



III KONGRES
BIOTECHNOLOGII



PRACE PRZEGLĄDOWE

Molekularne podstawy rozkładu ksenobiotycznych związków aromatycznych

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

Molecular basis for the degradation of aromatic xenobiotic compounds

Summary

Aromatic compounds in the environment can be of natural or anthropological origins. Xenobiotic arenes are found to be weakly degraded because of the presence of stable aromatic ring (due to the delocalization of their π orbitals) and different constituents which can impede biodegradation rate. That's why the cleavage of aromatic ring by dioxygenases of bacterial origin is the critical step in removing of these xenobiotics from environment. Also, monooxygenases play important role in biotransformation of the initial structure to one of the central intermediates: catechol, hydroquinone, protocatechuate or gentisate. In biodegradation of haloaromatics, dehalogenases are the essential enzymes in removing these xenobiotics.

Key words:

xenobiotic, biodegradation, monooxygenase, dioxygenase, dehalogenase.

Adres do korespondencji

Izabela Greń,
Katedra Biochemii,
Wydział Biologii
i Ochrony Środowiska,
ul. Jagiellońska 28,
40-032 Katowice;
e-mail:
izabela.gren@us.edu.pl

1. Pochodzenie związków aromatycznych w środowisku

Związki z pierścieniem aromatycznym stanowią w środowisku dużą grupę związków chemicznych, pochodzenia zarówno antropogenicznego, jak i naturalnego. Aromatyczne polimery lignin obejmują około 25% lądowej biomasy i są drugim, po celulozie, najpowszechniejszym polimerem na Ziemi. Najbardziej typowymi monomerycznymi produktami jej biodegradacji są waniolina i kwas wanilinowy (1).

biotechnologia

2 (81) 58-67 2008

Związki fenolowe stanowią dużą grupę roślinnych metabolitów wtórnych (1). Duże ilości związków o strukturze aromatycznej powstają także w trakcie erupcji wulkanów oraz pożarów lasów, łąk, prerii, przy czym przeważają wśród nich wielopierścieniowe związki aromatyczne (2). Obok związków aromatycznych naturalnego pochodzenia, ogromna ilość tych substancji powstaje w wyniku działalności człowieka. Głównym źródłem, z którego otrzymuje się wiele węglowodorów aromatycznych i ich pochodnych, jest tzw. smoła pogazowa – jeden z produktów koksowania węgla (3). Dioksyny i substancje dioksynopodobne to olbrzymia grupa ksenobiotyków, dostających się do środowiska na skutek działalności przemysłowej człowieka. Powstają one w procesach chemicznych oraz termicznych, do których należą produkcja i degradacja herbicydów, spalanie odpadów komunalnych, szpitalnych i przemysłowych, produkcja stali, żelaza i miedzi, przetwórstwo złomu metalowego, spalanie paliw płynnych i stałych oraz ścieranie opon (4).

2. Z czego wynika słaba degradacja ksenobiotyków o strukturze aromatycznej?

Definicja ksenobiotyku, obejmująca większość leków i trucizn jako substancji nie będących naturalnymi składnikami żywego organizmu, obejmuje także związki chemiczne wytwarzane przez człowieka, o strukturze chemicznej nie występującej w przyrodzie, do których organizmy nie przystosowały się na drodze wcześniejszej ewolucji (5). Trwałość związków aromatycznych i ich odporność na rozkład wynika z obecności w ich strukturze pierścienia aromatycznego, utworzonego przez elektrony znajdujące się na niezhybrydizowanych orbitalach typu *p*. Każdy z atomów węgla pierścienia posiada taki jeden, równocenny, niezhybrydizowany orbital z pojedynczym elektronem. Każdy z orbitali *p* oddziałuje z dwoma sąsiednimi identycznymi orbitalami *p*, co w konsekwencji prowadzi do tego, że dla benzenu sześć elektronów z orbitali *p* jest całkowicie zdelokalizowanych w obrębie pierścienia. W ten sposób płaska struktura benzenu jest od dołu i od góry pokryta chmurą elektronów zdelokalizowanych, które swoją obecnością utrudniają dotarcie do wiązań C-C i wpływają na stabilność struktury tego związku aromatycznego (3). Właściwości fizyczne i chemiczne benzenu ulegają znacznej zmianie, jeżeli w strukturze pierścienia pojawią się podstawniki. Niektóre z nich aktywują pierścień, w efekcie czego łatwiej zachodzą reakcje substytucji i addycji elektrofilowej. Grupami aktywującymi są m.in. podstawnik metylowy (-CH₃) lub hydroksylowy (-OH). Z kolei obecność innych podstawników, takich jak grupa aldehydowa (-CHO), karboksylowa (-COOH), nitrowa (-NO₂), czy atomy chlorowców, powoduje dezaktywację pierścienia aromatycznego (3).

