



**Xenobiotikumokat átalakító flavoenzimek szerkezet-funkció
vizsgálata**

doktori (PhD) értekezés tézisei

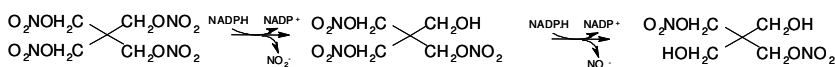
Barna Teréz Mária

Debreceni Egyetem
Természettudományi Kar
Debrecen, 2005.

Értekezés előzményei

PETN reduktáz

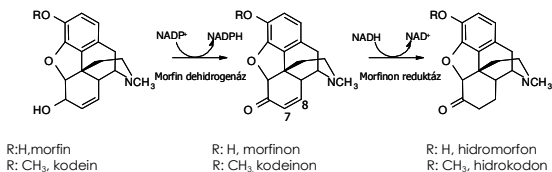
Az *Enterobacter cloacae* PB2 törzset, robbanóanyag által szennyezett talajból izolálta Binks és Bruce, felhasználva a baktérium törzs azon képességét, hogy talajból nitrát észtereket [pentaeritril-tetranitrátot (PETN): glicerín-trinitrátot [nitroglicerín, (GNT)] nitrogén forrásként hasznosít (1. ábra). Ugyancsak nitrogén forrásként képes hasznosítani az egyik legmakacsabb, a biotranszformációnak legjobban ellenálló aromás nitrovegyületet, a 2,4,6-trinitro-toluolt (TNT) is. Az *Enterobacter cloacae* PB2 törzs nitrátésztereket és aromás nitrovegyületeket lebontó képessége egyetlen flavoenzimhez rendelhető, a nikotinamid koenzim (NADPH) függő PETN redukázhoz. Sikeresen folynak a PETN redukázhoz kapcsolódó bioremediációs és fitoremediációs kísérletek. A PETN redukáz kódoló gént tartalmazó transzgenikus dohány képes csírázni és növekedni TNT-vel vagy GNT-nel szennyezett tápoldatban, szemben a vad típussal, amely elpusztult ilyen körülmények között.



1. ábra

Morfinon reduktáz

Morfion redukált (MR), opiátot termelő gyógyszergyár környékéről származó baktérium a *Pseudomonas putida* M10 termeli (Bruce et al., 1990). A baktérium a morfint és a kodeint két lépésben, két különböző enzim közreműködésével hidromorfonná és hidrokodonná alakítja át (2. ábra). A morfion és a kodeinon C7-C8 kettős kötését a NADH-függő morfion hidrogénezi, hidromorfonná és hidrokodonná alakítja.



2. ábra

A hidromorfon és hidrokodon értékes gyógyszeralapanyag. A *Pseudomonas putida* M10 tenyészetből, morfin illetve kodein alapanyagból kiinduló, kétlépéses biotranszformáción alapuló ipari méretekben történő termelés, költség meghatározó tényezője a felhasznált kétfajta nikotinamid koenzim mennyisége. Morfin dehidrogenáz működéséhez NADP^+ , míg morfinon redukázéhoz NADH szükséges. MR nagy fokú preferenciát mutat β - NADH iránt, sem a- NADH -val, sem NADPH -val nem reagál. Fehérje mérnökséggel, kívánatos lenne a morfinon redukáz koenzim speciticitását NADPH -ra változtatni, mivel a koenzim speciticitás csúrlével a kétlépéses folyamatban megvalósulna a nikotinamid koenzim újrahasznosítása.

A PETN redukáz és MR 48%-ban azonos aminosav szekvenciával rendelkezik, nagy fokú homológiát mutatva az öreg sárga enzim (ÖSE) családba tartozó több fehérjével is. A szerkezeti adatok és aktivitásuk alapján, a család tagjait úgy jellemezhetjük, hogy FMN kofaktort tartalmazó, β/α szerkezeti egységekből felépülő, nikotinamid koenzim függő oxido-redukázok. Az ÖSE homológjai elterjedtek az élővilágban, mind a baktériumokban, gombákban és a növényekben, jelenleg közel 90 ÖSE homológot ismerünk. A hasonló vázszerkezet ellenére, katalitikus aktivitásuk illetve funkciójuk igen eltérő.

