



Dioksygenazy – główne enzymy degradacji związków aromatycznych

Urszula Guzik, Izabela Greń, Danuta Wojcieszńska, Sylwia Łabużek
Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski, Katowice

Dioxygenases – the key enzymes in the biodegradation of aromatic compounds

Summary

Progressing degradation of the natural environment has caused an increased interest in the field of biological treatment of both water and soil polluted with different xenobiotics. Aromatic compounds are considered to be one of the most toxic and weakly degraded xenobiotics. The potential solution of the accelerated environment's pollution problem seems to be the bioremediation – the process using the biological organisms to return the environment altered by contaminants to its original condition. Dioxygenases isolated from the microorganisms can be responsible for hydroxylation of the aromatic ring or for its cleavage. Different types of the cleaving dioxygenases have been distinguished due to the kind of the substrate they preferentially can degrade. Cleavage of the aromatic ring facilitates further degradation of xenobiotics, and therefore the dioxygenases are the key enzymes in the biodegradation process of these xenobiotics.

Key words:

dioxygenases, hydroxylation of aromatic ring, cleavage of aromatic ring.

Adres do korespondencji

Urszula Guzik,
Katedra Biochemii,
Wydział Biologii
i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Śląski,
ul. Jagiellońska 28,
40-032 Katowice;
e-mail:
uguzik@us.edu.pl

1. Wprowadzenie

Areny stanowią w środowisku dużą grupę związków chemicznych, pochodzenia zarówno antropogenicznego, jak i naturalnego, i charakteryzują się wysoką stabilnością struktury pierścienia aromatycznego. Cecha ta decyduje o wykorzystaniu, na szeroką skalę w różnorodnych gałęziach przemysłu, naturalnych i nienaturalnych substancji aromatycznych, a jednocześnie spr-

wia, że ksenobiotyczne związki aromatyczne akumulują się w środowisku naturalnym (1). Dlatego też w ostatnich latach dużo uwagi poświęca się poszukiwaniom efektywnych, biologicznych metod oczyszczania terenów zanieczyszczonych związkami aromatycznymi. Jedną z tych metod jest bioremediacja, czyli zespół procesów prowadzonych przez organizmy, którego skutkiem jest częściowe lub całkowite usunięcie ze środowiska czynnika zanieczyszczającego. Grupą organizmów, którą najczęściej wykorzystuje się w bioremediacji środowisk zanieczyszczonych związkami aromatycznymi są mikroorganizmy.

2. Rola dioksygenaz w degradacji związków aromatycznych

Porównanie szlaków rozkładu związków aromatycznych pozwoliło wyróżnić 3 zasadnicze etapy ich biodegradacji. Transformacja wyjściowej struktury ksenobiotyku o budowie aromatycznej do jednego z czterech zasadniczych intermediatów: katecholu, kwasu protokatechowego, hydroksyhydrochinonu lub kwasu gentyzynowego odbywa się na drodze tzw. peryferycznych szlaków rozkładów. Podstawowym etapem w rozkładzie arenów jest jednak rozszczepienie pierścienia aromatycznego, w efekcie którego powstają związki alifatyczne, które w trzecim etapie biodegradacji, z udziałem szeregu enzymów, ulegają przekształceniu do intermediatów cyklu Krebsa (1-16).

Chociaż główna rola przypisywana dioksygenazom jest związana z procesem rozszczepienia stabilnego pierścienia aromatycznego, mogą one także pełnić funkcję w szlakach peryferyjnych. W transformacji związków typu benzen czy naftalen, których pierwotna struktura nie posiada żadnej grupy hydroksylowej, uczestniczą dioksygenazy hydroksylujące [EC 1.14.12.X], wprowadzające do pierścienia aromatycznego dwie grupy hydroksylowe (5,7,12). Natomiast dioksygenazy rozszczepiające katalizują drugi etap degradacji związków aromatycznych, polegający na rozerwaniu wiązania węgiel-węgiel pierścienia poprzez przyłączenie cząsteczki tlenu i wytworzenie nienasyconych kwasów alifatycznych. Podział dioksygenaz rozszczepiających pierścień na intradiolowe i ekstradiolowe jest związany z obecnością podstawników hydroksylowych przy atomach węgla, pomiędzy którymi dochodzi do rozerwania wiązania. Jeżeli rozcięciu ulega wiązanie pomiędzy atomami węgla, z których każdy zawiera grupę hydroksylową jako podstawnik, reakcja ta jest katalizowana przez dioksygenazy intradiolowe, czyli pierwszy enzym szlaku *orto* rozkładu związków aromatycznych. Natomiast jeżeli tylko jeden z atomów węgla, pomiędzy którymi dojdzie do rozerwania wiązania, posiada podstawnik hydroksylowy, wówczas w proces ten zaangażowane są dioksygenazy ekstradiolowe, pierwsze enzymy szlaku *meta* rozkładu związków aromatycznych (8,12-14).

Początkowo sądzono, że nie ma zasadniczych różnic pomiędzy dioksygenazami intradiolowymi a ekstradiolowymi. Wykazano jednak później, że enzymy te charakteryzują się całkowicie odmienną strukturą i mechanizmem działania. Ponadto diok-

sygenazy ekstradiolowe są, jak się wydaje, enzymami o znacznie szerszym spektrum działania niż dioksygenazy intradiolowe. Te ostatnie do działania bezwzględnie wymagają obecności dwóch grup hydroksylowych w pozycji *orto* względem siebie. Tymczasem stwierdzono, że nie wszystkie aromatyczne substraty dioksygenaz typu ekstradiolowego posiadają dwie sąsiadujące ze sobą grupy hydroksylowe. Kwas gentyzynowy lub jego podstawione pochodne, w których grupy hydroksylowe usytuowane są względem siebie w pozycji *para*, są głównymi intermediami w tlenowym rozkładzie takich związków jak dibenzofuran, naftalen, salicylany, 3-hydroksybenzoesan czy niektóre halogenowane węglowodory aromatyczne (15). Degradacja gentyzynianu katalizowana jest przez 1,2-dioksygenazę gentyzynianową [EC 1.13.11.4], która rozszczepia pierścień aromatyczny pomiędzy węglem podstawionym grupą hydroksylową a sąsiednim węglem z podstawnikiem karboksylowym (2,16,17). Ten sam sposób rozszczepienia pierścienia aromatycznego przez dioksygenazy typu ekstradiolowego jest charakterystyczny dla hydrochinonu, kwasu salicylowego, 2-aminofenolu oraz jego metylowych i chlorowych pochodnych (1,3,18). W przeciwieństwie do typowych substratów dioksygenaz ekstradiolowych, związki te są albo dihydroksylowane w pozycji *para* lub/i posiadają grupę hydroksylową w pozycji *orto* względem grup karboksylowej lub aminowej (1). Dlatego też niektórzy autorzy wydzielają dioksygenazy katalizujące taki sposób rozszczepienia jako trzecią rodzinę dioksygenaz (15).

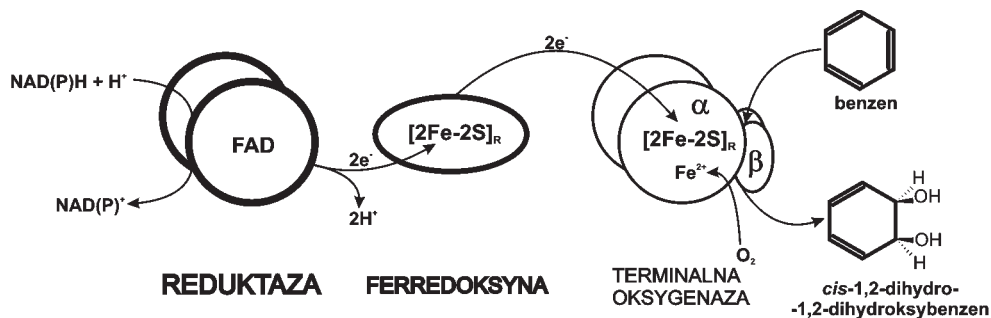
3. Charakterystyka dioksygenaz hydroksylujących