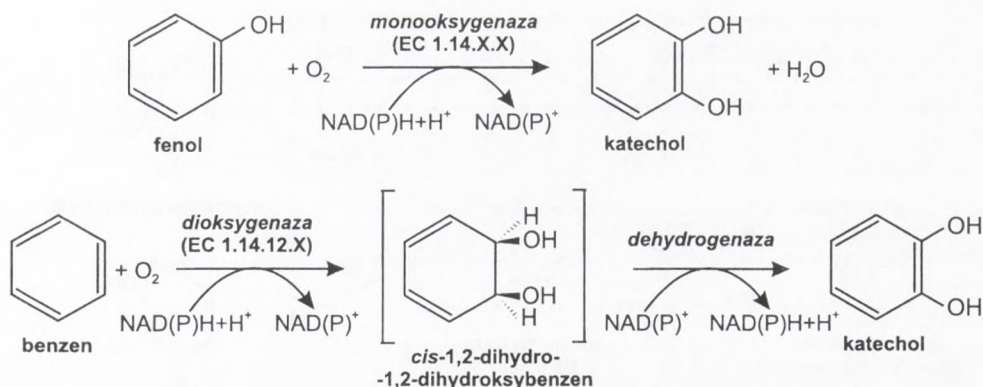
Ciekawą grupę ksenobiotyków o strukturze aromatycznej stanowią chlorofenole. Nie tylko są one wysoce toksycznymi ksenobiotykami, ale mogą także stanowić kataboliczne intermediały, np. rozkładu kwasów chlorofenoksyoctowych, będących

pestycydami. Pierścień aromatyczny chlorofenoli poza funkcyjną grupą hydroksylową zawiera także od jednego do pięciu podstawników chlorowych, które ze względu na swoją dużą elektroujemność mają zdolność wyciągania elektronów typu π z pierścienia aromatycznego, w efekcie czego jest on trudniej biodegradowalny. Dezaktywujący wpływ atomów chloru pogłębia się wraz ze wzrostem liczby tych podstawników w pierścieniu aromatycznym, co jest skorelowane ze wzrostem lipofilności i elektrofilności tych związków (3).

3. Na czym polega biodegradacja ksenobiotycznych związków aromatycznych?

W tlenowej, mikrobiologicznej degradacji ksenobiotyków o strukturze aromatycznej można wyróżnić trzy etapy, wspólne dla większości szlaków degradacji węglowodorów aromatycznych. Są to: hydroksylacja pierścienia, jego rozszczepienie i dalsze utlenienie powstałego układu alifatycznego do intermediatów cyklu Krebsa, a następnie CO_2 i H_2O .

