

ENZYMY METABOLIZUJÍCÍ KONTAMINANTY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

MARIE STIBOROVÁ^a, JIŘÍ HUDEČEK^a, JAN PÁČA^a JR., VÁCLAV MARTÍNEK^a a JAN PÁČA^b

^aKatedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, ^bFakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
stiborov@natur.cuni.cz, Jan.Paca@vscht.cz

Došlo 4.3.04, přijato 16.6.04.

Klíčová slova: polutanty, biodegradace, metabolismus, enzymy, oxygenasy, peroxidasy, oxidace, redukce

Obsah

1. Úvod
2. Enzymy biotransformující cizorodé látky oxidačními reakcemi
 - 2.1. Monoxygenasy
 - 2.1.1. Flavinové monoxygenasy
 - 2.1.2. Systémy cytochromů P450
 - 2.2. Dioxygenasy
 - 2.2.1. Dioxygenasy neštěpící aromatické kruhy
 - 2.2.2. Dioxygenasy štěpící aromatické kruhy
 - 2.3. Komponenty vícenásobných oxygenasových systémů transportující elektrony
 - 2.3.1. Složky systémů cytochromu P450 transportující elektrony
 - 2.3.2. Elektron-transportující systémy dalších oxygenas
 - 2.4. Peroxidasy
3. Enzymy biotransformující cizorodé látky redukčními reakcemi
 - 3.1. NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (DT-diaforasa)
 - 3.2. Xanthinoxidasa
 - 3.3. NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa
4. Závěr

1. Úvod

S vývojem nových technologií se v životním prostředí začala hromadit značná množství sloučenin, cizorodých látek (xenobiotik), se kterými se organismy dříve neselektovaly. Jedná se o sloučeniny cíleně produkované a využívané v průmyslu nebo zemědělství. Na zdravotní stav lidské populace mají povětšinou negativní vliv. Největším problémem jsou chemické sloučeniny, které jsou pro organismy potenciálně toxické, a dále pak ty, které se v prostředí akumulují a pozměňují tak stav jednotlivých

složek celého ekosystému. V zemích Evropské unie a České republiky se v tomto ohledu objevuje značný problém s kontaminací prostředí např. fenolickými látkami, nitrosloučeninami, aromatickými aminy a průmyslovými barviv. Zdroje kontaminace těmito sloučeninami jsou široké: např. odpadní vody z rafinerií ropy, z provozů tepelného zpracování uhlí, výroben svítíplynu, dehtů, fenolu, barviv, nitrovaných sloučenin, pesticidů, výbušnin, z provozů barvářského a textilního průmyslu, výplachové vody z periodického mytí těchto zařízení, skládky odpadu z výroby výše uvedených sloučenin, a dále tzv. „staré zátěže“, t.j. půdy dlouhodobě kontaminované uvedenými látkami na místech dnes již nepoužívaných technologických provozů¹.

Klasické fyzikálně-chemické technologie jsou pro odstraňování polutantů ze složek životního prostředí většinou ekonomicky velmi nákladné a pro životní prostředí nepříliš šetrné. Snahou je proto využívat výhodnější postupy jako je biologická dekontaminace prostředí pomocí organismů (bioremediace)². Osud a přímé odstranění polutantů z životního prostředí závisí především na jejich metabolismu (biotransformaci) zprostředkovaném enzymovými systémy organismů tvořících trofické řetězce³.

Za biotransformaci cizorodých látek jsou označovány procesy, které by měly vést k jejich snadnému vyloučení z organismu nebo potlačení jejich působení. Zvláštní případ biotransformace je typický pro mikroorganismy. Ty mohou za určitých podmínek toxickou látku nejen transformovat na netoxický produkt, ale mohou xenobiotikum navíc využívat jako substrát pro svůj růst a vývoj. V takovém případě je cizorodá látka po určité fázi biotransformace začleněna přímo do intermediárního metabolismu mikroorganismů.

Studium biotransformace (degradace) kontaminantů životního prostředí jako jsou aromatické uhlovodíky a jejich hydroxylované, chlorované a nitrované deriváty působením mikroorganismů se zaměřuje především na poznání jejich metabolických cest^{4,5}, energetickou účinnost takové metabolické konverze^{6,7}, indukci a represi oxidace xenobiotik⁸, modelování kinetiky degradačních procesů⁹⁻¹¹, sledování inhibičních účinků těchto kontaminantů na růst mikroorganismu^{12,13} i studium růstu buněk na takových látkách za extrémně nízkých růstových rychlostí^{14,15}.

Schopnost degradovat cizorodé sloučeniny mají prokaryotní i eukaryotní mikroorganismy. Z prokaryot byly studovány např. bakterie *Pseudomonas putida*¹⁶, psychrofilní kmen *Pseudomonas putida Q5* (cit.¹⁷), *Commamonas testosteroni*¹⁸, *Alcaligenes sp.*, *Mycobacterium vaccae*¹⁹, *Rhodococcus sp.* a *Paracoccus sp.*²⁰. Z eukaryotních organismů byly pak testovány např. *Candida tropicalis*²¹, *Trichosporon cutaneum*²², *Rhodotorula rubra*, *Cryptococcus sp.*, *Fusarium flocciferum*, *Penicillium sp.*²³. Dodnes se však hledají nové kmeny, které by cizorodé látky degrado-

valy účinněji než kmeny dosud používané, a to buď samostatně nebo ve směsných populacích^{24,25}. Vysvětlení přesného mechanismu degradačních procesů, které je nezbytné pro jejich regulaci (řízení), však dosud chybí.

Předpokladem řízení (usměrňování) degradačních procesů cizorodých látek mikroorganismy, rovněž jako pro výběr nových mikrobiálních kmenů je poznání, které enzymové systémy jsou za metabolismus xenobiotik v jednotlivých fázích disimilace zodpovědné. Cílem příspěvku je informovat o nejefektivnějších enzymech přítomných jak v živočišných, tak i v mikrobiálních organismech, schopných účinně metabolizovat významné polutanty životního prostředí. Z nich je kladen největší důraz na enzymy metabolizující fenolické látky, nitrované sloučeniny, aromatické aminy a některá barviva v tzv. první fázi biotransformace³. Je tomu tak proto, že zatímco metabolity vznikající biotransformací uvedených polutantů jsou již poměrně dobře prozkoumány, informace o enzymech, které je tvoří, jsou dosud nedostatečné. Poznání enzymů metabolizujících polutanty je přitom limitující pro regulaci (modulaci) takových procesů v organismech i pro konstrukci efektivních bioreaktorů, které by tyto kontaminanty účinně odstraňovaly z prostředí. Biologická transformace uvedených sloučenin v první fázi jejich biotransformace probíhá buď oxidační nebo redukční cestou.

2. Enzymy biotransformující cizorodé látky oxidačními reakcemi

Nejpočetnější skupinou enzymů participujících na oxidaci xenobiotik jako jsou aromáty, fenoly, nitroaromáty, aromatické aminy a azobarviva jsou enzymy označované jako oxygenasy (nebo hydroxylasy), a to jak ze skupiny monooxygenas, tak i dioxygenas²⁶. Obě skupiny enzymů pro svoji aktivitu vyžadují molekulu kyslíku a přítomnost kofaktoru, který je schopný jej aktivovat. Jako kofaktory slouží např. přechodné kovy (nejčastěji nehemové i hemové Fe) nebo flaviny^{27–30}. V řadě organismů se jako další enzymy při oxidaci zmiňovaných látek uplatňují také peroxidasy³¹.

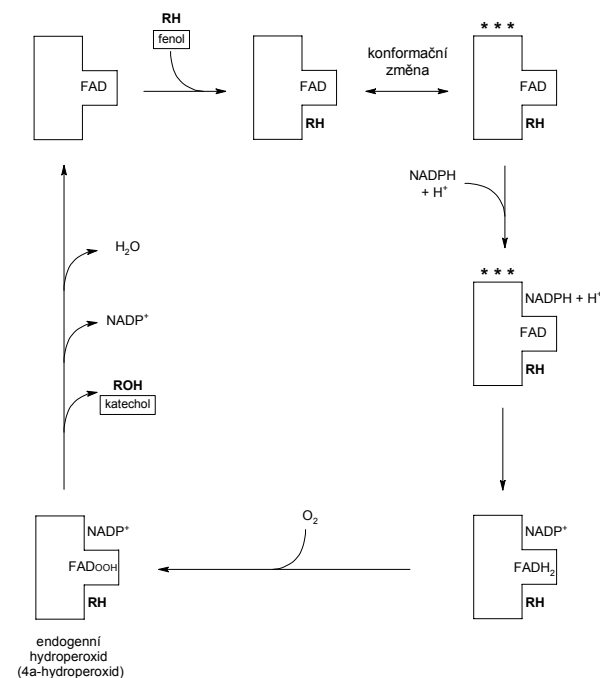
2.1. Monooxygenasy

Monooxygenasy lze klasifikovat do dvou základních skupin. První velkou skupinu monooxygenas tvoří monooxygenasy flavinové. Flavinové monooxygenasy katalyzují monohydroxylaci aromatického kruhu substrátů obsahují buď pouze jeden typ enzymového proteinu²⁸ nebo jsou vícesložkové^{32,33}. Druhou skupinou jsou oxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí („mixed function oxidases“, MFO) obsahující cytochrom P450 (CYP) jako terminální oxidasu^{29,30,34}. Tyto enzymové systémy katalyzují inkorporaci jednoho atomu kyslíku do molekuly hydrofobního substrátu, přičemž druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Monooxygenasy hydroxylují celou škálu polutantů životního prostředí, které jsou uváděny v předkládaném článku.

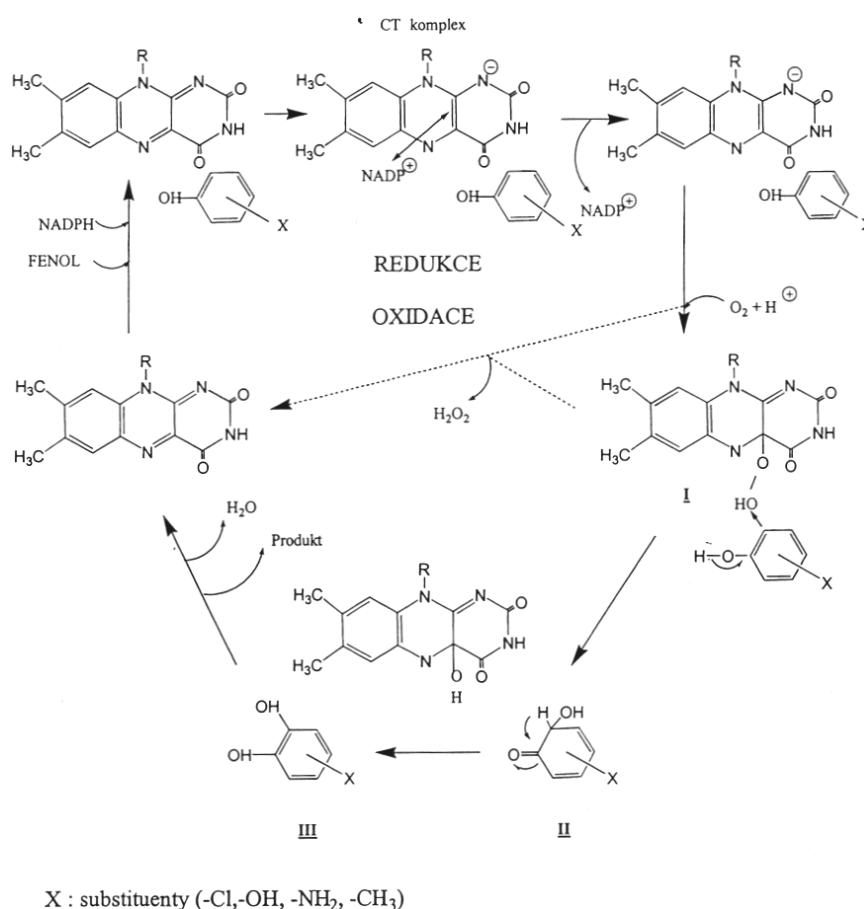
2.1.1. Flavinové monooxygenasy

Flavinové kofaktory jednosložkových monooxygenas mohou existovat v semichinoidních formách schopných reagovat s molekulou kyslíku. Vzniká reaktivní peroxidový intermediát, v němž je kyslík na FAD vázán kovalentní vazbou^{35,36}. Dalším koenzymem je NADPH (cit.^{35,36}).

