



**Xenobiotikumokat átalakító flavoenzimek szerkezet-funkció
vizsgálata**

Barna Teréz Mária

Doktori (PhD) értekezés

**Debreceni Egyetem
Debrecen, 2005.**

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Biológia Doktori Iskola: „A bioreguláció molekuláris és fiziológiai szerveződése és biotechnológiai vonatkozásai” programjának keretében készítettem a Debreceni Egyetem doktori Ph.D. fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2005.

.....

a jelölt aláírása
/Barna Teréz Mária/

Tanúsítjuk, hogy doktorjelölt között a fent megnevezett doktori program keretében irányításunkkal végezte munkáját. Az értekezésben foglaltak a jelölt önálló munkáján alapulnak, az eredményekhez önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2005.

.....

a konzulens aláírása
/Dr. Kiss László/

Tartalomjegyzék

Rövidítések	4
I. Bevezetés	6
I.2. irodalmi áttekintés	9
I. 2. 1. TNT aerob lebontása	11
I. 2. 2. Anaerob baktérium	13
I. 2. 3. Fehér gyökér gombák TNT átalakítása	14
I. 2. 4. Biodegradáció transzgenikus növényekkel	14
I.2. 5. Nitroreduktázok	16
I. 2. 6. Flavinfehérjék	18
I. 2. 7. Flavoenzimek csoportosítása	22
I. 2. 8. Az Öreg Sárga Enzim család	26
II. Célkitűzések	28
III. Vizsgálati módszerek	29
IV. Új Tudományos eredmények összefoglalása	32
IV. 1. PETN reduktáz háromdimenziós molekula szerkezete	33
IV. 2. Szteroid szubsztrátum különböző geometriájú kötődése az oxidált és redukált alakú PETN reduktázhoz	38
IV. 3. Aromás nitrovegyületek (TNT és pikrinsav) PETN reduktáz katalizálta redukzív bomlásának mechanizmusa	41
IV. 3.1. TNT enzimatis redukciója	42
IV. 3.1. Pikrinsav enzimatis redukciója	45
IV. 4. Nitroaromás vegyületek kötődése	47
IV. 5. Az aktív centrumban levő hisztidinek szerepe a TNT redukció mechanizmusában	48
IV. 6. Trp102 szerepe nitroatomások kötődésében – enzimdinamika szubatomos felbontásban	50

IV. 7. Kofaktor specificitás szerkezeti értelmezése	54
PETN reduktázban és MR-ban	57
V. 8. MR szubsztrátspecificitásának szerkezeti magyarázata - Cys191 szerepe a kodeinon kötődésben	58
V. Konklúzió	59
VI. Summary	60
VII. Hivatkozások	64
VIII. Disszertáció alapját képező közlemények listája	73

RÖVIDÍTÉSEK:

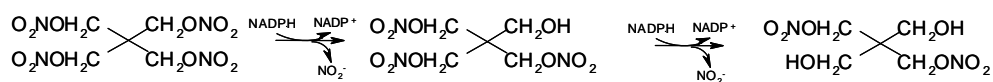
Arg	arginin
Asn	aszparagin
AZT	tetranitro-azoxi-toluol
Cys	cisztein
2,4-DNF	2,4-dinitro-fenol
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FMN	flavin-mononukleotid
GTN	glicerín-trinitrát
HADNT	hidroxilamino-dinitro-toluol
HMX	oktahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazokin (high melting explosive)
H-TNT	hidrid-Meisenheimer komplex (TNT σ adduktuma)
2H-TNT	dihidrid-Meisenheimer komplex
IPTG	isopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
kDa	1000 Dalton
<i>morB</i>	<i>Pseudomonas putida</i> M10 morfinon reduktázt kódoló gén
His	hisztidin
MR	morfinon reduktáz
NADH	nikotinamid-adenine-dinukleotid (redukált forma)
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát (redukált forma)
OBP	ösztrogén kötő fehérje
<i>onr</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> PETN reduktáz kódoló gén
ÖSE	öreg sárga enzim
PDB	Protein Data Bank

PETN	pentaeritrit-tetranitrát
RSCB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
RDX	hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (royal demolition explosive)
TAT	triamino-toluol
TIM	trióz-foszfát izomeráz
TNT	2,4,6-trinitro-toluol
Trp	triptofán
Tyr	tirozin

I. Bevezetés

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 [pentaeritrit-tetranitrátot (PETN); glicerín-trinitrátot [nitroglicerín, (GTN)] nitrogén forrásként hasznosít (Binks *et al.*, 1996). Ugyancsak nitrogén forrásként képes hasznosítani az egyik legmakacsabb, a biotranszformációnak legjobban ellenálló aromás nitrovegyületet, a 2,4,6-trinitro-toluolt (TNT) is (French *et al.*, 1998). Az *Enterobacter cloacae* PB2 törzs nitrátésztereket és aromás nitrovegyületeket lebontó képessége egyetlen flavoenzimhez rendelhető, a nikotinamid kofaktor (NADPH) függő PETN reduktázhoz (1. ábra). Sikeresen folynak a PETN reduktázhoz kapcsolódó bioremedációs és fitoremedációs kísérletek. A PETN reduktázt kódoló gént tartalmazó transzgenikus dohány képes csírázni és növekedni TNT-vel vagy GTN-nel szennyezett tápoldatban, szemben a vad típussal, amely elpusztult ilyen körülmények között (French *et al.*, 1999).

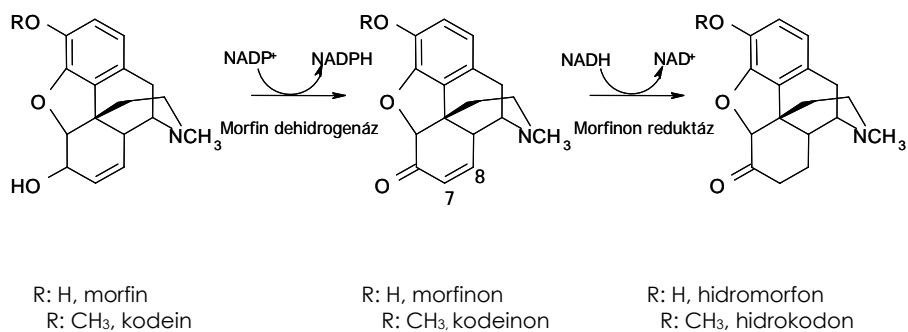


1. ábra

A PETN reduktáz, NADPH jelenlétében, a PETN-t redukálja pentaeritrit-dinitráttá, nitrit felszabadítása közben. A pentaeritrit-dinitrátot az *E. cloacae* PB2 más, eddig még nem azonosított, enzimeji oxidálják dialdehiddé (Binks *et al.*, 1996).

Morfinon reduktáz

Morfinon reduktázt (MR), opiátot termelő gyógyszergyár környékéről származó baktérium a *Pseudomonas putida* M10 termeli (Bruce *et al.*, 1990). A baktérium a morfin és a kodeint két lépésben, két különböző enzim közreműködésével hidromorfonná és hidrokodonná alakítja át (2. ábra). Az első lépésben, a NADP⁺-függő morfin dehidrogenáz oxidálja a morfin- és a kodein C6 atomján levő hidroxilcsoportot, morfinont és kodeinont eredményezve (Bruce *et al.*, 1990). A morfinon és a kodeinon C7-C8 kettős kötését a NADH-függő morfinon hidrogénezi, hidromorfonná és hidrokodonná (Hailes *et al.*, 1993).



2. ábra

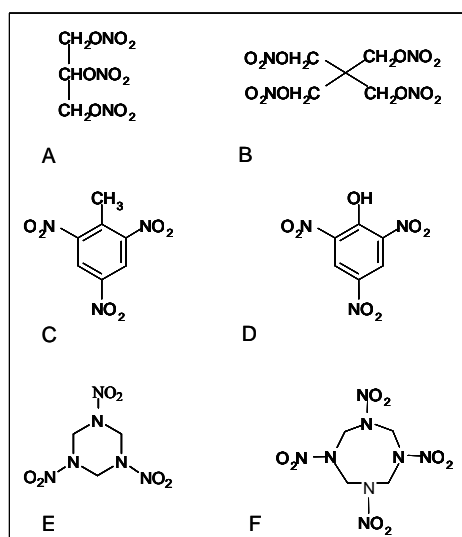
A *Pseudomonas putida* M10 kétlépéses opiát biotranszformációja

A hidromorfon és hidrokodon értékes gyógyszeralapanyag. A hidromorfon hétszerte erősebb fájdalom csillapító hatású mint a morfin, a kodeinon

pedig köhögés csillapító (Melmon *et al.*, 1972. Gazdaságos előállításukat élénk ipari érdeklődés kíséri. 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 reduktázéhoz NADH szükséges. MR nagy fokú preferenciát mutat β -NADH iránt, sem α -NADH-val, sem NADPH-val nem reagál (Craig *et al.*, 1998). Kívánatos lenne, fehérje mérnökséggel, a morfinon reduktáz koenzim specificitását NADPH-ra változtatni. Ekkor elérhetnénk, hogy az első reakcióban, a morfin dehidrogenáz által termelt NADPH-t, a morfinon reduktáz közvetlenül felhasználhatná. A morfinon reduktáz által termelt NADP⁺-t, pedig *vice versa*, közvetlenül a morfinon dehidrogenáz hasznosíthatná. A kofaktor specificitás cseréjével a kétlépéses folyamatban megvalósulna a nikotinamid koenzim újrahasznosítása. Ehhez azonban elengedhetetlen az enzim szerkezetének ismerete és a koenzim specificitásáért felelős szerkezeti egység azonosítása.

I. 2. Irodalmi áttekintés

Az elmúlt évszázadban, a hadianyaggyárak termelése, a robbanóanyagok használata és megsemmisítése széleskörű környezetszennyezéshez vezetett, egyaránt veszélyt jelentve az emberi egészségre és a mikrobás életre (Hannink *et al.*, 2001; Tamalge *et al.*, 1999). A három nagy vegyület csoporthoz a nitrát észterekhez, nitrocsoporttal többszörösen szubsztituált aromás vegyületekhez és ciklikus nitraminokhoz tartozó robbanó anyagok a xenobiotikumok közé sorolhatók (3. ábra). Ezek közül is a biotranszformációnak legjobban ellenálló robbanóanyag a TNT.



3. ábra

A három fő vegyület csoportba tartozó robbanó anyagok A: pentaeritrit-tetranitrát (PETN); B: glicerin-trinitrát ([GTN; (nitroglicerint)], C: 2,4,6-trinitro-toluol (TNT); D: 2,4,6-trinitro-fenol (pikrinsav); E: hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin [RDX; (Royal Demolition Explosive)] F: oktahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazokin (HMX; (High Melting Explosive)). A PETN, GTN, TNT, pikrinsav és RDX az *Enterobacter cloacae* PETN redukáz szubsztátumai (Binks *et al.*, 1996; French *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2001).

Szintetikus kemikáliák közül, xenobiotikumoknak nevezzük azon vegyületeket, amelyek szubsztitúciós csoport számában, szerkezetében és szterikus elrendeződésében különböznek a természetben előforduló vegyületektől. Xenofor csoportoknak tekinthetők a halogén, azo és nitro szubsztituensek. Evolúciós léptékkal mérve a xenobiotikumok jelenléte rövid a bioszférában, ezért biodegradációnak ellenállnak, azaz rekalcitrátként viselkednek (Spain, *et al.*, 1995; Esteve-Nunez *et al.*, 2001). A biológiában csak a nagy katabolikus potenciállal rendelkező mikroorganizmusok fejleszthették ki új lebontási útvonalakat, amelyekkel a xenobiotikumokat nitrogén és szénforrásként hasznosíthatják (Perec *et al.*, 2000; Parales *et al.*, 2002).

Eddig ipari méretekben is használt eredményes eljárás a robbanóanyaggal szennyezett talaj megsemmisítésére az incineráció, a szennyezett talaj elégetése. Az incineráció alkalmazásakor két nagy problémával szembesülünk. A tökéletlen égés során kiszabaduló gázok növelik az üvegházhatást, valamint az égetés mellékterméke toxikus hamu (Kalafut *et al.*, 1998; Snellinx *et al.*, 2002). Az incineráció nagy költsége és újabb veszélyes hulladékot termelő volta környezetkimélő eljárások kifejlesztését és alkalmazását sürgeti, mint például a bioremedicció és fitoremedicció (Parales *et al.*, 2002; Hannink *et al.*, 2001).

Dolgozatom egyik felében az aromás, nitrocsoporthal többszörösen szubsztituált xenobiotikum, a TNT biotranszformációját vizsgáltam PETN

reduktáz jelenlétében. A következő rövid fejezet betekintést enged különböző mikroorganizmusok TNT-t átalakító stratégiájára.

I. 2. 1. TNT aerob lebontása

Az aerob mikroorganizmusok meghatározó mechanizmusa, hogy a szénhidrogéneket oxidatív módon, kezdeti hidroxilációval aktiválnak (Gunsalus, *et al.*, 1975). Ez a reakcióút azonban nem működik, ha a xenobiotikum elektronvonzó szubsztituenst, például nitrocsoportot tartalmaz. Az elektronvonzó csoport viszonylag magas redoxi potenciált indukál, érzékennyé téve a vegyületet nukleofil támadásra és ellenállóvá oxidációval szemben. Az aerob mikroorganizmusok is rendelkeznek aromás nitrovegyületet aktiváló redukciós mechanizmussal. Ennek kezdeti lépése az aromás gyűrű nitrocsoportjának hidroxilaminná történő átalakítása (Nishino *et al.*, 2000).

A részleges redukciót az egyszerűen nitrocsoporttal szubsztituált aromás vegyületek a nitro-benzol esetében a hidroxilamin származék Bamberger típusú átrendeződése követ aminos-fenol származékká, amelyet a mono- és dioxigenázok már képesek lebontani (Nishino *et al.*, 1993).

A nitrocsoporttal többszörösen szubsztituált aromás vegyületeknél így a TNT esetén, az aerob baktériumok részleges redukciós mechanizmusában, a xenobiotikum egy vagy két nitrocsoportját redukálják hidroxilaminná és ezt követően aminocsoporttá (Nishino *et al.*, 2000).

Az aerob baktériumok a hidroxilamino- és amino-dinitrotoluol vagy diamino-nitrotoluol származékok további lebontására általában nem

képesek. A részleges redukzív metabolizmus termékei felhalmozódnak és egymással reagálnak. A nitrózó- és hidroxilamino-toluol származékok kondenzációs reakciója azoxi-vegyületet, tetranitro-azoxi-toluolt (AZT) eredményez (Wang *et al.*, 2000), amelynek toxicitása és mutagén hatása erősebb, mint magának a TNT-nek (Honeycutt *et al.*, 1996). A termékek számát tovább növeli, hogy oxigén jelenlétében az aminohidroxil-toluol származékok könnyen polimerizálódnak (Wang *et al.*, 2000). Az 1. táblázatban néhány TNT-t átalakítani képes aerob baktérium törzset foglaltam össze.

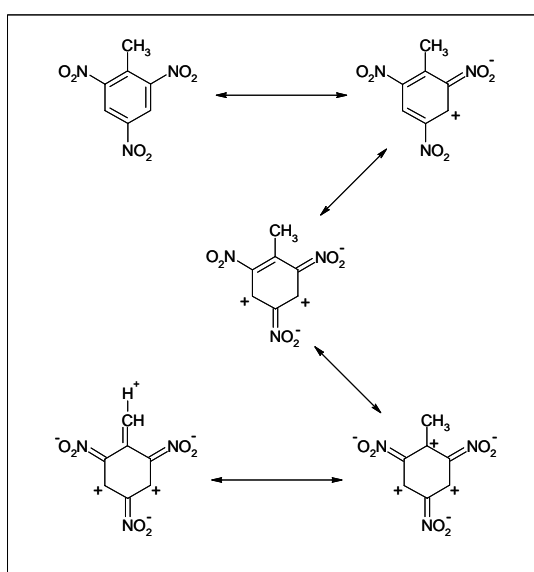
Mikroorganizmus	Enzim	Hivatkozás
<i>Enterobacter cloacae</i>	NAD(P)H nitroreduktáz	Nivinskas <i>et al.</i> , 2000
<i>P. putida</i> II-B	Xenobiotic reduktáz A	Blehert <i>et al.</i> , 1999
<i>P. aeruginosa</i> strain MX		Oh <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas</i> sp. JLR11		Esteve-Nunez <i>et al.</i> , 2000
<i>P. pseudoalcaligenes</i> JS52		Fiorella <i>et al.</i> , 1997

1. táblázat

A TNT-t nitrocsoport redukcióval átalakító baktérium törzsek és (ahol ismert) a lebontásért felelős enzimek

A TNT lebontásában a mikroorganizmusok körében bizonyítottan mindössze három gramm pozitív baktérium törzs esetében említenek, a nitrocsoport redukciótól eltérő mechanizmust: az aromás gyűrűn megvalósuló hidridaddíciót (French *et al.*, 1998; Vorbeck *et al.*; 1998 Pak *et al.*, 2000). A nitrocsoportok induktív – és mezomer effektusának

következtében az aromás gyűrű C-3 és C-5 atomjai érzékennyé válnak nukleofil támadásra (9. ábra). A mikroorganizmusok enzimei által katalizált C-3 és C-5 helyeken megvalósuló hidridaddícióban, a TNT-t átalakítják hidrid-Meisenheimer (H-TNT) és dihidrid-Meisenheimer (2H-TNT) komplexekké.



4. ábra

A TNT rezonancia stabilizált határszerkezetei

I. 2. 2. Anaerob baktérium

Az anaerob mikroorganizmusok, mint a *Clostridium* (Lewis *et al.*, 1996;), a *Desulfovibrio* (Preuss *et al.*, 1993; Boophy, R. *et al.*, 1992) és a *Veillonella alcalescens* (McCormick *et al.*, 1976) törzsek képesek a nitrocsoporttal többszörösen szubsztituált aromás vegyületek nitrocsoportjait konszekutív lépéseken keresztül aminocsoportokká alakítani (1. táblázat). A reakciósebesség a nitrocsoport aminocsoportra történő cseréjével

fokozatosan csökken, mivel az aminocsoport elektrondonáló karaktere gyengíti az aromás gyűrű elektronhiányát. Az összes nitro/aminocsoport csere szigorú anaerob körülményt igényel. Az anaerob transzformáció végterméke 2,4,6-trinitro-toluol esetén, 2,4,6-triamino-toluol (TAT) (McCormick *et al.*, 1976; Preuss *et al.*, 1993). A TAT reaktív oxigén jelenlétében, könnyen autoxidációt szenved és polimerizálódik. A talajban képződött TAT-polimer irreverzibilisen kötődik a talajmátrixhoz, ezt kihasználva bioremedációs kísérletekben először szigorú anaerob majd aerob biokezelés kombinációjának vetik alá a TNT-vel szennyezett talajt (Funk *et al.*, 1993; Daun *et al.*, 1998; Lenke *et al.*, 1998).