Hydroksylację związków aromatycznych, które posiadają już jedną grupę hydroksylową, jak na przykład chlorofenole, przeprowadzają monoooksygenazy zależne od NAD(P)H [EC 1.14.X.X]. Są to enzymy włączające jeden atom tlenu cząsteczkowego w postaci grupy hydroksylowej do pierścienia aromatycznego, podczas gdy drugi atom tlenu jest redukowany do cząsteczki wody. Proces hydroksylacji benzenu, toluenu, naftalenu i innych związków, których struktura pierwotna nie zawiera grupy hydroksylowej, przebiega najczęściej z udziałem dioksygenaz hydroksylujących [EC 1.14.12.X]. Włączają one dwa atomy tlenu cząsteczkowego poprzez wprowadzenie dwóch grup hydroksylowych do pierścienia aromatycznego, z równoczesnym utlenieniem NAD(P)H. Produktem tej reakcji jest *cis*-1,2-dihydro-1,2-dihydroksybenzen, który następnie jest przekształcany do katecholu przez dehydrogenazę (rys. 1) (6-8). Tego typu transformacja ma na celu zwiększenie rozpuszczalności ksenobiotyku, a przez to zwiększenie jego dostępności dla mikroorganizmów, jak również przygotowanie ksenobiotyku do dalszego etapu rozkładu, wymagającego obecności w pierścieniu dwóch grup hydroksylowych w położeniu *orto* lub *para* względem siebie. Hydroksylacja pierścienia wyjściowej struktury aromatycznej ksenobiotyku może prowadzić do powstania jednego z czterech podstawowych metabolitów pośrednich rozkładu związków aromatycznych: katecholu, kwasu protokatechowego, kwasu gentyzynowego lub hydrochinonu (6-9). Katechol jest produktem pośrednim degradacji benzenu, fenolu, kwasu benzoowego i ich pochodnych. Jest on również centralnym intermediatem szlaków rozkładu naftalenu i bifenyli. Krezole, kwasy benzoowe, gallusowy, ftalowy, jak również lignina podlegają najczęściej mikrobiologicznemu rozkładowi poprzez kwas protokatechowy, jako produkt pośredni degradacji. Kwas gentyzynowy został zidentyfikowany jako centralny intermediat katabolizmu kwasów antranilowego, salicylowego oraz 3-hy-



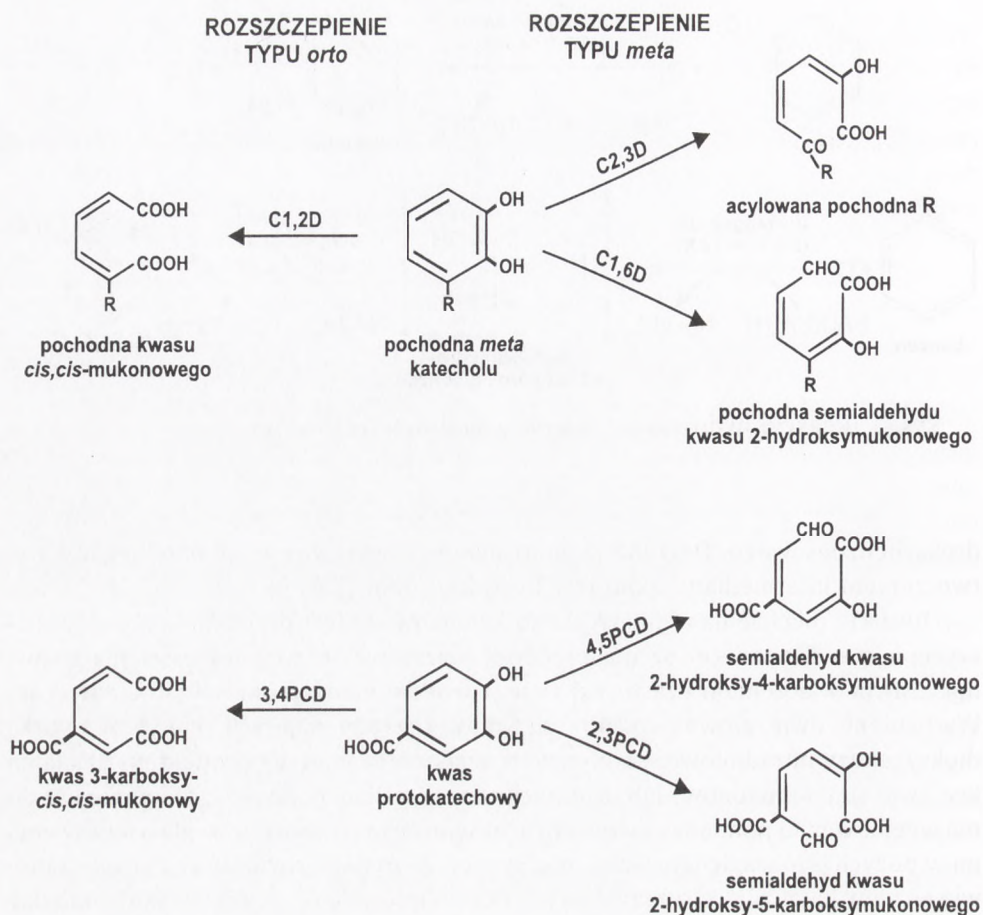
Rys. 1. Reakcje hydroksylacji pierścienia aromatycznego.

droksybenzoesowego. Degradacja *p*-nitrofenolu i rezorcyny może przebiegać z wytworzeniem intermediatu jakim jest hydroksychinol (7,9,10).

