

DIOXYGENASY HYDROXYLUJÍCÍ AROMATICKÉ KRUHY – VZTAH STRUKTURY A SUBSTRÁTOVÉ SPECIFITY

JAN ČAPEK, LUCIE MUSILOVÁ, TOMÁŠ MACEK a ONDŘEJ UHLÍK

Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 3, 166 28 Praha 6
ondrej.uhlik@vscht.cz

Došlo 13.5.13, přijato 13.6.13.

Klíčová slova: dioxygenasy, aromatický kruh, hydroxylace, aktivní místo

Obsah

1. Úvod
2. Klasifikace a základní uspořádání dioxygenas hydroxylujících aromatické kruhy
3. Mechanismus účinku dioxygenas hydroxylujících aromatické kruhy
4. Vztah struktury a substrátové specifity dioxygenas hydroxylujících aromatické kruhy
 - 4.1. Substrátová a reakční rozmanitost
 - 4.2. Struktura terminální oxygenasy a její vliv na substrátovou specifitu
 - 4.3. Parametry aktivního místa ovlivňující reakci a výběr substrátů
 - 4.3.1. Koordinace železa a kyslíku
 - 4.3.2. Chemická podstata aktivního místa
 - 4.3.3. Velikost aktivního místa
 - 4.3.4. Flexibilita aktivního místa
 - 4.3.5. Tvar aktivního místa
5. Závěr

1. Úvod

Aromatické dioxygenasy jsou enzymy, které inkorporují dva atomy kyslíku do molekuly substrátu obsahující alespoň jeden aromatický kruh. Jedna skupina dioxygenas produkuje *cis*-hydroxylované metabolity, aniž přitom dojde k poškození základní struktury sloučeniny – tato skupina enzymů se nazývá dioxygenasy hydroxylující aromatické kruhy¹. Druhá skupina pak zavedením dvou atomů kyslíku do substrátu způsobí rozštěpení aromatických kruhů metabolizované sloučeniny. Tato skupina enzymů se nazývá dioxygenasy štěpící aromatické kruhy. Navzdory různým katabolickým strategiím rozklad aromatických látek zahrnuje téměř vždy dva základní kroky: iniciační aktivace

termodynamicky stabilního benzenového kruhu a následné štěpení².

Aromatické dioxygenasy mají nezastupitelnou roli v přírodě, kde jsou využívány některými aerobními kmeny bakterií při odbourávání aromatických sloučenin. Mnoho takových sloučenin, např. benzen, toluen, etylbenzen, xylen (BTEX), polyaromatické uhlovodíky (PAU) nebo polychlorované bifenylly (PCB), jsou časté polutanty. Nabízí se tak možnost využití potenciálu mikrobiálního metabolismu jako bezpečné a ekonomické alternativy ke klasickým fyzikálně-chemickým postupům při revitalizaci krajiny kontaminované těmito látkami^{3–7}. Další text se již zabývá pouze dioxygenasami hydroxylujícími aromatické kruhy.

2. Klasifikace a základní uspořádání dioxygenas hydroxylujících aromatické kruhy

Tyto dioxygenasy jsou vícekomponentové systémy skládající se ze dvou nebo ze tří proteinů, které tvoří reduktasu, elektron-transportní řetězec a terminální oxygenasu. U dvoukomponentových systémů předává reduktasa elektrony rovnou terminální oxygenase. U tříkomponentových systémů elektrony putují z reduktasy na oxygenasu přes ferredoxin¹. Oxygenasa jako jedna složka enzymu bude v následujícím textu uvedena jako terminální oxygenasa – pro jasné odlišení od názvu celého enzymu.

Kromě jednoho druhu reduktas je možné všechny zde zmíněné komponenty enzymů řadit mezi nehemové FeS proteiny. Při studiu dioxygenas hydroxylujících aromatické kruhy se můžeme setkat s motivy vázajícími [2Fe-2S] nebo [3Fe-4S] centra. Skupina [3Fe-4S] je vždy vázána třemi cysteiny. Podle složení aminokyselin podílející se na koordinaci [2Fe-2S] centra rozlišujeme Rieskeho a rostlinný typ. U rostlinného typu je tato skupina koordinována čtyřmi cysteiny na rozdíl od Rieskeho typu, u kterého se na koordinaci podílejí dva histidiny a dva cysteiny⁸.

Kweon a spol.¹ vytvořili nejnovější klasifikační systém, který rozděluje dioxygenasy hydroxylující aromatické kruhy na pět odlišných skupin (tab. I). Jako klasifikační klíč použili strukturní rysy elektron-transportního řetězce. Kromě tohoto klasifikačního systému založeného na struktuře proteinů elektron-transportního řetězce se můžeme ještě setkat s dělením založeným na jiném klasifikačním klíči, které však koresponduje s výše uvedenou klasifikací. Colbert a spol.⁹ publikovali rozdělení příbuzných dioxygenas hydroxylujících aromatické kruhy do tří skupin (skupiny I, II a III) na základě srovnání struktur 25 α podjednotek, přičemž enzymy v jednotlivých skupinách si odpovídají jak strukturně tak i funkčně. Popořadě skupiny I, II a III podle Colberta a spol.⁹ přibližně odpovídají skupinám IV, III a V podle Kweona a spol.¹. Druhý zmíněný klasifikační systém je sestaven z užší množiny

Tabulka I

Klasifikační systém dioxygenas hydroxylujících aromatické kruhy podle Kweona a spol.¹

Klasifikace		Struktura			Příklady	Původ	
Typ	podtyp	podjednotky oxygenasy		elektron-transportní řetězec			
		α	β	typ ferredoxinu	typ reduktasy ^a		
I	I $\alpha\beta$	α	β	FNR _C (P)	anilindioxygenasa	<i>Acinetobacter</i> sp. YAA	
	I α	α			fenoxybenzoátdioxygenasa	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> POB310	
II		α	β	FNR _N (P)	2-halobenzoát-1,2-dioxygenasa	<i>Pseudomonas cepacia</i> 2CBS	
					benzoát-1,2-dioxygenasa	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	
III	III $\alpha\beta$	α	β	[2Fe-2S] FNR _N (P/R)	naftalendioxygenasa	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIB 9816-4	
	III α	α			(R)	karbazol-1,9a-dioxygenasa	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10
IV		α	β	[2Fe-2S] (P/R)	bifenyldioxygenasa	<i>Pseudomonas</i> sp. KKS102	
					GR	dioxindioxygenasa	<i>Sphingomonas</i> sp. RW1
V		α	β	[3Fe-4S]	GR	fenanthrendioxygenasa	<i>Nocardioides</i> sp. KP7
						GR	ftalátdioxygenasa