I. 2. 3. Fehér gyökér gombák TNT átalakítása

A nitroaromás vegyületek, így a TNT, gombákkal történő biotranszformációjának lépéseiről egy fehér gyökér gomba, a *Phanerochaete chrysosporium* (Stahl *et al.*, 1993a; 1995; Michels *et al.*, 1995) esetén közöltek részletes adatokat. A *Phanerochaete chrysosporium*, hasonlóan az aerob baktériumok többségéhez, TNT lebontó mechanizmusában kezdeti lépésként a részleges redukciós utat követi. A TNT-t a plazmamembrán redox rendszere redukálja hidroxilamino-dinitro-toluol intermedieren keresztül amino-dinitrotoluol származékká (Stahl *et al.*, 1993b). Bármilyen hatás, amely megsérti a plazmamembránt, egyúttal megszünteti a gomba redukciós aktivitását is. A TNT metabolizmus következő, egyedi lépése a 4-amino-2,6-dinitrotoluol amino csoportjának formilezése 4-formamido-2,6-DNT képződése közben (Michels *et al.*, 1995). Formilezésre egyrészt azért van szükség, hogy megakadályozza a további szabálytalan oxidációt, másrészt, a formilezett nitro-toluol származék aktiválja a gomba lignin peroxidáz rendszerét (Michels *et al.*, 1995).

I. 2. 4. Biodegradáció transzgenikus növényekkel

Mikroorganizmusok új katabolikus útvonalainak kifejlesztése lerövidíthető laboratórium körülmények között, szelekciós nyomásra. Néhány esetben a lebontás mechanizmusát megfejtették, a felelős géneket szekvenálták és klónozták. Számtalan kísérlet mérte a bioaugmentáció hatásosságát (Hoepfel *et al.*, 1994), a laboratóriumi körülmények között hatásosan működő biomassza szennyezett helyre juttatása, azonban többnyire nem hozott megfelelő eredményt. Egyrészt azért, mert a limitált tápanyagért folyó versenyben az ott már egyensúlyban élő mikroflóra lett a győztes, a kívülről bevitt biomassza mennyisége pedig rohamosan csökkent. Másrészt, szennyeződések lebontása során keletkező köztitermékek toxikusak a biomasszára. Sokszor, pedig toxikus anyagok bevitelére van szükség, hogy indukálható legyen a lebontás (Hooker, *et al.*, 1999). Az indukció toxikus anyagok bevitelével is megoldható lenne génmanipulált baktériumok használatával, azonban a jelenlegi törvények nem engedik a génmanipulált baktériumok környezetbe juttatását.

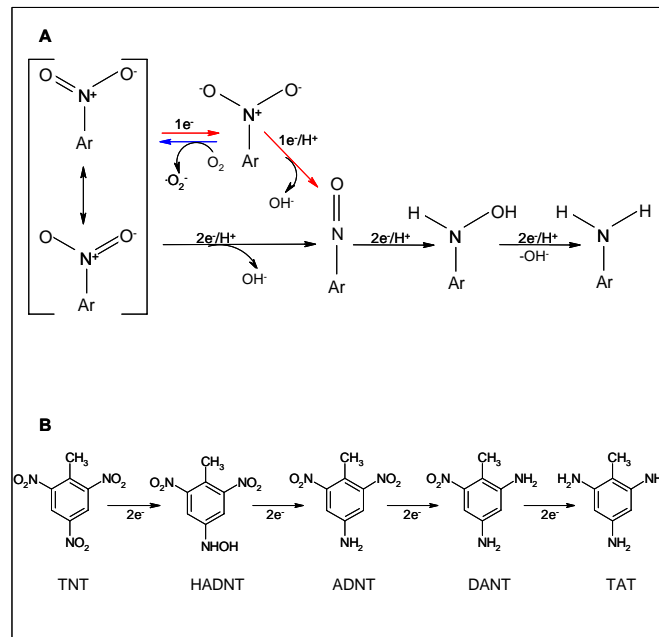
Mindezen nehézségeket legyőzendő fordulnak a kutatók olyan zöld növények *in situ* használatához, amelyek hatásosan vehetnek részt a xenobiotikumok lebontásában (Susarla *et al.*, 2002). A fitoremedáció előnye, hogy a növények nagy mennyiségben termelhetők adott területen, ott könnyen összegyűjthetők és megsemmisíthetők. Hátránya pedig az, hogy a növények biodegradációs hatékonysága elmarad a baktériumokétól és gombákétól. A lebontási képességet növelendő próbálkoznak a kutatók génmanipulált növények előállításával, amelyek xenobiotikumok lebontásáért felelős baktérium géneket hordoznak.

Az általam vizsgált enzimet, az *Enterobacter cloacae* PB2 talajbaktérium által termelt enzim, a PETN reduktáz kódoló génjét Prof. Bruce és laboratóriumában sikerült dohányba klónoznia (French, 1999). A transzgenikus dohány, amely PETN reduktáz enzimet termelt, csírázni és

növekedni tudott 0.05mM TNT és 1mM GTN jelenlétében, szemben a vad típussal, amely elpusztult ilyen körülmények között. A transzgenikus dohányban a PETN reduktáz intracellulárisan fejeződik ki, a PETN reduktáz expressziós szintje 0.2%, a teljes oldható sejt fehérjéhez képest. Újabban a xenobiotikumok lebontásáért felelős géneket fákba helyezik, a fa gyökérrendszere a talaj mély rétegeiből is képes „kiszűrni” ezen anyagokat és kometabolizmusban együttműködni a jelen levő mikroorganizmusokkal (Vanderford *et al.*, 1997; Hughes *et al.*, 1997).

I. 2. 5. Nitroreduktázok

Prokariótákban és eukariótákban, nitroaromás vegyületek átalakításáért nitroreduktázok felelősek (5. ábra). A nitroreduktázok két nagy csoportját különböztetjük meg: oxigénre érzékeny, I-es típusú és oxigénre nem érzékeny II-es típusú nitroreduktázokat.



5. ábra

Oxigén érzékeny, II-es típusú (A) nitroreduktázok és oxigénre nem érzékeny I-es típusú (B) nitroreduktázok aromás nitrovegyületeket átalakító mechanizmusa

Az oxigénre érzékeny nitroreduktázok vagy II-es típusú nitroreduktázok, a nitrocsoport egyelektronos redukcióját katalizálják nitroanion gyökké. A nitroanion gyök molekuláris oxigénnel reagálva visszaalakul nitrocsoporttá miközben szuperoxidanion gyök keletkezik. A nitrocsoport átalakítása szempontjából eredménytelen ciklus alakul ki, amelyben nagy mennyiségű szuperoxidanion gyök szabadul fel, oxidatív stresszet idézve elő (Koder *et al.*, 2002). A II-es típusú nitroreduktáz aktivitással rendelkező eukarióta enzimrendszerek a NADPH-citokróm P450 oxidoreduktáz, a NAD(P)H függő citokróm b₅ oxidoreduktáz, xantin dehidrogenáz és xantin oxidáz, glutation reduktáz és szukcinát dehidrogenáz (Bryant *et al.*, 1991a). Keveset tudunk a prokarióta II-es típusú nitroreduktázokról, ez ideig az *Escherichia coli*-ből és a *Clostridium perfringens*-ből izolált II-es típusú nitroreduktázokról számoltak be (Peterson *et al.*, 1979; Rafii *et al.*, 1993).

Az oxigénre nem érzékeny I-es típusú tartozó nitroreduktázok, a nitroaromás vegyületek nitrocsoportjának kételektronos, konszekutív lépésekben történő redukcióját katalizálják nitrozó és hidroxilamin származékokon keresztül aminná (2.ábra). Oxigénre nem érzékeny nitroreduktáz aktivitással rendelkezik az *Enterobacter cloacae* - (Byrant *et al.*, 1991b; Haynes *et al.*, 2002) az *E. coli* B - (Anlezark *et al.*, 1991) és a *Salmonella typhimurium* - (Watanabe *et al.*, 1989; Nokhbeh *et al.*, 2002) és *Comamonas acidovorans* törzsekből izolált nitroreduktázok.

Az *E. Coli*-, a *Salmonella typhimurium*- és az *Enterobacter* nitroreduktázok között nagy a szekvencia homológia, mind a három enzim egy 24kD-os FMN-t tartalmazó doménből épül föl (Briant, *et al.*, 1991c). Jól inhibíálhatók dikumerollal és jódbenzooesavval. A dikumerol, a menadion redukálnak és a NAD(P)H:kinon oxidoreduktálnak (korábbi nevén DT-diaforáznak) specifikus inhibitora (Cenas *et al.*, 2001). Az inhibíciós eredményekből arra következtethetünk, hogy ezen enzimek, *in vivo* kinon redukálóként működnek. Ezzel szemben a *Pseudomonas* nitroreduktáz és *Comamonas* nitroreduktáz expressziója indukálható nitrovegyületekkel, ezért ezek specifikus nitroreduktázok tekinthetők, amelyek közöttük homológia nincsen.

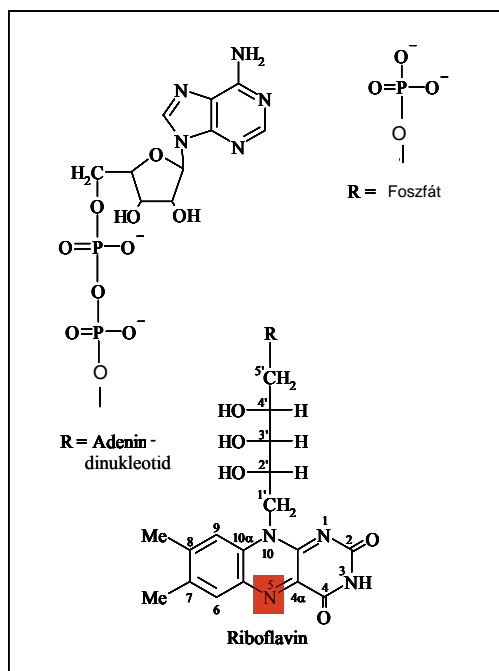
Eukarióta rendszerek közül csupán a NAD(P)H:kinon oxidoreduktáz (Cenas *et al.*, 2001) és xantin dehidrogenáz rendelkezik oxigénre nem érzékeny nitroreduktáz aktivitással (Bryant *et al.*, 1991a).

Mind az I-es és mind a II-es típusú nitroreduktáz aktivitással bíró enzim(rendszer)ek közös tulajdonsága, hogy valamennyi elektrondonorként nikotinamid koenzimet felhasználó flavoenzimek. Általában, a nitroreduktáz aktivitást mutató flavoenzimeknek más a fiziológiai funkciója, erre a legjobb példa az eukarióta metabolikus flavoenzimek csoportja. Nem meglepő, hogy maga a szabad redukált flavin is képes aromás vegyületek nitrocsoportjának redukciójára.

I. 2. 6. Flavinfehérjék

A biológiai oxidációkban felszabaduló elektronokat a fehérjék nem képesek tárolni és közvetíteni, mindezen funkciókat a kofaktorok, koenzimek és prosztetikus csoportok közreműködésével végzik. A koenzimek az enzimkatalízis során átmenetileg hozzákapcsolódnak az enzimhez és egy másik enzim által regenerálódnak. Nikotinamid származékok, a NADPH és a NADH tipikus koenzimeknek tekinthetők. A kofaktorok, ellenben, az enzimátikus reakcióban az enzimhez végig kötve maradnak. Ha ez a kötés az enzim és a kofaktor között kovalens és egyúttal a kofaktort nehéz eltávolítani az enzimtől oly módon, hogy az apoprotein ne sérüljön, akkor prosztetikus csoportról beszélünk. A leggyakoribb elektronátadásban részt vevő kofaktorok: hem és flavin.

Elsőként azonosították és határozták meg a számos enzim működéséhez elengedhetetlen riboflavin szerkezetét, funkcióját és nevezték el B₂ vitaminnak (Kuhn, *et al.* 1937). A riboflavin származékai a flavin koenzimek. A flavin koenzimeket az izoalloxazin gyűrű, valamint az izoalloxazin gyűrű 10-es nitrogénjéhez kapcsolódó ribitil-lánc alkot. Attól függően, hogy milyen csoport kapcsolódik a ribitil-lánc 5'-szénéhez, foszfát csoport esetén flavin- mononukleotid (FMN, a riboflavin foszfátésztere), adenin-dinukleotid kötődésekor pedig flavin-adenin-dinukleotidot (FAD, adenin difoszfáttal képzett észtere) különböztetünk meg (6.ábra). A flavin kofaktor mindkét formája kovalensen és másodlagos kölcsönhatásokon keresztül is kötődhet a fehérjéhez. Kovalens kölcsönhatásban, a flavin a fehérjelánchoz, az izoalloxazin gyűrű C-8 metil csoportján, illetve a gyűrű C-6-os csoportján keresztül kapcsolódhat (Mewies *et al.*, 1998; Decker, 1991).

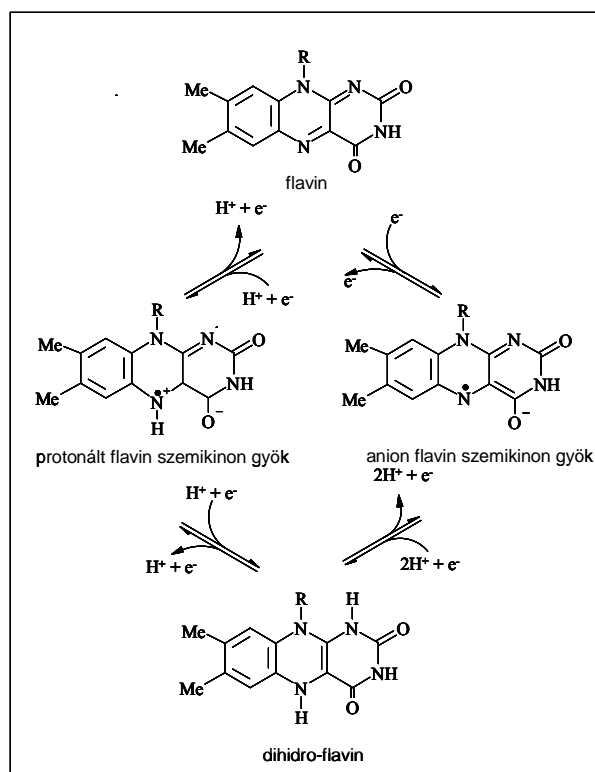


6. ábra

A flavin kofaktor szerkezete, piros színnel kiemelve az izoalloxazin gyűrű N-5 atomját, amely közvetlenül érintett az elektronok átadásában

A flavoenzimek egyik jellemzője, a redoxreakciók sokszínűsége, amelyet katalizálnak, a dehidrogénezéstől, az elektrontranszporton keresztül a molekuláris oxigén aktiválásáig és sérült DNS javító funkcióig (Massey, 2000). A flavoenzimek kivételesen gazdag kémiai aktivitását, elsősorban az izoalloxazin gyűrű szerkezetének köszönhetik (Fitzpatrick, 2001).

A flavin kofaktor három lehetséges redoxformában fordul elő: a rezonancia stabilizált oxidált flavin (Fl_{ox}), az egy elektron redukált flavin szemikion gyök ($\text{FlH}\cdot$) és a két elektron redukált dihidro-flavin (Fl_{redH}) (ábra). Ennek megfelelően elektron -, hidrogén atom- és hidridtranszferre képesek (Dreyer, 1984; Fitzpatrick, 2001) (7. ábra).



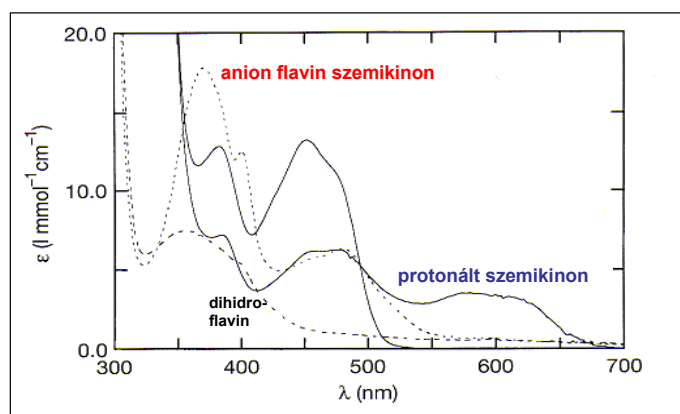
7.ábra

A flavin lehetséges redoxállapotai

A flavofehérjék a légzési láncban egy- és két-elektronos redoxreakciók között közvetítenek. A légzési láncban szerves szubsztrátumot oxidálnak két-elektronos lépésben, a tárolt elektronokat pedig egy-elektronos lépésben adják át elektron akceptoroknak, fém ion centrumnak vagy citokrómnak (Palfey *et al.*, 1998). A különböző redoxállapotokban történő változás legfőképpen az izoalloxazin gyűrű "éndiamin" alcsoportját érinti N(1), N(5) és C4(a) atomokat. Redoxformák változatosságán túlmenően a flavin amfoter molekula, mind a három redoxállapotában kationos, semleges és anionos alakban is előfordul. Fiziológiás körülmények között azonban csak a semleges és anionos alakokkal kell számolnunk.

A „sok színűség” a flavoenzimek optikai spektrumát tekintve is igaz. Különböző redoxállapotaiban sajátos elektron elnyelési spektrummal

rendelkeznek, amely lehetővé teszi a katalitikus folyamat redoxi változásának nyomon követését. A flavin oxidált formájának elnyelési maximuma 400 és 500nm között van (7. ábra). A két elektront felvevő redukált flavinban a konjugált elektronrendszer megszűnésével a látható spektrum elnyelési sávjai is megszűnnek. A flavin szemikínon gyök anionos és semleges alakja spektrálisan is elkülöníthető. Míg az anionos alak 370nm-en addig a semleges vagy protonált alak 580 és 620 nm között rendelkezik széles elnyelési sávval (8. ábra).



8. ábra

A különböző redoxállapotú flavin UV-látható spektruma

A szabad flavin hetes pH-jú egyensúlyi oldatában, az oxidált flavin (Fl_{ox}) mellett 5% flavin szemikínon gyök ($FlH\cdot$) fordul elő. A szabad $Fl_{ox}/FlH\cdot$ pár redoxpotenciálja 240mV, a szabad $FlH\cdot/Fl_{red}H^+$ pár redoxpotenciálja -172mV (Muller *et al.*, 1983). Ha a flavin fehérjéhez kötődik, akkor a redoxpárok redoxpotenciálja 600mV széles tartományban csökkenhet vagy növekedhet a fehérjével való kölcsönhatás eredményeként. Két szélsőséges esetben, a tiamin dehidrogenázban a $Fl_{ox}/FlH\cdot$ pár redoxpotenciálja +80 mV-ra nő, az *Azobakter vivelandii* flavodoxinban $Fl_{ox}/FlH\cdot$ pár redoxpotenciálja pedig -495mV-ra csökken (Massey, *et al.*,

1980). A szabad flavinhoz képest a fehérjéhez kötött flavin redoxpotenciáljának megváltozása azt jelenti, hogy a fehérje képes a flavin különböző redoxállapotait stabilizálni. A szemikinon gyök stabilizációja megnyilvánul az $\text{FlH}\cdot / \text{Fl}_{\text{red}}\text{H}^-$ pár redoxpotenciáljának pozitívabbá válásában.