Otwarcie pierścienia aromatycznego katalizowane jest przez dioksygenazy rozszczepiające. Enzymy te rozcinają jedno z wiązań węgiel-węgiel pierścienia z równoczesnym włączeniem cząsteczki tlenu, tworząc nienasycone kwasy alifatyczne. Wyróżniono dwie główne rodziny enzymów rozszczepiających. Pierwszą tworzą dioksygenazy intradiolowe, czyli enzymy szlaku *orto*, których produktem działania jest kwas *cis,cis*-mukonowy lub jego pochodne. Katalizują one rozszczepienie wiązania węgiel-węgiel pomiędzy dwoma hydroksylowanymi atomami węgla usytuowanymi w pozycji *orto* względem siebie w pierścieniu aromatycznym. Drugą grupę stanowią enzymy katalizujące rozszczepienie ekstradiolowe *meta*, które zachodzi między hydroksylowanym atomem węgla w pierścieniu a sąsiadującym węglem niehydroksylowanym. W wyniku tej reakcji powstaje semialdehyd kwasu 2-hydroksymukonowego lub jego pochodne. W zależności od rozszczepianego substratu wyróżniono dioksygenazy: katecholowe, kwasu protokatechowego, gentyzynowego (rozszczenie pierścienia aromatycznego pomiędzy węglem podstawionym grupą hydroksylową a sąsiednim węglem z podstawnikiem karboksylowym) oraz hydrochinonowe (rys. 2) (6,9-11).

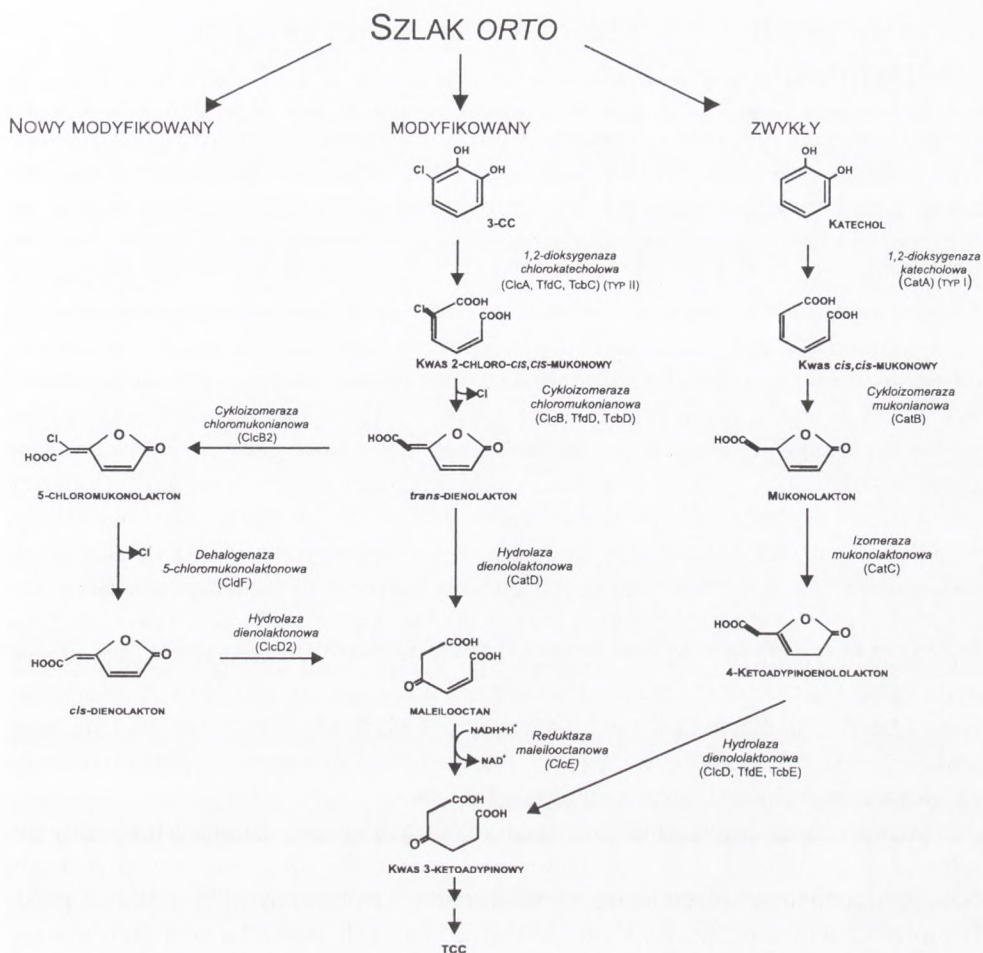
Trzeci etap degradacji związków aromatycznych związany jest z utlenieniem, powstałego po rozszczepieniu pierścienia aromatycznego, alifatycznego łańcucha do intermediatów cyklu kwasów trikarboksylowych (rys. 3) z wykorzystaniem enzymów szlaku typu *orto* albo *meta*. Powstałe fragmenty dwu- lub czterowęglowe zostają włączone w podstawowy metabolizm komórki (6,9,12).