Dioksygenazy hydroksylujące są enzymami należącymi do niehemowych oksygenaz typu Rieskego, zawierających w centrum aktywnym klaster $[2Fe-2S]$ i mającymi jedno lub dwa białka transportujące elektrony, które poprzedzają terminalną oksygenazę (5,19-21). Białka należące do rodziny dioksygenaz hydroksylujących zostały podzielone na trzy grupy, ze względu na liczbę komponentów i ich budowę. Enzymy klasy I są dwukomponentowymi białkami. Pierwszym elementem w łańcuchu przekazu elektronów jest reduktaza zawierająca flawinę i centrum żelazowo-siarkowe $[2Fe-2S]$, drugim dioksygenaza terminalna. Przedstawicielami tej klasy są m.in. dioksygenaza kwasu benzoesowego, dioksygenaza ftalanowa i 3,4-dioksygenaza 4-chlorofenylooctanowa. W klasie tej dokonuje się podziału na podklasy IA i IB, zawierające odpowiednio, FMN i FAD. Enzymy należące do klasy II składają się z trzech elementów: reduktazy zawierającej flawinę, ale pozbawionej centrum żelazowo-siarkowego, ferredoksyny i terminalnej oksygenazy. Podklasa IIA, której przedstawicielem jest dioksygenaza pyrazonowa, posiada ferredoksynę typu roślinnego, w przeciwieństwie do przedstawicieli podklasy IIB, zawierających ferredoksynę z klasterem $[2Fe-2S]$ typu Rieskego. Przedstawicielami tej podklasy są dioksygenaza toluenowa i 1,2-dioksygenaza benzenowa. Także trzy komponenty białkowe tworzą dioksygenazy hydroksylujące III klasy. Są to: reduktaza zawierająca flawinę oraz

centrum żelazowo-siarkowe [2Fe-2S], [2Fe-2S] ferredoksyna i terminalna oksygenaza. Klasa ta reprezentowana jest przez dioksygenazę naftalenową (5,6,8,22).

Sekwencje aminokwasowe katalitycznych podjednostek α oksygenaz terminalnych oraz określenie ich substratów jest podstawą drugiego podziału dioksygenaz hydroksylujących, według którego wyróżnia się cztery rodziny dioksygenaz hydroksylujących: toluenowo/bifenylową, naftalenową, benzoesanową i ftalanową. Rodzina toluenowo/bifenylowa to enzymy występujące, zarówno u Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych bakterii, biorące udział w degradacji toluenu, benzenu, izopropylbenzenu, chlorobenzenu i bifenyłu. Do rodziny naftalenowej należą tylko enzymy mikroorganizmów Gram-ujemnych, hydroksylujących naftalen i fenantren oraz nitrobenzen i nitrotoluen. Rodzina benzoesanowa jest zróżnicowaną grupą zawierającą enzymy utleniające kwasy aromatyczne, takie jak: benzoesowy, metylobenzoesowy, antranilowy, 2-chlorobenzoesowy, trichlorofenoksyoctowy i izopropylbenzoesowy. Oksygenazy rodzin toluenowo/bifenylowej, naftalenowej oraz benzoesanowej są heteromultimerami zawierającymi podjednostki α i β . Rodzina ftalanowa jest dużą i zróżnicowaną grupą enzymów, których oksygenazy terminalne są homomultimerami zbudowanymi z α_n podjednostek. Rodzina ta zawiera enzymy, które hydroksylują poza kwasem ftalowym, takie kwasy aromatyczne jak waniliowy, 3-chlorobenzoesowy czy fenoksybenzoesowy. Kilka dioksygenaz hydroksylujących, takich jak anilinowa, salicylanowa czy 3-fenylpropionowa, nie zostały zaklasyfikowane do żadnej z tych klas (19,21).

Komponenty białkowe wchodzące w skład dioksygenaz hydroksylujących tworzą łańcuch przenośników elektronów z NAD(P)H na końcową oksygenazę (rys. 1). Pierwszym etapem reakcji hydroksylacji pierścienia aromatycznego jest dwuelektronowa redukcja grupy prostetycznej, FAD lub FMN, reduktazy, przy jednoczesnym utlenieniu NAD(P)H. W trójkomponentowej dioksygenazie hydroksylującej masa molekularna reduktazy flawinowej wynosi 42-67 kDa, podczas gdy w dwukomponentowej mieści się w zakresie 34-38 kDa. Z flawiny pojedyncze elektrony są następnie przekazywane na centrum żelazowo-siarkowe [2Fe-2S], będące elementem reduktazy zawierającej flawinę lub oddzielnego białka ferredoksyny. Ferredoksyna pełni rolę elementu pośredniczącego w łańcuchu transportu elektronów, przekazując elektrony na terminalną oksygenazę. Ferredoksyna jest małym białkiem o masie molekularnej 12-15 kDa, zawierającym klaster [2Fe-2S] o właściwościach spektroskopowych i potencjale redoks zbliżonym do klasterów [2Fe-2S] typu Rieskego. Ich centrum zawiera $\text{Fe}_2\text{S}_4\text{N}_2$, w którym jeden jon żelaza jest połączony z białkiem przez dwie reszty histydyny, a drugi przez dwie reszty cysteiny (5,8,23). Terminalna oksygenaza, będąca dużym, białkowym kompleksem, jest odpowiedzialna za wprowadzenie dwóch grup hydroksylowych do pierścienia aromatycznego substratu. Enzym ten buduje maksymalnie sześć podjednostek, dwóch typów: α i β , o łącznej masie molekularnej 150-210 kDa. Podjednostki terminalnej oksygenazy mogą być zorganizowane w tetramery $\alpha_2\beta_2$, jak w dioksygenazie benzenowej czy toluenowej lub heksamery $\alpha_3\beta_3$, tworzące oksygenazę terminalną dioksygenazy kwasu benzoeso-



Rys. 1. Łańcuch przenośników elektronów dioksygenazy benzenowej; [2Fe-2S]_R oznacza klastery typu Rieskego.

wego i naftalenowej. Terminalne oksygenazy mogą być też zbudowane tylko z podjednostek α , jak na przykład w 3,4-dioksygenazie 4-siarkobenzooesowej, która zbudowana jest z dwóch podjednostek α , 3,4-dioksygenazie 4-chlorofenylooctowej, składającej się z trzech podjednostek α , czy dioksygenazie ftalanowej, zbudowanej z czterech podjednostek α (5,23,24). Konfiguracja podjednostek terminalnej oksygenazy stała się podstawą do kolejnego podziału dioksygenaz hydroksylujących, tym razem na pięć klas, z których każda zawiera dioksygenazy o innym ułożeniu podjednostek (25).

Każda podjednostka α zawiera białko Rieskego, które odbiera elektrony od ferredoksyiny, oraz niehemowo związane żelazo. Dwa jony żelaza w białku Rieskego występują na plus trzecim stopniu utlenienia i są związane z białkiem w identyczny sposób jak w klastrze [2Fe-2S] ferredoksyiny (6,19,23,24,26,27). W przeciwieństwie do białek Rieskego kompleksów mitochondrialnego bc_1 i chloroplastowego b_6f , których potencjał redoks wynosi blisko +300 mV, białko Rieskego dioksygenaz hydroksylujących charakteryzuje się potencjałem oksydoredukcyjnym -150 mV i nie wykazuje jonizacji (22,26). Uważa się, że niehemowo związany jon żelaza na plus drugim stopniu utlenienia, znajdujący się w centrum katalitycznym podjednostki α , odpowiada za aktywację tlenu (28). Utworzenie połączenia żelaza z tlenem cząsteczkowym, w postaci nadtlenu żelaza, jest głównym etapem reakcji hydroksylacji. Powstały kompleks Fe-O-O-substrat może albo podlegać redukcji, albo mostek tlenowy może ulec rozerwaniu (23). W wyniku koordynacyjnego połączenia centralnego atomu żelaza z układem trzech aminokwasów podjednostki α oksygenazy terminalnej, powstaje tak zwany motyw 2-His-1-karboksyłowy (ang. *2-His-1-carboxylate motif*). Mogą go tworzyć, zlokalizowane w centralnej części sekwencji aminokwasowej wszystkich znanych podjednostek α : histydyna, tyrozyna, glutaminian lub asparaginian (28,29). Wykazano, że w dioksygenazie toluenowej są to His-222, His-228, Glu-214, natomiast w dioksygenazie naftalenowej: His-208, His-213, Glu-200 lub Asp-362 (19,23,24,30). Zamiana któregośkolwiek z tych aminokwasów na alaninę, na drodze mutagenyzy, wywołuje inaktywację enzymu, co potwierdza wcześniejsze