Reakční cyklus těchto enzymů byl vysvětlen na příkladu flavinové monooxygenasy, *p*-hydroxybenzoát-hydroxylasy³⁷ a fenolhydroxylasy z kvasinky *Trichosporon cutaneum*³⁸. Reakční cyklus (obr. 1) je iniciován vazbou substrátu na proteinovou molekulu enzymu. Tvorbou komplexu enzym-substrát dochází ke konformační změně, která zvyšuje rychlost hydridového přenosu z NADPH na dusíkový atom N5 isoalloxazinového kruhu flavinu až o pět řádů. NADPH je oxidován a FAD redukován na FADH₂, přičemž je kyslík redukován jednoelektronovými reakcemi, nejdříve na superoxidový anionradikál, který dále tvoří 4a-hydroperoxyflavin (komplex I v obrázku 2). Produkt hydroxylace fenolických látek se dále podrobuje změnám za vzniku komplexů II a III, 4a-hydroxyflavinu (obr. 2). Monooxygenasy tohoto typu tedy aktivují biatomickou molekulu kyslíku vazbou na isoalloxazinový kruh flavinového koenzymu za tvorby uvedeného hydroperoxyflavinu^{35,36}. Jestliže je na enzym vázán substrát neobsahující na aromatickém kruhu své molekuly substituent, jenž je donorem elektronů (např. benzoát), k hydroxylaci takového substrátu nedochází. Flavinový peroxid se pak rozkládá na peroxid vodíku a FAD. Substrátem schopným hydroxylace je např. fenol, je-li tento vázán v aktivním centru enzymu, dochází k přeměně 4a-hydroperoxyflavinu na další,



Obr. 1. Reakční cyklus flavinových monooxygenas



Obr. 2. Struktura komplexů flavinů se substráty fenolhydroxylasy

reaktivní intermediát dosud neznámé struktury^{35,36}, jeden atom kyslíku je pak inkorporován do substrátu a druhý zůstává v této fázi reakce ještě vázán ve flavin-4a-hydroxid. Ten je nestabilní a spontánně konvertuje na FAD za uvolnění molekuly vody (cit.³⁹).

Skupina výše uvedených flavinových monooxygenas je tříděna podle velikosti podjednotek. 4-Hydroxybenzoát-hydroxylasa, 4-hydroxyfenylacetát-hydroxylasa a salicylát-hydroxylasa jsou enzymy, s molekulovou hmotností podjednotek okolo hodnoty 45 000 (cit.³⁹⁻⁴¹), molekulová hmotnost podjednotek jiných hydroxylas se pohybuje v rozmezí 60 000 až 80 000 (cit.⁴¹⁻⁴⁴). Většina flavoproteinových monooxygenas inkorporuje novou hydroxylovou skupinu do polohy *ortho*, i když jsou rovněž známy enzymy hydroxylující *para* polohu molekuly substrátu. Další z enzymů této skupiny, *p*-hydroxybenzoát-hydroxylasa z *Pseudomonas cepacia*, je monomer o molekulové hmotnosti 44 000, zatímco stejný enzym jiných mikroorganismů (*Micrococcus*) má molekulovou hmotnost 70 000 (cit.^{45,46}).

Molekuly flavinových monooxygenas, fenolhydroxylasy z kvasinek *Trichosporon cutaneum*^{38,47} a *Candida tropicalis*⁴⁸ a 2,4-dichlorofenolhydroxylasy z *Alcaligenes eutrophus*⁴⁹ (s molekulovou hmotností o 20 000 až 30 000

větší než u *p*-hydroxybenzoát-hydroxylasy) jsou evolučně blízké. Tato skupina monooxygenas se vykazuje 45% sekvenční homologií, zatímco homologie mezi skupinou fenolhydroxylas, dichlorofenolhydroxylasou a *p*-hydroxybenzoát-hydroxylasou je nižší (25 %). Konzervované sekvence jsou lokalizovány ve dvou oblastech. Jednou je N-terminální oblast, v níž je lokalizováno místo pro vazbu ADP části kofaktoru FAD, ev. NADPH (cit.³⁹). Druhá konzervovaná oblast těchto enzymů odpovídá části proteinového řetězce, který je v molekule *p*-hydroxybenzoát-hydroxylasy vymezen aminokyselinovými zbytky Met276 až Ser329 (cit.²⁸).

Jednosložkové monooxygenasy obsahující flavin (FAD) jsou přítomné rovněž v živočišných organismech. Zde jsou lokalizovány v membránách endopasmatického retikula (tzv. Zieglerův enzym). Molekulová hmotnost Zieglerova enzymu je 60 000. Vedle FAD je druhým kofaktorem NADPH. Enzym dále obsahuje ionty Zn²⁺ a Ca²⁺, které však nejsou esenciální pro katalytickou aktivitu^{49,50}. Živočišné flavinové monooxygenasy preferenčně hydroxylují terciární a sekundární aminy. V rostlinách obdobné enzymy (flavinové monooxygenasy) dosud identifikovány nebyly.

Druhý typ monooxygenas obsahuje více proteinových

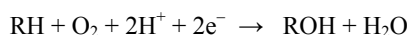
složek^{51,52}. Dvě multikomponentní monoxygenasy z *Pseudomonas sp.* CF600 a *Pseudomonas mendocina* KRI hrají klíčovou roli při katalýze prvních hydroxylačních kroků v degradaci fenolu a toluenu^{51,52}. Multikomponentní fenolhydroxylasa přeměňuje fenol na katechol a druhý enzym, toluen-4-monoxygenasa, katalyzuje zavedení jedné hydroxylové skupiny do *para* polohy aromatického kruhu toluenu. Uvedené reakce jsou podobné reakcím katalyzovaným flavinovými monoxygenasami jednosložkovými, ale struktura těchto vícenásobných monoxygenas je spíše podobná jinému enzymu, konkrétně methanomonooxygenase.

Genetické a biochemické analýzy potvrdily, že v reakcích *in vitro* je hydroxylace fenolů (ev. derivátů polycyklických aromatických sloučenin obsahujících jednu nebo více hydroxylových skupin) katalyzována enzymem složeným z pěti rozdílných polypeptidů, zatímco šest polypeptidových řetězců je zapotřebí pro růst buněk (obsahujících tento enzym) na fenolických substrátech⁵³. Pouze jeden z těchto polypeptidů byl izolován a charakterizován jako elektron transportující komponenta enzymu. Také obdobné studie s toluen 4-hydroxylasou signalizují, že podmínkou funkčnosti enzymu je přítomnost (kooperace) alespoň pěti až šesti podjednotek⁵⁴. Dva z peptidů toluen 4-hydroxylasy, které jsou kódovány geny *tmoA* a *tmoE*, fungují pravděpodobně jako terminální oxidasa, zatímco produkt genu *tmoC* je elektron transportující komponentou⁵⁴. Funkce dalších dvou polypeptidů nebyla dosud určena.

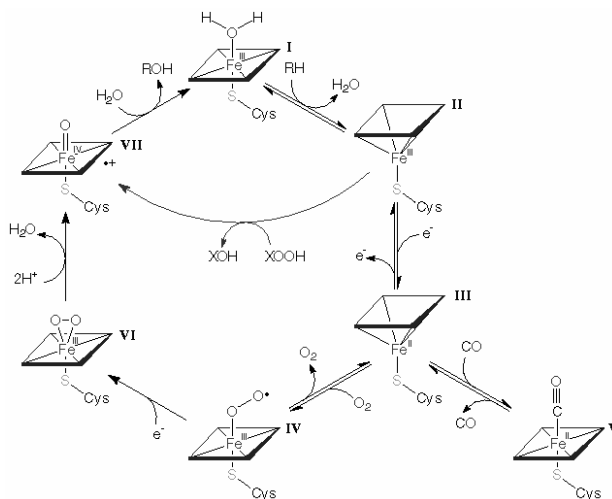
2.1.2. Systémy cytochromů P450

Enzymový systém monoxygenas obsahujících cytochromy P450 je rovněž systém vícenásobný^{29,30,34}. Sestává ze složky hydroxylasové a jedné nebo dvou komponent umožňujících transport elektronů. Častými enzymy uvedeného multisložkového systému jsou hemové enzymy, cytochromy P450 (CYP), a jejich reduktasy (např. NADPH:CYP reduktasa, NADH:cytochrom b₅ reduktasa, ferredoxin reduktasa). Systém cytochromu P450 je v eukaryotických buňkách vázán v membráně hladkého endoplazmatického retikula nebo mitochondrií, zatímco bakteriální cytochromy P450 jsou enzymy rozpustné. Cytochrom P450 je terminální oxidasou tohoto systému^{29,30,34}. NADPH:CYP reduktasa slouží jako dělič elektronového páru dodávající postupně elektrony cytochromu P450 (v tzv. první a druhé redukci cytochromu P450). Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je v proteinové molekule enzymu vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu (pátý ligand železa protoporfyrinu IX). Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování uvedených hemoproteinů a odlišuje je od většiny ostatních hemoproteinů (odlišné spektrální a katalytické vlastnosti)^{55–57}. Šestá ligandem je atom kyslíku molekuly vody. Cytochrom P450 spolupůsobí buď s mikrosomálním NADPH:CYP reduktasou nebo dalšími enzymy lokalizovanými v mitochondriích.

Obecný průběh monoxygenasové reakce katalyzované cytochromem P450 lze vyjádřit sumární rovnicí (kde RH je substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce):



Reakční cyklus cytochromů P450 probíhá uspořádaným mechanismem a sestává alespoň z osmi kroků. Schematicky je znázorněn na obrázku 3. V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (tj. s oxidačním číslem III) a je hexakoordinováno (tedy v nízkospinovém stavu). Šestá valence je obsazena kyslíkem vody nebo interním (aminokyselinovým) ligandem. Po vniknutí substrátu [RH] do aktivního místa dochází k vytlačení šestého ligandu železa, které zůstane pentakoordinované (vysokospinový stav) a zároveň dochází ke konformační změně v molekule enzymu. Tato změna se projeví i změnou spektrálních vlastností cytochromu P450 (posunem absorpčního pásu hemu). Vazbou substrátu je umožněna jednoelektronová redukce cytochromu P450 interakcí s NADPH:CYP reduktasou, čímž se hemové železo redukuje na Fe^{II} (ferro forma), přičemž stále zůstává pentakoordinováno (vysokospinový stav). Tato forma enzymu je pak schopna vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy. Navázáním molekulárního kyslíku se dále tvoří ternární ferri-superoxidový komplex, kde je železo opět hexakoordinované a v nízkospinové formě. Tento nepřilíh stabilní komplex je dále redukován NADPH:CYP reduktasou nebo NADH:cytochrom b₅ reduktasou, čímž dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion. Pokud není druhý elektron doručen dostatečně rychle, komplex se rozpadá a uvolněný superoxidový anionradikál je pak superoxidodismutasou přeměněn na peroxid vodíku. Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku po druhé redukci je již zcela aktivovanou formou cytochromu P450, ve které dochází ke štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a dojde k uvolnění vody. Zatímco druhý zůstane vázán na Fe hemu a vzniká tak



Obr. 3. Reakční cyklus cytochromu P450 (převzato z <http://metallo.scripps.edu/promise>)

ferrioxenový komplex. Ten je stabilizován mezomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Takto vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na Fe hemu. Dochází k rekombinaci radikálů za vzniku nativní formy cytochromu P450 a hydroxyderivátu substrátu [ROH], jenž je z enzymu uvolněn^{29,30,34,58,59}.