^aGR – reduktasy náležící do glutationové rodiny, FNR_N – reduktasy náležící do rodiny ferredoxin-NADP reduktas s [2Fe-2S] centrem na N-konci, FNR_C – reduktasy náležící do rodiny ferredoxin-NADP reduktas s [2Fe-2S] centrem na C-konci, P – rostlinný typ [2Fe-2S] centra, R – Rieský typ [2Fe-2S] centra^{1,8}

dioxygenas hydroxylujících aromatické kruhy a až na výjimky neobsahuje dioxygenasy ze skupiny I a II podle Kweona a spol.¹. Nevýhodou tohoto systému je, že vychází z porovnání struktur α podjednotek, které se liší mezi různými kmeny bakterií u stejných enzymů.

3. Mechanismus účinku dioxygenas hydroxylujících aromatické kruhy

Jak již bylo řečeno v úvodu, dioxygenasy neštěpící aromatické kruhy katalyzují regio- a stereospecificky inkorporaci dvou atomů kyslíku do aromatického kruhu substrátu, což je klíčová reakce v transformaci poměrně nereaktivních aromatických sloučenin. Celkově se při reakci spotřebují dva atomy kyslíku, dva elektrony a dva protony.

Studie provedené na naftalen-1,2-dioxygenase detailněji odkryly mechanismus dihydroxylace substrátu. Po iniciační redukci Rieskeho centra jedním externím elektronem dojde k navázání substrátu a následně k navázání a aktivaci kyslíku. K této aktivaci jsou zapotřebí dva elektrony, z nichž jeden je dodán externě a druhý pochází z oxidace železa. Jako nejpravděpodobnější forma aktivovaného kyslíku se jeví hydroperoxoželezitý komplex Fe³⁺-OOH. Takto aktivovaný kyslík atakuje substrát za vzniku *cis*-diolu, který je navázán na atom železa. Pro

uvolnění substrátu proběhne redukce atomu železa druhým externím elektronem a protonace kyslíku¹⁰. Ashikawa a spol.¹¹ navrhli podrobnější mechanismus navázání substrátu a kyslíku podpořený studii na karbazol-1,9a-dioxygenase. Jakmile je zredukováno Rieskeho centrum, dojde k navázání substrátu, který indukuje konformační změny. Tyto změny způsobí odtažení atomu železa i s jeho ligandy od substrátu a tím pádem dojde k vytvoření prostoru pro navázání molekuly kyslíku. Kyslík se může dostat do aktivního místa i bez přítomnosti substrátu, ale v tomto případě se váže jiným způsobem, než který je vhodný pro reakci. Odkud se v reakčním cyklu vezmou protony, je zatím ne zcela vyřešená otázka. Z krystalových struktur nebyly zaznamenány žádné vhodné aminokyseliny poblíž probíhající reakce, které by mohly poskytnout protony, takže pravděpodobně pochází z molekuly vody^{11,12}. Mezi karbazol-1,9a-dioxygenasami byly nalezeny konzervativní aminokyseliny podílející se na koordinaci takovéto molekuly vody¹¹. U naftalendioxygenasy izolované z kmene *Sphingomonas* sp. CHY-1 existuje kanálek ústící do aktivního místa naplněn osmi molekulami vody. Předpokládá se, že molekuly vody v tomto kanálku mohou sloužit jako zdroj protonů¹³.

4. Vztah struktury a substrátové specifity dioxygenas hydroxylujících aromatické kruhy

Podle složení elektron-transportního řetězce mohou být tyto enzymy dvou nebo tříkomponentové. Barriault a Sylvestre¹⁴ experimentálně ukázali, nakořik musí být jednotlivé složky enzymu mezi sebou kompatibilní. Když nahradili reduktasu naftalendioxygenasy reduktasou z bifenyldioxygenasy, tak se aktivita enzymu nezměnila. Naopak při záměně ferredoxinů došlo k značnému poklesu aktivity enzymů. Z tohoto odvodili, že reduktasové komponenty nejsou příliš specifické pro daný enzymatický systém. Naproti tomu interakce nezbytná k transferu elektronů z ferredoxinu na terminální oxygenasu je daleko specifičtější.

Hlavní roli ve výběru substrátu a regio- a stereospecifity má terminální oxygenasa. Do současnosti bylo publikováno několik krystalových struktur terminálních oxygenas a to jak heterohexamerních ($\alpha_3\beta_3$) (cit.^{9,12,13,15–21}), tak i homotrimerních (α_3) (cit.^{22,23}). K těmto přirozeně se vyskytujícím terminálním oxygenasám také přibyly krystalové struktury dvou uměle vytvořených variant P4 a RR41. Varianta P4 vznikla záměnami Thr[335]→Ala a Phe[336]→Met z terminální oxygenasy bifenyldioxygenasy z kmene *Burkholderia xenovorans* LB400. Druhá varianta RR41 vznikla z varianty P4 dalšími třemi mutacemi: Asn[338]→Gln, Ile[341]→Val a Leu[409]→Phe (cit.^{24,25}). Byly získány krystalové struktury i dalších mutantů jiných oxygenas, ale pouze o výše zmíněných dvou variantách se zmiňuje následující text.

Při detailním porovnávání aminokyselinového složení aktivního místa v terminální oxygenase se toto složení liší u stejného enzymu mezi jednotlivými kmeny bakterií. Pro zjednodušení následujícího textu bude daná terminální oxygenasa uvedena jako název enzymu spolu s označením kmene bakterií, ze kterého pochází. Například bifenyldioxygenasa B1 je terminální oxygenasa enzymu bifenyldioxygenasy z kmene *Sphingobium yanoikuyae* B1. Bude-li z odstavce dále jasné, o jakou terminální oxygenasu se jedná, bude po zbytek odstavce uveden jen název enzymu.