przypuszczenia, że aminokwasy te są ligandami Fe^{+2} (22,28,29). W badaniach krytalograficznych białka Rieskego dioksygenazy naftalenowej wykazano, że odległość pomiędzy klasterem [2Fe-2S] a niehemowo związanym Fe^{2+} podjednostki α wynosi 43,5 Å, co uniemożliwia przejście elektronów z klastra [2Fe-2S] do Fe^{2+} . Natomiast odległość pomiędzy klasterem [2Fe-2S] jednej podjednostki α a niehemowo związanym Fe^{2+} drugiej podjednostki α wynosi tylko 12 Å. Dlatego też zaproponowano, że centrum katalityczne terminalnej oksygenazy zlokalizowane jest na połączeniu dwóch podjednostek α , a elektrony transportowane są z klastra [2Fe-2S] jednej podjednostki α do Fe^{2+} sąsiedniej podjednostki α . Pokonanie przez elektrony odległości 12 Å pomiędzy centrum Rieskego a Fe^{2+} jest możliwe dzięki Asn-205. Umożliwia ona wytworzenie wiązania wodorowego pomiędzy His-208, związaną z centralnym jodem żelaza jednej podjednostki a His-104, wiążącą klaster [2Fe-2S] sąsiedniej podjednostki α . Wymiana Asn-205 na inny aminokwas znosi aktywność dioksygenazy hydroksylującej, co świadczy o znaczeniu tego pomostowego aminokwasu w transporcie elektronów (24,27,29). Podjednostka β nie bierze bezpośredniego udziału w katalizie reakcji hydroksylacji, choć niektórzy autorzy uważają, że może ona być odpowiedzialna za specyficzność substratową dioksygenaz toluenowej i bifenyłowej. Uważa się jednak, że główną rolę w specyficznym wiązaniu substratu odgrywa podjednostka α , co wykazali Parales i wsp. Natomiast podjednostka β może odgrywać rolę w utrzymywaniu razem podjednostek α oraz w formowaniu produktu (5,31,33).

4. Budowa i właściwości chemiczne dioksygenaz intradiolowych

W analizie strukturalnej oraz porównania sekwencji aminokwasowych dioksygenaz intradiolowych wykazuje się, że wszystkie opisane dotychczas enzymy, przeprowadzające rozszczepienie typu *orto*, należą do jednej linii ewolucyjnej. Enzymy te są najczęściej homo- lub heteromultimerami, zawierającymi różną ilość trójwartościowego żelaza na mol enzymu (13,33). Mimo różnego układu podjednostek, domeny katalityczne tych enzymów wykazują podobną strukturę pofałdowania oraz skład aminokwasowy (34). Dlatego też podziału dioksygenaz intradiolowych dokonuje się ze względu na stopień powinowactwa do substratu. Dzieli się je na trzy klasy: 1,2-dioksygenazy katecholowe [EC 1.13.11.1], 3,4-dioksygenazy kwasu protokatechowego [EC 1.13.11.3] i 1,2-dioksygenazy hydroksyhydrochinonowe [EC 1.13.11.37] (1). Wśród dioksygenaz katecholowych wyróżnia się dwie podklasy. Do pierwszej należą dioksygenazy charakteryzujące się wysoką specyficznością w stosunku do katecholu i nie transformujące jego uchlorowanych pochodnych z wyjątkiem 4-chlorokatecholu (35). W drugiej podklasie znalazły się dioksygenazy katalizujące rozszczepienie katecholu i jego podstawionych pochodnych, a zatem cechujące się szerszą specyficznością substratową (34,36). 3,4-Dioksygenazy kwasu protokatechowego są najczęściej oligomerami wykazującymi dużą specyficzność substratową względem

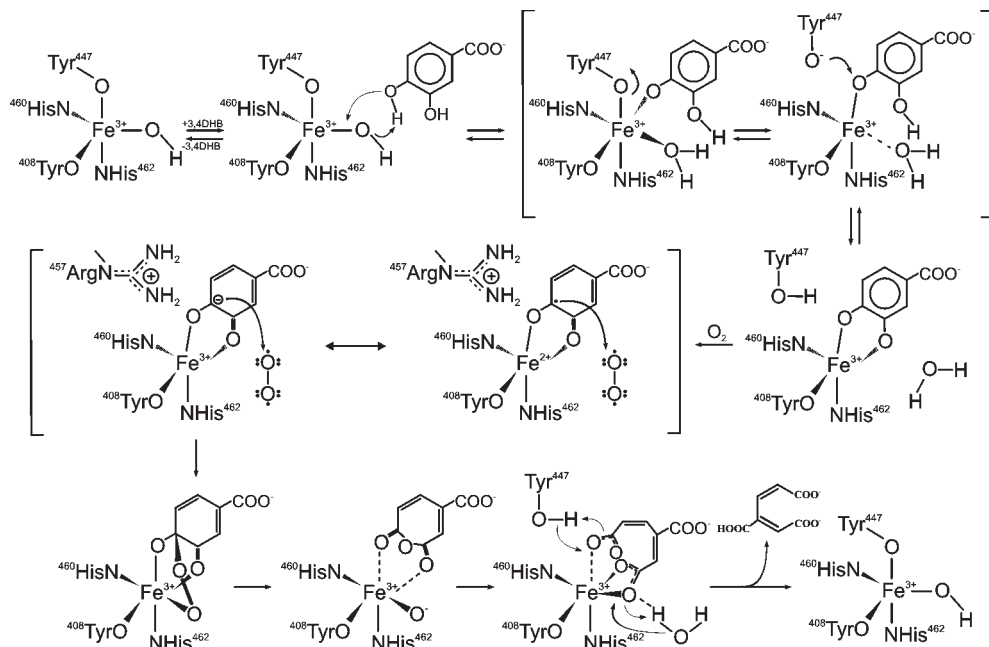
kwasów hydroksybenzoesowych (12,34). 1,2-Dioksygenazy hydroksyhydrochinonowe rozszczepiają pierścień aromatyczny trihydroksybenzenu i podobnie jak dioksygenazy katecholowe są głównie homodimerami (1,36,37).

W badaniach krystalograficznych dioksygenaz intradiolowych wykazano istnienie dwóch odmian struktury przestrzennej tych enzymów. Modelowymi enzymami grupy 3,4-dioksygenaz kwasu protokatechowego są enzymy wyizolowane z komórek szczepów *Pseudomonas putida* B-10 oraz *Acinetobacter* sp. ADP1. Są one zbudowane z protomerów, na które składają się dwie podjednostki białkowe α i β , tworzących oligomeryczne struktury tych dioksygenaz. Izolacje 1,2-dioksygenazy katecholowej szczepu *Acinetobacter* sp. ADP1, 1,2-dioksygenazy 4-chlorokatecholowej szczepu *Rhodococcus opacus* 1CP czy 1,2-dioksygenazy hydroksyhydrochinonowej szczepu *Nocardioides simplex* 3E pozwoliły określić strukturę charakterystyczną dla 1,2-dioksygenaz katecholowych i hydroksyhydrochinonowych. Enzymy te są najczęściej homodimerami utworzonymi przez podjednostki o masie molekularnej w zakresie 30-40 kDa każda (1,38). Podjednostki α i β 3,4-dioksygenazy kwasu protokatechowego, homologiczne względem siebie, zbudowane są odpowiednio z około 200 i 230 reszt aminokwasowych. Stopień podobieństwa pomiędzy podjednostką α i β 3,4-dioksygenazy szczepu *Pseudomonas putida* B-10 wynosi 30%, a dla podjednostek 3,4-dioksygenazy szczepu *Acinetobacter* sp. ADP1 26%. Natomiast w zestawieniu sekwencji aminokwasowych podjednostek α i β pomiędzy gatunkami wykazano podobieństwo, odpowiednio, dla podjednostki α oraz β , 46 do 56% oraz 55 do 65%. W badaniach struktury podjednostek 3,4-dioksygenaz kwasu protokatechowego wykazano, że charakteryzują się one podobną strukturą trzeciorzędową. Ich wspólną cechą jest ośmioniciowa β -kartka, zagięta w połowie dla utworzenia dwóch, czteroniciowych warstw. Otwarte brzegi zagiętej β -kartki są utrzymywane razem dzięki utworzeniu wiązań wodorowych z atomami łańcucha głównego białka. Miejsce aktywne każdego protomeru zlokalizowane jest na jednym końcu rozległej powierzchni pomiędzy podjednostkami α i β , w pobliżu szczytu oligomeru, po zewnętrznej stronie białka. Podjednostka β dostarcza większości aminokwasów zlokalizowanych w sąsiedztwie trójwartościowego żelaza. Pozostałe aminokwasy pochodzą z N-końcowej części podjednostki α (1,39). Żelazo trójwartościowe, niezwiązanej z substratem, 3,4-dioksygenazy kwasu protokatechowego jest koordynowane przez łańcuchy boczne czterech aminokwasów: pierścienie imidazolowe His-460 i His-462 oraz reszty fenolowe Tyr-408 i Tyr-447. Piątym ligandem żelaza jest grupa hydroksylowa z cząsteczki wody (1,38,40,41). Podobnie koordynowane jest żelazo w 1,2-dioksygenazach katecholowych i hydroksyhydrochinonowych, gdzie aksialnymi ligandami są His-226 i Tyr-200, a ekwatorialnymi Tyr-164, His-224 oraz grupa hydroksylowa (1,34,37,40).

