokyselín[27,30]. Molekula má tvar elipsoidu rozmerov cca 900 × 650 × 600 nm (cit.[9]). Sekundárna štruktúra sójovej lipoxygenázy pozostáva hlavne z α-helikálne usporiadaných častí polypeptidového reťazca.

Proteín rastlinných lipoxygenáz je tvorený jednoduchým polypeptidovým reťazcom s relatívnou molekulovou hmotnosťou v rozmedzí 94–104 kDa (cit.[9]). V štruktúre rastlinných lipoxygenáz možno rozlíšiť 2 domény: menšiu *N*-terminálnu doménu (doména I) a väčšiu *C*-terminálnu doménu (doména II) obsahujúcu aktívne miesto[26]. Vzhľadom na prítomnosť bočných reťazcov aminokyselín zodpovedajúcich za katalytickú aktivitu v *C*-koncovej časti lipoxygenázy (doména II) je táto doména alternatívne označovaná aj ako katalytická.

Katalytická doména pozostáva z 18–22 α-helikálne usporiadaných úsekov polypeptidového reťazca a jedného (králičia LOX) alebo dvoch (sójová LOX) antiparalelných β-listov, ktoré formujú kavitu aktívneho miesta. Okolie centrálneho kovového atómu bolo analyzované röntgenovou štruktúrnou analýzou[31]. Aktívnym miestom sójovej LOX prebiehajú dva dlhé centrálne helixy (helix 9 a helix 18), ktoré majú vnútorný π-helikálny úsek[32]. Zriedkavo sa vyskytujúce π-helikálne usporiadanie polypeptidového reťazca vytvára v helixe natiahnutie, umožňujúce účasť postranných reťazcov histidínu na tvorbe koordinačnej väzby s Fe^{2+}/Fe^{3+} (cit.[33]). Tri histidínové ligandy pre atóm železa vykazujú evolučnú konzervovanosť[34,35]. U rastlinných lipoxygenáz je katión železa (Fe^{2+}/Fe^{3+}) okrem imidazolových kruhov histidínu koordinovaný karboxylovou skupinou *C*-terminálneho izoleucínu, kyslíkom karbamidovej skupiny asparagínu a hydroxidovým aniónom, resp. molekulou vody. Rovnako ako imidazolové ligandy v postranných reťazcoch histidínu, je pre zachovanie funkcie esenciálny *N*-terminálny izoleucín[36,37]. Pozícia hydroxidového aniónu v smere do kavity poukazuje na jeho funkciu pri odtrhnutí vodíkového radikálu ($H^{\bullet}$) zo substrátu. Karboxylová skupina *C*-terminálneho izoleucínu a karbamidová skupina asparagínu sú lokalizované v neväzbovej vzdialenosti od katiónu železa. Medziatómová vzdialenosť vylučuje existenciu kovalentnej väzby medzi Fe^{2+} a asparagínom[28]. Asparagín, koordinačne viazaný ku katiónu železa, je štrukturálnym znakom rastlinných lipoxygenáz. Živočíšne lipoxygenázy majú na tejto koordinačnej pozícii imidazolový ligand – histidín[36–38].

Prvé kryštalografické analýzy lipoxygenázy ukázali existenciu dlhej tenkej dutinky prechádzajúcej molekulou lipoxygenázy, ktorá je vyplnená vodou. V súčasnosti sú identifikované a čiastočne charakterizované dve také formácie u sójovej LOX-1 (sLO-1) a tri u sójovej LOX-3 (sLO-3). Do *C*-terminálnej domény ústia dve kavity označované ako I a II, zbiehajúce sa v oblasti aktívneho miesta. Lievikovito formovaná kavita I predstavuje prístupovú cestu pre molekulu kyslíka do reakčného centra s katiónom železa. Dlhá a tenká kavita II, umožňujúca



Obr. 2. **Aktívne miesto rastlinných lipoxygenáz (a) a živočíšnych lipoxygenáz (b)**

vstup molekuly polynenasýtenej mastnej kyseliny plní funkciu väzbového miesta pre substrát. Zvláštnosťou sójovej LOX-3 (sLO-3) je prítomnosť tretej kavity, prebiehajúcej od miesta viažuceho železo k rozhraniu β-valca v *N*-terminálnej doméne a katalytickej domény. Kavita III, väzbové miesto železa a kavita II formujú súvislý kanálik cez molekulu proteínu.