A disszertáció célkitűzése

Röntgen diffrakció, klasszikus - és tranziens kinetikai valamint célzott aminosav kicserélési kísérletekben arra kerestem a választ, hogy nagy szekvencia homológiával rendelkező enzimek esetében, mint a PETN redukáz és MR, milyen faktorer befolyásolják és határozzák meg az eltérő katalitikus aktivitást és szubsztrátspecifitást. Atomos felbontású enzim-szubsztrátum - és enzim-inhibitor komplexek háromdimenziós molekula szerkezetei alapján, célul tűztam ki a PETN redukáz és MR molekuláris enzimszabályozásának a megismerését.

A PETN redukáz bioremedicós és fitoremedicós kísérletekben való részvételéhez, szükség van nagy specifitású és aktivitású enzim használatára. Hogyan magyarázható a PETN redukáz különleges nitroaromás gyűrű hidrogénezési aktivitása a flavoenzimek csoportjában? A szerkezet-funkció kapcsolatot ismerve fehérje mérnökséggel növelhető-e a PETN redukáz nitroaromás gyűrű telítési aktivitása, illetve megjósolható-e a kérdéses aktivitás eddig még nem vizsgált ÖSE homológok esetében, az aminosav sorrend ismeretében.

Mindkét enzim háromdimenziós szerkezetének felderítésével, kihasználva A MR és a PETN redukáz eltérő koenzim specifitását, célul tűztam ki a nikotinamid felismerő szerkezeti egység meghatározását.

Alkalmazott vizsgálati módszerek

A PETN redukáz és morfinon redukáz izolálása rekombináns JM109 *Escherichia coli* törzsekben történt, amelyek PETN redukáz kódoló plazmidot (pONR1) és morfinon redukáz kódoló plazmidot tartalmaztak (pMorB). A pONR és pMorB plazmid mutagenézist *Pfu* turbo DNA polimeráz tartalmazó QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit-tel (Stratagene) végeztem, a megfelelő mutációt tartalmazó szensz és antiszensz komplementer primerek felhasználásával.

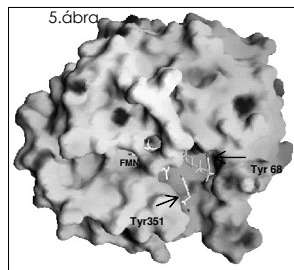
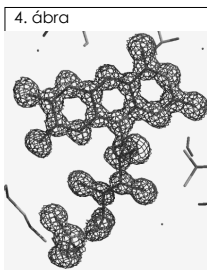
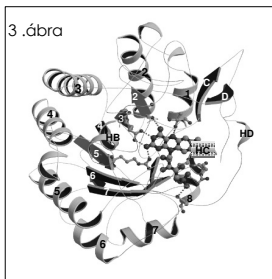
Steady-state - és tranziens kinetikai mérésekhez, redoxititrálásokhoz, ligandumkötő kísérletekhez UV-látható spektroszkópiát használtam. Gyors enzimreakciókat stopped-flow spektrofotometrián követtem, inert atmoszférában. A TNT degradáció közfitermékeinek analízise HPLC, TLC és ESI-MS mérésekkel végeztem.

PETN redukáz és MR kristályosítása gőztenzió alapuló függőcepp és ülőcepp módszerrel történt. Sugárforrásként Rigaku forgóanódos röntgensugár generátor használtam, szinkrotronsugárforrást Daresbury (Anglia) és ESRF (Franciaország) szinkrotronok szolgáltatják. Az adatfeldolgozáshoz DENZO és SCALEPACK programot, a finomításhoz CNS, CCP4 és SHELX programokat használtam. A molekulaépítést XTALVIEW programcsomag segítségével végeztem.

Az értekezés új tudományos eredményei

PETN redukáz és morfinon redukáz molekulászerkezete - TIM hordó vázszerkezet, hidrogénhid hálózattal stabilizált FMN

Nyolc ismétlődő β/α egységből felépülő TIM hordó alakzat határozza meg a PETN redukáz és MR vázát, a hordókat összekötő hurkok további alegységeket zárnak magukba, meghatározott funkcióval (3.ábra). A PETN redukáz monomer, míg a MR két TIM hordóból álló homodimer. A flavin-mononukleotid (4.ábra) a TIM hordó középpontjában, kiterjedt hidrogénhid hálózattal kötődik az őt körülvevő β -redőkhöz (3.ábra). Az FMN-kötődés hasonló hidrogénhid mintázatot követ az ÖSE család tagjaiban.