V přítomnosti oxidačních činidel, jako jsou organické peroxidy, může z komplexu [III] (obr. 3) vznikat přímo stav [VII] (obr. 3). Cytochrom P450 aktivovaný tímto způsobem je rovněž schopen katalyzovat hydroxylaci substrátů^{29,30}. Tato reakce bývá označována jako peroxidasová aktivita cytochromu P450. Reakce s organickými hydroperoxidy probíhá, na rozdíl od reakce probíhající v přítomnosti NADPH a O₂, neuspořádaným mechanismem, takže vazba peroxidu není závislá na vazbě substrátu. Účinnost oxidace organických substrátů peroxidasovou aktivitou cytochromu P450 je obvykle nižší než reakce za přítomnosti NADPH a O₂, a to především z důvodů významné destrukce samotného enzymu. Bylo zjištěno, že inaktivace cytochromu P450 působením H₂O₂ nebo kumoylhydroperoxidu je způsobena degradací hemu na reaktivní fragmenty. Tyto fragmenty se mohou kovalentně vázat do aktivního centra enzymu, a tak jej ireversibilně inaktivovat⁶⁰.

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (isoenzymech, isoformách), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry (stupně) homologie jejich primární struktury (pořadí aminokyselin) proteinových molekul. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za zkratkou P450. Následuje velké písmeno označující podrodinu^{61–63}.

Cytochromy P450 byly identifikovány v mnoha organismech od prokaryotických organismů po většinu organismů eukaryotických jako jsou např. kvasinky, houby, rostliny či hmyz^{64,65}. Většina těchto enzymů však byla nalezena v organismech živočišných. Molekulové hmotnosti jednotlivých cytochromů P450 se pohybují kolem hodnoty 50 000.

Substrátová specifita cytochromů P450 participujících na biotransformaci xenobiotik je většinou široká. Hydroxylují celou škálu organických sloučenin (např. polutantů, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, alifatické uhlovodíky, polycyklické aromatické nitrosloucheniny, aromatické i alifatické aminy, fenoly, dále pak řadu léčiv i parafarmaceutik). Naopak však existují i CYP enzymy, které hydroxylují pouze malý počet substrátů. Takovými cytochromy P450 jsou enzymy metabolizující endogenní sloučeniny v eukaryotických buňkách (např. steroidní hormony^{29,30}).

Cytochromy P450 mikroorganismů často slouží jako prvotní enzymy přeměňující organické substráty na metabolity využitelné jako zdroj uhlíku a energie pro růst a vývoj těchto organismů. CYP101 označovaný také jako CYP_{cam} (z angl. „camphor“) je bakteriální enzym z *Pseudomonas putida* metabolizující kafr, na němž tyto organismy rostou^{51,66,67}. Zavedením hydroxylové skupiny

do skeletu kafru CYP101 se vlastně zahajuje jeho metabolismus. CYP101 hydroxyluje i další substráty včetně polycyklických aromatických uhlovodíků. U tohoto enzymu je známa nejen jeho primární struktura (je tvořen 414 aminokyselinovými zbytky), ale pomocí roentgenové strukturní krystalografie byla určena i jeho prostorová struktura^{66–68}. Podobně jako CYP101 zahajuje metabolismus dalších xenobiotických susbtrátů (alkanů, mastných kyselin) rodina cytochromů CYP52 exprimovaných v kvasinkách *Candida maltosa*⁶⁹. Cytochrom P450, který hydroxyluje fenol na catechol, byl detegován i v kvasince *Candida tropicalis*⁷⁰. Ačkoliv aminokyselinová sekvence cytochromů P450 se podle rodin enzymů často liší významně, prostorové uspořádání proteinových molekul je zřejmě velmi podobné (především v aktivním centru enzymu). N-terminální doména eukaryotických enzymů, která je zodpovědná za vazbu těchto proteinů v membránách^{71–73}, v cytochremech P450 prokaryotických organismů chybí. Oproti většině systémů cytochromu P450, kde jsou jednotlivé proteinové složky (CYP a reduktasy) separátní proteiny, které spolu interagují nekovalentními interakcemi, je v CYP102 (CYP_{BM-3}) z *Bacillus megaterium* komponenta transportující elektron přímou součástí jednoho proteinu (tzv. elektron transportující – reduktasová – doména enzymu). Enzym má odpovídající větší molekulovou hmotnost, konkrétně 118 000 (cit.²⁶).

Hydroxylace azobarviv a aromatických aminů cytochromy P450 je dobře prozkoumána především v živočišných organismech. Modelově byla studována aromatická aminoazobarviva (především karcinogenní dimethylaminoazobenzen a jeho deriváty) a jeden ze zástupců azobarviv, které neobsahují aminoskupinu ve své molekule (karcinogenní azobarvivo Sudan I, 1-fenylazo-2-hydroxynaftalen)^{74–77}. Živočišné cytochromy P450 podrodiny 1A jsou majoritními enzymy, kterými jsou azobarviva hydroxylována (jak na atomech uhlíku, tak i dusíku jejich molekul)^{77,78}. Hydroxyderiváty azobarviv jsou pak konjugovány na sloučeniny, které jsou snadno exkretovány z organismů. V případě aromatických aminoazobarviv nebo aromatických aminů však hydroxylační reakce nevedou pouze k jejich detoxikaci. V případě N-hydroxylace aminoskupin v jejich molekulách dochází k tvorbě nitreniového nebo karbeniového iontu, které jako silné elektrofilní modifikují biologicky důležité makromolekuly, což vede k iniciaci nádorových procesů. Tvorbu těchto derivátů dokonce potencuje i konjugace N-hydroxylovaných metabolitů s aktivním sulfátem; rozpadem sulfátových konjugátů se totiž nitreniové ionty tvoří ještě ochotněji^{34,73}. V případě azobarviv neobsahující aminoskupinu v molekule je aktivace zprostředkována buď oxidačním štěpením těchto azobarviv na benzendiazoniový ion nebo jednoelektronovými oxidacemi za vzniku radikálů^{74–77}. Specifické cytochromy P450 hydroxylující azobarviva v mikrobiálních buňkách dosud popsány nebyly.

Aromatické nitrosloucheniny jsou hydroxylovány cytochromy P450 na hydroxy-deriváty, které tvoří buď konjugáty substitucí na hydroxyskupině nebo jsou dále přeměňovány dioxygenasami. Cytochromy P450 participu-

jící na takových reakcích jsou především živočišné CYP1A, 2B a CYP2E1 (cit.⁷⁹). Jiná cesta hydroxylace existuje u nitro-aromátů, které obsahují další funkční skupiny (např. alkylové substituenty). Ty jsou cytochromy P450 hydroxylačními reakcemi oxidačně dealkylovány. Těchto reakcí se účastní např. CYP2B a 2E1. Obecně platí, že hydroxylační reakce katalyzované cytochromy P450 vedou k detoxikaci nitro-aromátů⁷⁹.

2.2. Dioxygenasy

Oxygenasy, které inkorporují oba atomy kyslíku do molekuly substrátu (dioxygenasy), jsou dalšími enzymy disimilujícími xenobiotika. Jedna skupina dioxygenas produkuje metabolity s inkorporovanými dvěma atomy kyslíku v molekule substrátu, aniž přitom dojde k poškození základní struktury sloučeniny (např. zachovává aromatické kruhy u aromatických uhlovodíků)²⁶. Druhá skupina pak zavedením dvou atomů kyslíku do substrátu způsobí i rozštěpení aromatických kruhů metabolizované sloučeniny.

2.2.1. Dioxygenasy neštěpící aromatické kruhy

Bakteriální dioxygenasy první skupiny obsahují několik komponent: hydroxylasovou složku a komponentu(y) umožňující transport elektronů. Hydroxylasové složky dioxygenas jsou oligomery tvořené z jednoho nebo dvou typů podjednotek, α_n nebo $(\alpha\beta)_n$ a obsahují většinou [2Fe-2S] centra, ale i další ionty nehemového železa. Přitom oba typy kofaktorů jsou lokalizovány v podjednotce α (cit.⁸⁰⁻⁸²). Molekulová hmotnost podjednotek α a β je 50 000 a 20 000. Aminokyselinová sekvence dioxygenas kyseliny benzoové, benzenu, toluenu a naftalenu signalizuje stejný proteinový základ těchto dioxygenas⁸³. Konzervovanými aminokyselinami α podjednotky je pět histidinů, dva cysteiny a dva tyrosiny²⁶. Redoxní [2Fe-2S] centra těchto dioxygenas jsou pravděpodobně koordinována dvěma cysteylovými a histidylovými zbytky a slouží jako akceptor elektronů z komponenty transportující elektrony. Kyslík je v proteinech těchto dioxygenas vázan na nehemové železo lokalizované v α podjednotce⁸². Předpokládá se, že některé z konzervovaných aminokyselinových zbytků histidinů a tyrosinů, které neparticipují na vazbě [2Fe-2S], koordinují ion tohoto nehemového železa.

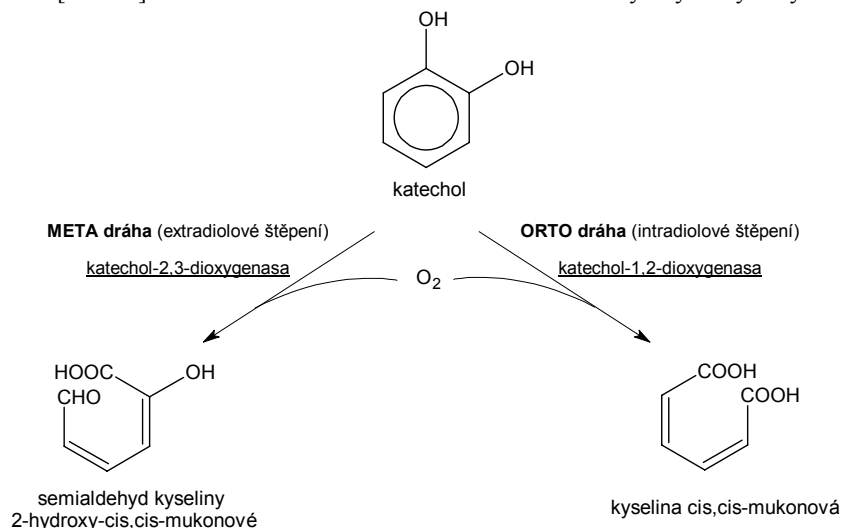
Podjednotky β různých dioxygenas vykazují mnohem menší sekvenční homologii a předpokládá se, že do katalytické aktivity dioxygenasových enzymů nejsou přímo začleněny. Genetické studie signalizují, že β podjednotky mo-

hou být důležité pro substrátovou specifitu daných enzymů⁸⁴. Zdá se, že katalytické centrum hydroxylasové komponenty enzymu může být lokalizováno mezi α a β podjednotkami, přičemž α podjednotka směřuje k uhlíku substrátu, který je oxidován a podjednotka β je důležitá pro rozpoznání struktury substrátu⁸³.