N-terminálna doména u lipoxygenáz z oboch zdrojov (živočíšna i rastlinná) je tvorená z 8 antiparalelných β-listov formujúcich valec (tzv. β-barel), pričom u rastlinného enzýmu je táto doména signifikantne väčšia (150 AK) v porovnaní so živočíšnym enzýmom (110–115 AK). *N*-koncová doména predstavuje ďalšiu odlišnosť medzi rastlinnými a živočíšnymi lipoxygenázami. Hoci funkcia β-valca nie je potvrdená, na základe podobnosti s C2 doménou niektorých lipáz sa predpokladá jeho význam pri asociácii enzýmu s biologickými membránami[29]. Táto funkcia bola potvrdená u lipoxygenázy z lipidových teliesok uhoriek[39]. Toto usporiadanie zohráva podobnú funkciu u živočíšnej 5-LOX pri asociácii s membránou bunkového jadra[40].

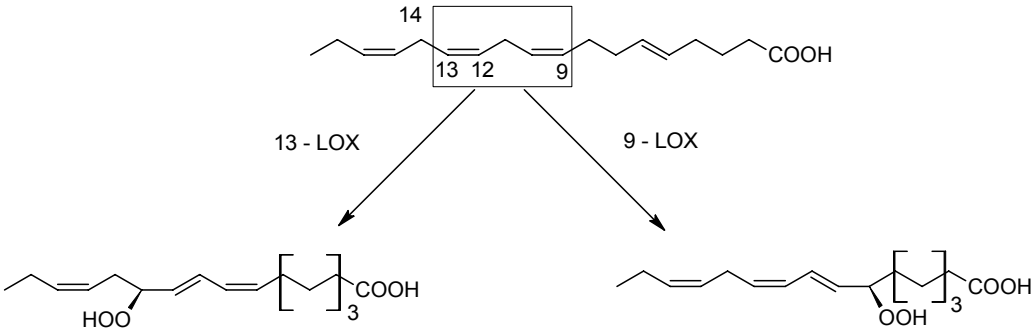
7. Polohová špecifita produktov v LOX reakcii

Pozícia dioxygenácie polynenasýtenej mastnej kyseliny vedúca k hydroperoxidovému produktu vyplýva z mechanizmu katalýzy reakcie sprostredkovanej lipoxygenázami. Polohová špecifita lipoxygenáz je výsledkom dvoch procesov: *i*) polohovo- a stereo-špecifickej eliminácie atómu vodíka z reťazca mastnej kyseliny obsahujúceho viaceré alylmetylénové motívy (napr. kyselina linolénová, arachidónová alebo eikozapentaénová), *ii*) polohovo- a stereošpecifickej inzercie molekulového kyslíka.

V prvom kroku dochádza k eliminácii vodíkového radikálu z atómu uhlíka, ktorý sa v dôsledku orientácie substrátu v aktívnom mieste dostáva do dosahu hydroxidovej skupiny na koordinačnej sfére katiónu železa, zodpovedajúcej za tento krok. Tento proces je závislý na „hĺbke“ vniknutia substrátu do väzbového miesta enzýmu a optimálnej vzájomnej priestorovej orientácie dvojice enzým–substrát. Vzniknutý radikál je stabilizovaný rezonančným efektom, z čoho v závislosti od polohy násobných väzieb v molekule substrátu vyplývajú 2 potenciálne polohy inzercie molekulového kyslíka. Radikál môže teoreticky prešmykovať v smere [+2] alebo [−2] vzhľadom na polohu eliminácie vodíkového radikálu. Priestorové vlastnosti reakčného centra obmedzujú možnosti naviazania O_2 z dvoch pozícií len na jednu. Poloha eliminácie atómu vodíka, spôsob stabilizácie utvoreného radikálu a priestor aktívneho centra tak tvoria kritériá determinujúce polohovú izomériu hydroperoxidu mastnej kyseliny, ktorý vzniká v dioxygenačnej reakcii katalyzovanej lipoxygenázou.