1,2-Dioksygenazy katecholowe i hydroksyhydrochinonowe są homodimerami, których podjednostki zbudowane są z około 300 reszt aminokwasowych, tworzących dwie domeny. Budowa rdzenia domeny katalitycznej odpowiada budowie domeny katalitycznej 3,4-dioksygenazy kwasu protokatechowego. Typową dla 1,2-dio-

ksygenaz jest natomiast domena N-terminalna, pośrednicząca w dimeryzacji podjednostek. Składa się ona z około 100 aminokwasów, tworzących maksymalnie pięć helis. Helisy dwóch podjednostek przenikają się wzajemnie tworząc strukturę dimeru i jednocześnie hydrofobowy tunel, do którego mogą być dołączane cząsteczki fosfolipidów. W zestawieniu sekwencji aminokwasowych 1,2-dioksygenaz katecholowych wykazano, że domena z motywem helikalnego zamka błyskawicznego (ang. *helical-zipper*) jest charakterystyczna dla enzymów z tej rodziny. Istnieje kilka hipotez wyjaśniających znaczenie tego motywu. W jednej z nich zakłada się, że hydrofobowy tunel odpowiada za wzrost miejscowej koncentracji substratu. Wydaje się to jednak mało prawdopodobne, gdyż katechol jest związkiem rozpuszczalnym w stężeniach znacznie przekraczających stężenia fizjologiczne. Ponadto nie stwierdzono występowania dla substratu bezpośredniej drogi od tunelu do centrum aktywnego enzymu. Uważa się również, że fosfolipidy przyłączone do hydrofobowego tunelu służą jako cząsteczki efektorowe. Odpowiadają one za zmiany konformacyjne centrum aktywnego enzymu, co z kolei umożliwia przyłączenie do hydrofobowego fragmentu enzymu laktonizującego *cis,cis*-mukonian, czyli kolejnego enzymu szlaku *orto*. Dzięki temu w komórce zachowane jest niskie stężenie intermediatów, które mogą być dla niej potencjalnie toksyczne. Uważa się również, że hydrofobowy fragment dioksygenaz może wpływać na płynność dwuwarstwy lipidowej. Związki aromatyczne znane są z antibakteryjnych właściwości ze względu na ich wpływ na integralność i funkcjonalność błony komórkowej. Wykazano jednak, że niektóre mikroorganizmy rozwinęły mechanizmy pozwalające pokonać toksyczność związków aromatycznych. Mogą one wypompowywać z komórki węglowodory aromatyczne przy użyciu energozależnej pompy, utrzymując ich stężenie w komórce na bezpiecznym poziomie. Drugi, alternatywny mechanizm, polega na zmianie płynności warstwy fosfolipidowej. Przypuszcza się, że dzięki hydrofobowemu regionowi, dioksygenazy intradiolowe mogą wiązać fosfolipidy błony komórkowej lub nowo zsyntetyzowane w komórce fosfolipidy. Powoduje to uwalnianie z błony hydrofobowych węglodorów aromatycznych i ich wiązanie w centrum aktywnym enzymu. Efektem tego procesu jest wzrost sztywności błony komórkowej, a w konsekwencji zmniejszenie jej przepuszczalności, co zabezpiecza komórkę przed toksycznym stężeniem związków aromatycznych w środowisku (1,12,34,38,42).

1,2-Dioksygenaza katecholowa szczepu *Pseudomonas arvilla* C-1 uważana była za heterodimer zbudowany z podjednostek α i β . Dopiero po oczyszczeniu tego enzymu na kolumnie chromatograficznej z wypełnieniem DEAE-Toyopearl wykazano, że w rzeczywistości enzym ten występuje w postaci trzech izozymów, utworzonych przez kombinację dwóch różnych podjednostek, tworzących dimery $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ oraz $\beta\beta$ i koegzystujących wspólnie w komórce. Wszystkie trzy izozymy charakteryzują się podobną specyficznością substratową, optymalnym pH oraz wartością stałej K_m (1,43,44). Również podobnymi parametrami kinetycznymi reakcji enzymatycznych oraz specyficznością substratową charakteryzują się izozymy IsoA i IsoB z komórek *Acinetobacter radioresistens*, pomimo ich strukturalnych różnic objawiających się róż-



Rys. 2. Mechanizm reakcji rozszczepienia typu *ortho* pierścienia aromatycznego kwasu protokatechowego.

ną masą molekularną oraz budową podjednostkową. Najwyższą aktywność IsoA i IsoB stwierdzono podczas rozszczepienia pierścienia aromatycznego katecholu. Niższą aktywność izozymy te wykazują względem katecholi z podstawnikami metylowym w pozycji 3 oraz 4. Nie stwierdzono zdolności tych izozymów do transformacji 3-chlorokatecholu oraz kwasu protokatechowego. Izozymy IsoA i IsoB charakteryzują się natomiast niższą aktywnością względem 4-metylokatecholu niż izozymy szczepu *Pseudomonas arvilla* C-1. Stwierdzono również, że wszystkie izozymy badanych szczepów wykazują zarówno aktywność intradiolową, jak i w niewielkim stopniu aktywność ekstradiolową (43-45).

Mechanizm rozszczepienia pierścienia aromatycznego przez dioksygenazy intradiolowe został zaproponowany na podstawie biochemicznych, spektroskopowych i strukturalnych badań 1,2-dioksygenaz katecholowych oraz 3,4-dioksygenaz kwasu protokatechowego. Reakcja wiązania substratu z enzymem jest procesem wieloetapowym, którego ostatecznym rezultatem jest zastąpienie aksjalnej tyrozyny i ekwatorialnego jonu hydroksylowego 1,2-dioksygenazy lub 3,4-dioksygenazy przez, odpowiednio, jon katecholanowy lub protokatecholanowy. Efektem tego jest ich aktywacja (1,12,37,38,46,47). W wyniku ataku żelaza na tlen, podczas którego dochodzi do redukcji żelaza z +3 na +2 stopień utlenienia i powstanie Fe²⁺-semichinonu, który reaguje bezpośrednio z dwoma atomami tlenu, wytwarza się struktura nad-

tlenku C-O-O-Fe, co przedstawiono na rysunku 2 (41). W powstałym intermedacie hydronadtlenkowym dochodzi do przegrupowania Criegee'a względem wiązania węgiel-węgiel poprzez migrację grupy acylowej, w konsekwencji której powstaje nietrwała struktura laktonowa. Efektem hydrolizy bezwodnika laktonowego jest uwolnienie produktu reakcji rozszczepienia pierścienia aromatycznego, czyli kwasu *cis,cis*-mukonowego (1,30,38,41).

5. Budowa i właściwości biochemiczne dioksygenaz ekstradiolowych

Dioksygenazy ekstradiolowe odgrywają zasadniczą rolę w biodegradacji związków aromatycznych, ze względu na znacznie szersze spektrum działania niż dioksygenazy intradiolowe. Do tej pory na podstawie analizy budowy strukturalnej lub porównania sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych dokonano kilku podziałów enzymów przeprowadzających rozszczepienie pierścienia aromatycznego drogą *meta*. Pierwszego podziału dioksygenaz ekstradiolowych dokonali Harayama i Reikik (33) na podstawie ich biochemicznych właściwości. Wyróżnili oni dwie rodziny, do których zaklasyfikowali odpowiednio enzymy preferujące substraty jednopierścieniowe i dwupierścieniowe (33,48,49).