2.2.2. Dioxygenasy štěpící aromatické kruhy

Substráty dioxygenas štěpících aromatické kruhy jsou intermediaáty vzniklé zavedením buď dvou hydroxylových skupin do aromatického kruhu nebo jedné do struktury fenolů. Tímto mechanismem je v mikroorganismech iniciována většina metabolických cest vedoucích k degradaci aromatických sloučenin. K rozštěpení kruhu aromatických dihydroxyderivátů, které jsou vůči sobě v *ortho* poloze, dochází buď v intra- nebo v extradiolové pozici. Obrázek 4 ukazuje jako příklad štěpení aromatického kruhu katecholu. V případě dioxygenas kyseliny gentisové a homogentisové, v nichž jsou hydroxylové skupiny vázány v *para* pozici, dochází ke štěpení kruhu mezi karboxylovým (nebo acetylovým) substituentem a proximální hydroxylovou skupinou²⁶.

První dioxygenasou štěpící aromatické kruhy, u níž byla určena primární struktura, je katechol 2,3-dioxygenasa kodovaná genem *xylE* na TOL katabolickém plasmidu *Pseudomonas putida* mt-2 (cit.⁸⁵). Enzym sestává ze čtyř identických podjednotek o molekulové hmotnosti 32 000 a obsahuje jeden katalyticky esenciální ion Fe^{2+} v každé podjednotce. Reakčním produktem je semialdehyd kyseliny 2-hydroxy-*cis,cis*-mukonové (nebo jeho substituovaný derivát)⁸⁶ (obr. 4). Reakce probíhá bi-uni uspořádaným mechanismem. Nejdříve dochází k vazbě katecholu, která je následována tvorbou ternárního komplexu vazbou molekuly kyslíku. Poté je štěpen aromatický kruh substrátu a tvoří se semialdehyd kyseliny 2-hydroxy-



Obr. 4. Reakce dioxygenas štěpících aromatických kruhů katecholu

cis,cis-mukonové⁸⁷.

Substrátová specifita uvedené dioxygenasy je poměrně široká. Enzym oxiduje řadu alkyl- a chloro-derivátů katecholu. 4-Ethylkatechol je sebevražděným substrátem enzymu, jenž je jím inaktivován oxidací dvojmocného železa na železo trojmocné²⁶. Čtyři katechol 2,3-dioxygenasy z *Pseudomonas*, jedna dioxygenasa 1,2-dihydroxynaftalenu a tři dioxygenasy 2,3-dihydroxybifenylu jsou členy stejné genetické „superrodiny“ (cit.⁸⁸). Naproti tomu katechol 2,3-dioxygenasa z *Alcaligenes eutrophus* je z hlediska aminokyselinové sekvence značně odlišná a je zařazena do jiné proteinové rodiny⁸⁹.

Extradiolové štěpení bylo rovněž zjištěno u jiné sloučeniny, protokatechátu. Protokatechát 4,5-dioxygenasa, která takové štěpení katalyzuje, je tvořena dvěma podjednotkami α a β o molekulové hmotnosti 18 000 a 34 000 s kvarterní strukturou $(\alpha\beta)_2\text{Fe}^{2+}$ (cit.⁹⁰). Primární struktura podjednotek je odlišná od podjednotek katechol 2,3-dioxygenasy, i když byla zjištěna příbuznost mezi podjednotkou β a obdobnou podjednotkou katechol 2,3-dioxygenasy z *Alcaligenes eutrophus*.

Na rozdíl od dioxygenas výše uvedeného typu obsahují dioxygenasy katalyzující intradiolové štěpení aromatického kruhu jako prosthetickou skupinu nehemové železo, které není vázáno v molekule přes atomy síry²⁶. Katechol 1,2-dioxygenasy mnoha mikroorganismů jsou složeny z podjednotek α a β rozdílného aminokyselinového složení, uspořádaných jako $(\alpha,\beta\text{-Fe}^{3+})_n$, některé dioxygenasy jiných mikroorganismů jsou tvořeny jedním polypeptidem $(\alpha\text{-Fe}^{3+})_n$. Existují rovněž enzymy obsahující různé kombinace obou podjednotek⁹¹. Katechol 1,2-dioxygenasy tohoto typu (označované jako katechol 1,2-dioxygenasy I) mají nízkou aktivitu vůči chlorokatecholu. Degradaci této látky katalyzuje chlorokatechol 1,2-dioxygenasa (někdy označovaná také jako katechol 1,2-dioxygenasa II). Tento enzym má širší substrátovou specifitu. Z podobnosti aminokyselinové sekvence vyplývá, že je evolučně blízký katechol 1,2-dioxygenase I (cit.⁹²).

Další sekvenčně příbuznou dioxygenasou je protokatechát 3,4-dioxygenasa. Aktivní centrum enzymu je lokalizováno v prostoru mezi dvěma strukturálně podobnými podjednotkami. Ion trojmocného železa je koordinován v podjednotce β dvěma zbytky tyrosinu a dvěma histidiny, pátá koordináční pozice železa je obsazena molekulou vody. Naproti tomu podjednotka α železo neobsahuje²⁶. Enzym této skupiny, přítomný v *Brevibacterium fuscum*, byl užít k detailnějším studiím mechanismu působení dioxygenas. Čtyři aminokyselinové ligandy a pravděpodobně jeden hydroxylový ion koordinují Fe^{3+} volného enzymu. Po vazbě substrátu do aktivního centra dochází k uvolnění hydroxylového iontu a jednoho histidylového ligandu. Biatomická molekula kyslíku poté atakuje aktivovaný aromatický kruh substrátu, což vede k zavedení obou atomů kyslíku do struktury substrátu²⁶.

Katechol 1,2-dioxygenasa, participující na degradaci fenolů intradiolovým štěpením hydroxylovaného produktu fenolu, katecholu, byla identifikována i v buňkách kvasi-

nek *Candida tropicalis* a *Trichosporon cutaneum*⁹³. Enzym z *Candida tropicalis* vykazuje podobné vlastnosti jako katechol 1,2-dioxygenasy I a II z *Pseudomonas sp.* B13 (cit.⁹³).

2.3. Komponenty vícenosložitých oxygenasových systémů transportující elektrony

2.3.1. Složky systému cytochromu P450 transportující elektrony

Nepostradatelnou složkou mikrosomálního systému cytochromu P450 eukaryotických organismů, sloužící k transportu elektronů, je NADPH:CYP reduktasa. Jedná se o enzym s molekulovou hmotností kolem 80 000 (cit.⁹⁴). Současná přítomnost FAD a FMN v molekule enzymu umožňuje působit jako dělič elektronového páru a redukovat tak cytochrom P450 v sekvenčně oddělených krocích (tzv. první a druhá redukce cytochromu P450, obr. 3). Zdrojem redukčních ekvivalentů je pak další koenzym této reduktasy, NADPH. NADPH:CYP reduktasa je tvořena hydrofilní doménou, která směřuje vně membrány endoplazmatického retikula. Tato část proteinové molekuly enzymu neumožňuje jeho interakci s cytochromy P450, vykazuje však NADPH:cytochrom c reduktasovou aktivitu. Hydrofobní doména enzymu slouží k ukotvení enzymu v membráně a k tvorbě funkčního enzymového systému s cytochromem P450. Detailně je funkce tohoto enzymu popsána v kapitole 3.3.

Druhou redukcí v reakčním cyklu systému cytochromu P450 může zprostředkovat i jiná reduktasa, NADH:cytochrom b_5 reduktasa, která tak v tomto kroku zastoupí NADPH:CYP reduktasu. I v případě tohoto enzymu jde o flavinový protein, podobně jako je tomu u jiných složek oxygenasových systémů transportujících elektrony, ale na rozdíl od nich využívá jako koenzymu NADH (cit.^{29,30,34}).

Některé mitochondriální a bakteriální cytochromy P450 využívají systémy transportující elektrony, tvořené dvěma různými proteiny. Jeden obsahuje [2Fe-2S] ferredoxin a druhý je flavoproteinem. V systému CYP101 (CYP_{cam}) jsou tyto dva proteiny označeny jako putidaredoxin a NADH:putidaredoxin reduktasa. Putidaredoxin přenáší elektrony z NADH:putidaredoxin reduktasy k CYP101. NADH tohoto systému redukuje FAD na FADH₂ a FADH₂ následně redukuje redoxní centrum [2Fe-2S] putidaredoxinu. Redukce hydroxylasové složky systému (CYP101) je zprostředkována redukováným putidaredoxinem, který interaguje s povrchem proteinové molekuly CYP101. Za zásadní jsou považovány elektrostatické interakce mezi karboxylovými skupinami přítomnými na povrchu putidaredoxinu se zbytky argininu a lysinu na povrchu CYP101 (cit.⁹⁵). Uvedený systém je podobný složce transportující elektrony v enzymovém systému mitochondrií, jejíž součástí jsou adrenodoxin a NADH:adrenodoxin reduktasa²⁶.

Komponentou transportující elektrony v systému

cytochromu P450_{scd} z *Streptomyces carbophilus* je také NADPH:CYP_{scd} reduktasa obsahující FMN a FAD. Je tedy podobná eukaryotickým reduktasám tohoto typu, ovšem na rozdíl od nich má nižší molekulovou hmotnost (51 000) (cit.⁹⁶).

Unikátním případem je pak složka transportující elektron CYP102 (CYP_{BM-3}) z *Bacillus megaterium*. Ten je totiž tvořen dvěma doménami, terminální oxidasou cytochromem P450 i NADPH:cytochrom P450 reduktasou, které jsou zde součástí jednoho proteinového řetězce^{30,97}. V eukaryotických buňkách takový typ enzymového systému cytochromu P450 dosud nebyl identifikován.

2.3.2. Elektron-transportující systémy dalších oxygenas

Komponenta transportující elektron řady dioxygenas (např. dioxygenasy benzenu a toluenu) a hydroxylas alkanů je tvořena dvěma odlišnými proteiny²⁶. Prvním je flavoprotein vykazující NAD(P)H:akceptor reduktasovou aktivitu, druhým pak ferredoxin. Flavoproteinová složka obsahuje většinou dvě konzervované oblasti, jednu v blízkosti N-konce proteinové molekuly a druhou lokalizovanou uprostřed řetězce. Ta obsahuje NADH- nebo FAD-vazebný $\beta\alpha\beta$ motiv.

Další typ komponent se vyskytuje jak u dioxygenas (např. dioxygenasy kyseliny benzoové), tak v monoxygenasách (např. multisložkové fenolhydroxylasy nebo methanmonoxygenasy, MMO). Ty jsou tvořeny jedním proteinovým řetězcem, který zprostředkovává přenos elektronů z NADH na hydroxylasovou složku systému^{26,83}. Primární struktury těchto komponent obsahují mnoho konzervovaných úseků, tyto proteiny si jsou tedy navzájem velmi podobné. Jejich N-terminální sekvence jsou blízké ferredoxinům a C-terminální řetězce ferredoxin:NADP reduktasám chloroplastů^{26,83}. Navíc sekvence participující na transportu elektronů, která je silně konzervovaná, obsahuje vazebné domény pro NAD(P)H a FAD. Tato proteinová část je podobná vazebným doménám pro flaviny a NADPH v NADPH:CYP reduktasách⁸³.

Alkanhydroxylasa z *Pseudomonas putida* (*oleovorans*) je tříložkovým proteinovým systémem. Přenos elektronů z NADH k aktivnímu centru membránově vázané hydroxylasové složky systému je zprostředkován NADH:rubredoxin reduktasou o molekulové hmotnosti 41 000 (cit.²⁴²⁸) a rubredoxinem (18 000) (cit.⁹⁸). NADH:rubredoxin reduktasa je velmi podobná NADH:putidaredoxin reduktase systému cytochromu P450 CYP101 a flavoproteinovým oxidoreduktasám jako jsou glutathionreduktasa, *p*-hydroxybenzoáthydroxylasa a lipamiddehydrogenasa²⁸.