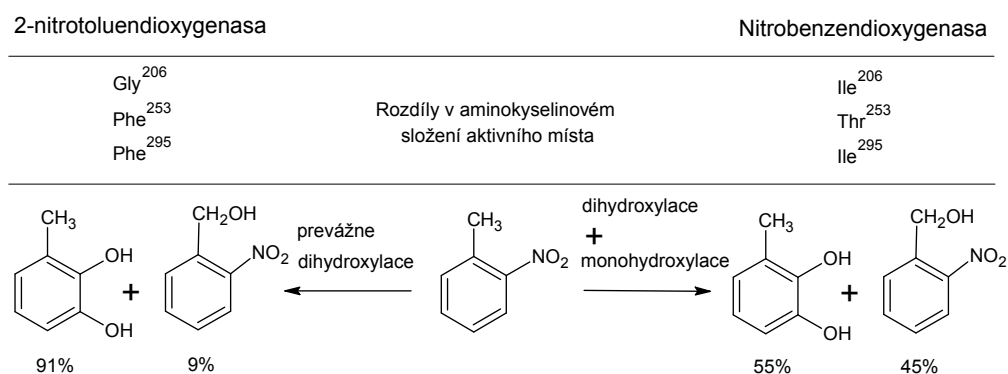
4.1. Substrátová a reakční rozmanitost

Navzdory evoluční specializaci dioxygenas hydroxylujících aromatické kruhy mohou tyto enzymy katalyzovat hydroxylaci širokého spektra strukturně analogických molekul. Chlorbenzendioxygenasa hydroxyluje 1,2-dichlorbenzen, toluen, bifenyl a naftalen²⁶. Naftalendioxygenasa katalyzuje reakci kyslíku s polyaromatickými kondenzovanými uhlovodíky, jako jsou anthracen, fenanthren a floren, s planárními molekulami obsahujícím mimo aromatický kruh také heteroatom, jako jsou dibenzofuran, dibenzothiofen, karbazol a dibenzo-1,4-dioxin, s molekulami obsahujícími jen jeden aromatický kruh, jako jsou styren, indan, anisol, *N*-methylanilin, toluen a ethylbenzen. Dalšími substráty jsou deriváty naftalenu nesoucí methylovou, methoxy- a nitroskupinu²⁷. Barriault a Sylvestre¹⁴ publikovali, že

naftalendioxygenasa je schopna hydroxylovat mimo bifenyl také jeho monochlorované deriváty. Dalším příkladem je toluendioxygenasa využívající substráty s jedním aromatickým kruhem, který může nést atomy halogenů, methylovou, ethylovou, vinylovou, hydroxylvou, nitrilovou, nitro-, methoxy- nebo propoxyskupinu, 2-methoxybifenyl, 2,3-dimethoxybifenyl-1,2-diol nebo bifenyl a jeho monochlorované deriváty. Mimoto dokáže toluendioxygenasa hydroxylovat 2-methoxynaftalen a 1,2-dihydronaftalen, zatím jediné známé substráty tohoto enzymu s kondenzovanými aromatickými kruhy. Mezi další substráty patří indan, inden a indol a malé halogenované alifatické alkeny²⁸. Mezi obzvláště důležitý substrát toluendioxygenasy patří trichlorethen (TCE), který je běžným polutantem podzemní vody. Toluendioxygenasa oxiduje TCE na dva kompletně dechlorované produkty glyoxylát a mravenčan²⁹.

Z hlediska substrátové specifity je intenzivně studována bifenyldioxygenasa. Důvodem je její schopnost oxidovat některé polychlorované bifenyly (PCB) a tím aktivovat tyto jinak inertní molekuly k dalšímu metabolickému zpracování³⁰. Bifenyldioxygenasa katalyzuje první reakci bakteriální bifenylové katabolické dráhy, kterou jsou některými bakteriálními kmeny transformovány některé PCB (cit.^{30,31}). Různé kmeny bakterií se velmi liší ve schopnosti degradovat PCB, nicméně mezi kmeny s největším potenciálem patří *Burkholderia xenovorans* LB400, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, *Pandoraea pnomenus* B-356 či *Rhodococcus jostii* RHA1. Některé z těchto kmenů jsou schopny transformovat kongenery obsahující až 7 atomů chloru⁹. Bifenyldioxygenasa, jakožto enzym zahajující katabolickou dráhu, má zásadní význam pro determinaci substrátové specifity bakterií degradujících PCB (cit.³¹). Mezi další substráty bifenyldioxygenasy patří molekuly s benzenovým nebo bifenylovým skeletem nesoucí různé substituenty – methylovou, ethylovou, vinylovou, karboxylovou nebo nitroskupinu. Bifenyldioxygenasa může oxidovat i bicycklé nebo tricycklé kondenzované sloučeniny, jako jsou chinolin, dibenzofuran a benzo[c]chinolin³².

Ačkoliv jsou tyto enzymy nejvíce známy svou dihydroxylační aktivitou, byly také publikovány i jiné reakce, které katalyzují, např. monohydroxylace, dehydrogenace, *O*- a *N*-dealkylace a sulfoxidace či oxidativní dehalogenační reakce^{29,32,33}. Monohydroxylace může být způsobena sterickými zábranami aktivního místa, které nedovolí substrátu, aby zaujal vhodnou pozici pro dihydroxylaci. Takový důvod k monohydroxylaci lze demonstrovat na příkladu reakce kyslíku s 2-nitrotoluenem katalyzované nitrobenzendioxygenasou JS765 a 2-nitrotoluendioxygenasou JS42. Tyto enzymy se liší jen ve třech aminokyselinách v aktivním místě a celkově sdílí 95 % sekvenční identity. Vznikající produkty jsou uvedeny na obr. 1. U nitrobenzendioxygenasy je jednou z aminokyselin utvářející aktivní místo fenylalanin, který částečně zabírá prostor methylové skupině 2-nitrotoluenu, ta se v zhruba polovině případů nasměřuje k železu místo k fenylalaninu, a proběhne její monohydroxylace. Naopak u 2-nitro-



Obr. 1. Produkty tvořené z 2-nitrotoluenu 2-nitrotoluidioxygenasou z kmene *Pseudomonas* sp. JS42 a nitrobenzendioxygenasou z kmene *Comamonas* sp. Číslování aminokyselin je podle naftalendioxygenasy NCIB 9816-4 (cit.¹⁶)

toluidioxygenasy je na stejné pozici fenylyalanin nahrazen prostorově úspornějším isoleucinem, a tím pádem methylová skupina nebude překážet *cis*-dihydroxylaci aromatického jádra¹⁶.