W 1996 r. Eltis i Bolin (48) przeprowadzili porównanie trzydziestu ośmiu dioksygenaz ekstradiolowych. Badania te umożliwiły im wydzielenie dwóch, zasadniczo różnych od siebie, typów dioksygenaz ekstradiolowych. Typ I zawiera sekwencję PROSITE PS00082 i został podzielony na pięć rodzin. Stopień zgodności aminokwasowej pomiędzy nimi nie przekracza 22%. Rodzina I.1 zawiera jednodomenowe enzymy i jest dzielona na dwie podrodziny, w których zgodność sekwencji aminokwasowej jest większa niż 54%. Rodzina I.2 zawiera dwudomenowe, zawierające żelazo enzymy, preferujące substraty monocykliczne, zgrupowane w pięć podrodzin. Na pięć podrodzin podzielono również rodzinę I.3, obejmującą dwudomenowe enzymy, zawierające żelazo i preferujące substraty bicykliczne. Rodziny I.4 i I.5 zawierają po jednym przedstawicielu, odpowiednio metapirookatechazę II z *Alcaligenes eutrophus* JM22 i 2,3-dioksygenazę kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego z *Arthrobacter globiformis*. Typ II dioksygenaz ekstradiolowych zawiera trzy enzymy, których sekwencja nie pozwala na ich włączenie do żadnej z rodzin typu I. Są to 4,5-dioksygenaza protokatechowa z *Pseudomonas paucimobilis*, 2,3-dioksygenaza katecholowa I z *Alcaligenes eutrophus* JM222 oraz 3,4-dioksygenaza kwasu dihydroksyfenylooctowego z *Escherichia coli* (49,50). Eltis i Bolin przeprowadzili również porównanie domen N- i C-końcowych dioksygenaz ekstradiolowych. Wykazali oni wysokie podobieństwo pomiędzy domenami karboksylowymi oraz pomiędzy domenami aminowymi. Na podstawie analizy otrzymanych wyników zaproponowali, że pierwotna dioksygenaza była białkiem jednodomenowym, które dało podstawę dla współczesnych dwudomenowych enzymów poprzez duplikację domeny pierwotnej. Obserwowane jednak różnice w preferencjach substratowych mogą sugerować istnienie dodatko-

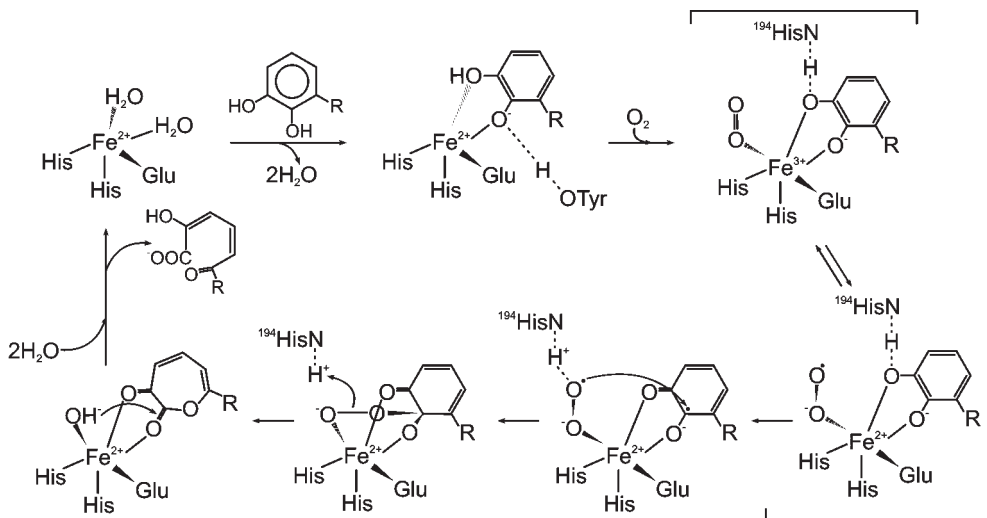
wego mechanizmu powstawania dwudomenowych dioksygenaz, którym może być mutacja punktowa lub rekombinacja (48,51).

Na podstawie sekwencji aminokwasowych domen dioksygenaz ekstradiolowych, również w 1996 r., Spence i wsp. (52) zaproponowali inny podział tych enzymów na trzy klasy. Klasa I zawiera enzymy jednodomenowe będące homodimerami lub homoheksamerami, o masie molekularnej podjednostki w zakresie 21-24 kDa, zawierającymi jon żelaza dwuwartościowego na podjednostkę. Klasa II obejmuje enzymy dwudomenowe, w których żelazo (II) jest koordynowane przez ligandy C-terminalnej domeny. Dioksygenazy te zawierają jon żelaza dwuwartościowego na podjednostkę o masie molekularnej 31-35 kDa. Enzymy katalizujące rozszczepienie pierścienia związków monocyklicznych są homotetramerami, natomiast homooktamery rozszczepiają związki bicykliczne, takie jak bifenyl. Enzymy dwudomenowe, w których żelazo (II) może być koordynowane przez aminokwasy N-terminalnej domeny, tworzą klasę III dioksygenaz ekstradiolowych. Obejmuje ona 1,2-dioksygenazę 2,3-dihydroksyfenylopropionianową MhpB oraz 2,3-dioksygenazę 3,4-dihydroksyfenylooctową HpcB, wyizolowane z komórek *Escherichia coli*, 2,3-dioksygenazę katecholową MpcI (MPC – metapirokatechaza) pochodzącą z *Alcaligenes eutrophus* oraz 4,5-dioksygenazę kwasu protokatechowego LigAB gatunku *Pseudomonas paucimobilis*. Ewolucja dioksygenaz ekstradiolowych w trzy klasy może być wyjaśniona mutacją genu w części kodującej C- lub N-terminalną domenę, poprzedzoną duplikacją genu kodującego dioksygenazy jednodomenowe (52,53).

Najnowsze podziału dioksygenaz ekstradiolowych dokonano na podstawie analizy sekwencji aminokwasowych oraz struktury przestrzennej enzymów. W podziale tym wyróżniono trzy typy. Pierwszy obejmuje dioksygenazy jedno- i dwudomenowe. Tworzą go enzymy należące do nadrodziny białek, określanych jako *vicinal oxygen chelate superfamily*. Do tego typu należą na przykład dwudomenowe: 1,2-dioksygenaza 2,3-dihydroksybifenyłowa szczepu *Burkholderia xenovorans* LB400, 2,3-dioksygenaza katecholowa szczepu *Pseudomonas putida* mt-2 czy dioksygenazy chlorohydrochinonowe oraz jednodomenowe izozymy 1,2-dioksygenazy 2,3-dihydroksybifenyłowej szczepu *Rhodococcus globerulus* P6. Drugi typ dioksygenaz ekstradiolowych obejmują enzymy multimeryczne, zbudowane z jednego lub dwóch rodzajów podjednostek. Przedstawicielami tego typu dioksygenaz są m.in. 4,5-dioksygenaza protokatechowa szczepu *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6, 2,3-dioksygenaza katecholowa I szczepu *Alcaligenes eutrophus* JMP222 czy 1,6-dioksygenaza 2-aminofenolowa szczepu *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. Trzeci typ dioksygenaz ekstradiolowych należy do nadrodziny białek *cupin* i zawiera takie enzymy, jak 1,2-dioksygenaza gentyzynianowa wyizolowana z komórek *Pseudomonas testosteroni* czy dioksygenaza homogentyzynianowa (1,54-56). Na podstawie dotychczasowych badań nad pochodzeniem dioksygenaz ekstradiolowych dowodzi się, że należą one do trzech ewolucyjnie niezależnych rodzin. Nie zaobserwowano jednak ścisłej korelacji pomiędzy specyficznością substratową tych dioksygenaz a ich ewolucyjnym pochodzeniem (1).