A fehérjelánc számos faktoron keresztül módosítja a flavin reaktivitását, elsősorban szabályozza az izoalloxazin gyűrű hozzáférhetőségét. A flavoenzimek többségében az izoalloxazin gyűrű hidrofób aktív centrumban van beágyazva. Ezáltal oldószertől elzárt környezetet biztosít oly módon, hogy az izoalloxazin váz xilén gyűrűjét hidrofób aminosavakkal, míg a poláros gyűrűit (pirimidin, pirazin) poláros csoportokkal veszi körbe. A flavin közvetlen környezetében levő fehérjelánc, hidrogénkötéseket alakít ki az izoalloxazin gyűrűvel. A fehérje ezen specifikus hidrogénhidak révén, képes stabilizálni a flavin különböző redoxformáit "modulálva" az enzim redoxpotenciálját az enzim katalízis kívánt értékére, így belyásolva az enzim reaktivitását (Muller *et al.*, 1983; Ghisla *et al.*, 1989).

I. 2. 7. Flavoenzimek csoportosítása

Mai napig általánosan elfogadott flavofehérjék osztályozási rendszerét Massey és Hemmerick állította fel 1980-ban (Massey *et al.*, 1980). A flavofehérjéket reaktivitásuk alapján öt főcsoportra osztották fel: transzhidrogenázokra, dehidrogenáz/oxidázokra, dehidrogenáz/oxigenázokra, dehidrogenáz/elektrontranszferázokra és elektrontranszferázokra. A transzhidrogenázokat, további alcsoportra sorolták be annak megfelelően, hogy milyen hidrogén-donor és hidrogén-akceptor között katalizálják a hidrogén transzferet. Megkülönböztetünk szén-szén, szén-kén, szén-nitrogén és nitrogén-nitrogén transzhidrogenázokat.

Ennek az osztályozási rendszernek nagy előnye, hogy ugyanolyan típusú katalizált reakció esetén is különbséget tud tenni a különböző mechanizmus szerint működő flavofehérjék között. Erre a legjobb példa a dehidrogenáz/oxidáz és dehidrogenáz/elektrontranszferáz flavoenzimek, amelyek, a szubsztrátum dehidrogenezését katalizálják. Ugyanakkor a katalitikus ciklus zárása, azaz a flavofehérje regenerációja különböző mechanizmus szerint játszódik le. A dehidrogenáz/elektrontranszferázoknál a nikotinamid koenzim vagy hem-fehérje, míg a dehidrogenáz/oxidázoknál a molekuláris oxigén regenerálja a flavoenzimet.

A flavodehidrogenázok működésének egyik alap kérdése, hogyan történik a szubsztrátum-hidrogén kötés hasadása és az elektronoknak a flavinra kerülése. Kémiai modell tanulmányok igazolták, hogy a nikotinamid koenzim és a flavoenzimek reakciójában, a nikotinamid gyűrű C-4 helyzetéről a két elektron közvetlen hidridtranszferen keresztül kerül a flavin N-5 atomjára (Massey *et al.*, 1980). Azon szubsztrátumok esetén, ahol az oxidálendő csoport mellett elektronvonzó szubsztituens található, mint például, az α -hidroxil savakban, ott karbanion mechanizmus szerint játszódik le az elektrontranszfer (Ghisla *et al.*, 1989). A karbanionos mechanizmusban a szubsztrátum deprotonálódását követően az így kialakult karbanion intéz nukleofil támadást a flavin N5 atomjára és azzal alkot átmeneti kovalens adduktumot (Ghisla *et al.*, 1989).

A dehidrogenáz/oxigenázok más néven flavofehérje monooxygenázok, a molekuláris oxigén egy atomjának beépülését katalizálják a szubsztrátumba. A flavoenzim, C4a-peroxi-flavin származék képzése közben aktiválja a molekuláris oxigént (Walsh, 1980). A képződött flavin-peroxid amfoter jellegű köztitermék. Protonált formája, a C4a-hidrogénperoxi-flavin (C4a-FLOOH), elektrofil karakterű, könnyen reagál nukleofil szubsztrátumokkal, katalizálva a második hidroxil csoport beépülését fenol- α -hidroxilázokba (Entsch *et al.*, 1976) valamint aminok,

szulfidok oxidációját N-oxidokká és S-oxidokká emlős oxigenázokban (Beatty *et al.*, 1981).

Ugyanakkor a flavin C4a-peroxi-flavin anion, amely a hidrogénperoxi-flavin részecskét megelőzően keletkezik a flavin és molekuláris oxigén reakciójában, nukleofil természetű. A baktériális luciferázokban, a C4a-peroxi-flavin anion támadja meg a hosszú láncú aldehidek karbonil csoportját (Macheroux P.,1993). Ha szubsztrátum nincs jelen, akkor a bakteriális C4a-peroxi komplex stabilitása olyan nagy, hogy alacsony hőmérsékleten izolálható (Ghisla *et al.*, 1989).

Szabályszerűség figyelhető meg a különböző osztályba tartozó enzimek és az enzimek flavin szemikínon gyök stabilizáló képessége között. A transzhydrogenázok nem rendelkeznek stabil flavin szemikínon gyökkel, a redoxreakciók két elektron átadásával történnek. A második osztályba tartozó enzimek, a dehidrogenáz/oxidázok stabilizálják a piros anion flavin szemikínon gyököt. Piros anion flavinszemikínon gyök rezonancia stabilizált állapotaiban a pirimidin gyűrű N1-C2-O régiójában negatív töltés lokalizálódik. A fehérje burok stabilizálhatja ezt a formát úgy, hogy a flavin ezen régióját pozitív oldalláncú aminosavak veszik körül. A 4. és 5. osztályba tartozó enzimek, amelyek az egy- elektronos elektrontranszfer reakciókat katalizálnak, a kék, semleges flavin szemikínon gyököt stabilizálják. Ezekben az enzimekben az izoalloxazingyűrű N-5 atomját hidrogénkötés rögzíti a fehérjéhez (Ghisla *et al.*, 1986).

Ebből a rövid összefoglalóból is kiderült, hogy az izoalloxazin váz a flavoenzimek katalitikus „motorja”. Az izoalloxazin váznak kitüntetett helye a pirazin és pirimidin gyűrű, azon belül is az N-5 atom, amely az elektron, a hidrid vagy a karbanion transzferben közvetlen rész vesz. A molekuláris oxigén aktiválásban pedig, a C4a atom játssza a főszerepet.

Massey and Hemmerich meghatározása szerint, a PETN reduktáz és a MR a szén-szén transzhydrogenáz flavoenzimek csoportjába tartoznak, az

enzimek a szubsztrátum és a nikotinamid koenzim között lejátszódó kételektronos elektrontranszfer reakciót katalizálnak.

Az egyre fejlődő röntgen kristallográfiai és NMR spektroszkópiai módszereknek köszönhetően, százhoz közeli flavofehérjének ismerjük a háromdimenziós szerkezetét. A szerkezeti adatok bővülő ismerete, azonban átrendezi a kizárólag enzimműködés alapján kialakított osztályozási elveket és új összefüggésekre hívja fel a figyelmet.

I. 2. 8. Az Öreg Sárga Enzim család

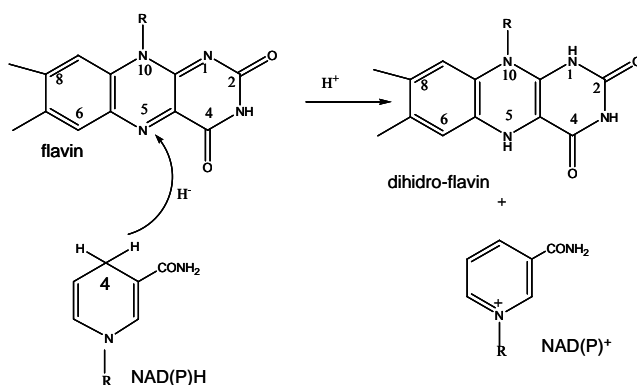
A PETN reduktáz és MR 48% aminosav szekvencia azonossággal rendelkezik, nagy fokú homológiát mutatva az öreg sárga enzim (ÖSE) családba tartozó több fehérjével is. Így a *Saccharomyces carlsbergensis* - és *Saccharomyces cerevisiae* öreg sárga enzimekkel (Saito *et al.*, 1991; Stott *et al.*, 1993; Niino *et al.*, 1995), a *Candida albicans* ösztrogén kötő fehérjéjével (Madani, 1994), az *Arabidopsis thaliana* (Schaller *et al.*, 1997) és a paradicsom (Straßner *et al.*, 1999) 12-oxofitodienoát reduktázával. A ÖSE háromdimenziós szerkezetét megfejtették, amely nyolc ismétlődő β/α egységekből épül fel, az apoproteinhez nem kovalensen kötött FMN kapcsolódik (Fox, *et al.*, 1994). A szerkezeti adatok és aktivitásuk alapján, a család tagjait úgy jellemezhetjük, hogy FMN kofaktort tartalmazó, β/α szerkezeti egységekből felépülő, nikotinamid kofaktor függő oxidoreduktázok. 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 (Miura *et al.*, 1997; Rohde *et al.*, 1999; Mizugaki *et al.*, 1979; Schaller *et al.*, 2000).

A biokémiai történetében az öreg sárga enzim vizsgálatok adtak először magyarázatot egy vitaminnak, a riboflavinnak, az enzimműködésben

betöltött szerepére. Otto Warburg, a biológiai oxidációk mechanizmusának tanulmányozása során, *Saccharomyces carlsbergensis*-ből izolált egy intenzív sárga színű fehérjét, amely katalizálta a NADPH oxidációját molekuláris oxigén jelenlétében (Warburg *et al.*, 1932). Hugh Theorell, 1935-ben a sárga fehérjéből ammónium szulfátos kicsapás során kivonta az apoproteint és a sárga pigmentet. Sem magában az apoprotein sem magában a sárga pigment nem katalizálta a NADPH oxidációját, azonban a két alkotó megfelelő pH-án történő összekeveréséből a sárga fehérje katalitikus aktivitása helyreállt. A sárga pigmentről bebizonyosodott, hogy riboflavin foszfát észtere a flavin mononukleotid. A sárga fehérjét, pedig öreg sárga enzimnek (ÖSE) nevezték el az utódok. Az ÖSE homodimer molekula, 49KDa móltömegű doménekből épül fel. Minden doménhez nem kovalens kötással FMN kötődik. A *Saccharomyces carlsbergensis*-ből izolált ÖSE izoenzimek keveréke, amelyeket két homológ gén kódol (Saito *et al.*, 1991). Annak ellenére, hogy fiziológiai szerepe a mai napig nem ismert, számos ligandumát azonosították, ezek közé tartoznak a fenolok és szteroidok. A fenoloknak és hidroxil csoportokat tartalmazó heteroatomos vegyületeknek kötődése az öreg sárga enzimhez nagy hullámhosszúságú elnyelési maximummal rendelkező töltés átviteli (CT) komplexet eredményez (Abramovitz *et al.*, 1976; Mathews *et al.*, 1975). Az enzim katalizálja az α/β -telítetlen karbonil vegyületek hidrogénezését, a 1-ciklohexén-2-on diszmutációját valamint oxidáz aktivitással is rendelkezik (Stott *et al.*, 1993; Vaz *et al.*, 1995). Az izoenzimek elegye nem mutat preferenciát NADPH és NADH között (Mathews *et al.*, 1971). OYE1- gyel jelölt izoenzim redukív félreakciójának részletes kinetikai vizsgálata, fiziológiás redukánsként a NADPH-t jelölte meg (Massey *et al.*, 1986). Az OYE1 háromdimenziós szerkezete számos értékes adatot nyújt az enzim működésének értelmezéséhez. Az enzimnek a nikotinamid analóg jelenlétében meghatározott molekula szerkezete megmutatta, hogy a nikotinamid gyűrű az izoalloxazin gyűrű fölé kötődik, míg a távoli adenin rész

nem alakít ki kölcsönhatást a fehérjelánccal (Fox, *et al.*, 1994). A háromdimenziós molekula szerkezetét alapul véve, hely-specifikus mutagenezissel bebizonyították, hogy a Tyr¹⁹⁶ fenolos oldallánc a katalitikusan aktív proton donor az α/β -telítetlen karbonil vegyületek olefinos kötésének redukciójában (Kohli *et al.*, 1998).

Az ÖSE család enzimei, az ÖSE, a dolgozatban tanulmányozott MR és PETN reduktáz, ping-pong mechanizmus szerint működnek, amelyben megkülönböztetünk redukzív- és oxidatív félreakciót (9. ábra).



9. ábra

Nikotinamid kofaktor függő, FMN-t tartalmazó oxido-reduktázok redukzív félreakciója

Reduktív félreakcióban, a nikotinamid kofaktor redukált formájáról, a nikotinamid gyűrű C4 atomjáról hidridtranszfer történik a flavin N5 atomjára (Massey *et al.*, 1980). A hidridtranszfer mind a három esetben sztereospecifikus, amit jelez a deuterált nikotinamid kofaktor jelenlétében mért primer izotóp effektus (Massey *et al.*, 1986; Craig *et al.*, 1998, Barna *et al.*, 2001). Az oxidatív félreakcióban a szubsztrátum oxidálja a redukált enzimet, ezzel zárva a katalitikus ciklust. Az ÖSE család tagjainak redukzív félreakcióban feltárt mechanizmusa közel azonos, ellenben az oxidatív félreakció változatos lefutásával, az enzimek széles szubsztrátspecifitásának köszönhetően.

II. A disszertáció célkitűzése

Szerkezeti, klasszikus - és tranzienst kinetikai valamint célzott aminosav kicserélési kísérletekben arra kerestem a választ, hogy nagy szekvencia homológiával rendelkező enzimek esetében, mint a PETN reduktáz és MR, milyen faktorok befolyásolják és határozzák meg az eltérő katalitikus aktivitást és szubsztrátum specifitást. Atomos felbontású enzim-szubsztrát - és enzim-inhibitor komplexek háromdimenziós molekula szerkezetei alapján, célul tűzttem ki a PETN reduktáz és MR molekuláris enzimszabályozását megismerni.

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

A MR ellentétben, a PETN reduktázzal, amely NADPH specifikus, nagyfokú NADH koenzim specifitást mutat. Mindkét enzim háromdimenziós szerkezetének felderítésével és az adatok értelmezésével megkívánom határozni a nikotinamid felismerő szerkezeti egységet.

II. Vizsgálati módszerek

Baktérium törzsek - enzimek izolálása

A PETN reduktáz és morfinon reduktáz izolálása rekombináns JM109 *Escherichia coli* törzsekből történt, amelyek PETN reduktázt kódoló plazmidot (pONR1) és morfinon reduktázt kódoló plazmidot (pMorB) tartalmaztak (French *et al.*, 1996; French *et al.*, 1995).

Rekombináns DNS technika

A pONR és pMorB plasmid mutagenézisét *Pfu* turbo DNA polymerázt tartalmazó QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit-tel (Stratagene) végeztem a megfelelő mutációt tartalmazó szensz és antiszensz komplementer primerek felhasználásával (Barna, *et al.*, 2001):

W102Y	5'	GT AT TGCGGT TCAGCTG TAT CACACCGGT CGTATCTC	3'
	5'	GAGATACGACCGGTGTG ATAC AGCTGAACCGCAATAC	3'
W102F	5'	GTAT TGCGG T TCAGCTG TTT CACACCGGTTCG TATCTC	3'
	5'	GAGATACGACCGGTGTG AAAC AGCTGAACCGCAATAC	3'
H181A	5'	CT T CGACCTGGT TGAGCT TGCG TCTGCGCACGGT TACCTG	3'
	5'	CAGGTAACCGTGCAGCA CGCA AGCTCAACCAGGTCGAAG	3'
H184A	5'	GT TGAGCT TCACTCTGCG GCG GGT TACCTGCTGCATCAG	3'
	5'	CTGATGCAGCAGGTAACCC GCC CGCAGAGTGAAGCTCAAC	3'

A primerek szintézise valamint a mutációt hordozó teljes gén szekvenálása a Leicester-i Egyetem PNCAL egységében történt.

UV-látható spektroszkópia

Az enzimek UV-látható spektrumait a ligandumkötő kísérletekben, redoxi titrálásokban, steady-state kinetikai mérések során Jasco V-550 típusú spektrofotométeren vettem fel (Barna *et al.*, 2001).

Diódasoros detektorral ellátott Applied Photophysics SX.17MV stopped-flow spektrofotométert használtam gyors enzimreakciók követésére (Khan, Barna *et al.*, 2004). A kinetikai paramétereket Spectrakinetics software (Applied Photophysics) nem lineáris illesztőprogramja segítségével határoztam meg.

Inert atmoszférás mérések

Belle Technology oxigén elnyelő BASF R3-11 katalizátorral ellátott „glove box” biztosította a 7ppm alatti oxigén koncentrációt az inert atmoszférás mérésekhez.

Szerves molekulák analízise

A TNT degradáció köztitermékeinek analízisét HPLC, TLC és ESI-MS mérésekkel végeztem. A HPLC mérések diódasoros detektorral (model: 994) felszerelt Waters Alliance– HPLC rendszerrel, Techspere 5ODS reverz fázisú oszlopon történtek (mozgófázis: 50% metanol és 50% víz; ionpár kromatográfiához mozgó fázisa: 50% AN és 50% 20mM tetrabutilammónium foszfát, pH 7,0). Vékonyréteg kromatográfiához preparatív és analitikai szilikagélt (Whatman AL SIL/UV 250), mozgófázisként diklórmetán:hexán:etilacetát (60:25:15) elegyét használtam. ESI-MS mérések Micromass platform quadropole electrospray mass spektrométeren negatív és pozitív ion módban történtek.

Röntgen kristallográfia

Az enzimek kristályosítása gőztenzió alapultú függőcsepp és ülőcsepp módszerrel történt (Barna, *et al*, 2001; Khan, Harris, Barna, 2002; Khan Barna, 2004, Barna *et al*, 2002). Sugárforrásként Rigaku RU-200HB forgóanódos röntgensugár generátort használtam. Az adatokat egykristályon 100K-en R-AXIS IV „image plate” detektoron a Cu anód K_{α} vonalának 1.5418Å hullámhosszán gyűjtöttem. Szinkrotronsugárforrást Daresbury (Anglia) és ESRF (Franciaország) szinkrotronok szolgáltatták. Az adatfeldolgozáshoz (pontcsoport és kristálycella paramétereinek meghatározásához) DENZO és SCALEPACK (Otwinowski *et al*, 1997) programot, a finomításhoz CNS (Brunger, *et al*, 1998), CCP4 és SHELX (Sheldrick, *et al*, 1997) programokat használtam. A molekulaépítést XTALVIEW (McRee, *et al*, 1992) programcsomag segítségével végeztem.

IV. Új tudományos eredmények összefoglalása

Az általam, röntgendiffrakciós mérésekkel megoldott és a disszertációm alapjául szolgáló háromdimenziós molekulaszervezeteket az 1. táblázatban foglaltam össze.