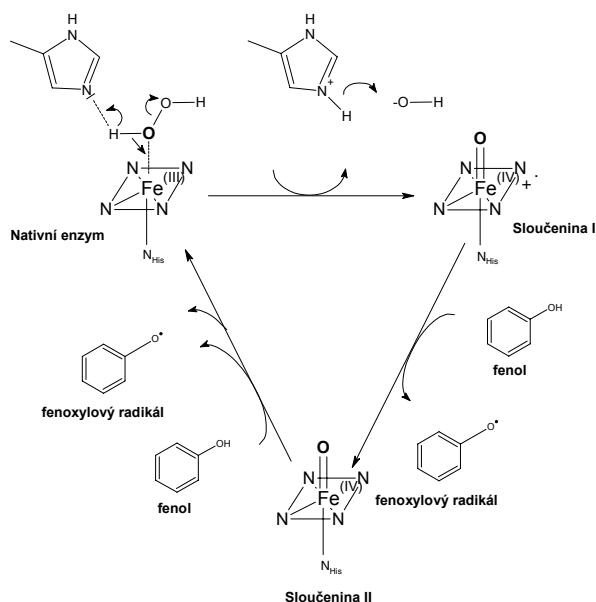
2.4. Peroxidasy

Významnou skupinu enzymů, které jsou efektivní v biotransformaci fenolů, azobarviv a redukčních metabolitů nitro-aromátů či azobarviv, aromatických aminů, reprezentují peroxidasy. Peroxidasy redukují peroxid vodíku (nebo jiné peroxidy) za současné oxidace další sloučeniny

(endogenní látky nebo xenobiotika). Funkcí společnou pro všechny peroxidasy je schopnost detoxikovat H₂O₂, zatímco spektrum oxidovaných sloučenin je velmi široké. Svou širokou substrátovou specifičtostí se peroxidasy blíží monoxygenasovému systému obsahujícímu cytochrom P450. Substráty mohou být látky organické i anorganické. Mezi nejlepší substráty peroxidas lze řadit právě fenoly a dále rovněž aromatické aminy^{31,99,100}. Peroxidasy jsou bohatě zastoupeny především v rostlinné říši a v nižších houbách, méně pak v tkáních živočichů a mikrobiálních buňkách.

Typickou vlastností peroxidas je schopnost katalyzovat velké množství různých typů reakcí [klasické peroxidasové redoxní reakce (vedoucí k dehydrogenaci), halogenace a dehalogenace, oxidace halogenidů, oxidační kondenzace aromatických aminů, oxidační polykondenzace fenolu a jeho derivátů, degradace ligninů, dekarboxylační reakce, oxidační štěpení azoskupiny (vznik diazoniového iontu), disproporcionace peroxidu vodíku katalyzovaná peroxidasami a nedávno nalezenou katalasou-peroxidasou, oxygenace a hydroxylace].

Peroxidasy jsou většinou hemoglykoproteiny³¹, jejichž prosthetickou skupinu tvoří obvykle ferriprotoporfyrin IX. Železo této skupiny má oxidační číslo III a je pentakoordinované^{101,102}, přičemž pátý ligand tvoří dusík histidylového zbytku proteinové části enzymu (obr. 5). Existují peroxidasy s pozmeněným porfyrinovým skeletem, v jiných porfyrinový skelet dokonce chybí. Takové peroxidasy obsahují např. ionty manganu (Mn²⁺) nebo vanadu (V³⁺) (cit.³¹). Právě podle charakteru aktivního místa jsou peroxidasy členěny do tří skupin – hemové peroxidasy, vanadové peroxidasy a ostatní peroxidasy. Nejpočetnější je skupina peroxidas, jejichž katalytické centrum obsahuje hem.



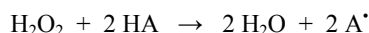
Obr. 5. Reakční cyklus peroxidas za účasti peroxidu vodíku

Obsah glykosidicky vázaných sacharidů se u jednotlivých peroxidas velmi liší a dosahuje až 30 % z celkové molekulové hmotnosti. Relativní molekulová hmotnost funkčních peroxidas se pohybuje v rozmezí 42 000–158 000.

O peroxidasách je známo, že se vyskytují ve velkém množství forem (pravděpodobně isoenzymů). Například křenová peroxidasa (HRP – horseradish peroxidase) se vyskytuje ve čtrnácti formách, laktoperoxidasa v šesti až deseti, myeloperoxidasa ve třech¹⁰³. Jsou-li tyto formy skutečnými isoenzymy, které jsou dány i geneticky podmíněnými rozdíly v primární sekvenci aminokyselin, nebo jsou to formy vzniklé posttranslačními modifikacemi, není známo. Dokonce se zvažuje, nejedná-li se i o arteficiální rozdíly způsobené extrakcí, izolací či způsobem stanovení¹⁰⁴. I když peroxidasy vykazují poměrně nízkou sekvenci homologii, obsahují konzervované úseky, které umožňují velmi podobné uspořádání terciární struktury těchto enzymů, resp. především jejich katalyticky aktivní domény³¹.

V buňkách rostlin a plísni hrají peroxidasy významnou roli při všech oxidačně-kondenzačních procesech, tj. především v procesech lignifikace. Při růstu buněčné stěny jsou do ní vázány monomery, které se prostřednictvím peroxidasy řetězí, poté zesítují, a tak formují matrix buněčné stěny. Jiné peroxidasy (ligninperoxidasa, manganperoxidasa) mají schopnost lignin depolymerovat. Tyto enzymy jsou sekretovány dřevokaznými houbami (např. *Phanerochaete chrysosporium*)¹⁰⁵. Peroxidasy jsou účinné v přeměně řady substrátů včetně xenobiotik jako jsou například benzo(a)pyren, pyren, benz(a)anthracen, anthracen, fenoly, polychlorované fenoly, azobarviva, Remazol Brilliant Blue R^{31,90,91,106}.

Zajímavými enzymy jsou tzv. katalasy-peroxidasy. Řadí se sice do skupiny katalas, ale vyznačují se peroxidasovou aktivitou, která je u těchto enzymů vyšší než jejich aktivita katalasová¹⁰⁷. Jsou schopny jednoelektronových oxidací řady xenobiotických substrátů, především látek fenolických. Reakce probíhá podle rovnice typické pro většinu peroxidas:



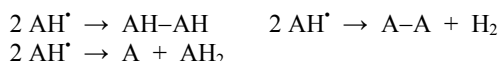
Katalasy-peroxidasy byly izolovány jak z prokaryotických buněk (např. *Escherichia coli*, *Chromatium vinosum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Rhodobacter capsulans*), tak i buněk eukaryotických (dosud dva zástupci, *Septoria tritici* a *Penicillium simplicissimus*)¹⁰⁷. Tyto hemové enzymy se většinou vyskytují ve formě homodimerů o molekulové hmotnosti v rozmezí 150 000 až 200 000 (cit.¹⁰⁷).

Katalytický cyklus peroxidas je zahájen vazbou H₂O₂ nebo jiného peroxidu (ROOH) na nativní peroxidasu, přičemž se enzym aktivuje (obr. 5). Vzniká Sloučenina I (případně Sloučenina ES), která je o dva oxidační ekvivalenty nad nativním enzymem³¹. Tato sloučenina nese aktivovaný kyslík. Struktura tohoto aktivovaného stavu enzymu je z klasického chemického pohledu dosti neobvyklá. Atom kyslíku je v ní kovalentně vázán jako šestý ligand

hemového Fe s formálním oxidačním číslem IV a druhý oxidační ekvivalent je přítomen ve formě ferrylporfyrinového π -kation radikálu (v případě Sloučeniny I) nebo na aminokyselinovém zbytku proteinu, nejčastěji Trp a Tyr (v případě Sloučeniny ES) (cit.³¹, obr. 5). Přítomnost reaktivního radikálu je pravděpodobně příčinou nestability Sloučeniny I a její krátké doby života (v řádech sekund až minut) v závislosti na druhu peroxidasy. Stabilita Sloučeniny I závisí také na koncentraci H₂O₂. V nepřítomnosti redukčního substrátu je peroxidasa velkým množstvím peroxidu degradována³¹.

Reakcí Sloučeniny I (případně ES, cit.³¹) se substrátem (donorem elektronů) vzniká Sloučenina II (cit.^{101,102}) a radikál substrátu. Elektronem vytrženým z molekuly substrátu se doplní deficit na porfyrinovém skeletu nebo na aminokyselinovém zbytku peroxidasy. Bylo zjištěno, že Sloučenina I oxiduje substrát 10–100× rychleji než Sloučenina II (cit.¹⁰⁸). Cyklus se uzavírá reakcí Sloučeniny II s další molekulou substrátu, přičemž se obnoví peroxidasa v základním, nativním stavu (obr. 5).

Radikály vzniklé jednoelektronovou oxidací substrátu jsou obvykle rychle uvolněny z vazebného místa peroxidasy volně do roztoku, kde reagují podle prostředí, ve kterém se vyskytují. A to nejčastěji za vzniku polymeračních nebo oxidačních produktů podle rovnic:



Peroxidasový cyklus odpovídá modifikovanému ping-pongovému mechanismu, kterého se účastní dvě molekuly redukčního a jedna molekula oxidačního substrátu. Oxidace substrátu (AH₂) peroxidasami je zprostředkována dvěma jednoelektronovými přenosy. Existují však výjimky. Bylo totiž zjištěno, že např. jodidy jsou oxidovány Sloučeninou I thyroïdperoxidasy reakcí přenášející dva elektrony. V tomto případě není Sloučenina II intermediátem reakce, ale po uvolnění oxidovaného substrátu je peroxidasa obnovena rovnou do svého základního stavu. Podobně mohou být oxidovány i aromatické sulfidy na sulfoxidy³¹.

Oxidace fenolů, azobarviv a aromatických aminů tvořených též redukcí nitro-aromátů či azobarviv, peroxidasami jsou v literatuře detailně popsány. Oxidační reakce mohou vést jak k detoxikaci xenobiotika, tak i k tvorbě toxičtějších sloučenin. Příkladem takových látek jsou např. azobarviva dimethylaminoazobenzen a Sudan I či aminy benzidin a 2-naftylamin, které jsou peroxidasami aktivovány na metabolity iniciující v živočišných organismech nádorové procesy^{31,100}.

Z poznatků získaných v experimentech *in vitro* vyplývá, že peroxidasy mohou být vysoce účinné v dekontaminaci životního prostředí znečištěného sloučeninami, o jejichž metabolismu předkládaný článek informuje. Uvedené sloučeniny (fenoly, aromatické aminy, azobarviva) jsou oxidovány na volné radikály nebo na chinony a chinoniminy^{31,100,109–111}. Tyto reaktivní oxidační produkty poskytují oligomery nerozpustné ve vodě, které mohou být snadno odstraňovány. V praxi již byly dokonce peroxidasy užity při dekontaminaci půd obsahujících ně-

kteří studované noxy, jmenovitě fenoly a aromatické aminy. V půdním prostředí se totiž oligomerní produkty vážou na humus, čímž výrazně klesá toxicita výchozích látek. Stejně reakce byly také testovány při dekontaminaci půdních sedimentů. Zpětné uvolňování detoxikovaných polutantů z oligomerů nebo humusu probíhá jen ve velmi malém měřítku, proto by oxidační reakce mohly být snadným a bezpečným způsobem dekontaminace^{112,113}. Oxidační reakce zprostředkované peroxidasami by mohly být využívány i pro odstranění fenolů a aromatických aminů z vodných roztoků (odpadních vod).