Különlegesen nagy fokú szekvencia homológia hordozója az α_3 , β_4/α_4 motívum, valamint a β_4 és α_4 egységeket összekötő rendezetlen orsó és HB hélix. Ebből a rendezetlen orsóból kerül ki az aktív centrum ligandum kötődésében részt vevő és a katalitikusan aktív aminosavak. Ennek a motívumnak α_3 és α_4 tagja az enzimek felületén helyezkedik, egyaránt szerepe lehet a TIM hordó váz kialakításában és eddig még ismeretlen fehérjéhez való kötődésben.

A harmadik hordó szuperszekunder szerkezete - nikotinamid koenzim felismerő hely

A legkisebb homológiát mutató régió a harmadik hordó kitüremkedéseként megjelenő szuperszekunder szerkezet (2.ábra): egy α/β hordó és egy antiparalel futó β -redő pár (C és D). Az antiparalel futó β -redő pár határolja az enzimek ligandum kötő csatornáját.

A PETN reduktázban szteroid ligandumok kötődése a β -redő pár két arginijében (Arg¹⁴² és Arg¹³⁰) jelentős konformációs változást idéz elő. A két arginin mobilis oldalláncának helyzete és töltése kedvezően befolyásolhatja, a NADPH nikotinamid gyűrűtől távoli adenosin-foszfat rész 2'-foszfát csoportjának kötődését, amely döntő szerepet játszik a koenzim specifitás meghatározásában. A MR β -redőjében az argininek helyén levő glutamát csoportok, elektrosztatikusan gátolják a NADPH foszfát csoportjának kötődését, viszont hidrogénhidat alkothatnak a NADH 2'-OH csoportjával. A β -redő párban a nikotinamid koenzim adenosin végének felismeréséért felelős szerkezeti egységet feltételezzük, amely a PETN reduktázban a NADPH, míg a MR-ban a NADH specifitást határozza meg. Ez a szerkezeti motívum, új a flavoenzimek körében. Az ÖSE enzim tagok nem rendelkeznek kofaktor stabilizáló egységgel, míg a multidomén flavofehérjéknél erre külön domén szakosodott.

Ligandum kötődés – flavin elektronszerkezete és aktív centrumú hisztidinek szerepe

A PETN reduktázban és MR-ban 20Å hosszú, oldószerek kitett csatornán keresztül jut a ligandum az enzimek aktív centrumába. A csatornában, két fenolos csoportjával szembe néző tirozin szabályozza a ligandum bejutását („gating mechanism”) (5.ábra).

Mind MR-ban és mind a PETN reduktázban a ligandumok a flavin sí oldalához kötődnek. A PETN reduktázban a ligandumok O-donor atomjaival [fenol származékok (pikrinsav, 2,4-DNP) fenolos oxigénjükkal, a ciklikus enonok (1-ciklohexén-2-on, 3-oxo szteroidok) karbonil oxigénjükkal] hidrogénhidat alakítanak ki az aktív centrum konzervatív hisztidinjeivel, His¹⁸¹ és His¹⁸⁴ -vel. A MR-ban, a kodeinon karbonil oxigénje hasonló hidrogénhidat létesít a konzervatív His¹⁸⁶ - és Asn¹⁸⁹-nal.

A PETN redukázban egyértékű anionok (klorid, acetát, tiocianát, azid) kötődnek a flavin izoalloxazin gyűrűjének C1-N1-O2 elektronhiányos régiója fölé. Ezen anionok kompetitív inhibitorai az enzimeknek. Redukció hatására az izoalloxazin gyűrű elektronszerkezete megváltozik, az anionok disszociálnak és rendezett víz molekula koordinálódik az említett régió fölé. Az izoalloxazin gyűrű az N5-N10 tengelymentén meghajlik, úgynevezett „lepké meghajlást” szenved az N5 sp^3 hibridállapota miatt. A redukált enzim fehérje részének szerkezete megegyezik az oxidált enzimével (6. ábra).