ENZIMEK	LIGANDUMOK			Felbontás (Å)	RCSB PDB* azonosító
PETN reduktáz oxidált alak	Szteroidok	Szubsztrátum	Prednizon	1,4	1H61
			1,4- Androsztadién- 3,17-dion	1,9	1H62
		Inhibitor	Progeszteron	1,6	1H60
	Nitro- aromások	Szubsztrátum	2,4,6-Trinitro-toluol	1,7	1GV5
			2,4,6-Trinitro-fenol	1,55	1GVQ
				0,9	1VYR
	Inhibitor	2,4-dinitro-fenol	1,38	1GVR	
	Aromás aldehid	Szubsztrátum	Fahéjaldehid	1,8	_*
		Inhibitor	Benzaldehid	1,6	_*
	anionok	Inhibitor	Klorid	1,6	_*
			Tiocianát	1,6	1H51
			Acetát	1,5	1H50
			Azid	1,8	_*
α/β - telítetlen keton	Szubsztrátum	1-Ciklohexén-2-on	2,0	1GVO	
PETN reduktáz redukált alak	-	-	-	1,5	1H63
W102F PETN reduktáz	Nitro- aromások	Szubsztrátum	2,4,6-Trinitro-toluol	1,28	1VY5
W102Y PETN reduktáz		Szubsztrátum	2,4,6-Trinitro-toluol	1,8	1VYP
MR-codeinon komplex	Opiát	Szubsztrátum	Kodeinon	2,2	1GWJ

1. táblázat

PETN reduktáz és MR, szubsztrátum és inhibitor jelenlétében megoldott molekulaszervezetei, feltüntetve a szerkezetek RCSB PDB azonosítóit

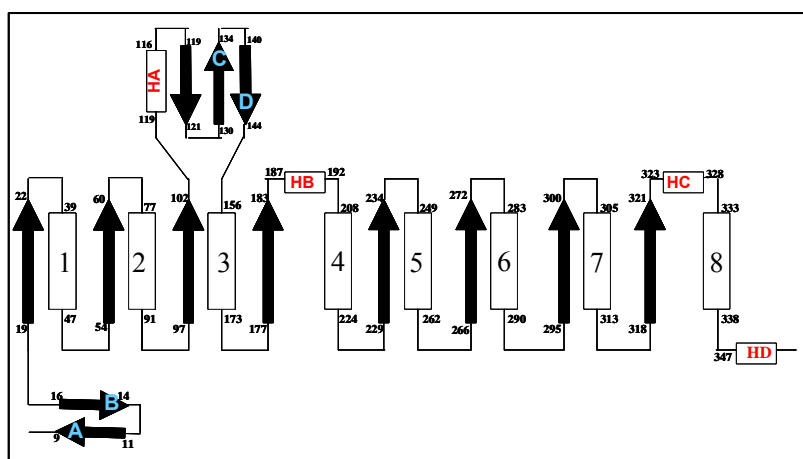
*RCSB PDB hozzáférés: www.rcsb.org/pdb ;

**Még nem publikált szerkezetek

III.1. PETN reduktáz molekula szerkezetének általános jellemzése

IV.1. PETN reduktáz háromdimenziós molekula szerkezete

A PETN reduktáz vázát, nyolc ismétlődő β/α egységből felépülő, TIM hordó (Wierenga, R.K., 2001) alakzat határozza meg, a hordókat összekötő hurkok további alegységeket zárnak magukba, meghatározott funkcióval (1.ábra) (Barna, *et al.*, 2001). A PETN reduktáz az öreg sárga enzimtől és MR-tól eltérően, monomer (Fox *et al.*, 1994; Barna *et al.*, 2002).

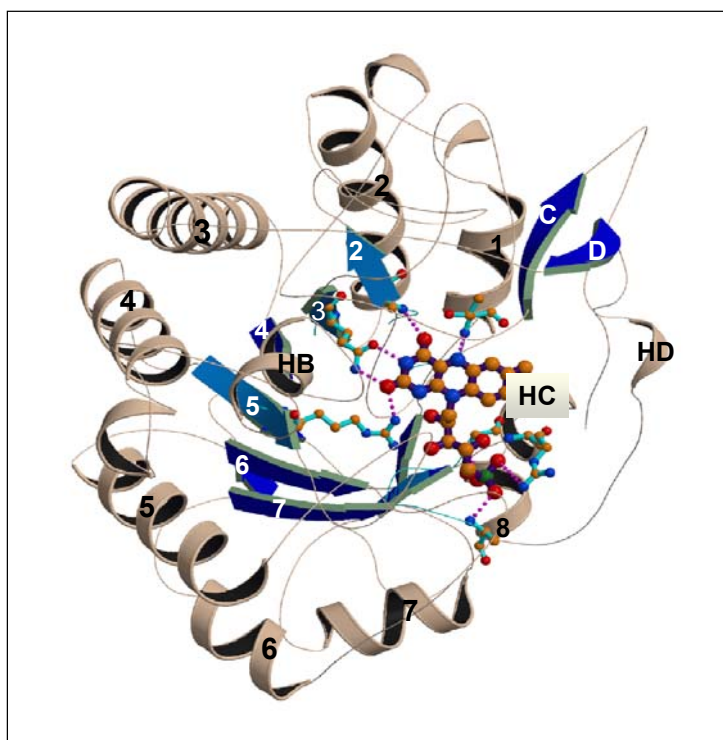


1.ábra

PETN reduktáz topológiája, α -héliceket téglalap, míg β -redőket nyilak ábrázolják. A másodlagos szerkezeti elemek fölé írt számok az őket alkotó aminosavakat jelölik. A TIM hordó nyolc β/α egységét a hélixekbe írt számok, míg a betűk a további másodlagos szerkezeti egységeket mutatják. A másodlagos szerkezeti elemek meghatározása Promotif programmal történt (Hutchinson, E. V. 1996).

A flavin-mononukleotid a molekula középpontjában, kiterjedt hidrogénhíd hálózatban kötődik az öt körülvevő β -redőkhöz (2. ábra). Az FMN-kötődés hasonló hidrogénhíd mintázatot követ az ÖSE-család tagjaiban. Az ÖSE-ben, a trimetilamin dehidrogenázban (TMDH) is megtalálható a C terminálshoz közeli 8-as hordó kitüremkedéseként a HC hélix (2. ábra),

amely stabilizálja az FMN ribitil-láncának foszfát csoportját (Lim *et al.*, 1986; Fox *et al.*, 1994). Az N-terminálshoz közeli β -hajtű [A, B, (2. ábra)], az ÖSE család tagjaival csekély homológiát mutató FMN-t kötő oxidoreduktáz enzimekben is fellelhető, úgy mint a flavocitokróm b₂-ben (Xia *et al.*, 1990) és a glikolát oxidázban (Lindqvist *et al.*, 1989) (1. és 2. ábra).



2. ábra

A PETN reduktáz TIM hordó szerkezete. A β -redők középpontjában, hidrogén-hidak stabilizálják a flavin-mononukleotidot. Molscipt (Kraulis, 1991) diagram ábrázolja a molekula másodlagos szerkezetét, szürke szalag az α -hélixeket, kék nyíl a β -redőket tünteti fel.

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 a ligandum kötődésében részt vevő két hisztidin: His¹⁸¹ és His¹⁸⁴ (3. ábra). E motívum α_3 és α_4 tagja az

enzim felületén helyezkedik el. Egyaránt szerepe lehet eddig még nem ismert fehérjéhez való kötődésben és magának a TIM hordó váznak kialakításában.

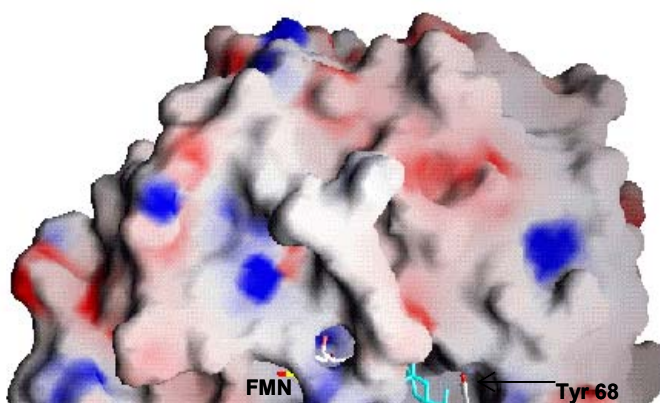
Onr : T PRALELDE IPG I VNDFRQAVA NAREAGFDL V E L L S A N G Y L L H Q F L S P S S N Q R T D Q Y G G S V E N R A R L V L E V V D A V C N : 223
Mor : T PRALETDG IPG I VEDYRQAAQRAKRAGFD M V E L L A A N A C L P N Q F L A T G T N R R T D Q Y G G S I E N R A R F P L E V V D A V A E : 225
Oye : P Q H S L T K D E I K Q Y I K E Y V Q A A K N S I A A G A D G V E L L S A N G Y L L N Q F L D P H S N T R T D E Y G G S I E N R A R F T L E V V D A L V E : 233
Onr : --s s -h h h h h h h h h h h h h h h h h h --s s s s s --h h h h h h -----h h h h h h h h h h h h : Mor : --s s -h h h h h h h h h h h h h h h h h h --s s s s s --h h h h h h -----h h h h h h h h h h h h : Oye : --s s -h h h h h h h h h h h h h h h h h h --s s s s s --h h h h h h -----h h h h h h h h h h h h : <i>huok3-></i> $\alpha 3$ $\beta 4$ αB $\alpha 4$

3. ábra

Az ÖSE család vizsgált tagjainak (Onr: PETN reduktáz; Mor: MR; Oye: ÖSE) konzervatív aminosav szekvencia régiója, a másodlagos szerkezeti egységek feltüntetésével (h: α -hélix; s: β -redő). Piros téglalapban a ligandum kötődésében részt vevő, míg a sárga téglalapban a feltételezett proton donor aminosavak találhatóak.

Ezzel ellentétben, a legkisebb homológiát mutató régió a harmadik hordó kitürenkedéseként megjelenő szuperszekunder szerkezet, amely egy α/β hordó és egy antiparalel futó β -redő pár (C és D) alkot (1. ábra). A szuperszekunder szerkezetnek meghatározott szerepe van a nikotinamid koenzim felismerésében, amelyet a „Kofaktor specificitás” című fejezetben részletesen elemzünk.

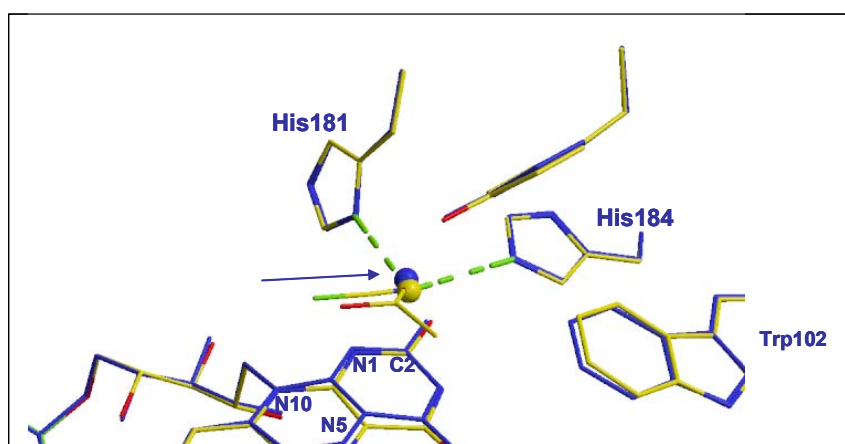
A PETN reduktázban, a ligandum egy 20Å hosszú, oldószernak kitett csatornán keresztül jut az enzim aktív centrumába (4. ábra). A ligandum kötő csatornát képezi a már említett, harmadik hordó meghosszabbításában található antiparalel futó β -redő pár (C,D). A csatornában, két fenolos csoportjával szembe néző Tyr⁶⁸ és Tyr³⁵¹ szabályozza a ligandum bejutását („gating mechanism”).



4.ábra

PETN reduktáz GRASP (Nicholls, A. 1991) potenciál felületi térképe. Piros szín a negatív, kék szín a pozitív tartományokat jelöli. Az aktív centrumban az FMN *si*-oldalához prednizon (türkíz) szubsztrátum kötődik.

PETN reduktáz aktív centrumában az FMN *re*-oldala fehérjébe van beágyazva, míg *si*-oldala oldószernek kitett, lehetővé téve a ligandumkötődést (4.ábra). Az oxidált FMN izoalloxazin gyűrűjének N-1 és C-2 régiója elektronszegény, ezen régióhoz kötődnek az egyértékű anionok (klorid, acetát, tiocianát és azid) 3.5 Å távolságban (Barna *et al*, 2001). A klór, oxigén, nitrogén donoratomjuk His¹⁸¹ és His¹⁸⁴ oldalláncaival alakít ki hidrogénkötést (5. ábra). Az aktív centrum hisztidinjeinek orientációját hidrogénhid hálózat rögzíti.



5. ábra.

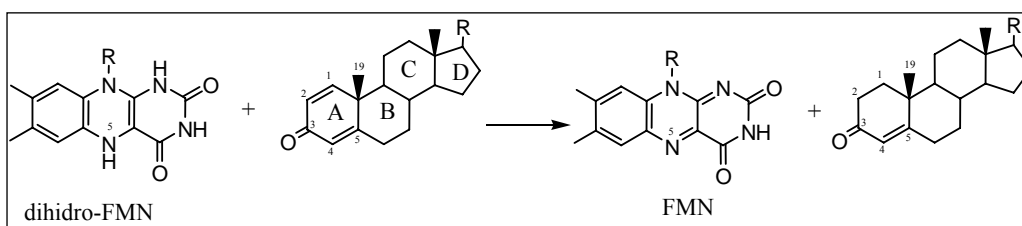
Egymásra vetített oxidált és redukált alakú PETN reduktáz aktív centruma. Sárga szín jelzi az oxidált, míg kék a redukált enzim alakot. Az oxidált enzimben a planáris konformációjú izoalloxazin gyűrűhöz, acetát és tiocianát, míg a redukált enzimhez, melyben az izoalloxazin gyűrű „lepke” meghajlást mutat, víz molekula (kék) koordinálódik. A zöld szaggatott vonal a ligandumoknak His¹⁸¹ és His¹⁸⁴ oldalláncaival kialakított hidrogénkötéseit mutatja.

A redukált enzimben a dihidro-FMN elektronban gazdag izoalloxazin gyűrűje nem kedvez az anionok kötődésének. A dihidro-FMN izoalloxazin gyűrű N-5 atomjának sp³ hibridállapota miatt a gyűrű elveszti planaritását és az N5-N10 tengely mentén 15°-s szögben „lepke” alakban meghajlik (5. ábra). A redukált enzim további fehérjérszének molekula szerkezete megegyezik az oxidált enzimben meghatározottal (Barna *et al*, 2001).

Az eddig bemutatott enzim-ligandum komplex szerkezeteken keresztül, azt látjuk, hogy a ligandum kötődést meghatározó tényezők közül a flavin elektronszerkezete az elsődleges. Másodsorban érvényesül, a hidrogénhíd képzésére alkalmas két hisztidil oldallánc ligandum kötődés irányát befolyásoló hatása.

IV. 2. Szteroid szubsztrátum különböző geometriájú kötődése az oxidált és redukált alakú PETN reduktázhoz

Néhány ÖSE homológ esetében, ÖSE (Vaz *et al.*, 1996), MR (French *et al.*, 1994) és PETN reduktáz (French, C.E. 1996), az α/β -telítetlen ketocsoportot tartalmazó szteroidok (progeszteron, tesztoszteron) kompetitív inhibitorokként hatnak. Ugyanakkor, kinetikai vizsgálataim azt mutatták, hogy a PETN reduktáz régió specifikusan redukálja a 3-oxo-1,4-dién szteroidok (prednizon, 1,4-androsztadién-3,17-dion) C1-C2 olefin kötését (6.ábra) (Barna *et al.*, 2001). Hasonló enzim aktivitásról nem számoltak be az ÖSE család tagjainak körében.



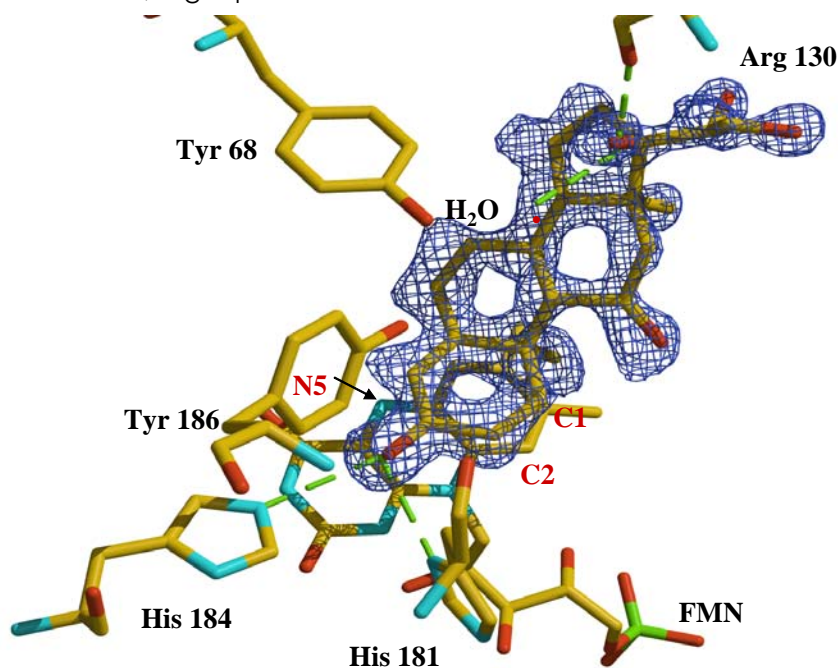
R: =O; 1,4-androsztadién-3,17-dion
R=R1+R2; R1: HOCH₂C(O), R2: OH; prednizon

6. ábra

A 3-oxo-1,4-dién szteroidok PETN reduktáz katalizált redukciója. Az enzim dehidro-FMN proszтетikus csoportja redukálja a 3-oxo-1,4-dién szteroidok „A” gyűrűjének C1-C2 olefin kötését.

Az oxidált PETN reduktáz-szteroid szubsztrátum komplexekben a szteroid β -oldala néz szembe az izoalloxazin *si*-oldalával, oly módon, hogy a 3-oxo csoport hidrogénhidat képez a His¹⁸¹ - és His¹⁸⁴ imidazol oldalláncokkal (7. ábra). A feltételezett proton donor, a konzervatív Tyr¹⁸⁶ (Kohli *et al.*, 1998), a szteroid „A” gyűrűje fölött a proton transzferhez kedvező orientációban, 3,3Å távolságban található.

Az oxidált enzim-szubsztrátum komplexben látott kötődési geometria a katalízisben aktív flavin N-5 atomját helyezi közvetlen közelbe a szteroid C4-C5 olefin kötésével 3,2 Å távolságra. A szubsztrátum orientációja alapján azt várnánk, hogy a flavin N-5 atomjáról kiinduló hidridtranszfer a C4-C5 olefin kötésre irányul. Ezzel szemben a szteroid C4-C5 olefin kötése sértetlen marad, régióspecifikusan a C1-C2 kettős kötés redukálódik.