Dioksygenazy ekstradiolowe są najczęściej multimerami, w których każda katalityczna podjednostka zawiera jon dwuwartościowego metalu (1,57-60). Mimo różnic w budowie podjednostkowej dioksygenaz ekstradiolowych oraz ich filogenetycznym pochodzeniu, większość z nich charakteryzuje się podobną budową miejsca aktywnego i posiada te same ligandy jonu metalu. Są nimi dwie histydyny oraz glutaminian, tworzące motyw 2-His-1-karboksyłowy. Motyw ten wraz z dwoma cząsteczkami wody jest koordynacyjnie połączony, najczęściej, z żelazem na +2 stopniu utlenienia (1,8,30,61). W badaniach krystalograficznych 1,2-dioksygenazy 2,3-dihydroksybifenyłu (BphC), wyizolowanej z *Pseudomonas* KKS102 wykazano, że każda jej podjednostka zbudowana jest z N- i C-końcowej domeny, zawierających motyw $\beta\alpha\beta\beta$. Wewnątrz cylindrycznej struktury w C-terminalnej domenie znajduje się centrum aktywne enzymu z jonem żelaza. W enzymie nie połączonym z substratem, jon Fe^{2+} koordynują His-145 i His-209, Glu-260 i dwie cząsteczki wody. Prawie identyczny układ ligandów występuje w 1,2-dioksygenazie 2,3-dihydroksybifenyłu szczepu *Pseudomonas* LB400 (1,38,62). Kita i wsp. (63) wykazali, że 2,3-dioksygenaza katecholowa MPC szczepu *Pseudomonas putida* mt-2 jest tetramerem zbudowanym z podjednostek α , z których każda zawiera pojedynczy jon Fe^{2+} . 1,2-Dioksygenaza 2,3-dihydroksybifenyłu i 2,3-dioksygenaza katecholowa różnią się budową miejsca wiążącego jon Fe^{2+} . Monomer 2,3-dioksygenazy katecholowej składa się z N- i C-terminalnej domeny, zbudowanych, odpowiednio, z ośmiu β -harmonijek i dwóch α -helis oraz dziewięciu β -harmonijek i czterech α -helis. Struktura β w C-terminalnej domenie tworzy strukturę przypominającą lejek, którego jeden koniec jest otwarty do powierzchni cząsteczki, drugi w stronę tetrameru, a centralna część tworzy zagłębienie. Zlokalizowane jest tam centrum aktywne enzymu. Katechol i dwa atomy tlenu wchodzi do centrum aktywnego poprzez szczelinę w otwartym regionie β lejka, składającego się głównie z hydrofobowych reszt aminokwasowych. Szczelina, przez którą wchodzi substrat i tlen, jest dużo węższa niż w BphC, gdyż częściowo zasłaniają ją reszty metioniny i fenyloalaniny. Z budowy tej wynika specyficzność substratowa metapirokatechazy. Ponieważ bifenyl jest cząsteczką dużo większą niż katechol, nie mieści się on w szczelinie prowadzącej do centrum aktywnego enzymu i w związku z tym nie może on być rozszczepiany przez MPC (1,63). Chociaż MPC różni się budową przestrzenną od BphC, to jego centrum aktywne również zawiera motyw 2-His-1-karboksyłowy. W każdej z czterech podjednostek α metapirokatechazy kofaktorami jonu Fe^{2+} są His-153, His-214 i Glu-265. 4,5-Dioksygenaza protokatechowa szczepu *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6, nie wykazuje podobieństwa z sekwencją aminokwasową 1,2-dioksygenazy 2,3-dihydroksybifenyłu ani metapirokatechazy, ale posiada bardzo podobne ligandy żelaza: His-12, His-61, Glu-242. O istotnym znaczeniu motywu 2-His-1-karboksyłowego w katalizie ekstradiolowego rozszczepienia pierścienia aromatycznego świadczy fakt, że bardzo zbliżone cechy miejsca aktywnego posiada ludzka dioksygenaza homogentyzynianowa. Enzym ten nie wykazuje podobieństwa z sekwencjami bakteryjnych dioksygenaz ekstradiolowych, a mimo to jego żelazo koordynowane jest również przez dwie histydyny i glutaminian (1,38,63).

Warunkiem ekstradiolowego rozszczepienia pierścienia aromatycznego jest utworzenie kompleksu pomiędzy dwuwartościowym żelazem a substratem. Dochodzi wtedy do usunięcia dwóch cząsteczek wody z centrum aktywnego i związanie przez Fe^{2+} substratu poprzez dwie grupy hydroksylowe. W miejscu wiązania substratu ekwatorialnymi ligandami są histydyna, glutaminian oraz grupa hydroksylowa substratu, natomiast aksjalnymi ligandami są druga histydyna i druga grupa hydroksylowa substratu. Puste miejsce w położeniu ekwatorialnym jest miejscem wiązania dwóch atomów tlenu. Podczas tworzenia kompleksu enzym-substrat dochodzi do związania Fe^{2+} z substratem w monoanionowej formie, w której tylko jedna grupa hydroksylowa substratu jest deprotonowana. Na podstawie porównania budowy wolnego enzymu z kompleksem enzym-substrat wykazano, że podczas wiązania substratu dochodzi do zmian konformacyjnych wokół centrum aktywnego enzymu. W kompleksie enzym-substrat deprotonowana grupa substratu poprzez wiązanie wodorowe oddziałuje z konserwatywną tyrozyną miejsca aktywnego, co jak się wydaje, stabilizuje połączenie substratu z enzymem (1,62). Wykazano również, że w obrębie miejsca aktywnego każdej ekstradiolowej dioksygenazy znajduje się konserwatywna histydyna (1,38). W centrum aktywnym 1,2-dioksygenazy 2,3-dihydroksybibifenyli jest nią His-194. Podczas wiązania substratu przez enzym His-194 zmienia konformację, co umożliwiwi utworzenie, pomiędzy nią a drugą grupą hydroksylową substratu, wiązania wodorowego. Silny zasadowy charakter His-194, wynikający z sieci oddziaływań wodorowych pomiędzy His-194, His-193 i Asp-170, powoduje deprotonację grupy hydroksylowej substratu. Przypuszcza się, że całkowitą deprotonację tej grupy indukuje wiązanie cząsteczki tlenu w pustym miejscu kompleksu enzym-substrat. Wykazano, że w miejscu tym przeważają aminokwasy hydrofobowe: alanina, walina, izoleucyna, leucyna, fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan, metionina, co jak się wydaje, jest konieczne dla związania niepolarniej cząsteczki tlenu (60,62,63). Połączenie cząsteczki tlenu z Fe^{2+} i jej atak na węgiel C2 substratu prowadzi do utworzenia semichinonowego intermediatu nadtlenu żelaza (64). Za stabilizację jego ujemnego ładunku odpowiada His-194, która oddziałuje z ujemnym ładunkiem atomów tlenu. W wyniku rozszczepienia wiązania O-O podczas przegrupowania Criegee'a, powstaje nienasycony lakton oraz Fe^{2+} z przyłączonym anionem wodorotlenowym. Wymagany dawcą protonu jest His-194. Końcowy produkt reakcji powstaje w wyniku hydrolizy laktonu (1,30,38,58,62). Ogólny mechanizm rozszczepienia pierścienia aromatycznego przez dioksygenazy ekstradiolowe przedstawiono na rysunku 3. Krystaliczna struktura BphC szczepu *Pseudomonas* sp. KKS102 wskazuje na znaczącą rolę aminokwasu centrum aktywnego, His-194, w katalizie reakcji rozszczepienia pierścienia aromatycznego katecholu. Odgrywa ona bowiem w niej trzy różne role. Działa jako zasada deprotonująca grupę hydroksylową substratu, stabilizuje ładunek cząsteczki tlenu oraz pełni funkcję donora protonu. Wykazano, że podobny podstawnik znajduje się w centrum aktywnym każdej dioksygenazy ekstradiolowej (38,62).



Rys. 3. Mechanizm ekstradiolowego rozszczepienia pierścienia aromatycznego.