Niezbędna w degradacji związków aromatycznych z podstawnikiem chlorowym reakcja dehalogenacji może zachodzić na każdym z wymienionych etapów rozkładu ksenobiotyków o strukturze aromatycznej. Dehalogenacja hydrolytyczna prowadzi do hydroksylacji pierścienia w wyniku podstawienia atomu chlorowca grupą hy-



Rys. 2. Reakcje rozszczepienia pierścienia aromatycznego katecholu podstawionego w pozycji *meta* oraz kwasu protokatechowego, gdzie: C1,2D – 1,2-dioksygenaza katecholowa; C2,3D – 2,3-dioksygenaza katecholowa C1,6D – 1,6-dioksygenaza katecholowa; 3,4PCD – 3,4-dioksygenaza kwasu protokatechowego; 4,5PCD – 4,5-dioksygenaza kwasu protokatechowego; 2,3PCD – 2,3-dioksygenaza kwasu protokatechowego.

droksylową. Reakcja ta stanowi często pierwszy etap rozkładu chlorofenoli, zawierających 3 lub więcej podstawników chlorowych (13,14). Bezpośrednie usunięcie podstawnika halogenowego w trakcie rozszczepienia ekstradiolowego pierścienia 3-chlorokatecholu opisano dotychczas tylko u szczepu *Pseudomonas* sp. GJ13, którego dioksygenaza posiada podjednostkę dehalogenującą. Jest to jeden z nielicznych przypadków, gdy rozszczepienie pierścienia 3-chlorokatecholu z udziałem 2,3-dioksygenazy nie prowadzi do powstania toksycznego chlorku acylu, inaktywującego samą dioksygenazę (15). Opisano także dioksygenazy, które dehalogenują, ale nie



Rys. 3. Porównanie szlaków rozszczepienia typu *ortho*: zwykłego, modyfikowanego i nowego modyfikowanego.

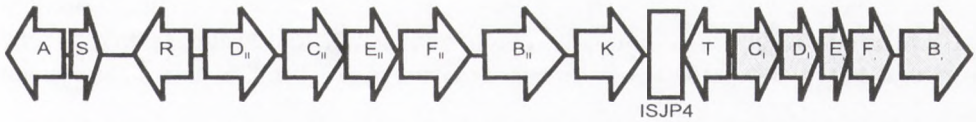
rozszerzają jednocześnie pierścienia aromatycznego. Do tej grupy enzymów zaliczono dioksygenazę kwasu 2-chlorobenzoowego, występującą w komórkach szczepu *Pseudomonas cepacia* 2CBS oraz dioksygenazę kwasu 4-chlorofenylooctowego z komórek szczepu *Pseudomonas* sp. CBS3 (13,16). Podczas dehalogenacji redukcijnej wymagana jest siła redukcyjna w postaci np. NADH lub cząsteczki glutationu (12).