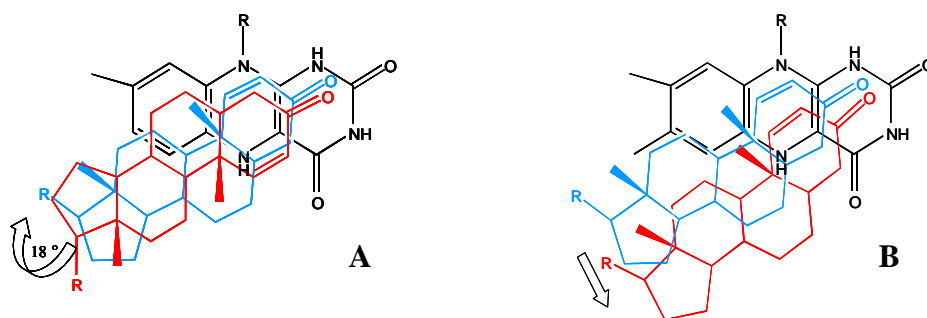
7. ábra

PETN reduktáz aktív centrumában koordinálódott prednizon szubsztrátum Fo-Fc elektronsűrűség függvénye, Xtalview (McRee, D. 1992) és Raster3D (Merri, E. 1994) programokkal megjelenítve.

Ahhoz, hogy a szteroid C1-C2 kettős kötésének redukciója végbemenjen, a redukált, azaz a katalitikusan aktív enzimben a szteroid kötődésnek olyan geometriát kell felvennie, hogy a C1-C2 kettős kötés a flavin N-5 atomja fölé kerüljön. Ezért fel kell tételeznünk, hogy az aktivált

enzim-szubsztrátum komplexben más orientációjú szteroid kötődés alakul ki, mint az oxidált enzim-szubsztrátum komplexben.

Az aktivált enzim-szubsztrátum komplexben a hidridtranszfer számára optimális geometria kétféleképpen jöhet létre. A szteroid, hasonlóan az oxidált enzim-komplexben, a β -oldalával kötődik a flavinhoz, de az izoalloxazin gyűrűvel koplánáris módon elmozdul és kerül a dihidro-FMN N-5 atomja fölé (i) (8/B. ábra). A másik lehetőség, hogy a szteroid az α -oldalával kötődik a redukált flavin *si*-oldalához, azaz a katalitikusan aktív komplexben a szteroid molekula 180°-s fordulatot hajt végre az oxidált enzimben megvalósult kötődéshez képest (ii) (8/A. ábra).

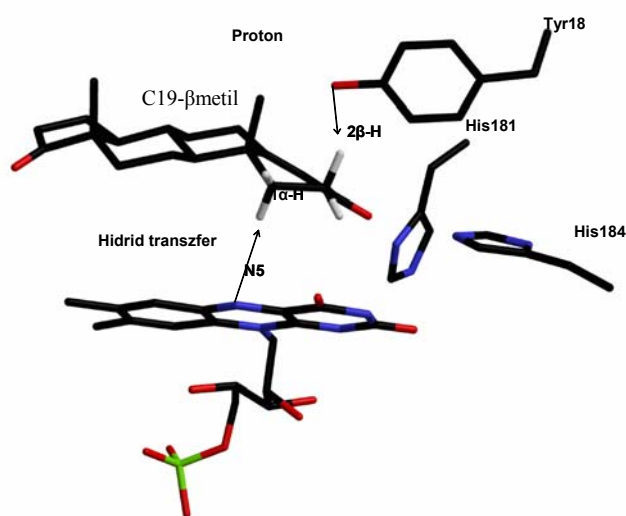


8.ábra

A redukált enzim-szubsztrátum komplexben kialakult szubsztrátum-flavin kölcsönhatás geometriai modellje, magyarázandó a szteroid C1-C2 kötésének redukcióját. Kék színű szteroid jelzi az oxidált enzim-szubsztrátum komplexben a szteroidkötődés irányát. Piros színű szteroid az aktivált enzim-komplexben a szubsztrátum koordinációját modellezi. Az „A” rajzon a redukálendő olefin kötés 180°-os fordulattal, míg a „B” rajzon translációs mozgással kerül a flavin N-5 atomja fölé.

A merev szteroid váznak köszönhetően, deutérium jelölő módszer segítségével és 2D-NMR spektroszkópia alkalmazásával a kettős kötés redukciójának mechanizmusa megállapítható vált (Barna *et al.*, 2001). Az NMR vizsgálat alapján a deutériumtranszfer a nikotinamid koenzimről a

szteroid váz „A” gyűrűjének 1- α helyzetére történik. A protonátmenet, pedig a szteroid váz „A” gyűrűjének 2- β helyzetére irányul (9. ábra). Az aktivált enzim-szubsztrátum komplexben a szubsztrátum kötődése 180°-os fordulattal valósul meg az oxidált enzim-szubsztrátum komplexben látotthoz képest (8/A. ábra). A redukált enzimben a flavin „lepke meghajlása” indukálhat olyan szteroid kötési módot, amelyben a síkból kilépő N-5 és C19- β metil csoport közötti szterikus taszítás megszűnik.



9. ábra

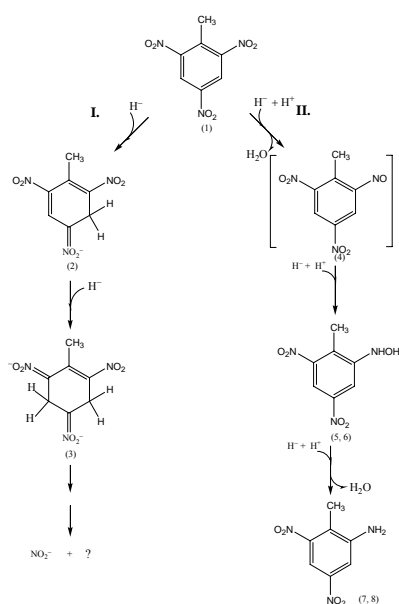
A redukált PETN reduktázhoz koordinálódott 3-oxo-1,4-dién szteroid modellje, a flavin N-5 atomjáról a szteroid 1 α -helyzetére irányuló hidrid és az enzim Tyr¹⁸⁶ oldalláncáról a szteroid 2- β -helyzetére irányuló protontranszfert nyilak jelölik.

A ligandum kötődés dinamikájának szerepére hívja fel a figyelmet, az enzim különböző oxidációs állapotaiban létrejövő eltérő geometriájú ligandum kötődés. Az aktivált enzimben létrejövő elektronszerkezet megváltozását a ligandum kötődés módja követi és ezzel a reakciótermék kialakulására döntő hatással van.

IV. 3. Aromás nitrovegyületek (TNT és pikrinsav) PETN reduktáz katalizálta redukciós bomlásának mechanizmusa

IV. 3. a. A TNT enzimatikus redukciója

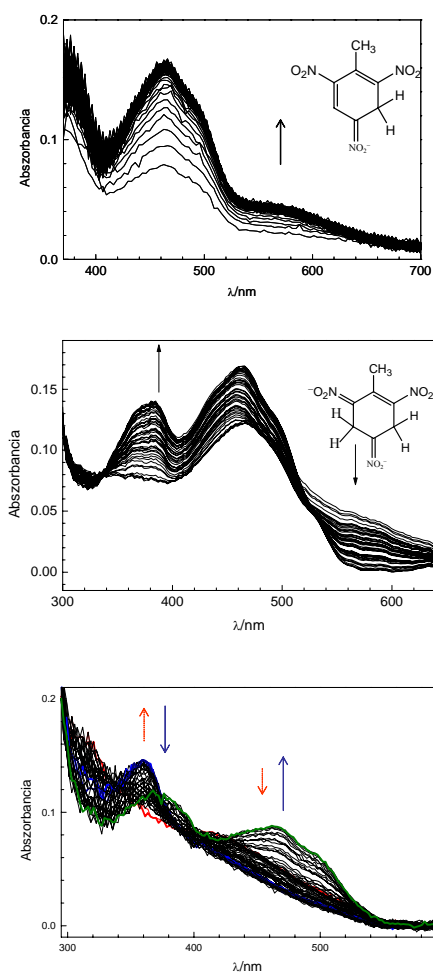
PETN reduktáz két párhuzamosan futó reakcióúton redukálja a 2,4,6-trinitro-toluolt (TNT). Az egyik mechanizmusban, az enzim a flavoenzimekre jellemző nitrocsoport redukáló, reduktáz aktivitást (Bueding *et al*, 1979 ; Harada *et al*, 1980; Bryant *et al*, 1991) fejt ki (10.ábra).



10. ábra

PETN reduktáz párhuzamos TNT lebontási útvonala. Minden egyes redukciós lépést sztöchiometrikus mennyiségű NADPH koenzim oxidáció kíséri. I: Nitrit felszabaduláshoz vezető aromás gyűrű telítési útvonal; II: Közvetlen nitrocsoport redukciós útvonal. A zárójelbe tett számok a következő metabolitokat jelölik: (1) 2,4,6-trinitro-toluol; (2) hidrid-Meisenheimer komplex (H-TNT); (3) dihidrid-Meisenheimer komplex (2H-TNT); (4) 2-nitrózó-4,6-dinitro-toluol, a zárójel arra utal, hogy gyors keletkezése és labilis természet miatt képződésére csak következtetni lehet; (5) 2-hidroxilamin-4,6-dinitro-toluol; (6) 4-hidroxilamin-2,6-dinitrotoluol*; (7) 2-amino-4,6-dinitrotoluol ; (8) 4-amino-2,6 dinitrotoluol*. *Az ábra nem tünteti fel, de VRK analízis kimutatta jelenlétét a reakció során.

A nitrit felszabaduláshoz vezető reakcióúton (ii), a redukció az aromás gyűrű kettős kötésének telítésével indul (10.ábra: I-es útvonal). Tranziens (stopped-flow) kinetikai mérések megmutatták, hogy a redukció során nem keletkezik az egy elektron átvitelére utaló jellegzetes UV-látható spektrummal rendelkező flavin szemikinon gyök (Barna *et al.*, 1999). Azonban megjelenik a hidridtranszferre utaló hidrid-Meisenheimer komplex (H-TNT) karakterisztikus UV-látható spektruma (11/A. ábra).



A: A két elektron redukált PETN reduktáz (40 μM) és 4 TNT (400 μM) jelenlétében 32s alatt regisztrált UV-látható spektrumok. Az 560nm maximumnál jelentkező abszorpciós váll, a hidrid-Meisenheimer komplex képződésre utal.

B:A Két elektron redukált PETN reduktáz (30 μM) és H-TNT(400 μM) jelenlétében 200s alatt regisztrált UV-látható spektrumok. A hidrid-Meisenheimer komplex mennyiségének időbeli csökkenése 560nm-en, a dihidrid-Meisenheimer komplex 460nm-en és az oxidált flavin egyidejű képződése 380nm-en látható.

C: A Két elektron redukált PETN reduktáz (30 μM) és 2H-TNT (400 μM) jelenlétében 500s alatt regisztrált UV-látható spektrumok. Az egyelektronos redukcióra utaló 360nm elnyelési maximummal rendelkező közti termék képződése és fogyása és az azzal egyidejű flavin oxidáció látható.

11. ábra

PETN reduktáz és TNT anaerob körülmények között lejátszódó reakciójának követése stopped-flow spektroszkópiával

11. ábra:

Mind a három reakció 50 μ M foszfát pufferban (pH=7), 25°C-on és nitrogén atmoszférában zajlott. A nyilak a reakció időbeli lefutását mutatják. (A C ábrán a piros vonal a kezdő, míg a kék vonal a befejező lépést jelöli).

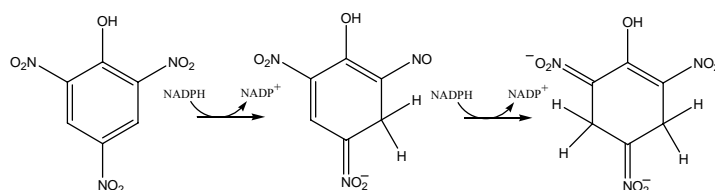
Az aromás gyűrű telítése, tehát egy lépésben kételektronos redukcióban, hidridátadással történik. A dihidro-flavin gyűrűről, a hidrid, mint nukleofil intéz támadást a TNT aromás gyűrűjének parciális pozitív töltésű C-3 atomjára. A redukció itt nem áll meg, hanem további hidridtranszferrel folytatódik, a hidrid-Meisenheimer komplex C-5 atomján levő kettős kötésére, dihidrid-Meisenheimer komplexet (2H-TNT) eredményezve (11/B. ábra).

Az irodalomban, a TNT enzimatisz degradációjában, a PETN reduktázon kívül, két esetben számolnak be bizonyítottan aromásgyűrű telítést, amelyek hidrid-Meisenheimer komplexet, illetve dihidro-Meisenheimer komplexet eredményeznek (Vorbeck *et al.*, 1994; Vorbeck *et al.*, 1998; Pak, *et al.*, 2000). Mindkét alkalommal a négy elektronos redukcióval keletkező 2H-TNT állapotot, az enzimatisz redukció végállapotával azonosítják, amelyből esetleg abiotikus folyamatok indulhatnak el (Vorbeck *et al.*, 1998; Pak *et al.*, 2000). Ezzel szemben HPLC és MS-ESI mérések azt mutatták, hogy a PETN reduktáz katalizálta redukcióból idővel a dihidro-Meisenheimer komplex elfogy és nitrit ion szabadul fel (French, *et al.*, 1998). Gyors reakciós kinetikai vizsgálatok megerősítették a redukált PETN reduktáz egyedülálló katalitikus aktivitását dihidro-Meisenheimer TNT komplexszel szemben (11/C. Ábra). A termék meghatározása és a reakció teljes kinetikai jellemzése folyamatban van.

PETN reduktáz, dihidro-Meisenheimer komplexet redukáló aktivitásának jelentősége abban rejlik, hogy a reakció eredményeképpen a TNT-ből nitrit ion szabadul fel. A PETN reduktázt termelő *Enterobakter cloacea* és PETN reduktáz gént hordozó transzgenikus dohány pedig az enzim ezen aktivitásának köszönheti, hogy nitrogén forrásként képes hasznosítani a táptalajból megfelelő koncentrációban jelenlevő TNT.

IV. 3. b. Pikrinsav enzimatiskus redukciója

A PETN reduktáz szubsztrátjai közé tartozik az ugyancsak aromás nitrovegyületet a 2,4,6-trinitro-fenol, köznapi nevén pikrinsav. Hasonlóan a TNT-hez, a nitrocsoport elektronszívó sajátossága miatt, a pikrinsav aromás gyűrűjének C(3) és C(5) atomjai érzékenyvé válnak nukleofil támadásra. PETN reduktáz hidroflavin csoportjáról hidrid átadás történik a pikrinsav C(3) és C(5) atomjaira, hidrid-Misenheimer- és dihidrid-Meisenheimer komplex képződése közben (12.ábra). A pikrinsav nitrocsoportjait a PETN reduktáz nem redukálja, az enzim specifikusan nitroaromás gyűrű hidrogénezési aktivitást fejt ki.



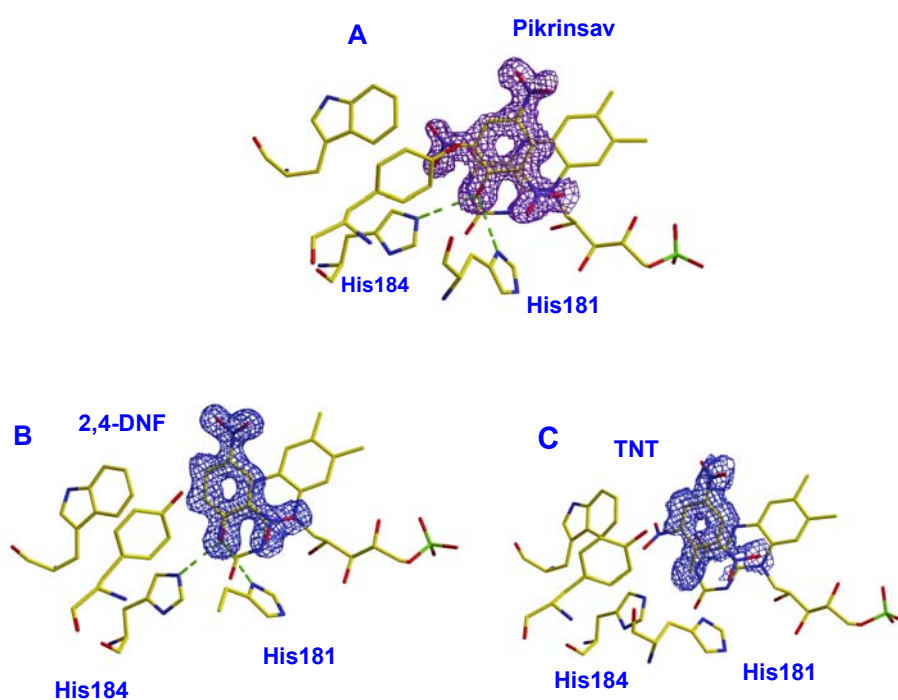
12. ábra

Pikrinsav PETN reduktáz katalizálta nitroaromás gyűrűhidrogénezés

IV. 4. Nitroaromás vegyületek kötődése

A nitroaromás vegyületek PETN reduktáz enzimhez való kötődését TNT és pikrinsav szubsztrátumok valamint 2,4-dinitro-fenol (2,4-DNF), kompetitív inhibitor jelenlétében vizsgáltam röntgen kristallográfiával és UV-VIS spektrofotometrián (Khan, Harris, Barna et al., 2002). Mind a három enzim komplexben az izoalloxazin gyűrű és a nitroaromás gyűrű π - π elektronjainak kölcsönhatása rendezi a ligandumokat a flavin pirimidin és pirazin gyűrűje fölé, 3,3 Å távolságban (13. ábra). Az aromás gyűrű

szubsztituenseinek irányultságát pikrinsav és 2,4-dinitro-fenol esetén, a ligandumok fenolos oxigénje és a hisztidil oldalláncok (His¹⁸¹) N(ϵ) és (His¹⁸⁴) N(δ) atomjai között kialakuló hidrogénkötés határozza meg, TNT kötődésekor, pedig a szubsztituensek és a hisztidil oldalláncok között fellépő sztérikus kényszerek (van der Waals taszítás).



13.ábra

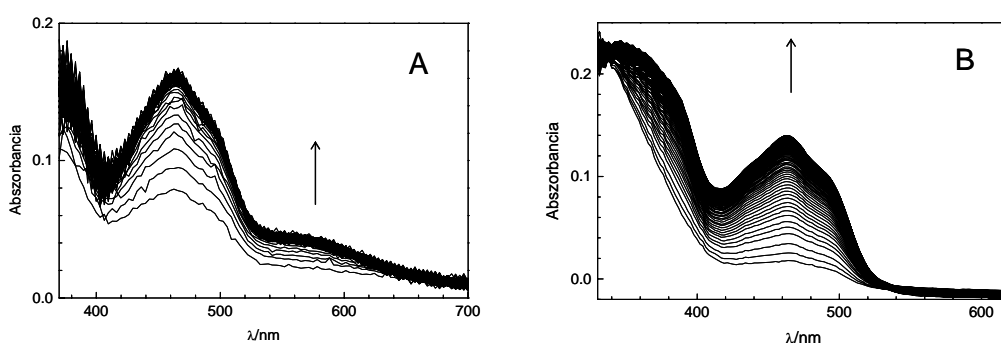
A PETN reduktáz-nitroaromás ligandum komplexeiben pikrinsav (A) - , TNT – és 2,4-dinitro-fenol (2,4-DNF) differencia elektronsűrűség függvénye, az ábrázolás Xtalview (McRee, D. 1992) és Raster3D (Merrit, E. 1994) programok felhasználásával történt.