6. ábra

7. ábra

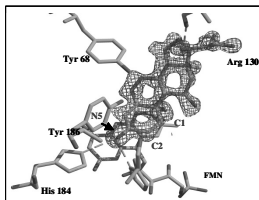
MR opiát szubsztrátspecifitásáért felelős aminosav: Cys¹⁹¹

A két enzim aktív centrumát összehasonlítva a legnagyobb eltérést a MR, Cys¹⁹¹ jelenléte okozza. Ezen a helyen az ÖSE család tagjaiban konzervatív tirozin található, így a PETN redukázban is (Tyr¹⁸⁶). Az aktív centrum ezen tirozinja putatív proton donor, ciklikus enonok kettős kötésének redukációjában. A MR-kodeinon komplex molekulaszervezetében, a cisztein oldallánc iránya és távolsága, kizárja a lehetőségét annak, hogy a szubsztrátum és a cisztein közötti proton transzfer játszódjon le (7. ábra). A C191A MR mutánsnál végzett oldattanulmányok megerősítették a szerkezeti adatokat. A C191 nem szerepel katalitikusan aktív savként, oldalláncának mégis nagy szerepe van a szubsztrátspecifitás meghatározásában. Kis térkitöltése révén lehetővé teszi a kodeinon merev, robosztus vázának kötődését az aktív centrumhoz.

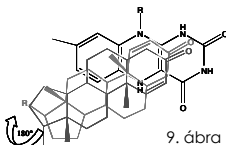
Szteroid szubsztrátum különböző geometriájú kötődése az oxidált és az aktivált enzim-komplexben – ligandum kötődés dinamikája

PETN redukáz régió specifikusan redukálja a 3-oxo-1,4-dién szteroidok (prednizon, 1,4-androsztadién-3,17-dion) C1-C2 olefin kötését. Hasonló enzimaktivitásról nem számoltak be az ÖSE család tagjainak körében.

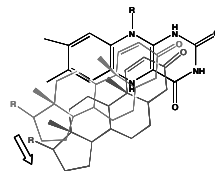
Az oxidált PETN redukáz-steroid szubsztrátum komplexben a szteroid β oldala néz szembe az izoalloxazin síj oldalával (8. ábra, 9. ábra). Ebben a geometriában a szubsztrátum redukálendő C1-C2 kettős kötése kedvezőtlen elrendezésben található, a hidridtranszfer szempontjából. Ahhoz, hogy a C1-C2 kettős kötés redukálódni tudjon, a katalitikusan aktív, két elektron redukált enzim-komplexben a szubsztrátum C1-C2 kö-



8. ábra



9. ábra



tésének a flavin N-5 atomjával fedésben kell lennie. Az optimális koordináció kialakulását két modellel értelmezhetjük a redukált enzimben: a szubsztrátum translációs mozgásával, és a szubsztrátum 180°-os fordulatával (9.ábra).

A merev szteroid váznak köszönhetően, deutérium jelölő módszer segítségével és 2D-NMR spektroszkópia alkalmazásával a kettős kötés redukciójának sztereokémiája és mechanizmusa megállapíthatóvá vált. A vizsgálat alapján, az aktivált enzim-szubsztrátum komplexben a flavin N-5 atomjáról kiinduló hidridtranszfer a szteroid „A” gyűrűjének 1 α helyzetére irányul. Az ezt követő proton transzfer, pedig a putatív proton donorról (Tyr186) a szteroid 2 β helyzetére történik. A szubsztrátum 180°-os fordulatot tesz, az oxidált komplexhez képest.

A redukált enzimben a flavin „lepke meghajlása” indukálja azt a szteroid koordinációt, amelyben a síkból kilépő N-5 és C19- β -metil csoport közötti szterikus taszítás megszűnik. A szteroid szubsztrátum-enzim komplexek vizsgálata felhívta a figyelmet a ligandum kötődés dinamikájának fontosságára az aktivált enzim-szubsztrátumok tanulmányozására. Elegendő a flavin elektronszerkezetének a megváltozása, hogy új szterikus és elektrosztatikus viszonyokat teremtsen, amelyre az alkalmas szubsztrátum produktív kötődéssel válaszol.

Nitroaromás vegyületek PETN reduktáz katalizálta redukciója

PETN reduktáz kivételes nitroaromás gyűrű hidrogénezési aktivitással rendelkezik, TNT és pikrinsav szubsztrátum esetén. Ezzel szemben a nikotinamid kofaktor függő flavoenzimek általános nitroreduktáz aktivitást mutatnak, a nitroaromás vegyületek nitrocsoportját redukálják.