4.2. Struktura terminální oxygenasy a její vliv na substrátovou specifitu

Terminální oxygenasy tvořené dvěma typy podjednotek jsou heterohexamerní metaloproteiny, které se skládají ze tří α podjednotek a ze tří β podjednotek. Každá α podjednotka s β podjednotkou tvoří $\alpha\beta$ protomer. Takto vzniklé tři protomery se složí dohromady do tvaru mající trojčetnou osu symetrie a připomínající houbu, přičemž α podjednotky tvoří klobouk a β podjednotky tvoří třen^{9,18,19}. Terminální oxygenasy tvořené jedním typem podjednotky se skládají pouze ze tří α podjednotek. Výjimku tvoří ftalaldioxygenasa, která je tvořena pravděpodobně čtyřmi α podjednotkami. Avšak její krystalová struktura zatím není známa³⁴. Struktura oxygenas tvořených třemi α podjednotkami se podobá klobouku α podjednotek u heterohexameru.

Navzdory celkové podobnosti dosud známých β podjednotek je lze rozdělit do dvou kategorií, jež se shodují s dělením α podjednotek do skupin I a II podle Colberta a spol.⁹, resp. IV a III podle Kweona a spol.¹. Jedním z důvodů tohoto dělení byly rozdíly ve strukturálním uspořádání *N*-konce β podjednotky, jež interaguje se sousední β podjednotkou. Dalším důvodem byly rozdíly v interakci s α podjednotkou v $\alpha\beta$ protomeru.

U skupiny I (resp. IV) panuje rozpor, zdali β podjednotka má vliv na substrátovou specifitu. Experimenty zaměřené na vytváření chimérických enzymů (α podjednotka patří oxygenase izolované z jiného kmene bakterií než β podjednotka, α,β) u zástupce této skupiny bifenyldioxygenasy ukázaly, že volba β podjednotky může ovlivnit jak rozsah substrátů, tak i katalytickou aktivitu α podjednotky^{9,35,36}. Hurtubise a spol.³⁵ publikovali vlastnosti dvou chimérických bifenyldioxygenas, u kterých zaměnili β podjednotky terminální oxygenasy mezi dvě-

ma bakteriálními kmeny *Burkholderia xenovorans* LB400 a *Pandoraea pnomemusa* B-356. Vznikly tak tyto chiméry: $\alpha_{B-356}\beta_{LB400}$ a $\alpha_{LB400}\beta_{B-356}$ (zde udává dolní index bakteriální kmen, ze kterého pochází dané podjednotky). Následně u těchto chimér byla sledována katalytická aktivita k různým PCB substrátům. U chiméry $\alpha_{B-356}\beta_{LB400}$ se zjistilo, že její reakční charakteristiky se podobají oxygenase nacházející se v bakteriálním kmenu *Burkholderia xenovorans* LB400 a ne v kmenu *Pandoraea pnomemusa* B-356, ze kterého pocházela α podjednotka. Druhá chiméra $\alpha_{LB400}\beta_{B-356}$ dokonce katalyzovala některé reakce podobně jako bifenyldioxygenasa LB400 a jiné reakce jako bifenyldioxygenasa B-356. Zielinski a spol.³⁷ naopak zastávají názor, že β podjednotka bifenyldioxygenasy má primárně pouze stabilizační význam heterohexameru a nijak se nepodílí na výběru substrátů. Obdobný rozpor panuje i u toluendioxygenasy F1, dalšího zástupce této skupiny³⁸.

β Podjednotka zástupců skupiny II (resp. III) má esenciální význam pouze z hlediska celkové stabilizace terminální oxygenasy. Výsledky experimentů ukázaly, že u naftalendioxygenasy, zástupce skupiny II, nemá β podjednotka vliv na substrátovou specifitu³⁹. Z krystalové struktury naftalendioxygenasy NCIB 9816-4 taktéž vyplynulo, že aminokyseliny β podjednotky jsou příliš daleko od aktivního místa pro ovlivnění jeho vlastností¹².

Navzdory rozdílným názorům o významu β podjednotky se autoři shodují, že správné sestavení jednotlivých podjednotek je naprosto nezbytné ke správné funkci enzymu. Mohammadi a kol.²⁵ příkladně demonstrovali důležitost správného sestavení α a β podjednotky mutací Asn[338]→Gln v α podjednotce oxygenasy bifenyldioxygenasy nazývané P4, což je varianta bifenyldioxygenasy LB400. Tato substituce vedla k nepřesnému sestavení podjednotek a to mělo za následek značné snížení katalytické aktivity nebo její úplnou ztrátu. Je zde třeba poznamenat, že další substitucí Leu[409]→Phe byla terminální oxygenasa schopna se opět správně sestavit.

α Podjednotka terminální oxygenasy je největším dílem zodpovědná za rozpoznání a vazbu substrátu a také za substrátovou specifitu^{31,40}. α Podjednotka se skládá ze

dvou domén: katalytické domény a Rieskeho domény. Katalytická doména váže jeden atom železa. Tvoří ji převážně C-konec terminální oxygenasy, ale přibližně 40 až 60 aminokyselin patří N-konci. Rieskeho doména obsahuje Rieskeho centrum a je tvořena N-koncem bez prvních přibližně 40 až 60 aminokyselin, které patří katalytické doméně^{18,30}. Rieskeho centrum v jedné α podjednotce je ve správně uspořádané kvarterní struktuře terminální oxygenasy velmi blízko atomu železa v aktivním místě sousední α podjednotky, tak aby mezi nimi mohl být uskutečněn přenos elektronů. Tento přenos je zprostředkován aspartátem, jenž může svými dvěma kyslíky vytvářet vodíkový můstek s jedním histidinem v Rieskeho centru a s druhým v aktivním místě³⁰. Důsledkem nahrazení aspartátu jinou aminokyselinou v naftalendioxigenase NCIB 9816-4 byl vznik inaktivního enzymu nebo enzymu jen s nepatrnou aktivitou⁴¹. Tento způsob propojení dvou domén je konzervativní ve všech dosud známých terminálních oxygenasach⁹.