PETN reduktáz különleges nitroaromás gyűrű hidrogénezési aktivitását a szerkezeti adatok tükrében értelmezhetjük. A nitroaromás szubsztrátumok (TNT és pikrinsav) koordinációja úgy valósul meg az enzim aktív centrumában, a fentebb említett kölcsönhatások következtében, hogy

az aromás gyűrű elektronhiányos C3 (C5) helye, a hidridátadó flavin N-5 atomjának közvetlen közelébe kerül.

IV. 5. Az aktív centrumban levő hisztidinek szerepe a TNT redukciójának mechanizmusában

Az ÖSE család általam vizsgált többi tagja a MR és ÖSE is képes a TNT szubsztrátumot reduktívan átalakítani. Azonban kizárólag, a flavoenzimekre általában jellemző nitroreduktáz aktivitással rendelkeznek, az aromás gyűrű nitrocsoportját, hidroxilaminná redukálják. 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 különbözik egymástól. Itt a MR-ban Asn¹⁸⁹, az ÖSE-ben Asn¹⁹⁴ található. A His¹⁸⁴, valamint a konzervatív His¹⁸¹ aminosavaknak, a TNT lebontásban betöltött szerepét vizsgálva, a két hisztidint anilinre cseréltem hely-specifikus mutagenézissel. Az így előállított H181A – és H184A PETN reduktáz mutánsok által katalizált TNT redukcióban, elmaradt a nitroaromás gyűrű telítésre jellemző hidrid-Meisenheimer komplex képződés (13. ábra). A redukciók, a nitrocsoport redukciójára utaló hidroxilamin-dinitrotoluolt eredményeztek. A H181A – és a H184A PETN reduktáz mutánsok kizárólag nitroreduktáz aktivitást mutattak TNT jelenlétében (14. ábra).



14. ábra

A vad típusú két elektron redukált PETN reduktáz (A) és TNT valamint a két elektron redukált H181A PETN reduktáz (B) és TNT, anaerob körülmények között lejátszódó, reakcióinak követése stopped-flow spektroszkópiával.

A: A két elektron redukált vad típusú PETN reduktáz ($40 \mu\text{M}$) és TNT ($400 \mu\text{M}$) jelenlétében, 32s alatt regisztrált UV-látható spektrumok. Az 560 nm maximumnál jelentkező abszorpciós váll, a hidrid-Meisenheimer komplex képződésre utal.

B: A két elektron redukált H181A PETN reduktáz ($44 \mu\text{M}$) és $400 \mu\text{M}$ TNT jelenlétében 4s alatt regisztrált UV-látható spektrumok. Az 350nm maximumnál jelentkező abszorpciós váll, hidroxilamino-dinitrotoluol származék képződését jelzi.

A Meisenheimer-komplex képződés feltétele, a szigorú sztérikus viszonyok fenntartása az aktív centrumban, amelyet elsősorban a két hisztidil oldallánc együttes jelenléte alakít ki. Valamelyik aktív centrumú hisztidin kiiktatásával a TNT aromás gyűrűje könnyen elmozdulhat az

izodalloxazin gyűrűn, így a hridátadás nem az aromás gyűrűn, hanem a nitro csoporton valósul meg. Ezen eredmények felhasználásával predikciós analízisre tehetünk kísérletet, PETN reduktázzal nagy fokú homológiát mutató enzimek felkutatására, amelyek képesek lehetnek nitroaromás gyűrű redukciójára (15. ábra).

181 184

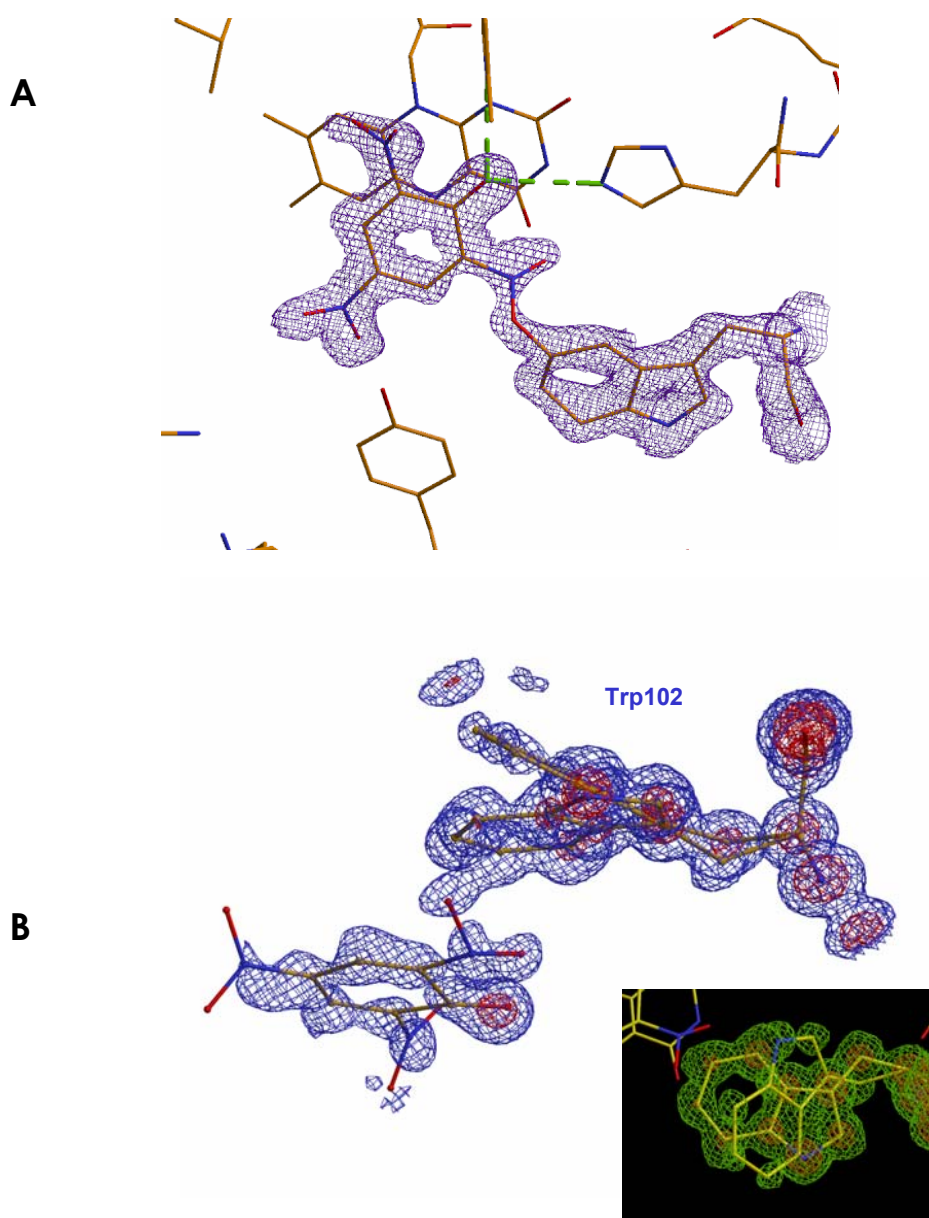
PETN	AREAGF D LVE LHSAHGYL LHQFL S PS SN
OYE1	SI AAGADG VE IHSANGYL LNQFL DPHSN
MORB	AKRAGFDMVEVHAANAACL PNQFLATGTN
EBP1	AL EAGFDY VE IHGAHGYL LDQFL NLASN
OPDA	AMEAGFDGVEIHGANGYL IDQFMKDTVN
NER A	ALWAGFD GVEIHAANGYL IEQF LK S ST N
NEM A	AR EAGFD LVELHSAHGY L LHQF LS PS SN

15.ábra

PETN reduktázzal homológ fehérjék aminosavsorrendjének összehasonlítása. A TNT redukcióban a PETN reduktáz kémiai aktivitását befolyásoló két aktív centrumú hisztidin és az azoknak megfelelő aminosavak a *Saccharomyces cerevisia* öreg sárga enzimben [OYE1, (Stott *et al.*, 1983)], *Candida albicans* ösztrogén kötő fehérjében [EBP, (Madani *et al.*, 1994)], *A. thaliana* 12-oxofitodienoát reduktázban [OPDA, (Schaller *et al.*, 1997)], *Pseudomonas putida* morfinon reduktázban [MORB, (French *et al.*, 1995)], *Argobacterium radiobacter* glicerín-trinitrát reduktázban [NER A, (Snape *et al.*, 1997)], *E. Coli* *N-etilmaleimid* reduktázban [NEM A (Miura *et al.*, 1997)]. A nagy fokú homológia és a két aktív centrumú hisztidin megléte alapján az *N-etilmaleimid* reduktázban várhatunk nitroaromás gyűrű telítési aktivitást.

IV. 6. Trp¹⁰² szerepe nitroatomások kötődésében - enzimdinamika szubatomos felbontásban

Pikrinsav–enzim komplex 1,5 Å felbontású elektronsűrűség térképén (16/A. ábra), a pikrinsav és Trp¹⁰² közötti folytonos elektronsűrűség jelenik meg, amelyben a Trp¹⁰² indol oldallánca valamint a pikrinsav nitrát csoportjának távolsága kovalens kötésnyi (Khan, Harris, Barna *et al.*, 2002). A szubsztrátum és Trp¹⁰² oldallánc közötti kölcsönhatás minőségére keresve a választ további röntgen diffrakciós vizsgálatokkal szub-atomos (0,9 Å) felbontásban határoztam meg a PETN reduktáz-pikrinsav komplex molekula szerkezetét (16/B. ábra) (Khan, Barna *et al.*, 2002). Az atomi felbontás lehetővé tette, hogy az elektronsűrűség 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 (16. 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 oldallancát 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.



16. ábra

Pikrinsav koordinálta PETN reduktázban a pikrinsav és Trp¹⁰² differencia elektronsűrűség függvénye A: 1,5 Å felbontásban B: 0,9 Å felbontásban, a baloldali kis téglalapban az elektronsűrűség függvény felülnézetben mutatja a Trp¹⁰² kétfajta konformációját.

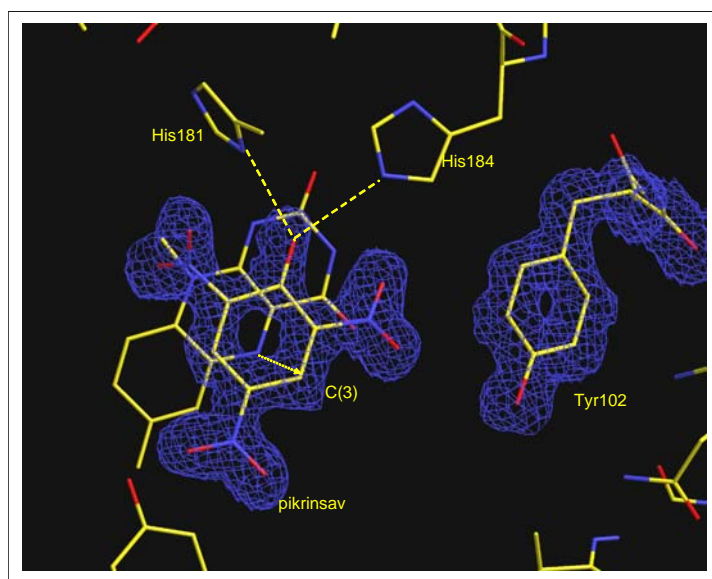
A Trp¹⁰² indol gyűrűjének elmozdulása konformáció változások sorozatát indukálja oldalláncon és a fehérje főláncában. A szubsztrátum kötődés okozta konformációs változások mellett, a molekulaszervezet rendezetlen régiói, a multikonformációban jelenlevő aminosavak is láthatóvá válnak. A leggyakrabban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

A PETN reduktáz aktív centrumának kialakításában kiemelkedő szerepe van a Trp¹⁰² aminosavnak. Az ÖSE családon belül helyzetét egyedül itt rögzíti hidrogénhíd (a Glu⁶⁰ oldalláncon keresztül), korlátozva az indol gyűrű szabadsági fokát. Az indol gyűrű sztérikus gátolásának következtében, a 2,4-dinitrofenol kötődése úgy valósul meg, hogy orto helyzetű nitrocsoportja az izoalloxazin gyűrű másik, a Trp¹⁰² -tól távoli, oldalára kerüljön (13. ábra). Ebben a koordinációban azonban a hidrid támadásra érzékeny C-3 pozíció nem kerül fedésbe a katalitikusan aktív flavin N-5 atomjával, így a vegyület kompetitív inibítorként viselkedik.

Szerkezeti adatok ráirányították a figyelmet az aktív centrumban, a flavintól 6Å távolságra levő konzervatív Trp¹⁰²-ra, az enzimműködés szabályozásában betöltött szerepére. Hely-specifikus mutációval előállított W102Y - és W102F PETN reduktáz-hoz koordinálódott pikrinsav molekula szerkezete azt bizonyította, hogy az indolnál kisebb térkitöltésű oldallánccal rendelkező aminosavak szorosabb ligandum kötődést tesznek lehetővé (17. ábra) (Khan, Barna et al., 2002). Ligandum kötődést zavaró sztérikus

kényszerek nem lépnek fel a fenil oldallánc és pikrinsav valamint a tirozil oldallánc és pikrinsav között (17.ábra). A W102Y PETN reduktáz aktív centrumához a nitroaromás szubsztrátum nemcsak szorosabban, hanem hidrid transzfer szempontjából kedvezőbb geometriával is kötődik, mint a vad típusú enzimhez (17. ábra). Ezt igazolja, TNT szubsztrátum esetén mért Meisenheimer-komplex képződés sebességi állandójának közel háromszorosára történő növekedése, a vad típusú enzimnél mérthez képest (Khan, Barna et al., 2002).

Összefoglalva, racionális mutagenezissel, kisebb térkitöltésű aminosav cserével kiiktatható volt a Trp¹⁰² oldallánc, ligandum kötődést csökkentő sztérikus gátlása, ezáltal megtöbbszöröződött az enzim specifikus, nitroaromás gyűrű telítési aktivitása.

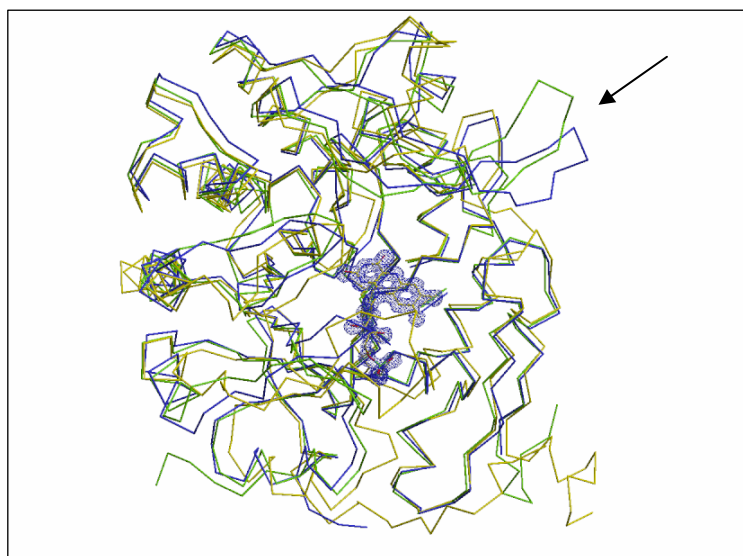


17. ábra

A W102Y PETN reduktáz aktív centruma, a koordinálódott pikrinsav és a triptofánt helyettesítő Tyr¹⁰² differencia elektronsűrűség függvénye.

IV. 7. Kofaktor specifitás

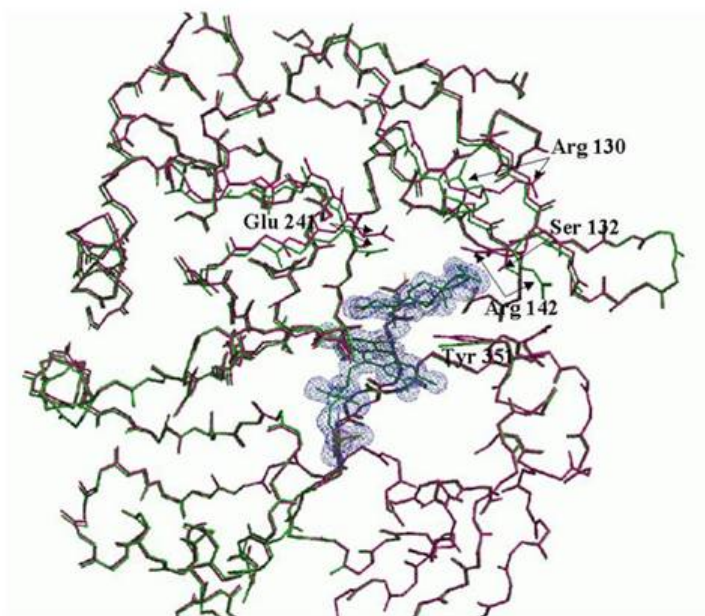
A PETN reduktáz és MR, $C\alpha$ -vázának szerkezete kizárólag a harmadik hordóban található szuperszekunder szerkezet alkotóiban és térállásában tér el markánsan, az ÖSE-től (17. ábra).



17. ábra

Az ÖSE (sárga), PETN reduktáz (kék) és a MR (zöld) egymásra vetített $C\alpha$ -váza. A nyíl a PETN reduktáz és MR harmadik hordójában található antiparalel futó β -redő párt mutatja, melyek a ligandum kötő csatorna részét képezik.

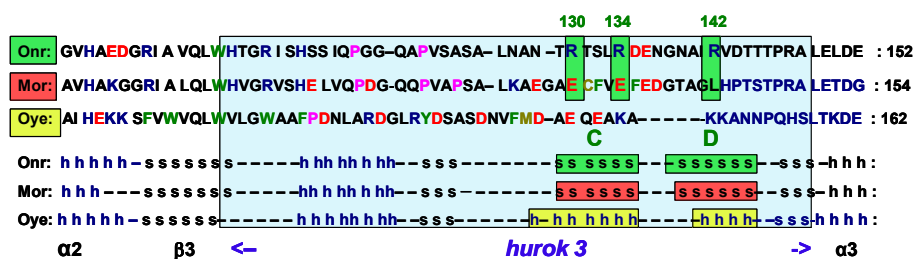
Az ÖSE-ben $\alpha 3$ és $\beta 3$ láncokat összekötő hurokban az antiparalel futó β -redő párt, α -hélix helyettesíti (.ábra). Az α -hélix mesze elkerüli a ligandum kötő csatornát. A PETN redukázban és MR-ban, viszont β -redő pár a csatorna részét képezi. Ez a szuperszekunder szerkezet igen mobilis, amit jól szemléltet, hogy ligandumkötődéskor könnyen elmozdul és alakítja ki ligandumkötődéshez szükséges geometriát. Erre a legjobb példa, a PETN redukázban szteroid kötődés hatására indukált konformációs változás, a β -redőpár két argininjének (Arg^{142} és Arg^{130}) oldalláncában (18. ábra).



18. ábra.