Stopped-flow spektrofotometriás vizsgálatok alapján, a két elektron redukált PETN reduktáz két konzekutív hidridtranszfer lépésben alakítja át a TNT-t. Az első hidridátadás a TNT aromás gyűrűjének elektrofil C3 atomjára történik, hidrid-Meisenheimer TNT komplex képződése közben. A második hidridátadást a redukált PETN reduktáz a hidrid-Meisenheimer komplex elektrofil C5 atomján hajtja végre, dihidrid-Meisenheimer TNT komplexet képezve. A redukció azonban itt nem áll meg, gyors reakciós kinetikai vizsgálatok megerősítették, a redukált PETN reduktáz egyedülálló katalitikus aktivitását dihidro-Meisenheimer TNT komplexszel szemben. A PETN reduktáz katalizálta redukcióból idővel a dihidro-Meisenheimer komplex elfogy és nitrít ion szabadul fel.

PETN reduktáz TNT dihidrid-Meisenheimer komplex redukáló aktivitásának jelentősége abban rejlik, hogy a reakció eredményeképpen a TNT-ből nitrít ion szabadul fel. Így a PETN reduktáz termelő *Enterobacter cloacae* nitrogén forrásként képes hasznosítani a táptalajból megfelelő koncentrációban jelenlevő TNT-t. A TNT-hez hasonlóan, a pikrinsavat a redukált PETN reduktáz a nitroaromás gyűrű C5 és C5 helyzetében telíti, hidrid-Meisenheimer - és dihidrid-Meisenheimer pikrinsav komplex képződése közben.

Az aromásgyűrű hidrogénezési aktivitás szerkezeti magyarázata - aktív centrumú hisztidinek szerepe

PETN reduktáz –TNT, PETN reduktáz-pikrinsav valamint a PETN reduktáz- 2,4-dinitrofenol komplexek molekula szerkezeteiben, mindhárom nitroaromás ligandum az izoalloxazin váz pirimidin gyűrűje fölé koordinálódik. Pikrinsav szubsztrátum és 2,4-dinitrotoluol inhibitor esetén, az aromás gyűrű szubsztituenseinek irányultságát a ligandumok fenolos oxigénje és a hisztidil oldalláncok között kialakuló hidrogénkötés határozza meg, TNT kötődésekor, pedig az aromás gyűrű szubsztituensei és a hisztidil oldalláncok között fellépő szterikus kényszerek (van der Waals taszítás). Mindezen kölcsönhatások a TNT és pikrinsav elektrofil C5 illetve C3 atomját helyezik a flavin N5 atomja fölé, hidridtranszferhez kedvező elrendeződésben.

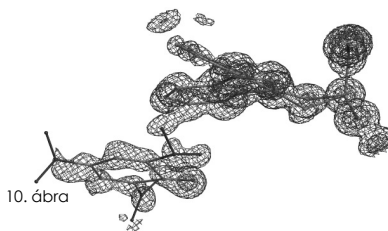
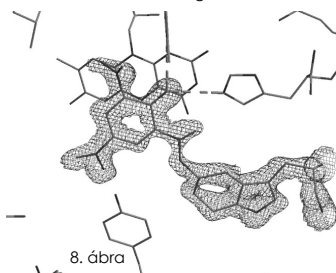
A PETN reduktáz homológjai is ÖSE, MR is képesek a TNT-t átalakítani, azonban a flavoenzimekre általánosan jellemző, nitroreduktáz aktivitással rendelkeznek. Az enzimek aktív centrumában, a flavin van der

Waals sugárnyi távolságában levő aminosavak közül, a három enzim a PETN reduktáz 184-es helyén levő hisztidinben különböznek egymástól. Itt a MR-ban Asn¹⁸⁹, az ÖSE-ben Asn¹⁹⁴ található.

A ligandum kötődésében aktív szerepet játszó His¹⁸¹ és His¹⁸⁴ aminosavakat hely-specifikus mutációval anilinre cserélve, az így előállított H181A - és H184A PETN reduktáz mutánsok katalizálta TNT degradációban, elmaradt a hidrid-Meisenheimer TNT komplex képződés. A hisztidin/alanin csere kioltotta az enzim nitroaromás gyűrű hidrogénezési aktivitását, helyette a nitrocsoport redukció volt tapasztalható. A nitroaromások aromás gyűrűjének telítéséhez pontos ligandum koordináció szükséges, olyan geometria, ahol a hidridetátadó flavin N5 és az aromás gyűrű elektrofil atomja közvetlen közelben kerülnek. Ezeket a sztérikus kényszereket mindkét hisztidin oldallánc együttes jelenléte alakítja ki az aktív centrumban. Valamelyik hisztidin oldallánc kiiktatásával, a TNT aromás gyűrűje könnyen elmozdulhat az izoalloxazin gyűrűn, így a hidridetadás nem az aromás gyűrűn, hanem a nitrocsoporton valósul meg. Ezen eredmények felhasználásával predikciós analízisre tehetünk kísérletet, azon enzimek felkutatására, amelyek az ÖSE családon belül rendelkezhetnek direkt nitroaromás gyűrű hidrogénezési aktivitással.