4.3. Parametry aktivního místa ovlivňující reakci a výběr substrátů

4.3.1. Koordinace železa a kyslíku

Atom železa je umístěn v kavitě aktivního místa. Terminální oxygenasa schopná reakce musí mít železo v redukovaném stavu Fe^{2+} , neboť právě tento stav zaručuje optimální prostorové uspořádání do penta-koordinované geometrie ve tvaru pyramidy se čtvercovou podstavou. Toto geometrické uspořádání nechává jednu stranu železa (podstava pyramidy) přístupnou z dutiny aktivního místa a dovoluje mít železu až tři externí ligandy; proto mohou tyto enzymy katalyzovat i velmi komplikované reakce. Pro úspěšné proběhnutí reakce musí být molekula kyslíku na-

vázána bokem. To znamená, že vzdálenosti obou atomů kyslíku od atomu železa jsou podobné. Boční způsob navázání umožňuje oběma atomům kyslíku atakovat sousední atomy na molekule substrátu ze stejné strany aromatického kruhu, tím je dán geometrický isomer reakce a jako produkt dihydroxylace vždy vzniká *cis*-dihydrodiol³⁰.

4.3.2. Chemická podstata aktivního místa

Aromatické substráty, jako jsou toluen, bifenyl či naftalen, jsou nepolární, proto v kavitě aktivního místa z drtivé většiny převládají hydrofobní aminokyseliny. Nicméně jakmile je potřeba ukotvit substráty se silně elektrofilními skupinami, jak je tomu u nitrobenzenu, 2-nitrotoluenu nebo 2,4-dinitrotoluenu, je k jejich fixaci v kavitě zapotřebí dodatečného množství vodíkových můstků. Proto se v kavitách příslušných enzymů nacházejí polární aminokyseliny vykonávající tuto funkci. Demonstrovat tento fakt lze na příkladu nitrobenzendioxigenasy a naftalendioxigenasy (obr. 2). Tyto enzymy vykazují přibližně 80 % sekvenční homologie. Po výměně Asn[260] \rightarrow Val u 2-nitrotoluendioxigenasy byl jako produkt monohydroxylace zjištěn 2-nitrobenzylalkohol. Je také zajímavé, že ačkoliv naftalendioxigenasa dokáže katalyzovat přeměnu širokého spektra substrátů, tak nitrobenzen mezi ně nepatří. Zdá se, že příčinou je neproduktivní orientace nitrobenzenu v kavitě aktivního místa a jedním z důvodů je pravděpodobně nepřítomnost asparaginu na pozici 260. Z těchto skutečností plyne, že vodíkový můstek spojující polární asparagin a nitroskupinu substrátu má důležitý význam v orientaci substrátu, tak aby proběhla dihydroxylace. Valin samozřejmě vytvořit vodíkový můstek nemůže, a tím pádem je substrát jinak orientován. Nejbliže se k atomu železa dostává methylová skupina, na které proběhne monohydroxylace. Ačkoliv je kavita převážně hyd-

Substrát			
Pozice 260	Asn	Mutace	Val
Enzym	Nitrobenzendioxigenasa	Naftalendioxigenasa Val \rightarrow Asn	Naftalendioxigenasa
	2-nitrotoluendioxigenasa	2-nitrotoluendioxigenasa Asn \rightarrow Val	2,4-dinitrotoluendioxigenasa
Hlavní produkt			

Obr. 2. Vliv polarity na pozici 260 na tvorbu produktů z 2-nitrotoluenu. Číslování pozice je podle naftalendioxigenasy NCIB 9816-4 (cit.^{16,43})

robovní, mohou mít i polární aminokyseliny u určitých enzymů důležitý význam a to především pro vhodné ukotvení a orientaci substrátu^{16,30,42}. Nicméně když byl proveden experiment v opačném směru, tedy nahrazení Val[260]→Asn v přírodní naftalendioxygenase, produktem přeměny 2-nitrotoluenu byl opět 2-nitrobenzylalkohol. Možná poněkud překvapivě u enzymu s touto mutací nedošlo k výrazné změně ve složení produktů ani v reakcích s naftalenem, bifenylem či anthracenem v porovnání s přírodní naftalendioxygenasou. Při substituci Thr[351]→Arg, která tímto měnila náboj na příslušném místě, nastala stejná situace⁴³.