3. Enzymy biotransformující cizorodé látky redukčními reakcemi

Redukční reakce participují na biotransformaci xenobiotik v menší míře než reakce oxidační. S tím souvisí i skutečnost, že rovněž enzymy katalyzující redukční reakce jsou daleko méně charakterizovány. Jejich identifikace a charakterizace však nabývají v poslední době na významu. Je tomu tak proto, že pro nitro-aromáty (popř. některá azobarviva) redukční reakce reprezentují významnou cestu jejich metabolismu. Z reduktas eukaryotických organismů jsou prozkoumány především enzymy živočišné. Majoritní podíl na redukci nitro-aromátů a azobarviv mají cytoplazmatické enzymy, flavoproteiny xanthinoxidasa a DT-diaforasa [NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa], v menší míře pak aldehydoxidasa, dále membránové enzymy NADPH:CYP reduktasa a částečně aktivní jsou i cytochromy P450 (cit.^{79,114}).

3.1. NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (DT-diaforasa)

Cytoplazmatický enzym NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa je flavoprotein katalyzující dvouelektronové redukce chinonů a chinoidních sloučenin na hydrochinony (bez tvorby radikálových meziproductů). Jako donor elektronů může využívat s obdobnou efektivitou NADH i NADPH (cit.¹¹⁵). Enzym je homodimer, v každém aktivním centru má jednu prosthetickou skupinu FAD. Obě identické podjednotky jsou v „head-to-tail“ uspořádání a každé aktivní centrum je tvořeno částí jedné i druhé podjednotky¹¹⁶.

Chinoidní sloučeniny, vznikající například biotransformací benzenu či benzo[a]pyrenu, se mohou kovalentně vázat na DNA, RNA nebo proteiny. Účastní se také jednoelektronových oxidačně-redukčních pochodů vedoucích k tvorbě oxidativního stresu^{117,118}. Vedle redukce chinonů redukuje NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa rovněž jiná nízkomolekulární xenobiotika, kupříkladu nitrosloučení a azobarviva¹¹⁵.

NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa je indukibilním enzymem. Existuje široká paleta strukturálně odlišných sloučenin majících schopnost indukovat NAD(P)H:chinonoxidoreduktasu, a tím chránit organismy před toxickými efekty řady xenobiotik. Jedná se především o 1,1'-azonaftaleny, analogy azobarviv Sudanu I a Sudanu III, kuma-

riny, flavonoidy, polycyklické aromatické uhlovodíky, sloučeniny obsahující ve své molekule síru, fenolické antioxidanty a další¹¹⁹. Přesný mechanismus indukce NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy nebyl dosud zcela objasněn; existence různých genů v potkaních i lidských játrech svědčí o přítomnosti násobných forem enzymu¹²⁰. NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy patří spolu s cytochromy P450 1A1 a 1A2 mezi enzymy indukované prostřednictvím Ah receptoru. Tímto zřejmě nejdůležitějším mechanismem zajišťují indukcí tohoto enzymu například polycyklické aromatické uhlovodíky a azobarviva¹¹⁹. Antiestrogeny (např. tamoxifen) stimuluje expresi NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy prostřednictvím receptoru specifického pro estrogeny¹²⁰ a některé induktory (např. tert-butylhydrochinon) k indukcii NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy intracelulární receptor nepotřebují¹¹⁹.

3.2. Xanthinoxidasa

Xanthinoxidasa je flavoprotein obsahující ionty molybdenu a železa katalyzující oxidační hydroxylaci řady aromatických heterocyklických sloučenin (z endogenních sloučenin hlavně xanthin a hypoxanthin, dále pak NADH) a aldehydů. V organismech se účastní především odbourávání purinových bází. Z purinů se nejdříve odštěpuje ribosa a uvolněný guanin je deaminován na xanthin. Ten je substrátem xanthinoxidasy, která ho hydroxyluje na uhliku C8 za vzniku kyseliny močové¹²¹.

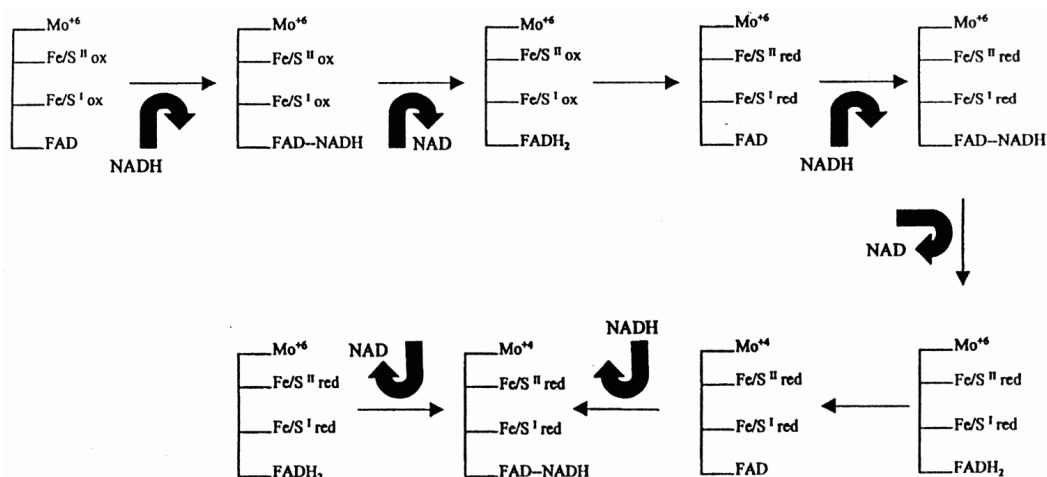
Eukaryotická xanthinoxidasa je homodimer o molekulární hmotnosti 130 000. Každý monomer obsahuje několik funkčních domén (několik systémů přenářející elektrony); dvě domény jsou koordinovány [Fe₂S₂] klastrem, další je doména flavinová. Poslední dvě domény přítomné v molekule enzymu jsou proteinové oblasti vázající dva ionty molybdenu jako kofaktoru. Celý tento komplex cyklicky přechází z plně oxidovaného stavu (Mo^{VI}) do redukováného stavu, Mo^{IV}, cit.¹²²).

Xanthinoxidasa je cytoplazmatický enzym exprimovaný v mnoha tkáních obratlovců, nejvíce v játrech. V jaterní tkáni se enzym vyskytuje též ve formě xanthindehydrogenasy, která vykazuje obdobnou enzymovou aktivitu. Vedle endogenních substrátů metabolizuje xanthinoxidasa i xenobiotika. Komplexní flavinový systém xanthinoxidasy (existence semichinoidních forem isoalloxazinových částí flavinových prosthetických skupin, iontů Mo a Fe, obr. 6) zabezpečuje její efektivní participaci na redukci řady xenobiotik (např. nitroaromátů)¹²¹.

Cytoplazmatická xanthinoxidasa redukuje polycyklické aromatické nitrosloučení (např. mono- a dinitropyreny, nitroareny, 3-nitrobenzanthron, 2-nitroanisol, nitrofenoly, nitrotolueny)^{114,123,124}. Naproti tomu DT-diaforasa byla určena za majoritní enzym redukující nitro-aromáty přírodního původu, aristolochové kyseliny^{125,126}.

3.3. NADPH:cytochrom P450 (CYP) oxidoreduktasa

Mezi nejdůležitější membránově vázaný enzym redu-

Obr. 6. Redukce xanthinoxidasy prostřednictvím NADH (převzato z cit.¹²¹)

kující řadu xenobiotik patří enzym lokalizovaný v membránách endoplazmatického retikula, obsahující oba známé zástupce flavinových kofaktorů, FMN i FAD, jmenovitě NADPH:CYP oxidoreduktasa (NADPH:CYP reduktasa). Tento enzym, membránově vázaný „žlutý protein“, je složkou monoxygenasového systému cytochromů P450, který katalyzuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450 (cit.¹²⁷) (v daném organismu je jedna forma NADPH:CYP reduktasy schopna spolupracovat s více formami CYP). Přenos elektronů byl popsán také na cytochrom c, cytochrom b₅, hem oxygenasu, ferrikyanid, elongasu mastných kyselin a další¹²⁸.

NADPH:CYP reduktasa má dvě funkční domény, hydrofobní N-terminální (6000), kterou je zakotvena v membráně, a hydrofilní C-terminální doménu (72 000)¹²⁹. Účinkem pankreatické proteasy trypsinu lze solubilizovat C-terminální doménu, která je částečně funkční: je schopna přenášet elektrony na cytochrom c a některé arteficiální akceptory elektronů, cytochrom P450 již ale redukovat nedokáže¹²⁹.

C-terminální funkční doména se skládá z FMN- a FAD-vazebné strukturní domény, „spojovací“ struktura umístěná mezi FMN- a FAD-vazebnou doménou pak zodpovídá za správnou prostorovou orientaci obou strukturních domén. FAD a FMN skupiny se vzájemně nepřekrývají, jsou v kontaktu prostřednictvím 7- a 8-methylových skupin isoalloxazinových kruhů, které leží těsně u sebe a svírají úhel zhruba 150°. Přenos elektronů mezi flaviny je tedy patrně přímý, není zprostředkovaný zbytkem aminokyseliny, a proto je tento přenos poměrně rychlý¹²⁹.

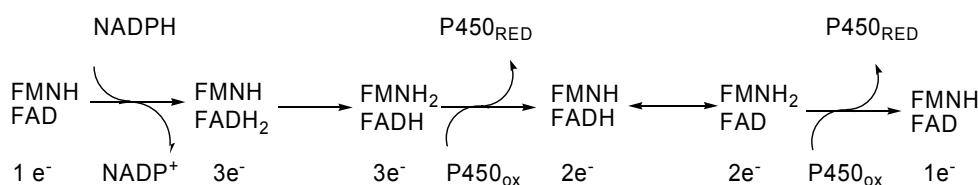
FAD-vazebná doména je zodpovědná za (nekovalentní) vazbu NADPH; pozitivně nabitě aminokyseliny (arginin, lysin) v místě vazby NADPH interagují s negativně nabitou fosfátovou skupinou v poloze 2' ribosy, kterou se tento koenzym liší od NADH, a způsobují tak neobvykle vysokou selektivitu NADPH:CYP reduktasy vůči NADPH (cit.¹²⁹).

FMN-vazebná doména je zodpovědná za přenos elektronů na akceptorovou molekulu (cytochrom P450 nebo cytochrom c). Pyrimidinová strana isoalloxazinového kruhu FMN se nachází v blízkosti povrchu enzymu a je tak snadno dostupná. Elektrony tedy opouštějí NADH:CYP reduktasu z této strany FMN skupiny a jsou přijímány hemem akceptorové molekuly. FMN vazebná doména proto zprostředkovává interakci s akceptorovou molekulou (cytochromem P450 nebo cytochromem c).

Interakce mezi NADPH:CYP reduktasou a cytochromem P450 jsou především elektrostatické povahy – kladně nabitý povrch cytochromu P450 (lysiny, argininy) interaguje se záporně nabitým povrchem NADPH:CYP reduktasy (aspartát, glutamát). Dále se uplatňují také hydrofobní interakce mezi nepolárními aminokyselinami (leucin, tryptofan, valin) v oblasti membránových domén NADPH:CYP reduktasy a cytochromu P450 (cit.¹²⁹).

Funkce NADPH:CYP reduktasy jako děliče elektronového páru byla vysvětlena na základě rozdílů redoxních potenciálů obou flavinových prostetických skupin^{130,131}. Akceptorem elektronů (resp. atomů vodíku) od NADPH je FAD, který elektrony následně předává FMN. Za jedoelektronovou redukcí akceptorové molekuly – cytochromu P450 – je (v případě savčí NADPH:CYP reduktasy) zodpovědný zcela redukovaný hydrochinon FMNH₂ (viz. schema 1).