Trp¹⁰² szerepe nitroaromások biodegradációjában- PETN reduktáz- pikrinsav komplex molekula szerkezete szubatomos felbontásban

Az 1,5 Å felbontású PETN reduktáz pikrinsav komplex molekulaszerkezete a Trp¹⁰² oldallánc és a pikrinsav 6-os helyzetű nitrocsoportjának sajátos kölcsönhatására hívta fel a figyelmet (8. ábra). A pikrinsav-enzim komplex szubatomos felbontású szerkezete lehetővé tette, hogy az elektron sűrűség térképen láthatóvá váljanak a multikonformációban jelenlevő aminosavak, azaz a fehérje dinamikájára is felvilágosítást kaphassunk. Az 1,5 Å felbontásban látott egységes konformációjú Trp¹⁰² aminosav két konformációra hasad a 0,9 Å felbontásban (10. ábra). Mindezt azzal magyarázhatjuk, hogy a kristályban a pikrinsav részlegesen kötődik az aktív centrumhoz, 1 mól enzim csupán 0,34 mól pikrinsavat köt meg. A szubsztrátum jelenléte a triptofán oldalláncát elmozdulásra kényszeríti. Ennek megfelelően a Trp¹⁰² 34%-nál észleljük a pikrinsav-kötődés indukálta konformáció módosulást, míg a fennmaradó 66%-nál, a szabad enzimre jellemző konformációt látjuk.



A Trp¹⁰² indol gyűrűjének elmozdulása konformáció változások sorozatát indukálja oldalláncon és a fehérje főláncában. A szubsztrátum kötődés okozta konformációs változások mellett, a molekulaszerkezet rendezetlen régiói, a multikonformációban jelenlevő aminosavak is láthatóvá válnak. A leggyakrabban az α -hélixek (α_4 , α_8 és α_2) glutamát -, valin - és lizin oldalláncai valamint β -redőben és hurokban is előforduló argininek és szerinek töltenek be kevert konformációs állapotot.

Hely-specifikus mutációval előállított W102Y és W102F PETN reduktáz kinetikai és szerkezeti vizsgálata azt bizonyította, hogy az indolnál kisebb térkitöltésű oldallánccal rendelkező aminosavak szorosabb ligandum kötődést tesznek lehetővé. A W102Y PETN reduktáz aktív centrumához a szubsztrátum nemcsak

szorosabban, hanem hidridtranszfer szempontjából kedvezőbb geometriával kötődik, mint a vad típusú enzimhez. Ezt igazolja TNT szubsztrátum esetén az oxidatív-félreakcióban mért Meisenheimer-komplex képződési sebességi állandójának közel háromszorosára történő növekedése, a vad típusú enzimnél mérthez képest. Szerkezeti alapokon nyugvó célzott fehérje mérnökséggel, kisebb térkitöltésű aminosav cserével kiiktatható volt a Trp¹⁰² oldallánc, ligandum kötődést csökkentő sztérikus gátlása, ezáltal megtöbbszöröződött az enzim nitroaromás gyűrű telítési aktivitása.