W dotychczasowych badaniach dowodzi się, że mechanizm rozszczepienia ekstradiolowego jest podobny we wszystkich typach dioksygenaz ekstradiolowych (1). Pochodne katecholu mogą być jednak wiązane z jonem żelaza w różny sposób, z czego wynika regiospecyficzność dioksygenaz ekstradiolowych i różne produkty rozszczepienia. Przykładem może być 3-metylokatechol, którego produktem rozszczepienia proksymalnego i dystalnego są odpowiednio, kwas 2-hydroksy-6-keto-hepta-2,4-dienowy i semialdehyd 3-metylo-2-hydroksymukonowy (65,66). Obecność podstawników i ich lokalizacja decydują o rodzaju rozszczepienia pierścienia aromatycznego. Wykazano, że ekstradiolowe rozszczepienie niektórych metylowych i chlorowych związków aromatycznych może prowadzić do powstawania toksycznych metabolitów w postaci acylohalogenków lub metylomukonolaktonów, toksycznych pochodnych metylowych (65-69). 3-Chlorokatechol może ulegać rozszczepieniu ekstradiolowemu na dwa sposoby. Rozszczepienie proksymalne z utworzeniem 2-hydroksymukonianu prowadzi do powstania toksycznego chlorku acylu, który akumuluje się w postaci brązowo zabarwionego polimeru (67). Podczas rozszczepienia dystalnego powstaje semialdehyd 3-chloro-2-hydroksymukonowy. Ten drugi rodzaj rozszczepienia nie powoduje nagromadzenia chlorku acylu i dezaktywacji enzymu (65,66,69,70). Inaktywacja dioksygenazy podczas rozszczepienia 3-chlorokatecholu związana jest prawdopodobnie z odwracalną chelatacją lub nieodwracalnymi kowalencyjnymi modyfikacjami żelaza centrum aktywnego przez chlorek acylu (1,70,71). Mars i wsp. (72) opisali u szczepu *Pseudomonas putida* GJ31 mechanizm zabezpieczający przed gromadzeniem się chlorku acylu podczas proksymalnego rozszczepienia 3-chlorokatecholu. Ekstradiolowa 2,3-dioksygenaza katecholowa CbcE rozkłada toksyczny metabolit z równoczesnym uwolnieniem chlorku nieorganiczne-

go (70,72). Podobnymi możliwościami charakteryzują się dioksygenaza chlorohydrochinonowa LinE, rozszczepiająca i dehalogenująca chlorohydrochinon, oraz dioksygenaza PcaA, rozszczepiająca 2,6-dichloro-*p*-hydrochinon podczas degradacji pentachlorofenolu (70,73). Również metylowe związki aromatyczne podlegają rozszczepieniu typu *meta*, zarówno proksymalnemu, jak i dystalnemu. Podczas rozszczepienia proksymalnego mogą powstawać toksyczne metylomukonolaktony. W badaniach Riegert i wsp. (66) wykazano jednak, że szczep *Sphingomonas xenophaga* BN6 przeprowadza efektywnie proksymalne rozszczepienie 3-metylokatecholu.

Obecność Fe^{2+} w centrum aktywnym dioksygenaz ekstradiolowych jest przyczyną dużej wrażliwości tych enzymów na czynniki oksydacyjne (63). Hasset i wsp. (74) wykazali hamujący wpływ nadtlenu wodoru na aktywność 2,3-dioksygenaz katecholowych szczepów z rodzaju *Pseudomonas*. W badaniach Villancourt i wsp. (75) wykazano inaktywujące działanie samego tlenu. Maksymalną aktywność enzymu obserwuje się przy niskiej prężności tlenu, pomimo że jest on dla dioksygenaz jednym z substratów reakcji (74,76). Stwierdzono, że działanie ochronne dla enzymu wykazują kwas askorbinowy, etanol oraz aceton, gdyż zapobiegają utlenieniu żelaza w centrum aktywnym enzymu (3,60,63). Aceton po związaniu z jonem żelaza prawdopodobnie blokuje żelazo na +2 stopniu utlenienia w centrum aktywnym enzymu. Zbyt wysokie stężenie acetonu zmniejsza jednak aktywność dioksygenaz ekstradiolowych, gdyż jest on również ich inhibitorem kompetycyjnym (57,63). Oprócz acetonu, charakter inhibitora kompetycyjnego wykazują niektóre pochodne fenoli oraz alifatyczne alkohole i ketony. Przyłączenie tych inhibitorów w miejscu aktywnym enzymu blokuje jego oddziaływanie z substratem. W konsekwencji uniemożliwia to oddziaływanie pomiędzy substratem a jonem żelaza. Wykazano również, że fenole i alifatyczne ketony poprzez koordynacyjne połączenie z jonem żelaza niszczą charakterystyczny układ żelaza w centrum aktywnym enzymu (57,63,77,78).

Poza dioksygenazami ekstradiolowymi zawierającymi w centrum aktywnym jon Fe^{2+} , opisano przykłady tych enzymów zawierających w centrum aktywnym dwuwartościowy jon manganu. Dioksygenazy te są niewrażliwe na inhibicyjne działanie cyjanku, azydku czy nadtlenu wodoru. Spadek aktywności manganozależnych dioksygenaz obserwuje się natomiast w obecności jonów Fe^{2+} . Do tego typu enzymów należą na przykład 2,3-dioksygenaza 3,4-dihydroksyfenylooctanowa, wyizolowana z komórek szczepów *Bacillus brevis*, *Brevibacterium fuscum* i *Arthrobacter globiformis*, czy 1,2-dioksygenaza 2,3-dihydroksybibenylowa szczepu *Bacillus* sp. JF8 (46,59,60,79,80).

6. Podsumowanie

Izolacja i charakterystyka szczepów bakteryjnych oraz konstruowanie nowych bakteryjnych genotypów umożliwiających degradację szerokiej gamy aromatycznych ksenobiotyków jest, jak się wydaje, niezbędne w skutecznym oczyszczaniu zdegradowanego środowiska. Naturalna różnorodność metaboliczna wśród mikro-

organizmów czasami nie wystarcza do efektywnego usuwania chemicznych zanieczyszczeń. Stąd wynika konieczność wzbogacenia naturalnych konsorcjów bakteryjnych szczepami zmodyfikowanymi metodami inżynierii genetycznej. Jednak manipulacje genetyczne wykorzystujące techniki *in vitro*, rozszerzające specyficzność substratową bakterii, wymagają wcześniejszej znajomości szlaków degradacyjnych oraz pełnej charakterystyki podstawowych enzymów, zaangażowanych w degradację związków aromatycznych (81). Przyszłościowe wykorzystanie tej wiedzy podczas prób tworzenia nowych szlaków metabolicznych *in silico* w połączeniu z technologią rekombinacyjną DNA, jak się wydaje, mogą wspomóc procesy bioremediacyjne środowisk zanieczyszczonych związkami aromatycznymi.

Literatura

1. Vaillancourt F. H., Bolin J. T., Eltis L. D., (2006), Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 41, 241-267.
2. Harwood C. S., Parales R. E., (1996), Annu. Rev. Microbiol., 50, 553-590.
3. Lendenmann U., Spain J. S., (1996), J. Bacteriol., 178, 6227-6232.
4. Williams P. A., Sayers J. R., (1994), Biodegradation, 5, 195-217.
5. Bertini I., Cremonini M. A., Ferretti S., Lozzi I., Luchinat C., Viezzoli M. S., (1996), Coordin. Chem. Rev., 151, 145-160.
6. Eby D. M., Beharry Z. M., Coulter E. D., Kurtz D. M., Neidle E. L., (2001), J. Bacteriol., 183, 109-118.
7. Karlsson A., Beharry Z. M., Eby D. M., Coulter E. D., Neidle E. L., Kurtz D. M., Eklund H., Ramaswamy S., (2002), J. Mol. Biol., 318, 261-272.
8. Wojcieszynska D., Greń I., Łabużek S., (2005), Post. Mikrobiol., 44, 63-70.
9. Moon J., Chang H., Min K. R., Kim Y., (1995), Biochem. Biophys. Res. Commun., 208, 943-949.
10. Ishiyama D., Vujaklija D., Davies J., (2004), Appl. Environ. Microbiol., 70, 1297-1306.
11. Zaborina O., Latus M., Eberspacher J., Golovleva L. A., Lingens F., (1995), J. Bacteriol., 177, 299-234.
12. Bugg T. D. H., (2003), Tetrahedron, 59, 7075-7101.
13. Fujiwara M., Golovleva L. A., Saeki Y., Nozaki M., Hayaishi O., (1975), J. Biol. Chem., 250, 4848-4855.
14. Reddig N., Pursche D., Krebs B., Rompel A., (2004), Inorg. Chim. Acta, 357, 273-271.
15. Suarez M., Ferrer E., (1996), FEMS Microbiol. Lett., 143, 89-95.
16. Harpel M. R., Lipscomb J. D., (1990), J. Biol. Chem., 265, 22187-22196.
17. Werwath J., Arfmann H. A., Pieper D. H., Timmis K. N., Wittich R. M., (1998), J. Bacteriol., 180, 4171-4176.
18. Takenaka S., Murakami S., Shinke R., Aoki K., (1998), Arch. Microbiol., 170, 132-137.
19. Gibson D. T., Parales R. E., (2000), Curr. Opin. Biotechnol., 11, 236-243.
20. Pessione E., Divari S., Griva E., Cavaletto M., Rossi G. L., Gilardi G., Giunta C., (1999), Eur. J. Biochem., 265, 549-555.
21. Ullrich R., Hofrichter M., (2007), Cell. Mol. Life Sci., 64, 271-293.
22. Mason J. R., Cammack R., (1992), Annu. Rev. Microbiol., 46, 277-305.
23. Wackett L. P., (2002), Enzym. Microb. Technol., 31, 577-587.
24. Parales R. E., Parales J. V., Gibson D. T., (1999), J. Bacteriol., 181, 1831-1837.
25. Yeates Ch., Holmes A. J., Gillings M. R., (2000), Environ. Microbiol., 2, 644-653.
26. Colbert Ch. L., Couture M. M. J., Eltis L. D., Bolin J. T., (2000), Structure, 8, 1267-1278.
27. Parales R. E., Resnick S. M., Yu C., Boyd D. R., Sharma N. D., Gibson D. T., (2000), J. Bacteriol., 182, 5495-5504.
28. Jiang H., Parales R. E., Lynch N. A., Gibson D. T., (1996), J. Bacteriol., 178, 3133-3139.
29. Parales R. E., Lee K., Resnick S. M., Jiang H., Lessner D. J., Gibson D. T., (2000), J. Bacteriol., 182, 141-149.