8. Kinetický model katalýzy

Lipoxygenázy katalyzujú polohovo- a stereošpecifickú dioxygenáciu mastných kyselín a lipidov na chirálne konjugované hydroperoxidy týchto substrátov. Kinetický model katalýzy dioxygenácie nenasýtených mastných kyselín bol navrhnutý na základe detailnejšieho štúdia sójovej lipoxygenázy (sLO). Lipoxygenázy pracujú usporiadaným bi-uni mechanizmom, v ktorom kyselina linolénová resp. linolová iniciálne reaguje s katalytickým centrom enzýmu (Fe^{3+}-OH) za vzniku radikálu mastnej kyseliny[44]. Tento krok je nasledovaný interakciou rezonančne stabilizovaného radikálu s molekulou kyslíka, pristupujúcou do aktívneho miesta enzýmu inou dutinkou ako polynenasýtená mastná kyselina. Vznik radikálu mastnej kyseliny ($L^{\bullet}$) je krok, v ktorom hydroxidový anión (Fe^{3+}-OH) na koordinačnej sfére železa (obr. 3) odtrhne a prijme z (1*Z*,4*Z*)-pentadiénového systému mastnej kyseliny vodíkový radikál ($H^{\bullet}$)[30,44,45], pričom dochádza k redukcii katiónu železa (Fe^{2+}-OH_2)[46]. Kyslík (O_2) sa rýchlo zlučuje s radikálovým intermediátom za vzniku hydroperoxylového radikálu mastnej kyseliny, ktorý zaniká prebratím vodíkového radikálu z redukovanej formy železa (Fe^{2+}-OH_2). Mechanizmus dioxygenácie nenasýtených mastných kyselín je uvedený na obr. 4. Hoci prítomnosť Fe-centier

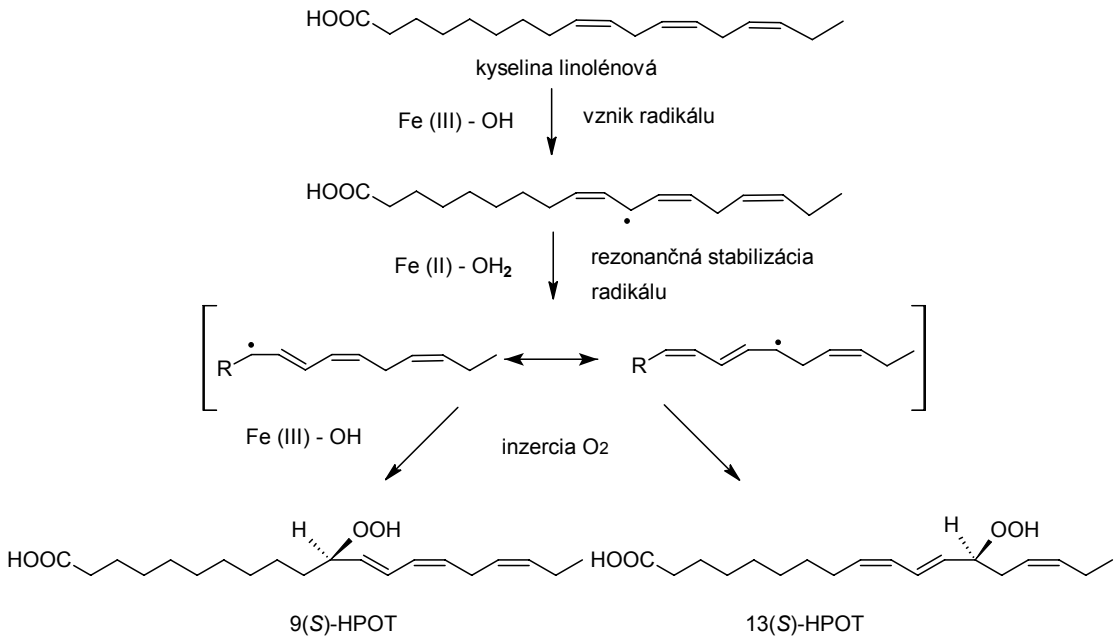


Obr. 3. **Polohové izoméry hydroperoxidových produktov reakcie katalyzovanej lipoxygenázou**

u oxygenáz je často nevyhnutná pre aktiváciu molekuly kyslíka, neexistuje relevantný dôkaz o interakcii tohto kofaktora s molekulou O_2 počas žiadneho stupňa katalytického cyklu[44].