Konklúzió

Nagy fokú homológiát mutató, az öreg sárga enzimek családjához tartozó enzimek, PETN reduktáz és MR reduktáz, atomos felbontású háromdimenziós molekula szerkezeteivel, az enzimszabályozás néhány fontos jellemzőjére sikerült rávilágítanunk. Fontos szerepük lehet a mobilis hurkokat meghatározó, kis homológiát mutató szekvencia régióknak családon belül. Ebből a régiókból alakulhatnak ki az evolúció során a szuperszekunder szerkezetek, amelyek specializálódhatnak például koenzim felismerő helyekké. A szubsztrátum-enzim komplexek vizsgálata felhívta a figyelmet az enzim dinamika és a ligandum kötődés dinamikájának fontosságára. Elegendő a flavin elektronszerkezetének a megváltozása, hogy új sztérikus és elektrosztatikus viszonyokat teremtsen, amelyre az alkalmas szubsztrátum produktív kötődéssel válaszol. Ugyanakkor láthattuk, hogy az aktív centrum aminosavait hidrogénhid hálózat rögzíti, ezzel meghatározva az aktív centrum geometriáját. Amikor kis geometriai változást okozó aminosavcserét hajtottunk végre, például Trp/Tyr csere esetén, akkor az aktív centrum geometriai merevségét győztük le. Ezzel, az addig, a nitroaromásokkal szemben kis aktivitást mutató enzim működése hatékonyabbá vált a kívánt mechanizmus irányába. Azonban eszenciális aminosav cserével, mint a ligandum kötést befolyásoló hisztidinek, kioltjuk az enzim addigi tevékenységét. Az öreg sárga enzim család fehérjéi biodiverzitásukat részben vázszerkezetüknek köszönhetik, hiszen néhány pont mutációval merőben megváltozik kémiai aktivitásuk és szubsztrátspecifitásuk. Ezért nem véletlen, hogy a család tagjai xenobiotikumok átalakításában vesznek részt.

Publications/A disszertáció alapját képező közlemények listája

Atomic resolution structures and solution behaviour of enzyme-substrate complexes of *Enterobacter cloacae* PB2 pentaerythritol tetranitrate reductase (2004). Khan, H. Barna, T., N. C., Scrutton, N. S. & Moody, P. C. E. *J. Biol. Chem.* 279, 30563-30572.

Crystal structure of bacterial morphinone reductase and properties of the C191A mutant enzyme (2002). Barna, T., Messiha, H. L., Petoza, C., Bruce, N. C., Scrutton, N. S. & Moody, P. C. E. *J. Biol. Chem.* 277, 30976-30983.

Kinetic and structural basis of reactivity of pentaerythritol tetranitrate reductase with NADPH, 2-cyclohexenone, nitroesters and nitroaromatic explosives (2002). Khan, H., Harris, R. J., Barna, T., Craig, D. H., Bruce, N. C., Munro, A. W., Moody, P. C. E. and Scrutton, N. S. *J. Biol. Chem.* 277, 21906-21912.

Mechanistic studies of Trp-102 mutant forms of pentaerythritol tetranitrate reductase (2002). Bruce, N. C., Barna, T., Harris, R. J., Khan, H., Moody, P. C. E. & Scrutton, N. S. In *Flavins and flavoproteins* (eds. Perham, R. N., Chapman, S. K.) 205-210.

Pentaerythritol tetranitrate reductase: reaction with NADPH, steroids, 2-cyclohexenone, nitroesters and nitroaromatic explosives (2002). Bruce, N. C., Barna, T., Khan, H., Harris, R. J., Munro, P. C. E. & Scrutton, N. S. In *Flavins and flavoproteins* (eds. Perham, R. N., Chapman, S. K.) 247-252.

Bacterial morphinone reductase: active site structure and properties of active site mutant enzymes (2002). Bruce, N. C., Messiha, H. L., Barna, T., Moody, P. C. E. & Scrutton, N. S. In *Flavins and flavoproteins* (eds. Perham, R. N., Chapman, S. K.) 287-292.

Effects of environment on flavin reactivity in morphinone reductase: analysis of enzymes displaying differential charge near the N1 and C2 carbonyl region of the active site flavin (2001). Craig, D. H., Barna, T., Moody, P. C. E., Bruce, N. C., Chapman, S. K., Munro, A. W. & Scrutton, N. S. *Biochem. J.* 359 315-323.

Crystal structure of pentaerythritol tetranitrate reductase: 'flipped' binding geometries for steroid substrates in different redox states of the enzyme (2001) Barna, T., Khan, H., Bruce, N. C., Barsukov, I., Scrutton, N. S. & Moody, P. C. E. *J. Mol. Biol.* 310 433-447.

Structure and mechanism of an explosives-degrading enzyme: PETN reductase (1999). Barna, T., Moody, P. C. E., Craig, D. H., Bruce, N. C. & Scrutton, N. S. In *Flavins and flavoproteins* (eds. Ghisla, S., Kroneck, P.,) pp. 671-674.