4.3.3. Velikost aktivního místa

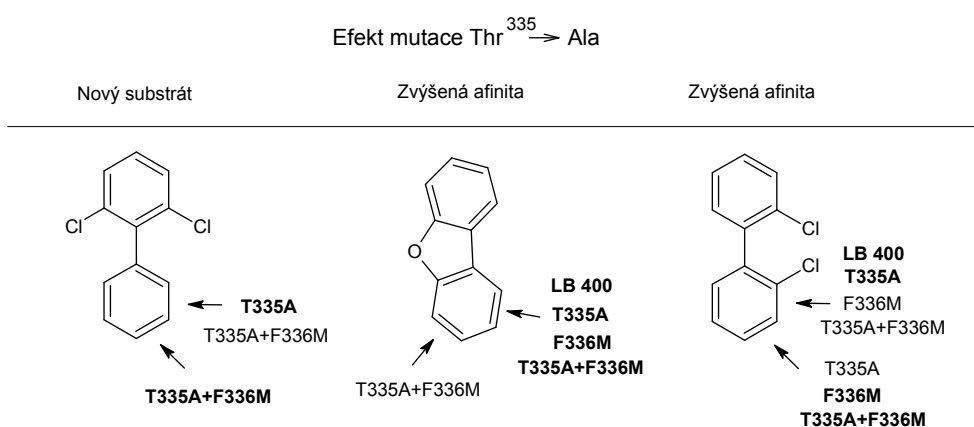
Význam velikosti aktivního místa ve výběru substrátů je především patrný u enzymů, jež jsou schopny hydroxylovat i polyaromatické uhlovodíky s více jak třemi kruhy. Bifenyldioxygenasa B1 a naftalendioxygenasa CHY-1 jsou schopny pojmut substráty až s pěti kondenzovanými kruhy, jako je např. benzo[*a*]pyren. Krystalové struktury potvrdily, že disponují největšími kavitami aktivních míst mezi enzymy s dosud známou krystalovou strukturou terminální oxygenasy. Obě terminální oxygenasy, navzdory názvu bifenyldioxygenasy B1, jsou nejpodobnější naftalendioxygenase NCIB 9816-4, u které ale nebyly zaznamenány reakce s podobně velkými substráty. První z hlavních příčin je velikost aktivního místa. Ze srovnání struktur oxygenas vyplývá, že důležité rozdíly v kompozici aminokyselin se nachází v části kavity, která je vzdálenější od motivu vázající atom železa. Zde došlo k náhradě některých objemných aminokyselin za úspornější, jako například náhrada tryptofanu a fenylalaninu za leuciny u bifenyldioxygenasy B1. Dále došlo u některých aminokyselin k pozměnění prostorového natočení a uspořádání. Druhá z hlavních příčin je širší vstup do aktivního místa spolu s dostatečnou flexibilitou struktur podílející se na jeho

stavbě. V obou případech jsou aminokyseliny kolem vstupu do aktivního místa natolik pohyblivé, aby byly schopny rozšířit vchod do kavity i pro tak objemný substrát, jako je benzo[*a*]pyren na rozdíl od nižší flexibility vstupu u naftalendioxygenasy NCIB 9816-4 (cit.^{13,19}).

4.3.4. Flexibilita aktivního místa

Důležitou roli hraje také flexibilita kavity aktivního místa ve schopnosti přizpůsobit se velikostně i tvarově substrátu. To je zapotřebí především v případě, kdy kavity není dostatečně velká k přijetí substrátu, jak je tomu např. u bifenyldioxygenasy RHA1. Srovnáním krystalových struktur bez navázaného a s navázaným bifenylem byly zjištěny výrazné konformační změny jak v kavitě, tak i ve vstupu do ní¹⁸. Naopak u bifenyldioxygenasy LB400, disponující větší kavitou, nevznikly žádné významné konformační změny po navázání substrátu²⁰. Stejný závěr byl vyvozen i u naftalendioxygenasy NCIB 9816-4, ale důvodem je pravděpodobně dostatečně malá velikost naftalenu¹⁸. Stejnou důležitost, jak již bylo ukázáno, má i flexibilita vstupu do aktivního místa. Ten je tvořen dvěma mobilními smyčkami (LI a LII), které podle struktury substrátu dokáží zaujmout různé konformace tak, aby substrát mohl projít do aktivního místa^{12,13}.

2,6-Dichlorbifenylyl obsahuje dva atomy chloru v pozicích *ortho* na jednom aromatickém kruhu. Takovýto kongener je obzvláště odolný vůči metabolické degradaci aerobními mikroorganismy⁴⁴. Výjimkou je kmen *Pandoraea pnomenus* B-356 schopný degradace tohoto kongeneru⁴⁵. Barriault a Sylvestre²⁴ dokázali vytvořit variantu bifenyldioxygenasy LB400 nazvanou P4, která je na rozdíl od přírodní formy schopna efektivní oxidace 2,6-dichlorbifenyly (obr. 3). Jak již bylo uvedeno, tohoto výsledku dosáhli pouhými dvěma mutacemi Thr[335]→Ala a Phe[336]→Met. Analýza krystalové struktury P4 bez i s navázaným 2,6-dichlorbifenylylem odhalila, že navázání



Obr. 3. Efekt mutací Thr[335]→Ala (T335A) a Phe[336]→Met (F336M) provedených na bifenyldioxygenase z kmene *Burkholderia xenovorans* LB400. Substituce Thr³³⁵→Ala umožňuje přijetí nového substrátu 2,6-dichlorbifenyly bifenyldioxygenasou a zvyšuje afinitu k dibenzofuranu a 2,2'-dichlorbifenyly. Šipky naznačují místo dihydroxylace, přičemž tučný text vyznačuje hlavní produkt tvořený danou variantou enzymu. Lze vidět, že jakmile je přítomna také/jenom mutace F336M dochází k změně regiospecifity. Číslování je podle bifenyldioxygenasy LB400

Tabulka II

Vliv aminokyseliny na pozici 336 vzhledem ke schopnosti bifenyldioxygenasy z kmenů *Burkholderia xenovorans* LB400 a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 dihydroxylovat 4,4'-dichlorbifenyl

Parametr				
Aminokyselina na pozici 336 ^a	fenylalanin	fenylalanin	isoleucin	isoleucin
Sterická charakteristika	prostorově náročný	prostorově náročný	prostorově úsporný	prostorově úsporný
Enzym	přírodní LB400	mutantní KF707	přírodní KF707	mutantní LB400
Afinita k 4,4'-dichlorbifenyly	velmi slabá	žádná	vysoká	vysoká

^a Pozice je číslována podle bifenyldioxygenasy LB400 (u bifenyldioxygenasy KF707 je to pozice 335)

tohoto substrátu je možné díky záměně na pozici 335. Thr[335] není v přímém kontaktu s 2,6-dichlorbifenyly, ale přes vodíkové můstky a jiné nevazebné interakce výrazně omezuje flexibilitu trojaminokyselinového segmentu (Val[320]-Gly[321]-Gln[322]) nacházejícího se v distální části kavity. Gly[321] je součástí tohoto segmentu a je v přímém kontaktu s aromatickým kruhem substrátu neúčastnícím se reakce. Při náhradě Thr[335]→Ala došlo k částečnému eliminování nevazebných interakcí mezi aminokyselinou na pozici 335 a trojaminokyselinovým segmentem. Tento segment se stal flexibilnějším a při navazování 2,6-dichlorbifenyly se pohybuje tak, že vytvoří dostatek prostoru pro jeho produktivní orientaci. Dále díky tomuto flexibilnímu segmentu je oxygenasa P4 schopna několikanásobně rychleji katalyzovat přeměnu 2,2'-dichlorbifenyly a dibenzofuranu ve srovnání s původním enzymem. Varianta RR41, která vznikla z varianty P4 vnesením dalších třech mutací, vyniká v rychlejší oxidaci dibenzofuranu než původní varianta P4. Nicméně základem opět zůstává záměna Thr[335]→Ala zvyšující flexibilitu distální části kavity. U třech nově vnesených mutací ve variantě RR41 není s jistotou určen způsob jejich pozitivního působení^{20,25}.