A progeszteron kötődés okozta indukált konformációs változás a PETN redukáz fehérjeláncában. Zöld színnel a ligandum kötődés előtti, míg a sárga színnel a ligandum jelenlétében kialakított szerkezetet mutatja. A legmobilisabb hurokban, a C és D antiparalel β -redőben található Arg^{142} - és Arg^{130} oldalláncának elmozdulása.

Mind a MR-ban mind a PETN reduktázban nagy térkitöltésű ligandumoknak, így a nikotinamid koenzimeknek is kölcsönhatásba kell kerülniük ezzel a hurokkal. A pozitív Arg¹⁴² és Arg¹³⁰ oldalláncok kedvező elrendeződésben vannak, hogy kölcsönhatást alakítsanak ki a NADPH nikotinamid gyűrűtől távoli adenozin részével, kiváltképpen a negatív töltésű foszfát csoportjával. A β -redő pár a PETN reduktázban pozitív argininekben gazdag, míg a MR-ban glutamát csoportok helyettesítik az arginineket, negatív töltésű környezetet kialakítva és elektrosztatikusan gátolva a NADPH foszfát csoportjának kötődését (19. ábra).



19. ábra

A PETN reduktáz (Onr), a MR (Mor) és ÖSE (Oye) aminosavsorrendjének és szerkezetének a harmadik hordóban található hurokban. A C és D antiparalel β -redő a PETN reduktázban pozitív argininekben, míg a MR-ban negatív glutamátokban gazdag.

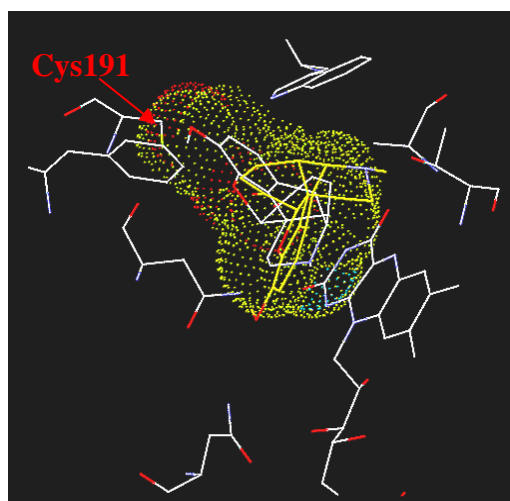
A MR nagy preferenciát mutat NADH felé, a PETN reduktáz pedig NADPH felé. Az ÖSE izoenzimjeinek elegye nem rendelkezik koenzim preferenciával (Bright, *et al*, 1975; Miura *et al.*, 1986). Az *Saccharomyces carlsbergensis*-ből izolált egyik izoenzim (OYE1) fiziológiás koenzimének a NADPH-t határozták meg, de NADH is könnyen redukálja (Massey *et al.*, 1986). NADPH analóggal végzett szerkezeti vizsgálatok arra utalnak, hogy az öreg sárga enzimből a NADPH származék az adenozin-foszfát végével szabadon, a nikotinamid gyűrűjével az izoalloxazin lánc fölé kötődik, vagyis

az enzim nem rendelkezik adenzin-2'-foszfát felismerő hellyel (Fox *et al.*, 1994). Feltételezhetjük, hogy a harmadik hordó szuperszekunder szerkezete, az antiparalel futó β -redő pár a PETN reduktáz és MR nikotinamid kofaktor felismerő helye. Ennek bizonyítását a PETN reduktázban az argininek, a MR ban a glutamátok kicserélésével és a keletkezett mutánsok kofaktor specificitásának vizsgálatával végezhetnénk el.

IV. 8. MR szubsztrátspecificitásának szerkezeti magyarázata - Cys¹⁹¹ szerepe a kodeinon kötődésben

MR –kodein komplex molekula szerkezetének megoldásával lehetővé vált, a morfinon reduktáz opiát szubsztátspecificitásának értelmezése. A MR-kodeinon komplex 2.2 Å felbontású elektronsűrűség térképén a flavin fölötti elektronsűrűséget (Barna *et al.*, 2002), kétféle orientációjú, kodein kötődéssel magyarázhatjuk. Mindkét orientációban hidrogénhidak stabilizálják a kodeinont, melynek van der Waals rádiusza kitölti az izoalloxazin gyűrű *si*-oldala feletti szabad teret (20. ábra). A kodeinon oxo-csoportját, mindkét orientációban, His¹⁸⁶ és Asp¹⁸⁹ oldalláncokkal kialakított hidrogénhid rögzíti. Az egyik irányú kötődés produktív, melyben a redukálható C7-C8 kettős az izoalloxazin gyűrű N-5 atomja fölött helyezkedik el. A kodeinon másik, non-produktív koordinációját az oxo-csoport körüli 90°-os elfordulás eredményezi.

20. ábra

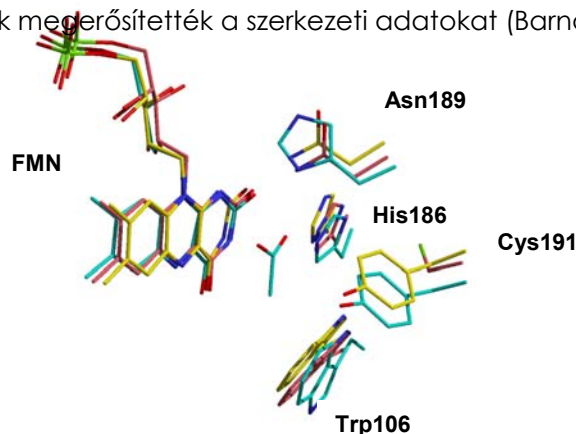


Az MR aktív centrumában kodeinon szubsztrátum kétféle orientációjú kötődése valamint a kodeion van der Waals sugara látható. Az áb-

Rázolás Xtalview (McRee, 1992) program felhasználásával történt. A Cys¹⁹¹ kis térkitöltése és oldalláncának iránya teszi lehetővé az opiát kötődését.

Ahhoz, hogy a morfinváz nagy térkitöltésű csoportja számára az aktív centrumban megfelelő geometria rendelkezésre álljon, elengedhetetlen a PETN reduktázban aminosav szekvenciájában a 186-os helyen található konzervatív tirozin helyettesítése kisebb térkitöltésű csoportra. Ellenkező esetben mint az .ábra mutatja a tirozil oldalláncok sztérikus gátolják a nagy térkitöltésű szubsztrátumok kötődését (21. ábra). A MR-ban egyedülállóan cisztein helyettesíti az ÖSE család konzervatív tirozinjét. A cisztein oldallánc elhelyezkedése szabad utat enged a morfinváz koordinációjának és az enzim opiát szubsztrátspecificitását hivatott fenntartani, amellyel kizárólag a morfinon reduktáz rendelkezik az ÖSE családon belül. Cisztein oldalláncnak köszönhető az is, hogy Cu²⁺ kötődhet az enzim aktív centrumában és enzimgátlást fejt ki (French *et al*, 1994).

Az ÖSE kinetikai vizsgálata során kimutatták a Tyr¹⁹⁶ aminosav kütüntetett szerepét az enzim katalitikus aktivitásában (Kohli, R.M. 1998). Az α/β -telítetlen ketonok olefin kötésének enzimatisz redukciójában a Tyr¹⁹⁶, a protonáló ágens. A MR-ban a Cys¹⁹¹ foglalja el a katalitikusan aktív sav helyét a szekvenciában. A MR-kodein komplexben a Cys¹⁹¹ oldallánc 5,1 Å távolságban, ellentétes orientációban található a szubsztrátumtól, amely kizárja a proton donor funkciót. A C191A mutánsal végzett oldattanulmányok megerősítették a szerkezeti adatokat (Barna *et al.*, 2002).



21. ábra

MR (piros), PETN reduktáz (kék) és ÖSE (sárga) aktív centruma, az izoalloxazin gyűrű fölé acetát koordinálódik.

V. 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 rögzít, 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, kiolthatjuk 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.

VI. Summary

PETN reductase from *Enterobacter cloacae* PB2 degrades the all major classes of explosives: nitrate esters (PETN, GTN) cyclic triazines (RDX) and nitroaromatics (TNT and picric acid), making the enzyme attractive in phytoremediation of explosive contaminated land. Morphinone reductase (MR) from *Pseudomonas putida* M10, plays a key role in a unique opiate biotransforming pathway, converting morphinone and codeinone into hydromorphone, a powerful analgesic, and hydrocodone, a mild antitussive.

Both enzymes are the members of nicotinamide cofactor dependent FMN containing oxido-reductases. PETN reductase is specific for NADPH, whereas MR is highly specific for NADH. They share a 53 % sequence identity . MR and PETN reductase show high sequence similarity with isoforms of Old Yellow Enzyme (OYE) from *Saccharomyces carlsbergensis* and from *Saccharomyces cerevisiae*.

The molecular structure of PETN reductase when complexed with substrates and inhibitors of different classes, such as nitroaromatics (TNT, picric acid, DNP), cyclic enones (3-oxo-steroids, 2-cyclohexen-1-one) and monovalent anions as well as the structure of the reduced form of PETN reductase, were solved at atomic resolution by X-ray diffraction. The crystal structure of morphinon reductase in the presence of codeinone substrate was also solved at high resolution. The overall structure of PETN reductase and morphinone reductase shows a typical eight stranded β/α barrel with a non-covalently bound FMN as prosthetic group. The pattern of the hydrogen bond network, that the flavin is involved in, is conserved throughout the β/α barrel of FMN dependent oxidoreductases.

Two further supersecondary structures have been found to confer certain characteristic reactivity patterns on PETN reductase and MR. An external helix between strand $\beta 8$ and helix8 has the function of stabilizing the phosphoryl moiety of FMN. The other supersecondary structure consists of an extra barrel and a pair of β -strands (β -loop excursion) that run antiparallel in front of the access channel to the active site between barrel (β_3/α_3). The β -loop excursion in PETN reductase is comprised of several positively charged amino acid residues. In contrast, in MR negatively charged amino acids dominate this β -loop. In PETN reductase, steroid binding has induced large conformational changes in two arginines residues Arg¹⁴² and Arg¹³⁰ in the β -loop excursion. The position of the two arginines is optimal to form interactions with the phosphate group of NADPH, therefore they are potential candidates to confer specificity for NADPH. The corresponding arginines in MR are replaced by acidic residues. Structural data suggests that the β -loop excursion of PETN reductase and MR can be the motif of nicotinamide coenzyme recognition and differentiation.

The *si*-face of the flavin is open to a well-defined solvent-filled access channel (20 Å in length) of the active centre. Two juxtaposed tyrosines in the access channel provide a gating mechanism for controlling ligand binding. All ligands in PETN reductase and MR binds above the *si*-face of the flavin. Ligands such as phenolic derivatives (picric acid, DNP, benzaldehyde) and cyclic enones (3-oxo steroids and codeinone) through their O-donor atoms are hydrogen bonded to the conserved His¹⁸¹ and His¹⁸⁴ in PETN reductase and with the corresponding His¹⁸⁶ and Asn¹⁸⁹ in MR. Comparing the active site of PETN reductase with that of MR, the striking difference is the presence of a cysteine (Cys¹⁹¹) residue in MR, which replaces the conserved Tyr¹⁸⁶ of PETN reductase. The position of Tyr¹⁸⁶ of PETN reductase is the putative proton donor in cyclic enones reduction in OYE homologs. In contrast, Cys¹⁹¹ is not involved in the mechanism of cyclic enones reduction, as mutagenesis studies have shown. The function of Cys¹⁹¹ is to create an appropriate space in the active centre for a bulky and conformationally restrained opiate binding.

PETN reductase catalyses the hydrogenation of C1-C2 olefinic bond of 3-oxo-1,4-diene steroids. PETN reductase shows multiple substrate binding modes in different redox states of the enzyme. In the oxidized form of PETN reductase, steroids bind with their β face above the *si* face of FMN. In this binding geometry the reductive olefinic bond is not positioned in close proximity to the flavin N5, which can be compatible with hydride transfer. Deuterium labeling methods have been developed to elucidate the stereochemistry of bond reduction. The two electron reduced form of PETN reductase binds the steroid substrate with its opposite a face above the *si*

face of FMN to realign the C1-C2 double bond favourable for hydride transfer. Hydride addition from flavin N5 occurs to the 1 α steroid position followed by proton uptake from the putative acid, Tyr¹⁸⁶, to the 2 β position of the steroid. In the reduced enzyme the flavins' "butterfly" configuration may induce an alternative substrate binding mode, to avoid an unfavourable steric interaction between the C19 β -methyl group of the steroid and the flavin.

The reductive transformation of TNT catalysed by PETN reductase, proceeds via parallel running reaction pathways, which consist of the direct hydrogenation of the aromatic ring (i) and the successive two-electron reductions of the nitro groups (nitroreductase pathway, ii). The molecular structure of the enzyme-TNT and enzyme-picric complexes provides the rationale of direct hydrogenation of the aromatic ring. The π - π interactions between the isoalloxazine ring of FMN and the nitroaromatics places the ligands above the flavin. The position of the nitro groups are also influenced by the two active site histidines through either hydrogen bonds (in case of picric acid and DNP) or van der Waals forces (in case of TNT). All these interactions contribute for ideal binding geometry of the nitroaromatic substrate for hydride attack from flavin N5 to C5 and C3 positions of TNT and picric acid, resulting in hydride-Meisenheimer and dihydro-Meisenheimer complexes. In contrast with *Mycobacterium sp.* strain HL 4NT-1 and Xenobiotic reductase, B from *Pseudomonas fluorescens* I-C, the dihydro-Meisenheimer complex is not the dead end of the enzymatic reduction. PETN reductase is able to reduce dihydro-Meisenheimer complex into an unknown product in the presence of nitrite liberation. The importance of nitrite liberation in the PETN catalysed TNT biotransformation is that the bacteria strain, *E. Cloacea*, which produces the enzyme, can utilize TNT as a sole nitrogen source.

The two active site histidines, His¹⁸¹ and His¹⁸⁴, were investigated to establish their function in nitroaromatics degradation. The two histidines were changed to alanine by site-directed mutagenesis and created H181A and H184A PETN reductase mutants. The change of histidine to alanine has dramatically altered the chemical activity of the enzyme. The mutations either of 181 or 184 positions have completely eliminated the aromatic ring hydrogenation ability of the two electron reduced PETN reductase on TNT. The mutant enzymes have shown only nitroreductase activity, like its close homologues such as MR and OYE. Solution studies indicate that the presence of both histidines, His¹⁸¹ and His¹⁸⁴, is strictly necessary to maintain the active site geometry, which positions the electrophilic C5 C3 of the nitroaromatic ring optimally for direct hydride transfer from flavin N5.

The crystal structure of PETN reductase, in complex with picric acid, at 0.9 Å resolution, has revealed that Trp¹⁰² can be a role in nitroaromatics

degradation. Picric acid binding induces conformational change in Trp¹⁰² to avoid steric clash. Since the binding of picric acid is partial (the calculated occupancy is 34%), Trp¹⁰² exists in multiple conformations. The change in the Trp¹⁰² conformation generates a series of multiple conformations in the main chain and side chains. Besides the substrate binding effect there are region of the structure where multiple conformations are found due to the disordered nature of these amino acids. Most frequently the side chains of arginine, glutamine, methionine and proline show mixed conformational populations. The structure at subatomic resolution provides further information about the protein dynamics.

Based on structural data Trp¹⁰² in PETN reductase, was mutated into phenylalanine (W102F) and tyrosine (W102Y). The crystal structure of W102F and W102Y PETN reductase mutants in complexes with picric acid show that ligand is bound at full occupancy in the active centre without steric hindrance of the Tyr¹⁰² and Phe¹⁰² side chains. The alignment of C5 of picric acid with the flavin N5 is more optimal for hydride transfer in the mutants enzymes. In the absence of structural data with TNT-PETN reductase mutants (W102F and W102Y) complexes, it is assumed that TNT is likely to bind in a similar manner as can be seen in the wild type enzyme. The consequence of optimal nitroaromatics binding for hydride transfer, in the mutants enzymes is that the observed rate of Meisenheimer complex formation has increased three times in the presence of W102Y PETN reductase mutant compared with that measured in the presence of wild type enzyme. Mutation of Trp¹⁰² has minor effects on the overall active site structure of PETN reductase, but the small structural changes in the active centre has a direct effect on nitroaromatics binding, accelerating the hydrogenation of the aromatic ring.

VII. HIVATKOZÁSOK

Abramovitz, A.S., and Massey, V. (1976a) Purification of intact old yellow enzyme using an affinity chromatography matrix for the sole chromatographic step. *Journal of Biological Chemistry* 251, 5321-5326.

Abramovitz, A.S., and Massey V. (1976b) Interaction of phenols with old yellow enzyme. Physical evidence for charge-transfer complexes. *Journal of Biological Chemistry* 251, 5327-5336.

Anlezark, G.M., Melton, R.G., Sherwood, R.F., Coles, B., Friedlos, F. and Knox R. (1992). The bioactivation of (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)-1. Purification and properties of a nitroreductase enzyme from *Escherichia coli*. *Biochem. Pharmacol.* 44, 2289-2295.

Barna, T., Khan, H., Bruce, N.C., Baruskov, I., Scrutton, N.S. and Moody, P.C.E. (2001) Crystal structure of pentaerythritol tetranitrate reductase: "flipped" binding geometries for steroid substrates in different redox states of the enzyme. *Journal of Molecular Biology* 310, 433-447.

Barna, T., Messiha, H.L., Petosa, C., Bruce, N.C., Scrutton, N.S. and Moody, P.C.E. (2002) Crystal structure of bacterial morphinone reductase and properties of the C191A mutant enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 277, 30976-30983.

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

- Beatty, N. and Ballou, D.P. (1981) *J. Biol. Chem.* 1981, 256. 4611.
- Binks, P.R., French, C.E., Nicklin, S. and Bruce N.C. (1996) Degradation of pentaerythritol tetranitrate by *Enterobacter cloacae* PB2. *Appl. Environ. Microbil.* 62, 1214-1219.
- Bleher, D.S., Fox, B.G. and Chambliss, G.H. (1999) Cloning and sequence analysis of two *Pseudomonas* flavoprotein xenobiotic reductases. *Journal of Bacteriology* 181, 6254-6263.
- Bruce, N. C., Barna, T., Khan, H., Harris, R. J., Munro, P. C. E. and Scrutton, N. S (2002) Pentaerythritol tetranitrate reductase: reaction with NADPH, steroids, 2-cyclohexenone, nitroesters and nitroaromatic explosives In *Flavins and flavoproteins* (eds. Perham, R. N., Chapman, S. K.) 247-252.
- Bryant, C. and McElroy (1991) Nitroreductases in F. Muller (ed), Chemistry and biochemistry of flavoenzymes – Vol.II. CRC. Press, Boca Raton.
- Bueding, E. and Jolliffe N. (1946) Metabolism of trinitrotoluene (TNT) in vitro. *J. Pharmacol. Exp.Ther.* 88, 300-312.
- Boopathy, R., and Kulpa, C.F. (1992) Trinitro toluene as sole nitrogen source for sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio* sp. (B strain) isolated from an anaerobic digester. *Curr. Microbiol.* 25, 235-241.
- Briant, C., and McElroy W.D. (1991a) Nitroreductases, In F. Muller (ed.), Chemistry and biochemistry of flavoenzymes – Vol. II. CRC Press, Boca Raton.
- Briant, C., and deLuca M. (1991b) Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *J.Biol. Chem.* 266, 4119-4125.
- Briant, C., Hubbard, L. And McElroy W.D. (1991c) Cloning, nucleotide sequence and expression of the nitroreductase gene from *Enterobacter cloacae*. *J.Biol. Chem.* 266, 4126-4130.
- Bruce, N.C., Wilmot, C.J., Jordan, K.N., Trebilcock, A.E., Gray Stephens, L.D. and Lowe C.R. (1990) Microbial-degradation of the morphine alkaloids - identification of morphinone as an intermediate in the metabolism of morphine by *Pseudomonas putida* M10. *Archives of Microbiology* 154, 465-470.
- Cenas, N., Nemeikaite-Ceniene, A., Stergediene, E., Nivinskas, H., Anusevicius, Z. and Sarlauskas, J. (2001) Quantitative-structure-activity relationships in enzymatic single electron reduction of nitroaromatic explosives: implications for their cytotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1528, 31-38.
- Craig, D.H., Moody, P.C.E., Bruce N.C. and Scrutton, N.S. (1998) Reductive and oxidative half-reactions of morphinone reductase from *Pseudomonas putida* M10: A kinetic and thermodynamic analysis. *Biochemistry* 37, 7598-7607.