30. Bugg T. D. H., (2001), *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 5, 550-555.
31. Parales J. V., Parales R. E., Resnick S. M., Gibson D. T., (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 1194-1199.
32. Parales R. E., Emig M. D., Lynch N. A., Gibson D. T., (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 2337-2344.
33. Harayama S., Reikik M., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 15328-15333.
34. Vetting M. W., Ohlendorf D. H., (2000), *Structure*, 8, 429-440.
35. Meer J. R., Eggen R. I. L., Zehnder A. J. B., de Vos W. M., (1999), *J. Bacteriol.*, 173, 2425-2434.
36. Potrawfke T., Armengaud J., Wittich R. M., (2001), *J. Bacteriol.*, 183, 997-1011.
37. Briganti F., Mangani S. at all, (1998), *FEBS Lett.*, 433, 58-62.
38. Bugg T. D. H., Lin G., (2001), *Chem. Commun.*, 941-952.
39. Ohlendorf D. H., Orville A. M., Lipscomb J. D., (1994), *J. Mol. Biol.*, 244, 586-608.
40. Arunachalam U., Massey V., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 11795-11801.
41. Orville A. M., Lipscomb J. D., Ohlendorf D. H., (1997), *Biochemistry*, 36, 10052-10066.
42. Ferraroni M., Solyanikova P., Kolomytseva M. P., Scozzafava A., Golovleva L., Briganti F., (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 27646-27655.
43. Briganti F., Pessione E., Giunta C., Mazzoli R., Scozzafava A., (2000), *J. Prot. Chem.*, 19, 709-716.
44. Nakai Ch., Horiike K., Kuramitsug S., Kagamiyama H., Nozaki M., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 660-665.
45. Briganti F., Pessione E., Giuntab C., Scozzafava A., (1997), *FEBS Lett.*, 416, 61-64.
46. Bertini I., Briganti F., Mangani S., Nolting H. F., Scozzafava A., (1995), *Coordin. Chem. Rev.*, 144, 321-345.
47. Yamahara R., Ogo S., Masuda H., Watanabe Y., (2002), *J. Inorg. Biochem.*, 88, 284-294.
48. Eltis L. D., Bolin J. T., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 5930-5937.
49. Kulakov L. A., Delcroix V. A., Larkin M. J., Ksenzenko V. N. Kulakova A. N., (1998), *Microbiology*, 144, 955-963.
50. Duffner F. M., Kirchner U., Bauer M. P., Muller R., (2000), *Gene*, 256, 215-221.
51. Mampel J., Providenti M. A., Cook A., (2005), *Arch. Microbiol.*, 183, 130-139.
52. Spence E. L., Kawamukai M., Sanvoisin J., Braven H., Bugg T. D. H., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 5249-5256.
53. Bugg T. D. H., Winfield C. H. J., (1998), *Nat. Prod. Rep.*, 47, 513-530.
54. Li X., Guo M., Fan J., Tang W., Deqiang W., Ge H., Rong H., Teng M., Niu L., Liu Q., Hao Q., (2006), *Protein Sci.*, 15, 71-771.
55. Nogales J., Canales A., Jimenez-Barbero J., Garcia J. L., Diaz E., (2005), *J. Biol. Chem.*, 280, 35382-35390.
56. Vetting M. W., Wackett L. P., Que L., Lipscomb J. D., Ohlendorf D. H., (2004), *J. Bacteriol.*, 186, 1945-1958.
57. Ishidaa T., Kitab A., Mikib K., Nozakia M., Horiike K., (2002), *International Congress Series*, 1233, 213-220.
58. Que L., Ho R. Y. N., (1996), *Chem. Rev.*, 96, 2607-2624.
59. Reynolds M. F., Costas M., Ito M., Jo D. H., Tipton A. A., Whiting A. K., Que Jr. L., (2003), *J. Biol. Inorg. Chem.*, 8, 263-272.
60. Uragami Y., Senda T., Sugimoto K., Sato N., Nagarajan V., Masai E., Fukuda M., Mitsui Y., (2001), *J. Inorg. Biochem.*, 3, 269-279.
61. Shu L., Chiou Y., Orville A. M., Miller M. A. Lipscomb J. D., Que L., (1995), *Biochemistry*, 34, 6649-6659.
62. Sato N., Uragami Y., Nishizaki T., Takahashi Y., Sazaki G., Sugimoto K., Nonaka T., Masai E., Senda T., (2002), *J. Mol. Biol.*, 321, 621-636.
63. Kita A., Kita S., Fujisawa I., Inaka K., Ishida T., Horiike K., Nozaki M., Miki K., (1999), *Structure*, 7, 25-34.
64. Wilmot C. M., (2007), *Science*, 316, 379-380.
65. Kaschabek S. R., Kasberg T., Muller D., Mars A. E., Janssen D. B., Reineke W., (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 296-302.
66. Riegert U., Heiss G., Fischer P., Stolz A., (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 2849-2853.

67. Bartels I., Knackmuss H. J., Reineke W., (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, 4, 500-505.
68. Hollender J., Hopp J., Dott W., (2000), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 445-450.
69. Riegert U., Burger S., Stolz A., (2001), *J. Bacteriol.*, 183, 2322-2330.
70. Hylckama Vlieg J. E. T., Poelarends G. J., Mars A. E., Janssen D. B., (2000), *Curr. Opin. Microbiol.*, 3, 257-262.
71. Klecka G. M., Gibson D. T., (1981), *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 1159-1165.
72. Mars A. E., Kingman J., Kaschabek S. R., Reineke W., Janssen D. B., (1999), *J. Bacteriol.*, 181, 1309-1318.
73. Ohtsubo Y., Miyauchi K., Kanda K., Hatta T., Kiyohara H., Senda T., Nagata Y., Mitsui Y., Takagi M., (1999), *FEBS Lett.*, 459, 395-398.
74. Hassett D. J., Ochsner U. A., Groce S. L., Parvatiyar K., Ma J., Lipscomb J. D., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4119-4123.
75. Vaillancourt F. H., Labbe G., Rouin N. M., Fortin P. D., Eltis L. D., (2002), *J. Biol. Chem.*, 277, 2019-2027.
76. Milo R. E., Duffner F. M., Muller R., (1999), *Extremophiles*, 3, 185-190.
77. Arciero D. M., Orville A. M., Lipscomb J. D., (1985), *J. Biol. Chem.*, 260, 14035-14044.
78. Bertini I., Briganti F., Sozzafava A., (1994), *FEBS Lett.*, 343, 56-60.
79. Hatta T., Mukerjee-Dhar G., Damborsky J., Kiyohara H., Kimbara K., (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 21483-21492.
80. Que Jr. L., Widom J., Crawford R. L., (1981), *J. Biol. Chem.*, 256, 10941-10944.
81. Greń I., Guzik U., Wojcieszńska D., Łabużek S., (2008), *Biotechnologia*, (w druku).