4. Podłoże genetyczne rozkładu ksenobiotycznych związków aromatycznych

Enzymy, uczestniczące w rozkładzie lub transformacji ksenobiotycznych związków aromatycznych, syntetyzowane są wewnątrz komórek mikroorganizmów i stanowią grupę enzymów indukcyjnych, syntetyzowanych w komórce w momencie zapotrzebowania na nie. Indukcja określonego szlaku rozkładu ksenobiotyku, czyli zestawu enzymów, jest związana z transkrypcją danego zestawu genów, noszącego nazwę operonu. W komórkach mikroorganizmów są dwa potencjalne miejsca lokalizacji tych genów: nukleoid i/lub plazmid. Wielkość plazmidów bywa zróżnicowana, od około 1000 par zasad do rozmiarów chromosomów bakteryjnych (megaplazmidy). Plazmidy występujące w komórkach szczepów zdolnych do rozkładu ksenobiotyków to plazmidy degradacyjne (kataboliczne), które niosą geny enzymów szlaków prowadzących do powstania dwu- lub czterowęglowych fragmentów, których dalszy metabolizm jest kodowany chromosomalnie (6,8,17-26). W badaniach dowodzi się, że mikroorganizmy degradujące związki aromatyczne charakteryzują się różnorodnością organizacji genów kodujących enzymy szlaków degradacyjnych. Geny kodujące enzymy szlaku *orto* rozkładu katecholu najczęściej umiejscowione są w chromosomie bakteryjnym, natomiast szlaku *meta* częściej w plazmidach degradacyjnych. Natomiast rozkład tlenowy chlorofenoli u większości bakterii jest uwarunkowany obecnością plazmidów degradacyjnych. W plazmidach tych znajdują się geny kodujące enzymy modyfikowanego szlaku *orto*, zaangażowane w przekształcenie chlorokatecholi do intermediatów cyklu Krebsa.

Plazmidy mogą być również miejscem lokalizacji genów kodujących enzymy peryferycznych szlaków rozkładu chloropodstawionych związków aromatycznych. Najlepiej poznanymi plazmidami katabolicznymi są plazmidy pJP4, pAC27 i pP51. Mimo różnych miejsc pochodzenia bakterii, będących gospodarzami tych plazmidów, struktura operonów umieszczonych w tych pozachromosomalnych cząstkach DNA jest bardzo zbliżona. Plazmid pJP4 niesiony przez *Ralstonia eutropha* JMP134 wykazuje duże podobieństwo do plazmidu pAC27, niesionego przez *Pseudomonas putida* i plazmidu pP51, obecnego u *Pseudomonas* sp. P51. Geny *tcb* plazmidu pP51 i geny *clc* plazmidu pAC27 mają identyczną organizację, natomiast geny *tfd* plazmidu pJP4 różnią się od nich brakiem jednej otwartej ramki odczytu (18-23). Natomiast u dotychczas opisanych Gram-dodatnich szczepów bakterii z rodzaju *Rhodococcus*, zdolnych do rozkładu uchlorowanych związków aromatycznych z jednym lub dwoma podstawnikami chlorowymi, geny kodujące odpowiednie enzymy zlokalizowane są w obrębie chromosomu (24-26).

Obecność plazmidu pJP4 o wielkości 80 kbp, warunkuje zdolność szczepu *Ralstonia eutropha* (*Cupriavidus negator*) JMP134 do wzrostu w obecności kwasu 2,4-dichloro- i 2-metylo-4-chlorofenoksyooctowego oraz kwasu 3-chlorobenzoowego. W obrębie plazmidu degradacyjnego pJP4 zlokalizowane są dwa moduły genowe *tfdI* i *tfdII*, których wzajemne ułożenie przedstawiono na rysunku 4 (20-22). W bada-



Rys. 4. Wzajemne ułożenie modułów genowych tfd_I i tfd_{II} w plazmidzie pJP4 ($tfdA$ – gen dioksygenazy zależnej od α -ketoglutaranu, $tfdB_I$ i $tfdB_{II}$ – geny monoooksygenaz, $tfdC_I$ i $tfdC_{II}$ – geny 1,2-dioksygenazy chlorokatecholowej, $tfdD_I$ i $tfdD_{II}$ – geny cykloizomerazy chloromukonianowej, $tfdE_I$ i $tfdE_{II}$ – geny hydrolazy mukonolaktonowej, $tfdF_I$ i $tfdF_{II}$ – geny reduktazy maleilooctanowej, $tfdS$ i $tfdR$ – geny regulatorowe, $tfdK$ – gen białka transportującego kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy, $tfdT$ – niefunkcjonalne białko regulatorowe, ISJP4 – element IS plazmidu JP4).

niach Laemmli i wsp. wykazano, że moduły genowe $tfdI$ i $tfdII$ nie są swoimi prostymi kopiami. Podobieństwo pomiędzy genami kodującymi 1,2-dioksygenazę chlorokatecholową obu modułów wynosi 60%, ale pomiędzy pozostałymi genami sięga już tylko 15%. Ponadto geny $tfdC$ i $tfdD$ w II module plazmidu pJP4 występują w odwrotnej kolejności niż w $tfdI$ oraz charakteryzują się wyższą zawartością par G+C (22).