Za podmienok saturácie enzýmu kyslíkom (O_2) je tvorba radikálového intermediátu ($L^{\bullet}$) krokom, ktorý limituje rýchlosť dioxygenácie mastných kyselín[47]. V neprítomnosti O_2 dochádza k hromadeniu radikálov polynenasýtených mastných kyselín. Akumulácia radikálov je pozorovateľná spektroskopicky ako úbytok absorbcie UV charakterizujúci mieru oxidácie Fe^{3+} (cit.[48]), resp. EPR signál zodpovedajúci radikálu mastnej kyseliny ($L^{\bullet}$) (cit.[49]).

Ireverzibilné odtrhnutie vodíkového radikálu ($H^{\bullet}$) z mastnej kyseliny kineticky rozdeľuje celkovú katalýzu na 2 čiastkové reakcie – redukčnú a oxidačnú[44]. Vyššie popísaná redukčná fáza zahŕňa udalosti od vstupu a priestorovej orientácie substrátu v aktívnom mieste až po vytvorenie radikálu mastnej kyseliny ($L^{\bullet}$). Na rozdiel od redukčnej fázy je oxidačná fáza zatiaľ málo popísaná. Neobjasnené zostávajú i ďalšie detaily enzýmovej katalýzy, vrátane spôsobu vnikania molekulového kyslíka do reakčného centra a vstupu mastnej kyseliny do blízkosti oktaedrálneho komplexu železa.



Obr. 4. **Mechanizmus dioxygenácie mastných kyselín lipoxygenázami;** (9S)-HPOT – kyselina (9*S*)-hydroperoxyoktadekatriénová, (13S)-HPOT – kyselina (13*S*)-hydroperoxyoktadekatriénová

9. Záver

Za posledných 10 rokov postúpilo poznanie lipoxygenáz, ich funkcií a lokalizácie v rastlinných bunkách značne dopredu, a to najmä vďaka kombinovanému genetickému a biochemickému prístupu k štúdiu oktadekánovej (lipoxygenázovej) dráhy. Znalosti o štruktúre lipoxygenáz sú viazané na úspešnosť pokusov o ich izoláciu, purifikáciu a následnú kryštalizáciu proteínov. Doteraz bola úspešne vyriešená štruktúra len u sójovej a králičej lipoxygenázy. Súčasné poznatky o štruktúre rastlinných LOX vychádzajú teda zo štúdia kryštálovej štruktúry sójovej lipoxygenázy a identifikácie sekvencie aminokyselín lipoxygenáz z iných rastlinných a živočíšnych zdrojov. Rovnako aj dnešné predstavy o mechanizme katalýzy dioxygenácie mastných kyselín sú výsledkom kombinovania rôznych prístupov. Mechanizmus zabezpečenia polohovej špecifity a sterošpecifity lipoxygenáz bol navrhnutý na základe znalostí o priestorovom usporiadaní aktívneho miesta enzýmu a vplyvu zmien primárnej štruktúry v tejto časti molekuly enzýmu. Poznatky o rastlinných lipoxygenázach možno úspešne aplikovať aj na živočíšne lipoxygenázy na základe pomerne vysokej homológie týchto enzýmov.

Vo väčšine prác sa predpokladá, že rastlinné lipoxygenázy pôsobia *in vivo* na voľné nenasýtené mastné kyseliny rovnako ako pri experimentoch s izolovanými LOX. Najnovšie experimentálne práce prinášajú dôkazy o pôsobení lipoxygenáz na esterovo viazané substráty. Tento typ lipoxygenáz bol identifikovaný napr. v lipidových telieskach a chloroplastoch. Pôsobenie chloroplastových LOX na esterifikované substráty je zaujímavé z hľadiska objasnenia postavenia lipoxygenáz v transdukcii signálov na environmentálne podnety. Napriek výrazným pokrokom v štúdiu lipoxygenáz zostávajú stále niektoré aspekty naďalej neobjasnené a sú predmetom ďalšieho úsilia v poznávaní týchto enzýmov.