4.3.5. Tvar aktivního místa

Spolu s flexibilitou a velikostí hraje významnou roli také tvar kavity. Obecně je architektura kavity v souladu s tvarem substrátu. Vzájemný soulad mezi tvarem substrátu a architekturou kavity aktivního místa má zásadní vliv na orientaci substrátu. Pokud kavita nemá takové vlastnosti, aby ukotvila substrát v produktivní orientaci, reakce neproběhne²⁰. Jsou-li přípustné různé orientace substrátu, dochází k tvorbě více regioisomerů a nebo i enantiomerů.

Kavitu aktivního místa lze rozdělit podle vzdálenosti od atomu železa na proximální a distální část. Proximální část bývá více konzervativní, kdežto v distální části je možné nalézt rozdíly i mezi strukturálně jinak velmi podobnými terminálními oxygenasami⁹. Například bifenyldioxygenasa LB400 katalyzuje reakce mnoha PCB kongenerů, ale vykazuje jen velmi slabou aktivitu k *para*-disubstituovaným kongenerům. Jedinou mutací fenylalaninu za

menší isoleucin na pozici 336 (Phe[336]→Ile) byla vytvořena varianta bifenyldioxygenasy LB400 efektivně oxidující 4,4'-dichlorbifenyl⁴⁶. Naopak bifenyldioxygenasa KF707 se vyznačuje degradační schopností vůči 4,4'-dichlorbifenyly a opět jedinou mutací isoleucinu za větší fenylalanin na stejné pozici jako u bifenyldioxygenasy LB400 (Ile[336]→Phe) došlo k odstranění této schopnosti (tab. II)⁴⁷. Logicky vedou tato fakta k závěru, že pro dihydroxylace *para*-disubstituovaných bifenyly je důležitá přítomnost malé hydrofobní aminokyseliny na pozici 336. Ve skutečnosti tomu tak není, protože bifenyldioxygenasa KF707 s alaninem na pozici 336 postrádala schopnost oxidace 4,4'-dichlorbifenyly. Zdá se tedy, že je někdy nutná přesná velikost aminokyseliny, aby byl tvar kavity vyhovující⁴⁷.

5. Závěr

Vztah struktury terminální oxygenasy a její substrátové specifity je založený na vzájemných interakcích mezi kavitou aktivního místa a substrátem. V předchozích kapitolách byly zmíněny základní parametry popisující aktivní místo. Těmito parametry jsou chemická podstata, tvar, velikost a flexibilita aktivního místa. Samozřejmě všechny tyto vlastnosti se současně podílí na celkovém charakteru aktivního místa, a i když byla mutacím připsána zodpovědnost za pozměnění určité vlastnosti, není možné vyloučit jejich vliv na ostatní parametry a celkově vliv na aktivní místo jako celek. Žádná aminokyselina, která má vliv na aktivní místo, není ovlivněna jen svými dvěma kovalentně vázanými sousedy – působí na ni mnoho dalších slabých nevazebných interakcí, jejichž původci jsou aminokyseliny v prostorově blízkém okolí, ale jinak třeba i velmi vzdálené svým pořadím v polypeptidovém řetězci. Síť vodíkových můstků mohou i vzdálenější aminokyseliny ovlivňovat charakter aktivního místa.

Jednoaminokyselinové substituce výrazně ovlivňující určitý parametr aktivního místa jsou vhodné záchytné body při studiu těchto enzymů, neboť se lépe určuje, jakou konkrétní vlastností, či mechanismem působí substituovaná

aminokyselina na substrát. Vícenásobné substituce mohou být kooperativní a pak je obtížnější určit klíčové pozice a vlastnosti aminokyselin. Do vztahu substrát-enzym je také třeba zahrnout vstup do kavity aktivního místa – ten se ukázal jako jedna ze zásadních vlastností při adaptaci na rozměrné substráty.

Jak bylo uvedeno, boční způsob navázání molekuly kyslíku na atom železa udává vznik geometrického *cis*-isomeru. Výsledkem působení kavity aktivního místa na substrát je jeho orientace vzhledem k atomu železa. Tato orientace udává regiospecifitu reakce. Pokud se mohou do blízkosti železa dostat různé dvojice uhlíků, vzniká také více odpovídajících regioisomerů. Naopak pokud se do blízkosti železa dostane jen jeden uhlík, proběhne místo dihydroxylace monohydroxylace.

Práce vznikla za finanční podpory projektu GAČR 13-28283S.