Oprócz genów katabolicznych w plazmidzie pJP4 obecne są również geny regulatorowe $tfdR$ i $tfdS$, będące swoimi wiernymi kopiami, ale zorientowanymi w przeciwnych kierunkach. Ich produkty działają jako regulatory transkrypcji z grupy LysR, czyli ich indukcja zachodzi pod wpływem intermediatów szlaków katabolicznych, których geny znajdują się pod kontrolą tych regulatorów (27-29). Produkt genu $tfdS$ działa zarówno jako represor, jak i aktywator transkrypcji genu $tfdB$, podczas gdy TfdR jest represorem genu $tfdA$ oraz zespołu $tfdC_I D_I E_I F_I$ (29).

W badaniach wykazano, że oba moduły genowe plazmidu pJP4 są czynne, chociaż aktywność enzymów kodowanych genami klasteru II jest niższa niż kodowanych przez klaster I. Wyjątkiem jest reduktaza maleilooctanowa, kodowana przez gen $tfdF_I$, której aktywność jest bardzo niska, wobec czego całkowita redukcja maleilooctanu katalizowana jest przez reduktazę, kodowaną przez gen $tfdF_{II}$ (30). Skonstruowanie mutantów z nieczynnymi genami obu modułów genowych plazmidu pJP4 pozwoliło na stwierdzenie, że aktywność genów $tfdE$ i $tfdB$ jest niezbędna do wzrostu na podłożu z 3-chlorobenzoesanem i 2,4-dihydroksyfenylooctanem. Jednocześnie wykazano, że mutacja w genie $tfdE_{II}$ hamuje wzrost na podłożu z 2-metylo-4-chlorofenoksyoctanem, mimo iż produkt genu $tfdE_{II}$ charakteryzuje się słabą aktywnością katalityczną. Wskazuje to, iż nawet słaba aktywność TfdE_{II} jest niezbędna do wzrostu w obecności tego substratu. W badaniach tych dowodzi się, że koszt utrzymywania w plazmidzie dodatkowego modułu genowego jest rekompensowany przez możliwość wykorzystania przez mikroorganizm szerszej gamy substratów wzrostowych (31).

Clement i wsp. (32) wykazali, iż szczepy *Ralstonia eutropha* JMP134 i JMP222 mogą rosnąć na podłożu z 2,4,6-trichlorofenolem jako jedynym źródłem węgla i energii. Szczep JMP222 nie posiada plazmidu, zatem geny kodujące enzymy szlaku rozkładu tego izomeru trichlorofenolu są kodowane chromosomalnie (24,33). W ba-

daniach Matus i wsp. dowodzi się, że enzymy szlaku rozkładu 2,4,6-trichlorofenolu przez 2,6-dichlorohydrochinonu do β -ketoadypinianu, kodowane są przez geny operonu katabolicznego *tcpABCD*, zlokalizowanego w chromosomie bakteryjnym (33).

5. Podsumowanie

Związki aromatyczne, znajdujące się w środowisku, mogą być albo pochodzenia naturalnego, albo antropogenicznego. Ksenobiotyczne związki aromatyczne uważane są za trudno degradowalne ze względu na obecność stabilnego pierścienia aromatycznego oraz podstawników, których obecność dodatkowo utrudnia ich rozkład. Mikroorganizmy obecne w środowisku nie zdołały wykształcić jeszcze skutecznych szlaków ich całkowitej biodegradacji. Dlatego konieczne jest konstruowanie szczepów bakteryjnych, charakteryzujących się takimi możliwościami degradacyjnymi. Musi być ono jednak poprzedzone poznaniem i zrozumieniem enzymologii oraz genetyki, czyli molekularnych podstaw rozkładu ksenobiotycznych związków aromatycznych.