LITERATURA

1. Menke F. L. H., Parchman S., Mueller M. J., Kijne J. W., Mamelink J.: Plant Physiol. *119*, 1289 (1999).
2. Haider G., von Schrader T., Fusslein M., Blechert S., Kutchan T. M.: Biol. Chem. *381*, 741 (2000).
3. Yamamoto S.: Biochim. Biophys. Acta *1128*, 117 (1992).
4. Schewe T., Rapaport S. M., Kühn H.: Adv. Enzymol. Mol. Biol. *58*, 191 (1986).
5. Gardner H. W., Weisleder D., Plattner R. D.: Plant Physiol. *97*, 1059 (1991).
6. Shibata D., Axelrod B.: J. Lipid Mediat. Cell Signal. *12*, 213 (1995).
7. Brash A. R.: J. Biol. Chem. *274*, 23679 (1999).
8. Siedow J. N.: Annu. Rev. Plant Physiol. *42*, 145 (1991).
9. Brash A. R., Ingram C. D., Harris T. M.: Biochemistry *26*, 5465 (1987).
10. Matsui K., Nishioka M., Ikeyoshi M., Matsumura Y., Mori T., Kajiwara T.: Biochim. Biophys. Acta *1390*, 8 (1998).
11. Serhan C., Anderson P., Goodman E., Dunham P., Weissman G.: J. Biol. Chem. *256*, 2736 (1981).
12. Fuller M. A., Weichert H., Fischer A. M., Feussner I., Grimes H. D.: Arch. Biochem. Biophys. *388*, 146 (2001).
13. Holtman W. L., Vredenbregt-Heistek J. C., Schmitt N. F., Feussner I.: Eur. J. Biochem. *248*, 452 (1997).
14. Hildebrand D. F.: Physiol. Plant. *76*, 249 (1989).
15. Wang C. X., Avdiushko S., Hildebrand D. F.: Plant Mol. Biol. *40*, 783 (1999).
16. Feussner I., Kindl H.: FEBS Lett. *298*, 223 (1992).
17. Matsui K., Irie M., Kajiwara T., Hatanaka A.: Plant Sci. *85*, 23 (1992).
18. Budnitskaia E. V., Borisova I. G.: FEBS Lett. *24*, 359 (1972).
19. Feussner I., Hause B., Vörös K., Parthier B., Wasternack C.: Plant J. *7*, 949 (1995).
20. Schaffrath U., Zabbai F., Dudler R.: Eur. J. Biochemistry *267*, 5935 (2000).
21. Braidot E., Petrussa E., Micolini S., Tubaro F., Vianello A., Macri F.: J. Exp. Bot. *55*, 1655 (2004).
22. Trannbarger T. J., Franceschi V. R., Hildebrand D. F., Grimes H. D.: Plant Cell *3*, 973 (1991).
23. Vernooy-Gerritsen M., Leunissen J. L. M., Veldink G. A., Vliegenhart J. F. G.: Plant Physiol. *76*, 1070 (1984).
24. Feussner I., Kindl H.: FEBS Lett. *298*, 223 (1992).
25. Nellen A., Rojahn B., Kindl H.: Z. Naturforsch. *50c*, 29 (1995).
26. Boyington J. C., Gaffney B. J., Amzel L. M. .: Biochem. Soc. Trans. *3*, 744 (1993).
27. Minor W., Steczko J., Stec B., Otwinowski Z., Bolin J. T., Walter R., Axelrod B.: Biochemistry *35*, 10687 (1996).
28. Skrzypczak-Jankun E., Amzel L. M., Kroa B. A., Funk M. O.: Proteins *29*, 15 (1997).
29. Gillmor S. A., Villasenor A., Fletterick R., Sigal E., Browner M. F.: Nat. Struct. Biol. *4*, 1003 (1997).
30. Tomchick D. R., Phan P., Cymborowski M., Minor W., Holman T. R.: Biochemistry *25*, 7509 (2001).
31. Minor W., Steczko J., Bolin J. T., Otwinowski Z., Axelrod B.: Biochemistry *32*, 6320 (1993).
32. Boyington J. C., Gaffney B. J., Amzel L. M.: J. Biol. Chem. *265*, 12771 (1990).
33. Gaffney B. J.: Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. *25*, 431 (1996).
34. Steczko J., Axelrod B.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *186*, 686 (1992).
35. Steczko J., Donoho G. P., Clemens J. C., Dixon J. E., Axelrod B.: Biochemistry *31*, 4053 (1992).
36. Chen X.-S., Kurre U., Jenkins N. A., Copeland N. G., Funk C. D.: J. Biol. Chem. *269*, 13979 (1994).
37. Hammarberg T., Zhang Y. Y., Lind B., Radmark O., Samuelsson B.: Eur. J. Biochem. *230*, 401 (1995).
38. Suzuki H., Kishimoto K., Yoshimoto T., Yamamoto