LITERATURA

- Kweon O., Kim S. J., Baek S., Chae J. C., Adjei M. D., Baek D. H., Kim Y. C., Cerniglia C. E.: *BMC Biochem.* 9, 11 (2008).
- Vaillancourt F. H., Bolin J. T., Eltis L. D.: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41, 241 (2006).
- Macková M., Dowling D., Macek T. (ed.): *Phytoremediation and Rhizoremediation. Theoretical Background.* Springer, Dordrecht 2006.
- Boyd D. R., Sharma N. D., Allen C. C. R.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 564 (2001).
- Stiborová M., Hudeček J., Páca J. Jr., Martínek V., Páca J.: *Chem. Listy* 98, 876 (2004).
- Uhlík O., Musilová L., Strejček M., Lovecká P., Macek T., Macková M., v knize: *Phytotechnologies: Remediation of Environmental Contaminants* (Anjum N., Pereira M. E., Ahmad I., Duarte C. A., Umar S., Khan N. A., ed.), kap. 21. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2012.
- Macek T., Macková M., Káš J.: *Biotechnol. Adv.* 18, 23 (2000).
- Friemann R.: *Ph.D. thesis*, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2005.
- Colbert C. L., Agar N. Y. R., Kumar P., Chakko M. N., Sinha S. C., Powlowski J. B., Eltis L. D., Bolin J. T.: *PLoS ONE* 8, e52550 (2013).
- Bassan A., Blomberg M. A., Siegbahn P. M.: *J. Biol. Inorg. Chem.* 9, 439 (2004).
- Ashikawa Y., Fujimoto Z., Usami Y., Inoue K., Noguchi H., Yamane H., Nojiri H.: *BMC Struct. Biol.* 12, 15 (2012).
- Kauppi B., Lee K., Carredano E., Parales R. E., Gibson D. T., Eklund H., Ramaswamy S.: *Structure* 6, 571 (1998).
- Jakončić J., Jouanneau Y., Meyer C., Stojanoff V.: *Febs J.* 274, 2470 (2007).
- Barriault D., Sylvestre M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 592 (1999).
- Dong X., Fushinobu S., Fukuda E., Terada T., Nakamura S., Shimizu K., Nojiri H., Omori T., Shoun H., Wakagi T.: *J. Bacteriol.* 187, 2483 (2005).
- Friemann R., Ivkovic-Jensen M., Lessner D., Yu C., Gibson D., Parales R., Eklund H., Ramaswamy S.: *J. Mol. Biol.* 348, 1139 (2005).
- Friemann R., Lee K., Brown E. N., Gibson D. T., Eklund H., Ramaswamy S.: *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 65, 24 (2009).
- Furusawa Y., Nagarajan V., Tanokura M., Masai E., Fukuda M., Senda T.: *J. Mol. Biol.* 342, 1041 (2004).
- Ferraro D., Brown E., Yu C.-L., Parales R., Gibson D., Ramaswamy S.: *BMC Struct. Biol.* 7, 10 (2007).
- Kumar P., Mohammadi M., Viger J.-F., Barriault D., Gomez-Gil L., Eltis L. D., Bolin J. T., Sylvestre M.: *J. Mol. Biol.* 405, 531 (2011).
- Gakhar L., Malik Z., Allen C., Lipscomb D., Larkin M., Ramaswamy S.: *J. Bacteriol.* 187, 7222 (2005).
- Nojiri H., Ashikawa Y., Noguchi H., Nam J., Urata M., Fujimoto Z., Uchimura H., Terada T., Nakamura S., Shimizu K., Yoshida T., Habe H., Omori T.: *J. Mol. Biol.* 351, 355 (2005).
- Martins B., Svetlitchnaia T., Dobbek H.: *Structure* 13, 817 (2005).
- Barriault D., Sylvestre M.: *J. Biol. Chem.* 279, 47480 (2004).
- Mohammadi M., Viger J.-F., Kumar P., Barriault D., Bolin J. T., Sylvestre M.: *J. Biol. Chem.* 286, 27612 (2011).
- Werlen C., Kohler H.-P. E., van der Meer J. R.: *J. Biol. Chem.* 271, 4009 (1996).
- Liu J., Kang J.: *Naphthalene 1,2-Dioxygenase Reactions*, <http://umbbd.ethz.ch/naph/ndo.html>, staženo 1. května 2013.
- Liu J., Negrete A.: *Toluene Dioxygenase Reactions*, <http://umbbd.ethz.ch/tol/tdo.html>, staženo 1. května 2013.
- Lange C. C., Wackett L. P.: *J. Bacteriol.* 179, 3858 (1997).
- Ferraro D., Gakhar L., Ramaswamy S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 175 (2005).
- Sylvestre M.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54, 153 (2004).
- Vezina J., Barriault D., Sylvestre M.: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15, 139 (2008).
- Resnick S. M., Lee K., Gibson D. T.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17, 438 (1996).
- Tarasev M., Rhames F., Ballou D. P.: *Biochemistry* 43, 12799 (2004).
- Hurtubise Y., Barriault D., Sylvestre M.: *J. Bacteriol.* 180, 5828 (1998).
- Chebrou H., Hurtubise Y., Barriault D., Sylvestre M.: *J. Bacteriol.* 181, 4805 (1999).
- Zielinski M., Backhaus S., Hofer B.: *Microbiology* 148, 2439 (2002).
- Parales R.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 271 (2003).
- Parales R. E., Emig M. D., Lynch N. A., Gibson D. T.:

- J. Bacteriol. 180, 2337 (1998).
40. Pieper D.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 67, 170 (2005).
 41. Parales R. E., Parales J. V., Gibson D. T.: J. Bacteriol. 181, 1831 (1999).
 42. Lee K.-S., Parales J., Friemann R., Parales R.: J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32, 465 (2005).
 43. Parales R., Lee K., Resnick S., Jiang H., Lessner D., Gibson D.: J. Bacteriol. 182, 1641 (2000).
 44. Maltseva O., Tsoi T., Quensen J., III, Fukuda M., Tiedje J.: Biodegradation 10, 363 (1999).
 45. Gómez-Gil L., Kumar P., Barriault D., Bolin J. T., Sylvestre M., Eltis L. D.: J. Bacteriol. 189, 5705 (2007).
 46. Mondello F. J., Turcich M. P., Lobos J. H., Erickson B. D.: Appl. Environ. Microbiol. 63, 3096 (1997).
 47. Suenaga H., Watanabe T., Sato M., Ngadiman, Furukawa K.: J. Bacteriol. 184, 3682 (2002).

J. Čapek, L. Musilová, T. Macek, and O. Uhlík
(*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Aromatic Ring Hydroxylating Dioxygenases – Structure - Function Relationships**

Aromatic ring hydroxylating dioxygenases (ARHDs) catalyze the insertion of molecular oxygen into aromatic rings, forming arenedihydrodiols. ARHDs consist of a terminal oxygenase and an electron transport system. ARHDs are key enzymes in biodegradation of many aromatic pollutants, including both monoaromatic and polyaromatic hydrocarbons, or low-chlorinated biphenyls. In general, ARHDs show broad substrate specificity thus being able to transform various aromatic compounds. This study aims to summarize the current knowledge of ARHDs, including their structure, substrate specificity and the influence of amino acid residues on the enzymes.