Literatura

1. Kączkowski J., (1993), *Biochemia roślin*, t. I, PWN, Warszawa.
2. Krauss M., Wilcke W., Martius C., Bandeira A. G., Garcia M. V. B., Amelung W., (2005), *Environ. Pollut.*, 135, 143-154.
3. Mcmurry J., (2000), *Chemia organiczna*, PWN, Warszawa.
4. Wasiela T., Tam I., Krajewski J., Tarkowski S., (1999), *Środowiskowe zagrożenia zdrowia. Dioksyny*, Oficyna Wydawnicza Instytutu Medycyny Pracy im. prof. dr med. Jerzego Nofera, Łódź.
5. http://www.letu.katowice.pl/Wpr/Slownik_Terminow.Htm.
6. Vaillancourt F. H., Bolin J. T., Eltis L. D., (2006), *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 41, 241-267.
7. Ullrich R., Hofrichter M., (2007), *Cell. Mol. Life Sci.*, 64, 271-293.
8. Reineke W., (1998), *Annu. Rev. Microbiol.*, 52, 287-331.
9. Harwood C. S., Parales R. E., (1996), *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 553-590.
10. Ishiyama D., Vujaklija D., Davies J., (2004), *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 1297-1306.
11. Bugg T. D. H., (2003), *Tetrahedron*, 59, 7075-7101.
12. Li X., Guo M., Fan J., Tang W., Deqiang W., Ge H., Rong H., Teng M., Niu L., Liu Q., Hao Q., (2006), *Protein Sci.*, 15, 71-771.
13. Janssen D. B., Preis F., van der Ploeg J. R., (1994), *Annu. Rev. Microbiol.*, 48, 163-191.
14. Apajalahti J. H., Salkinoja-Salonen M. S., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 675-681.
15. Kaschabek S. R., Kasberg T., Müller D., Mars A. E., Janssen D. B., Reineke W., (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 296-302.
16. van Hylckama Vielg J. Et., Poelarends G. J., Mars A. E., Janssen D. B., (2000), *Curr. Opin. Microbiol.*, 3, 257-262.
17. Thiel M., Kaschabek S. R., Groning J., Mau M., Schlomann M., (2005), *Arch. Microbiol.*, 183, 80-94.
18. Klemba M., Jakobs B., Wittich R. M., Pieper D., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3255-3261.
19. Liu T., Chapman P. J., (1984), *Coll. Biol. Sciences*, 173, 314-318.
20. Schlömann M., (2002), *J. Bacteriol.*, 184, 4049-4053.

21. van der Meer J. R., Neerven A. R. W., Vries E. J., Vos W. M., Zehdner A. J. B., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 6-15.
22. Laemmli C., Werlen Ch., Meer J. R., (2004), *Bioch. Biophys. Res. Com.*, 181, 112-121.
23. Bhat M. A., Tsudam., Horiike K., Nozaki M., Vaidyanathan Ch. S., Nakazawa T., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 307-312.
24. Louie T. M., Webster Ch. M., Xun L., (2002), *J. Bacteriol.*, 184, 3492-3500.
25. Moiseeva O. V., Solyanikova I. P., Kaschabek S. R., Gröning J., Thiel M., Golovleva L. A., Schlömann M., (2002), *Appl. Environ. Microbiol.*, 184, 5282-5292.
26. Ferraroni M., Kolomytseva M. P., Solyanikova I. P., Scozzafava A., Golovleva L. A., Briganti F., (2006), *J. Mol. Biol.*, 360, 788-799.
27. Diaz E., Prieto M. A., (2000), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11, 467-475.
28. Tropel D., van der Meer J. R., (2004), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68, 474-500.
29. Matrubutham U., Harker A. R., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 2348-2353.
30. Plumeier I., Pantoja-Perez D., Heim S., Gonzáles B., Pieper D. H., (2002), *J. Bacteriol.*, 184, 4054-4064.
31. Laemmli C., Werlen Ch., Meer J. R., (2004), *Bioch. Biophys. Res. Com.*, 181, 112-121.
32. Clément P., Matus V., Cárdenas L., Gonzáles B., (1995), *FEMS Microb. Lett.*, 127, 51-55.
33. Matus V., Sanchez M. A., Martinez M., Gonzáles B., (2003), *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 7108-7115.