S., Kanai F., Ebina Y., Miyatake A., Tanabe T.: Biochim. Biophys. Acta *1210*, 308 (1994).
39. May C., Höhne M., Gnau P., Schwennesen K., Kindl H.: Eur. J. Biochem. *267*, 1100 (2000).
40. Chen X.-S., Funk C. D.: J. Biol. Chem. *276*, 811 (2001).
41. Feussner I., Kühn H., Wasternack C.: Trends Plant Sci. *6*, 268 (2001).
42. Hornung E., Walther M., Kühn H., Feussner I.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 4192 (1999).
43. Jisaka M., Kim R. B., Boeglin W. E., Brash A. R.: J. Biol. Chem. *275*, 1287 (2000).
44. Glickman M. H., Klinman J. P.: Biochemistry *35*, 12882 (1996).
45. Scarrow R. C., Trimitsis M. G., Buck C. P., Grove G. N., Cowling R. A., Nelson M. J.: Biochemistry *33*, 15023 (1994).
46. Lehnert N., Solomon E. I.: J. Biol. Inorg. Chem. *8*, 294 (2003).
47. Glickman M. H., Klinman J. P.: Biochemistry *34*, 14077 (1995).
48. Jonsson T., Glickman M. H., Sun S. J., Klinman J. P.: J. Am. Chem. Soc. *118*, 10319 (1996).
49. Nelson M. J., Cowling R. A. Seitz S. P.: Biochemistry *33*, 4966 (1994).

M. Vanko, I. Holková, M. Obložinský, F. Bilka, and L. Bezáková *(Department of Cell and Molecular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic):* **Plant Lipoxygenases – Structure and Mechanism of Biocatalysis**

Lipoxygenases (LOX; EC 1.13.11.12) catalyse regio- and stereospecific insertion of molecular oxygen into the (*Z*,*Z*)-penta-1,4-diene system of polyunsaturated fatty acids, producing fatty acid hydroperoxides. Plant lipoxygenases are involved in lipid degradation, regulation of growth and development, senescence and also in defense reactions of plants. Resolution of LOX crystal structure, determination of amino acid sequence in LOX proteins and steric properties of their active sites, spectrophotometric observation of cyclic changes in the iron oxidation state, and the radical formation in the catalysis resulted in the present knowledge of LOX catalytic mechanisms. The presence of several enzyme isoforms in the same cell and evidence of their different subcellular localization leads to the speculation that diverse isoforms could be involved in different branches of lipoxygenase metabolic pathways. Today, LOXs are studied as enzymes that take part in signal transduction processes in plant cells.

VŠCHT Praha přijme pro Ústav chemického inženýrství technika/laboranta

Náplň práce:
Experimentální práce na poloprovozních aparaturách (např. nádoba s mechanickými míchadly, destilační kolona), v některých případech řízených počítačem, zpracování experimentálních dat na PC. Technické zabezpečení: zásobování chemikáliemi a jejich příprava (míchání roztoků, odměrná analýza), údržba a montáže při výstavbě a rekonstrukcích experimentálních zařízení, údržba a inventarizace technického zázemí.

Požadavky:
SŠ technického/chemického směru, MS Office

Nabízíme:
zajímavou práci v moderně vybavené laboratoři
příležitost k profesnímu rozvoji
pracoviště v blízkosti metra
zaměstnanecké výhody (pružnou pracovní dobu, příspěvek na stravování, rekreaci, penzijní připojištění, návštěvu kulturních zařízení)

Nástup: dle dohody
Kontakt: doc. Dr. Tomáš Moucha, tel. 220443299, 728870278