Vzhledem k tomu, že NADPH:CYP reduktasa a cytochromy P450 jako součásti MFO systému spolu velmi úzce „spolupracují“ při biotransformaci xenobiotik i eobiotik, některé ze sloučenin majících schopnost indukovat cytochromy P450 indukují současně i NADPH:CYP reduktasu, většinou však v menší míře. Doposud nebylo prokázáno, zda k indukci NADPH:CYP reduktasy dochází stejnými mechanismy (prostřednictvím stejných receptorů) jako při indukci cytochromu P450. NADPH:CYP reduktasu indukují např. 3,3',4,4'-tetrachlorbifenyl¹³² a některé dimethylsiloxany¹³³. Dále byla zvýšená aktivita



Schema 1

NADPH:CYP reductasy stanovená v jaterních, ledvinných a plicních mikrosomech u potkanů vystavených čtyřtýdenní inhalaci zplodin motorových vozidel¹³⁴.

NADPH:CYP reductasa je v rámci fylogeneze velmi konzervovaný enzym. NADPH:CYP reductasy z různých mikrobiálních, rostlinných a živočišných druhů vykazují vysokou homologii v aminokyselinové sekvenci (např. lidská a potkaní forma mají sekvenční homologii 92 %, přičemž nejvíce odlišností v aminokyselinové sekvenci se nachází v N-terminální „kotvící“ oblasti, zatímco FMN-vazebná doména je u obou forem téměř shodná¹³⁵). Tento fakt ukazuje na významnou roli tohoto enzymu v průběhu evoluce¹³⁶.

Vedle endogenních substrátů (cytochrom P450, cytochrom c) NADPH:CYP reductasa redukčně metabolizuje i nízkomolekulární substráty včetně cizorodých látek. Substráty tohoto enzymu jsou např. 1,8-dinitropyren¹¹⁴, 3-nitrobenzanthron¹²³, aristolochové kyseliny¹³⁷, dimethylaminoazobenzen¹¹⁴ a jeho metabolit, methylaminoazobenzen¹¹⁴. Cizorodé substráty interagují s doménou proteinové molekuly enzymu, na kterou je vázán koenzym, NADPH, a která je lokalizovaná na opačné straně od N-konce proteinové molekuly enzymu¹³⁸.

Také v případě samotných cytochromů P450 byla zjištěna jejich redukční aktivita vůči nitroaromátům 1-, 2- a 4-nitropyrenu¹¹⁴, 6-nitrochrysenu¹¹⁴, 3-nitrobenzanthronu¹²³ a aristolochovým kyselinám¹³⁷ i azobarvivu dimethylaminoazobenzenu⁷³. Aktivní v takových reakcích jsou především živočišné enzymy podrodin CYP1A, 2B, 2D a 3A.

Redukce nitro-aromátů patří mezi majoritní reakce biotransformace těchto sloučenin také u mikroorganismů. Z mikroorganismů jsou v redukci nitro-aromátů efektivní např. *Pseudomonas aeruginosa*¹³⁹, *P. vesicularis*¹⁴⁰, *P. pseudoalcaligenes*¹⁴¹, *Rhodococcus erythropolis*¹⁴², *Nocardioides sp.* CB22-2 (cit.¹⁴³), aktinomycety a streptomycety¹⁴⁴. Redukčními reakcemi vzniká plejáda metabolitů, v nichž jsou nitroskupiny postupně redukovány na aminoskupiny. Dochází rovněž k denitrozaci. V tomto případě je však otázkou, zda probíhá reakcemi redukčními či oxidačními. Na rozdíl od živočišných organismů je identifikace enzymů zodpovědných za redukční reakce v mikroorganismech teprve v počátcích. V současnosti jsou ve většině případů označovány pouze jako reductasy, u kterých není specifita detailně prozkoumána. Absence poznatků o těchto enzymech je tedy výzvou pro jejich intenzivní studium.

4. Závěr

Poznání komplexních procesů probíhajících při biodegradaci i při tvorbě toxických (karcinogenních) derivátů čtyř skupin kontaminantů životního prostředí (fenolů, nitroaromátů, aromatických aminů a azobarviv) je předmětem grantových projektů řešených v našich laboratořích. Důvod je zřejmý. Detailní rozluštění takových procesů by mohlo být využito pro odstraňování polutantů z kontaminovaných složek životního prostředí nebo k zabránění reakcí iniciujících procesy nádorového bujení v organismech včetně člověka. Zvláštní zřetel je nutno klást nejen na poznání majoritních enzymů metabolizujících uvedené polutanty, ale i na studium vzájemného ovlivnění jednotlivých enzymů v procesu biodegradace, jejich inhibici (modulaci) samotnými noxami a jejich směsí. Poznání metabolických reakcí a enzymů, které je katalyzují, je stěžejní pro biotechnologické konstrukce kmenů mikroorganismů cíleně exprimujících rekombinantní enzymy těch organismů, které nejefektivněji biodegradují studované polutanty. Limitující je i pro přípravu směsných bioreaktorů využitelných v praxi.

Podporováno GA ČR (granty 104/03/0407, 203/03/0283) a MPO ČR (grant FD-K/096).

LITERATURA

1. Singer P. C., Pfander F. K., Chincilli J., Lamb J. C.: *Symp. Proc. Environment. Aspects Fuel Convers. Technol. III*, str. 461. Hollywood, Florida (1977).
2. Kučerová P., Macková M., Poláčková L., Burkhard J., Demnerová J., Macek T.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 1497 (1999).
3. Sandermann H.: *Pharmacogenetics* 4, 225 (1991).
4. Muller R. H., Babel W.: *Acta Biotechnol.* 13, 243 (1993).
5. Nishino S. F., Spain J. C.: *Environ. Sci. Technol.* 27, 489 (1993).
6. Muller R. H., Babel W.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 446 (1994).
7. Muller R. H., Babel W.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 156 (1996).
8. Mason J. R.: *Arch. Microbiol.* 162, 57 (1994).
9. Bae B., Autenriech R. L., Bonner J. S.: *Water Environm. Res.* 67, 215 (1995).
10. Vijayaraghavan S., Srinivasaraghavan T., Musti S.,

- Kar S., Swaminathan T., Baradarajan A.: *Bioprocess. Eng.* **12**, 227 (1995).
11. Limvert E. S. B., Betts W. B.: *Appl. Microbiol.* **43**, 165 (1995).
 12. Wang Y. T., Gabbard H. D., Pai P. C.: *J. Environ. Eng.* **117**, 487 (1991).
 13. Heipieper H. J., Keweloh H., Rehm H. J.: *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1213 (1991).
 14. Muller R. H., Babel W.: *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 147 (1996).
 15. Collins L. D., Dauglis A. J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 182 (1997).
 16. Koturi G., Robinson C. V.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 539 (1991).
 17. Ehrhard H. M., Rehm H. J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 312 (1989).
 18. Páca J. Jr., Páca J., Kostečková A., Stiborová M.: ve Sborníku příspěvků: *VIII. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno 3.–4.2.2003* (Wimmerová, M., Beneš, P. Ed.), str. 59. Vydavatelství MU, Brno-Kraví Hora (2004).
 19. Burbac B. L., Perry J. Z.: *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1025 (1993).
 20. Hensel Z., Straube G.: *Ant. Van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **57**, 33 (1990).
 21. Komárková E., Páca J., Klapková E., Stiborová M., Soccol C. R., Sobotka M.: *Arch. Biol. & Technol.*, **46**, 537 (2003).
 22. Hutshionson D. H., Robinson C. V.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 599 (1988).
 23. Anselmo A. M., Cabral J. M. S., Novais J. M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 200 (1989).
 24. Páca J., Martius G. G. S.: *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **24**, 127 (1996).
 25. Martius G. G. S., Stottmeister U., Jechorek M., Páca J.: *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **24**, 168 (1996).
 26. Harayama S., Kok M., Neidle E. L.: *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 565 (1992).
 27. Ghisla S., Massey V.: *Eur. J. Biochem.* **181**, 1 (1989).
 28. Eggink G., Engel H., Vriend G., Terpstra P., Witholt B.: *J. Mol. Biol.* **121**, 135 (1990).
 29. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: *Chem. Listy* **93**, 229 (1999).
 30. Stiborová M., Hudeček J., Páca J.: *Bull. Čs. Spol. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 57 (2000).
 31. Stiborová M., Mikšanová M., Martínek V., Frei E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **65**, 297 (2000).
 32. Harayama S., Rekik M., Wubbolts M., Rose K., Lep-pik R. A.: *J. Bacteriol.* **171**, 5048 (1989).
 33. Suzuki M., Kayakawa T., Shaw J. P., Rekik M., Harayama S.: *J. Bacteriol.* **173**, 169 (1991).
 34. Guengerich F. P.: *J. Biol. Chem.* **266**, 10019 (1991).
 35. Taylor M. G., Massey V.: *J. Biol. Chem.* **265**, 13687 (1990).
 36. Taylor M. G., Massey V.: *J. Biol. Chem.* **266**, 8281 (1991).
 37. Schreuder H. A., Hol. W. G. J., Drenth J.: *Biochemistry* **29**, 3101 (1990).
 38. Xu D., Ballou D. P., Massey V.: *Biochemistry* **40**, 12369 (2001).
 39. Schreuder H. A., Hol. W. G. J., Drenth J.: *J. Biol. Chem.* **263**, 3131 (1988).
 40. Raju S. G., Kamath A. V., Vaidyanathan C. S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 537 (1988).
 41. You I. S., Murray R. I., Jollie D., Gunsalus I. C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 1049 (1990).
 42. Nurk A., Kasak L., Kivisaar M.: *Gene* **102**, 13 (1991).
 43. Perkins E. J., Gordon M. P., Caceres O., Lurquin P. F.: *J. Bacteriol.* **172**, 2351 (1990).
 44. Zeyer J., Kocher H. P.: *J. Bacteriol.* **170**, 1789 (1988).
 45. Rajasekharan S., Rajasekharan R., Vaidyanathan C. S.: *Arch. Biochem. Biophys.* **278**, 21 (1990).
 46. Wang L. H., Hanzah R. Y., Yu Y., Tu S. C.: *Biochemistry* **26**, 1099 (1987).
 47. Sejlitz T., Neujahr H. Y.: *J. Protein Chem.* **10**, 43 (1991).
 48. Neujahr H. Y., Gaal A.: *Ant. Van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* **40**, 209 (1974).
 49. Ziegler D. M., Pettit F. H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 188 (1964).
 50. Kvasničková E., Hais I. M.: *Česk. Farm.* **XLII**, 315 (1994).
 51. Neidle E., Harnett C., Ornston L., Bairoch N., Rekik M.: *Eur. J. Biochem.* **204**, 113 (1992).
 52. Whited G. M., Gibson D. T.: *J. Bacteriol.* **173**, 3010 (1991).
 53. Powlowski J., Shingler V.: *J. Bacteriol.* **172**, 6834 (1990).
 54. Yen K. M., Karl M. R., Blatt L. M., Simon M. J., Winter R. B.: *J. Bacteriol.* **173**, 5315 (1991).
 55. Anzenbacher P., Dawson J. H., Kitagawa T.: *J. Mol. Struct.* **214**, 149 (1989).
 56. Anzenbacher P., Hudeček J., Stiborová M., Larroque C., Lange R., Heibel G., Hildebrandt P., v knize: *Cytochrome P-450. Biochemistry and Biophysics* (Archakov A.I., Bachmanova G.I., ed.), str. 1. INCO-TNC, Moscow 1992.
 57. Hudeček J., Baumruk V., Anzenbacher P., Munro A. W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 811 (1998).
 58. Coon M. J., Ding X., Pernecky S. J., Vaz A. D. N.: *FASEB J.* **6**, 669 (1992).
 59. Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.: *Chem. Listy* **95**, 212 (2001).
 60. He K., Bornheim L. M., Falick A. M., Maltby D., Yin H., Correia M. A.: *Biochemistry* **37**, 17448 (1998).
 61. Nelson D. R., Kamataki T., Waxman D. J., Guengerich F. P., Estabrook R. W., Feyereisen R., Gonzales F. J., Coon M. J., Gunsalus I. C., Gotoh O., Okada K., Nebert D. W.: *DNA Cell Biol.* **12**, 1 (1993).
 62. Spatzenegger M., Jaeger W.: *Drug Metab. Rev.* **27**, 397 (1995).
 63. Nebert D. W., Nelson D. R., Adesnik M., Coon M. J., Esrabrook R. W., Gonzales F. J., Guengerich F. P.,

- Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper B., Levin W., Phillips J. R., Sato R., Waterman M. R.: *DNA* 8, 1 (1989).
64. Nebert D. W., Gonzalez F. J.: *Annu. Rev. Biochem.* 56, 945 (1987).
 65. Nebert D. W., Nelson D. R., Coom M. J., Estabrook R. W., Feyereisen R.: *Cell Biol.* 10, 1 (1991).
 66. Poulos T. L., Finzel B. C., Gunsalus I. C., Wagner G. C., Kraut J.: *J. Biol. Chem.* 260, 16122 (1985).
 67. Raag R., Poulos T. L.: *Biochemistry* 30, 2674 (1991).
 68. Raag R., Poulos T. L.: *Biochemistry* 28, 7586 (1989).
 69. Zimmer T., Iida T., Schunck W.-H., Yoshida Y., Ohta A., Takagi M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 244 (1998).
 70. Stiborová M., Suchá V., Mikšanová M., Páca J. Jr, Páca J.: *Gen. Physiol. Biophys.* 22, 167 (2003).
 71. Edwards R. J., Murray B. P., Singleton A. M., Boobis A. R.: *Biochemistry* 30, 71 (1991).
 72. Zvelebil M. J. J. M., Wolf C. R., Sternberg M. J. E.: *Protein Eng.* 4, 271 (1991).
 73. Rendic S., DiCarlo F. J.: *Drug Metab. Rev.* 29, 413 (1997).
 74. Stiborová M., Asfaw B., Anzenbacher P., Lešetický L., Hodek P.: *Cancer Lett.* 40, 319 (1988).
 75. Stiborová M., Asfaw B., Anzenbacher P., Hodek P.: *Cancer Lett.* 40, 327 (1988).
 76. Stiborová M., Asfaw B., Frei E., Schmeiser H. H., Wiessler M.: *Chem. Res. Toxicol.* 8, 489 (1995).
 77. Stiborová M., Martínek V., Rýdlová H., Hodek P., Frei E.: *Cancer Res.* 62, 5678 (2002).
 78. Martínek V., Stiborová M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 67, 1883 (2002).
 79. Stiborová M.: *Chem. Listy* 96, 784 (2002).
 80. Enseley B. D., Gibson D. T.: *J. Bacteriol.* 155, 505 (1983).
 81. Subramanian V., Liu T.-N., Yeh W.-K., Serdar C. M., Wackett L. P.: *J. Biol. Chem.* 260, 2355 (1985).
 82. Yamaguchi M., Fujisawa H.: *J. Biol. Chem.* 257, 12497 (1982).
 83. Neidle E. L., Hartnett C., Ornston L. N., Bairoch A., Rekik M.: *J. Bacteriol.* 173, 5385 (1991).
 84. Harayama S., Rekik M., Timmis K. N.: *Mol. Gen. Genet.* 202, 226 (1986).
 85. Nakai C., Kagamiyama H., Nozaki M., Nakazawa T., Inouye S.: *J. Biol. Chem.* 258, 2923 (1983).
 86. Hahn D. R., Solenberg P. J., Baltz R. H.: *J. Bacteriol.* 173, 5573 (1991).
 87. Nozaki M.: *Top. Curr. Chem.* 78, 148 (1979).
 88. Harayama S., Rekik M.: *J. Biol. Chem.* 264, 15328 (1989).
 89. Kabisch M., Fortnagel P.: *Nucleic Acids Res.* 18, 3405 (1990).
 90. Arciero D. M., Lipscomb J. D.: *J. Biol. Chem.* 261, 2170 (1986).
 91. Nakai C., Horiike K., Kuramitsu S., Kagamiyama H., Nozaki M.: *J. Biol. Chem.* 265, 660 (1990).
 92. Harnett C., Neidle E. L., Ngai K.-L., Ornston L. N.: *J. Bacteriol.* 172, 956 (1990).
 93. Krug I., Straube G.: *J. Basic. Microbiol.* 26, 271 (1986).
 94. Benveniste I., Lesot A., Hasenfratz M. P., Kochs G., Durst F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 105 (1991).
 95. Stayton P. S., Sligar S. G.: *Biochemistry* 30, 1845 (1991).
 96. Serizawa N., Matsuoka T.: *Biochim. Biophys. Acta* 1084, 35 (1991).
 97. Li H. Y., Darwish K., Poulos T. L.: *J. Biol. Chem.* 266, 11909 (1991).
 98. Kok M., Oldenhuis R., van der Linden M. P., Meulenbergh C. H., Kingma J.: *J. Biol. Chem.* 264, 5442 (1989).
 99. Stiborová M., Asfaw B., Anzenbacher P.: *FEBS Lett.* 232, 378 (1988).
 100. Eling T. E., Thompson D. C., Foureman G. L., Curtis J. F., Hughes M. F.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 1 (1990).
 101. Smulevich G.: *Biochemistry* 33, 7398 (1994).
 102. Smulevich G., English A. M., Martini A. R., Marzocchi M. P.: *Biochemistry* 30, 772 (1991).
 103. Hoyle M. C.: *Plant Physiol.* 60, 787 (1977).
 104. Borchert R., Decedue C. J.: *Plant Physiol.* 62, 794 (1978).
 105. Farel R. L., Murtagh K. E., Tien M., Mosuch M. D., Kirk T. J.: *Enzyme Microb. Technol.* 11, 322 (1989).
 106. Mikšanová M., Hudeček J., Páca J., Stiborová M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 66, 663 (2001).
 107. Zámocký M.: *Chem. Listy* 92, 875 (1998).
 108. Hayashi Y., Yanazaki J.: *J. Biol. Chem.* 254, 9101 (1979).
 109. Stiborová M., Mikšanová M., Havlíček V., Schmeiser H. H., Frei E.: *Mutat. Res., Fund. Molec. Mech. Mutagen.* 500, 49 (2002).
 110. Dec J., Bollag J. M.: *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1132 (1994).
 111. Nicell J. A., Bewtra K., Biswas N., Taylor K. E.: *Water Res.* 27, 1629 (1993).
 112. Klibanov A. M., Morris E. D.: *Enzyme Microbiol. Technol.* 3, 119 (1981).
 113. Klibanov A. M., Tu T. M., Scott K. P.: *Science* 221, 259 (1983).
 114. Fu P. P.: *Drug Metab. Rev.* 22, 209 (1990).
 115. Segura-Aguilar J., Kaiser R., Lind C.: *Biochim. Biophys. Acta* 1120, 33 (1992).
 116. Li R., Bianchet M. A., Talalay P., Amzel L. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8846 (1995).
 117. Lind C., Vadi H., Ernster L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 97 (1978).
 118. Benson A. M., Hunkeler M. J., Talalay P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 5216 (1980).
 119. De Long M. J., Prochaska H. J., Talalay P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 787 (1986).
 120. Montano M. M., Katzenellenbogen B. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2581 (1997).
 121. Pritsos C. A.: *Chem.-Biol. Interact.* 129, 195 (2000).
 122. <http://us.expasy.org/> staženo 4. prosince 2003.

123. Arlt V. M., Stiborová M., Hewer A., Schmeiser H. H., Phillips D. H.: *Cancer Res.* **63**, 2752 (2003).
124. Stiborová M., Mikšanová M., Smrček S., Bieler C. A., Breuer A., Klokow K. A., Schmeiser H. H., Frei E.: *Carcinogenesis* **25**, 833 (2004).
125. Stiborová M., Frei E., Sopko B., Wiessler M., Schmeiser H. H.: *Carcinogenesis* **23**, 617 (2002).
126. Stiborová M., Frei E., Sopko B., Sopková K., Marková V., Laňková M., Kumstýřová T., Wiessler M., Schmeiser H. H.: *Carcinogenesis* **24**, 1695 (2003).
127. Schacter B. A., Nelson E. B., Marver H. S., Masters B. S. S.: *J. Biol. Chem.* **247**, 3601 (1972).
128. Gut I., Souček P., Hodek P.: *Pracovní lékařství* **1**, 15 (1992).
129. Wang M., Roberts L. D., Paschke R., Shea M. T., Masters S. S. B., Kim P. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 8411 (1997).
130. Vermilion J. L., Ballou D. P., Massey V., Coon M. J.: *J. Biol. Chem.* **256**, 266 (1981).
131. Oprian D. D., Coon M. J.: *J. Biol. Chem.* **257**, 8935 (1982).
132. White R. D., Shea D., Solow A. R., Stegman J. J.: *Biochem. Pharmacol.* **53**, 1029 (1997).
133. Zhang J., Falany J. L., Xie X. W., Falany C. N.: *Chem. - Biol. Interact.* **124**, 133 (2000).
134. Ueng T. H., Hwang W. P., Chen R. M., Wang H. W., Kuo M. L., Park S. S., Guengerich F. P.: *J. Toxicol. Environ. Health* **54**, 509 (1998).
135. <http://www.expasy.ch/> staženo 29. ledna 2004.
136. Shen A. L., Kasper C. B.: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Grove, Springer, Verland, Heidelberg 1993.
137. Stiborová M., Frei E., Wiessler M., Schmeiser H. H.: *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 1128 (2001).
138. Stiborová M., Hájek M., Frei E., Schmeiser H. H.: *Gen. Physiol. Biophys.* **20**, 375 (2001).
139. Noguera D. R., Freedman D. L.: *Appl. Environm. Microbiol.* **62**, 2257 (1996).
140. Davis E. P., Boopathy R., Manning J.: *Curr. Microbiol.* **34**, 192 (1997).
141. Fiorella P. D., Spain J. C.: *Appl. Environm. Microbiol.* **63**, 2007 (1997).
142. Vorbeck C., Lenke H., Fischer P. Spain J. C., Knackmuss H.-J.: *Appl. Environm. Microbiol.* **64**, 246 (1998).
143. Behrend C., Heesche-Wagner K.: *Appl. Environm. Microbiol.* **65**, 1372 (1998).
144. Pasti-Grigsby M. B., Lewis T. A., Crawford D. L., Crawford R. L.: *Appl. Environm. Microbiol.* **62**, 1120 (1996).

M. Stiborová^a, J. Hudeček^a, J. Páca Jr.^a, V. Martínek^a, and J. Páca^b (^a*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University,* ^b*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Study of Enzymes Metabolizing Environmental Pollutants as a Means of Modulating Their Biodegradation**

Enzymes participating in oxidation and reduction of environmental pollutants such as phenols, azo dyes, nitroaromatics and aromatic amines are reviewed. Monooxygenases, enzymes, incorporating one atom of dioxygen into the molecule of substrate, consist of two groups. One of them includes enzymes containing flavins as prosthetic groups, while members of the other group are mixed-function monooxygenases containing heme enzyme cytochrome P450 as a terminal oxidase. Both types of enzymes play a major role in oxidation of xenobiotics in animals and microorganisms, while an additional group of heme enzymes, peroxidases, play a minor role. Dioxygenases utilizing both atoms of a dioxygen molecule are efficient enzymes biodegrading many xenobiotics, mainly in microorganisms. Reductases such as NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase, xanthine oxidase and NAD(P)H:quinone oxidoreductase participate in biotransformation of azo dyes and nitroaromatics in reductive reactions. NADH, NADPH, xanthine or hypoxanthine are employed as cofactors in these reactions. Detailed study of structure and function of the reviewed enzymes might be utilized in modulating biodegradation of xenobiotics in organisms.