- Daun, H. Lenke, M. Reuss and H.-J. Knackmuss (1998) Biological treatment of TNT-contaminated soil I: Anaerobic cometabolic reduction and interaction of TNT and metabolites with soil components. *Environ. Sci. Technol.* 32 1956–1963.
- Decker, K. (1991) Covalent flavoproteins (Chapter 13). in *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes Vol II*, (Ed, Muller, F.), CRC Press.
- Dreyer, J.L. (1984) Electron transfer in biological systems: an overview. *Experientia* 40, 653-776.
- Entsch, B, Ballou, D.P. and Massey, V. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 2550-2563.
- Esteve-Nunez, A., Cabellero, A. and Ramos, J.L. (2001) Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 335-352.
- Fiorella, P.D. and Spain, J.C. (1997) Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS 52. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2007-2015.
- Fitzpatrick, P.F. (2001) Substrate dehydrogenation by flavoproteins. *Accounts of Chemical Research* 34, 299-307.
- Fox, K.M. and Karplus, P.A. (1994) Old yellow enzyme at 2.Å resolution: overall structure, ligand binding and comparison with related flavoproteins. *Structure* 2, 1089-1105.
- Funk, S. B., Roberts, D.J., Crawford, D.L. and Crawford, R.L. (1993) Initial-phase optimization for bioremediation of munition compound-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2171-2177.
- French, C.E., and Bruce N.C. (1994) Purification and characterisation of morphinone reductase from *Pseudomonas putatida* M10. *Biochem. J.* 301, 97-103.
- French, C.E. and Bruce, N.C. (1995) Bacterial morphinone reductase is related to old yellow enzyme. *Biochemical Journal* 312, 671-678.
- French, C.E., Nicklin S. and Bruce N.C. (1996) Sequence and properties of pentaerythritol tetranitrate reductase from *Enterobacter cloacae* PB2. *J. Bacter.* 178, 6623-6627.
- French, C.E., Nicklin S. and Bruce N.C. (1998) Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. *Appl. Env. Microbiology*, 64, 2864-2868.
- French, C.E., Rosser, S.J., Davies, G.J., Nicklin S. and Bruce N.C. (1999) Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. *Nature Biotech.* 17, 491-494.
- Ghisla, S. and Massey, V. (1989) Mechanism of flavoprotein-catalysed reactions. *European Journal of Biochemistry* 181, 1-17.

Ghisla, S. and Massey, V. (1986) New flavins for old: artificial flavins as active site probes of flavoproteins. *Biochem. J.* 239, 1-12.

Gunsalus, I.C., Pederson, T.C. and Sligar, S. G. (1975) Oxygenase-catalysed biological hydroxylations. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 377-407.

Groenewegen, P.E.J., Breeuwer, J.M., van Helvoort, M.A., Langenhoff, F.P., and de Bont, A.M. (1992) Novel degradative pathway of 4-nitrobenzoate in *Comamonas acidovorans* NBA-10. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1599-1605.

Hannink, N., Rosser, S.J., French, C.E., Basran, A., Murray, J.A.H., Nicklin, S. and Bruce, N.C. (2001) Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. *Nature Biotechnology* 9, 1168-1172.

Harada, N. and Omura, T. (1980) Participation of cytochrome P450 in the reduction of nitro compounds by rat liver microsomes. *J. Biochem.* 87, 1539-1554.

Harris, R.J., Khan, H., Barna, T., Moody, P.C.E. and Scrutton, N.S. (2002) Mechanistic studies of Trp 102 mutant forms of pentaerythritol tetranitrate reductase. In *Flavins and Flavoproteins 2002: Fourteenth International Symposium*, (Eds, Perham, R.N., Chapman, S.K. and Scrutton, N.S.), Rudolf Weber, Berlin, 247-252.

Hailes, A.M. and Bruce, N.C. (1993) Biological synthesis of the analgesic hydromorphone, and intermediate in the metabolism of morphine by *Pseudomonas putida* M10. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2166-2170.

Hastings, J.W., Balny, C. Le Peuch, and Douzou, P. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 3468.

Honeycutt, M.E., Jarvis, A.S. and McFarland, V.A. (1996) Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites. *Ecotoxicological and Environmental Safety* 35, 282-287.

Hooker, B.S. and Skeen, R.S. (1997) Transgenic phytoremediation blasts onto the scene. *Nature Biotechnology* 17, 428.

Hughes, J.B., Wang, C., Yesland, K., Bhadra, R., Richardson, A., Bennet, G. and Rudolph, F. (1998) Reduction of 2,4,6-trinitrotoluene by *Clostridium acetobutylicum* through hydroxylamino intermediates. *Environmental Toxicological Chemistry* 17, 343-348.

Hutchinson, E. V. And Thornton, J. M. (1996) PROMOTIF: a program to identify and analyse structural motifs in proteins. *Protein Sci.* 5, 212-220.

Kalafut, T., Wales, M.E., Rastogi, V.K., Naumova, R.P., Zaripova, S.K. and Wild, J.R. (1998) Biotransformation patterns of 2,4,6-trinitrotoluene by aerobic bacteria. *Current Microbiology* 36, 45-54.

Khan, H., Harris, R.J., Barna, T., Craig D.H., Bruce N.C., Munro, A.W., Moody, P.C.E. and Scrutton, N.S. (2002) Kinetic and structural basis of reactivity of pentaerythritol

tetranitrate reductase with NADPH, 2-cyclohexenone, nitroester and nitroaromatic explosives. *Journal of Biological Chemistry* 277, 21906-21912.

Koder, R.L. and Miller A.F. (1998) Steady-state kinetic mechanism, stereospecificity, substrate and inhibitor specificity of *Enterobacter cloacae* nitroreductase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1387, 395-405.

Kohli, R.M. and Massey, V. (1998). The oxidative half-reaction of old yellow enzyme. The role of tyrosine 196. *J. Biol. Chem.* 273, 32763-32770.

Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* 24, 946-949.

Kuhn, R. Reimund, K. and Weygand, F. (1934), *Ber.* 67, 1460-1463.

Lenke, H., Warrelmann, J.G., Daun, K., Hund, U., Sieglén, U., Walter and Knackmus H.J. (1998) Biological treatment of TNT-contaminated soil. II. Biological induced immobilization of the contaminants and full-scale application. *Environ. Sci. Technol.* 32 1964-1971.

Lewis, T.A., Goszczynski, S., Crawford, R.L., Korus, R.A. and Adamassu, W. (1996) Products of anaerobic 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transformation by *Clostridium bifementans*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4669-4674.

Lim, L.W., Shamala, N. and Mathews, F. S. (1986) Three dimensional structure of the Iron-Sulfur flavoprotein trimethylamine dehydrogenase at 2.4 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry* 261, 15140-15146.

Lindqvist, Y. (1989) *J. Mol. Biol.* 209, 151-166.

Macheroux, P. Ghisla, S. and Hastings, J.W. (1993) *Biochemistry*, 32, 14183-14186.

Madani, N.D., Massey, P.J., Rodriguez-Pombo, P., Krishnan, A.V. and Feldman, D. (1994) *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 922-926.

Massey, V. and Ghisla, S. (1983) In *Biological oxidations* (Sund. H. And Ullrich, V. eds) pp.114-139. Springer, Berlin.

Massey, V. and Hemmerich, P. (1980) Active-site probe of flavoproteins. *Biochem. Soc. Trans.* 8, 246-256.

Massey, V. and Schopfer, L. (1986a) Reactivity of old yellow enzyme: the discovery of multiple isoenzymes and a family of related proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 6097-6106.

Massey, V. and Schopfer L. M. (1986b) Reactivity of Old Yellow Enzyme with α -NADPH and other pyridine nucleotide derivatives. *J. Biol. Chem.* 261, 1215-1222.

Massey, V. (2000) The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochemical Society Transactions* 28, 283-296.

Mathews, R.G., Massey, V. and Sweeley, C.C. (1975) Identification of p-hydroxybenzaldehyde as the ligand in the green form of old yellow enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 250, 9294-9298.

Mathews, R. and Massey, V. (1971) Free and complexed forms of OYE. In *Flavins and Flavoproteins 1971: Third international symposium*, (Ed, Kamin, H.) University Park Press, Baltimore and Butterworth and Co. (Publishers), London, 329-348.

Mewies, M., McIntire, W.S. and Scrutton, N.S (1998) Covalent attachment of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) to enzymes: The current state of affairs. *Protein Science* 7, 7-20.

McRee, D. (1992). A visual protein crystallographic software system for X11/XView. *J. Mol. Graph.* 10, 44-4641.

McCormick, N.G., Feeherry, F.E. and Levinson, H.S (1976) Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 31, 949-958.

Meah, Y., Brown, B.J., Chakraborty, S. and Massey, V. (2001) Old yellow enzyme: reduction of nitrate esters, glycerin trinitrate and propylene-1,2,-dinitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 8560-8565.

Merrit, E. and Murphy, M. (1994). Raster3D version 2.0: a program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallog. sect. D*, 50, 869-873.

Mewies, M., McIntire, W.S. and Scrutton, N.S (1998) Covalent attachment of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) to enzymes: The current state of affairs. *Protein Science* 7, 7-20.

Michels, J. and Gottschalk, G. (1995) Pathway of 2,4,6-trinitrotoluene degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. In *Biodegradation of nitroaromatic compounds* (Ed, Spain, J.C.), Plenum Press, 135-149

Miura, K., Tomioka, Y., Suzuki, H., Yonezawa, M., Hishinuma, T. and Mizugaki, M. (1997) Molecular cloning of the *nem* A gene encoding N-ethylmaleimide reductase from *Escherichia coli*. *Biological Pharmacological Bulletin* 20, 110-112

Miura, R. (2000) Versatility and specificity in flavoenzymes: control mechanisms of flavin reactivity. *The Chemical Record* 1, 183-194.

Mizugaki, M., Unuma, T. and Yamanaka, H. (1979) "Studies on the metabolism of unsaturated fattyacids. II. Separation and general properties of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphatedependent *cis* -2-enoyl-coenzyme A reductase from *Escherichia coli* K-12" *Chemical &Pharmaceutical Bulletin, Tokyo* 27, 2334-2337.

Muller, F. (1983) The flavin redox-system and its biological function. *Topics in Current Chemistry* 108, 71-107.

Nicholls, A., and Honig, B. (1991) GRASP, Columbia University, New York.

Niino, Y.S., Chakraborty, S., Brown, B.J. and Massey, V. (1995) A new old yellow enzyme of *Saccharomyces cerevisia*. *Journal of Biological Chemistry* 270, 1983-1991.

Nishino, S.F. and Spain, J.C. (1993) Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Oxidative pathway for biodegradation of nitrobenzene by a *Comomonas* sp. Strain JS765. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2520-2525.

S.F. Nishino, J.C. Spain and Z. He (2000) Strategies for aerobic degradation of nitroaromatic compounds by bacteria. Process discovery to field application. In: J.C. Spain, J.B. Hughes and H.-J. Knackmuss, Editors, *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives*, CRC Press, Boca Raton, FL . 7-61.

Nivinskas, H., Koder, R.L. Anusevicius, I., Sarlauskas, J., Muller, A-F. and Cenas, N. (2000) Two-electron reduction of nitroaromatic compounds by *Enterobacter cloacae* NAD(P)H nitroreductase: description of quantitative structure-activity relationships. *Acta Biochimica Polonica* 47, 941-949.

Nokhbeh, M.R., Boroumnadi, S., Pokorny, N., Koziarz, P., Paterson, E.S. and Lambert, I.B. (2002) Identification and characterisation of SnRA, an inducible oxygen-insensitive nitroreductase in *Salmonella enteric serovar Typhimurium* TA 1535. *Mutation Research* 508, 59-70.

Oh, B-T., Sarath, G., Shea, P.J., Drijber, R.A. and Comfort, S.D. (2000) Rapid spectrophotometric determination of 2,4,6-trinitrotoluene in a *Pseudomonas* enzyme assay. *Journal of Microbiological Methods* 42, 149-158.

Pak, J.W., Knoke, K.L. Noguera, D.R., Fox, B.G. and Chambliss, G.H. (2000). Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens*-I-C. *Appl. Env. Microbiology*, 66, 4742-4750.

Palfey, B.A. and Massey, V. (1998) Chapter 29: Flavin dependent enzymes. From *Comprehensive Biological catalysis, A mechanistic reference* Vol III, (Ed, Sinnott, M.) Academic Press.

Parales, R.E., Bruce, N.C., Schmid, A. and Wackett, L.P. (2002) Biodegradation, Biotransformation and Biocatalysis (B3). *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4699-4709.

Perec, C.M. and Agathos, S.N. (2000) Biodegradation of nitroaromatic compound pollutants: from pathways to remediation. *Biotechnology Annual Reviews* 6, 197-220.

Peterson, F.J.;Mason, R.P., Hovespian J., and Holtzman J.L. (1979) Oxygensensitive- and insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *J Biol. Chem.* 254, 4009-4019.

Porter, D.J.J. and Bright, H.J. (1980) Oxidation of dihydronicotinamides by flavins in enzymes and model reactions. Old yellow enzyme and lumniflavin. *Journal of Biological Chemistry* 255, 7362-7370.

- Preuss, A., Fimbel, J. and Dickert, G. (1993) Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Arch. Microbiol.* 159, 345-353.
- Rafii, F. and Cerniglia C.E. (1993) Comparison of azoreductase and nitroreductase from *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1731-1734.
- Rohde, B.H., Schmid, R. and Ullrich, M.S. (1999) "Thermoregulated expression and characterization of an NAD(P)H- dependent 2-cyclohexen-1-one reductase in the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*" *Journal of Bacteriology* 181, 814-822.
- Saito, K., Thiele, D.J., Davio, M., Lockridge, O. and Massey, V. (1991) The cloning and expression of a gene encoding old yellow enzyme from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of Biological Chemistry* 266, 2072-20724.
- Schaller, F. and Weiler E.W. (1997a) Molecular cloning and characterisation of 12-oxophytodienoate reductase, an enzyme of the octadecanoid signalling pathway from *Arabidopsis thaliana* - structural and functional relationships to yeast old yellow enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 272, 28066-28072.
- Schopler, L.M. and Massey V. (1991) „Old Yellow Enzyme" in a study of enzymes (Kuby, S.A. ed.) CRC Press, Cleveland, Ohio pp. 247-269.
- Spain, J.C. (1995a) Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annual Reviews in Microbiology* 49, 523-535.
- Snellinx, Z., Neparim, A., Taghavi, S., Vangeronsneld, J., Vanek, F. and Lelie, D.V.D. (2002) Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds. *Environmental Science Pollution Research* 9, 48-61.
- Susarla, S., Medina, V.F. and McCutcheon, S.C. (2002) Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18, 647-658.
- Stahl, J.D and Aust, S.D (1993a) Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 192, 471-476.
- Stahl, J.D and Aust, S.D (1993b) Plasma membrane dependent reduction of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 192, 477-482.
- Stewart, R.C. and Massey, V. (1985) Potentiometric studies of native and flavin substituted old yellow enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 260, 13639-13647.
- Stott, K., Saito, K., Thiele, D.J and Massey, V. (1993) Old yellow enzyme, the discovery of multiple isozymes and a family of related proteins. *Journal of Biological Chemistry* 268, 6097-6106.

Straßner, J., Furholz, A., Macheroux, P., Amrhein, N. and Schaller, A. (1999) A homolog of old yellow enzyme in tomato; spectral properties and substrate specificity of the recombinant protein. *Journal of Biological Chemistry* 274, 35067-35073.

Tamalge, S.S., Opresko, D.M., Maxwell, C.J., Welsh, C.J.E., Cretella, M., Reno, P.H. and Daniel, F.B. (1999) Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Reviews in Environmental Contamination Toxicology* 161, 1-156.

Vanderford, M., Schanks, J.V. and Hughes, J.B. (1997) Phytotransformation of trinitrotoluene and distribution of metabolic products in *Myriophyllum aquaticum*. *Biotechnology Letters* 19, 227-280.

Vaz, A.D.N., Chakraborty, S. and Massey, V. (1995) Old yellow enzyme: aromatisation of cyclic enones and mechanism of a novel dismutation reaction. *Biochemistry* 34, 4246-4256.

Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P. and Knackmuss, H.-J. (1994) Identification of a hydride-Meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Mycobacterium* strain. *Journal of Bacteriology* 176, 932-934.

Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P., Spain, J.C. and Knackmuss, H.-J. (1998) Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 246-252.

Walsh, C. (1979) Flavin-dependent dehydrogenases and oxidases (Chapter 11). In *Enzymatic Reaction Mechanisms* (Ed, Walsh, C.) 1st Edition, Freeman and Company, San Francisco.

Walsh, C. (1980) Flavin co-enzymes: at the crossroads of biological redox chemistry. *Accounts of Chemical Research* 13, 146-155.

Wang, C.Y., Zheng, D. and Hughes, J.B. (2000) Stability of hydroxylamino and amino intermediates from reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene. *Biotechnology Letters* 22, 15-19.

Warburg, O. and Christian, W. (1932) "Ein zweites sauerstoffübertragendes Ferment und sein Absorptionsspektrum" *Naturwissenschaften* 20, 688.

Watanabe, M., Nishino, T., Takio, K., Sofuni, T. and Nohmi, T. (1998) Purification and characterisation of wild-type and mutant classical nitroreductases of *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 23922-23928

Williams, R.E., Rathbone, D.A., Moody, P.C., Scrutton, N.S. and Bruce, N.C. (2001) Degradation of explosives by nitrate ester reductases. *Biochemical Society Symposium* 68, 143-153.

Xia, Z.X. and Matthews, F.S. (1990) Molecular structure of flavocytochrome b₂ at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 212, 837-863.

Yano, Y. (2001) Artificial flavin receptors: effects of hydrogen bonding on redox properties of a flavin mimic. *Antioxidants and Redox Signalling* 3, 899-909.

VIII. 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. *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.