



## Enzymy zależne od fosforanu pirydoksalu – charakterystyka i zastosowanie w biotechnologii

Michał Woźniak, Maria Koziółkiewicz

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Biochemii  
Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

### Pyridoxal phosphate dependent enzymes – characteristics and ap- plication in biotechnology

#### Summary

Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent enzymes catalyze broad range of reactions. They are involved in biotransformation of amino acids and their derivatives in bacteria, fungi, plants and animals. Recently, due to development of crystallographic technology, three-dimensional structures of some PLP-enzymes are being solved. A comparison of tertiary structure of these enzymes has shown that most of them can be divided into three classes of homologous proteins.

This review contains short characteristics of PLP-dependent enzymes, regarding to their substrates and the reaction types catalyzed. Because of wide distribution and involvement in numerous important cellular processes, these enzymes are considered as candidates for drug targets. Better understanding of structures and functions of this important group of enzymes is essential for designing their inhibitors and for synthesis of improved protein-based catalysts.

#### Key words:

PLP-dependent enzymes, pyridoxal phosphate, substrate specificity.

#### Adres do korespondencji

Michał Woźniak,  
Wydział Biotechnologii  
i Nauk o Żywności,  
Instytut Biochemii  
Technicznej,  
Politechnika Łódzka,  
ul. Stefanowskiego 4/10,  
90-924 Łódź.

### 1. Wstęp

Fosforanpirydoksalu (PLP, pochodna witaminy B<sub>6</sub>) jest grupą prostetyczną wielu enzymów katalizujących procesy transformacji aminokwasów (aminotransferazy, syntazy, karboksylazy, racemazy) zarówno w bakteriach jak i w organizmach wyższych. Enzymy zależne od fosforanpirydoksalu, katalizują

szereg różnych reakcji, takich jak: transaminacja, racemizacja,  $\alpha$ -dekarboksylacja,  $\beta$ - i  $\gamma$ -eliminacja oraz reakcje  $\beta$ -podstawienia (1). Większość enzymów PLP-zależnych, pomimo tak zróżnicowanych funkcji, wykazuje znaczne podobieństwo pod względem struktury III- i IV-rzędowej oraz mechanizmu reakcji. W latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku Dunathan i Voet postawili hipotezę, że wszystkie enzymy PLP-zależne pochodzą od wspólnego przodka (2). Na podstawie przeprowadzonych badań krystalograficznych zbadano struktury przestrzenne wielu enzymów PLP-zależnych, co pozwoliło wyodrębnić podgrupy enzymów o podobnej budowie i przeprowadzić próbę ich klasyfikacji (3-6). Do tej pory kilkakrotnie podejmowano próby klasyfikacji tych enzymów na podstawie ich struktury przestrzennej czy rodzaju katalizowanych przez nie reakcji.

Enzymy PLP-zależne są szeroko rozpowszechnione zarówno wśród *Prokaryota* jak i *Eukaryota*. Prawie 1,5% genów organizmów prokariotycznych koduje enzymy PLP-zależne (7). Jednak wraz ze wzrostem wielkości genomów maleje procentowy udział genów kodujących te enzymy. Wynika to stąd, że enzymy zależne od PLP katalizują reakcje metabolizmu podstawowego, a w przypadku organizmów eukariotycznych, w miarę jak zwiększa się stopień ich złożoności, maleje procentowy udział genów kodujących enzymy metabolizmu podstawowego. Jednakże na podstawie najnowszych analiz wskazuje się, że u eukariontów ilość białek enzymatycznych zależnych od fosforanu pirydoksalu może być większa niż ilość dotychczas zidentyfikowanych genów kodujących enzymy PLP-zależne. Tłumaczy się to istnieniem izoenzymów, kodowanych przez te same geny, ale występujących w różnych organellach komórkowych (np. cytoplazma, mitochondria), a także istnieniem enzymów PLP-zależnych kodowanych przez geny, których prawdziwa funkcja nie została dotychczas określona (7).

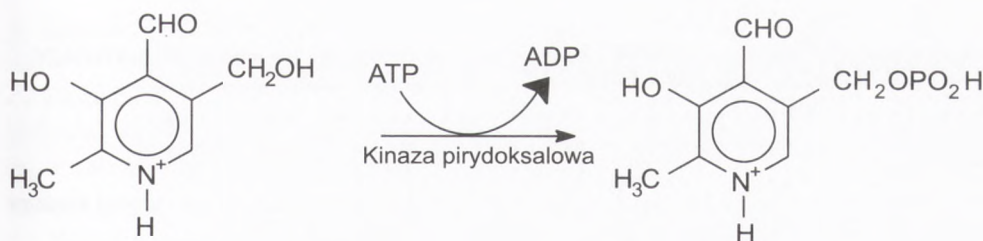
W ostatnich latach enzymy PLP-zależne stały się przedmiotem zainteresowania biotechnologów, ponieważ znajdują one zastosowanie przede wszystkim w biosyntezie aminokwasów i ich pochodnych, w produkcji różnego rodzaju farmaceutyków oraz w ochronie środowiska (8-10). Jednocześnie enzymy te, zaangażowane w procesy komórkowe, stają się coraz częściej częściami docelowymi dla specyficznych leków (11,12).

Nadrodzina enzymów PLP-zależnych wzbudza zainteresowanie również dlatego, że pomimo podobnej struktury katalizują one reakcje o różnym mechanizmie i należą do różnych klas enzymów. Ustalenie pokrewieństwa pomiędzy tymi białkami pozwoli zrozumieć ich ewolucję oraz lepiej poznać szlaki metaboliczne z ich udziałem.

## **2. Fosforan pirydoksalu. Budowa, właściwości, mechanizm działania enzymów PLP-zależnych**

Fosforan pirydoksalu, jako forma witaminy B<sub>6</sub>, nie jest produkowany w organizmach wyższych; jego biosynteza zachodzi w komórkach bakterii oraz grzybów i drożdży. W organizmach prokariotycznych (np. w *E. coli*) fosforan pirydoksalu





Rys. 1. Fosforylacja pirydoksalu.

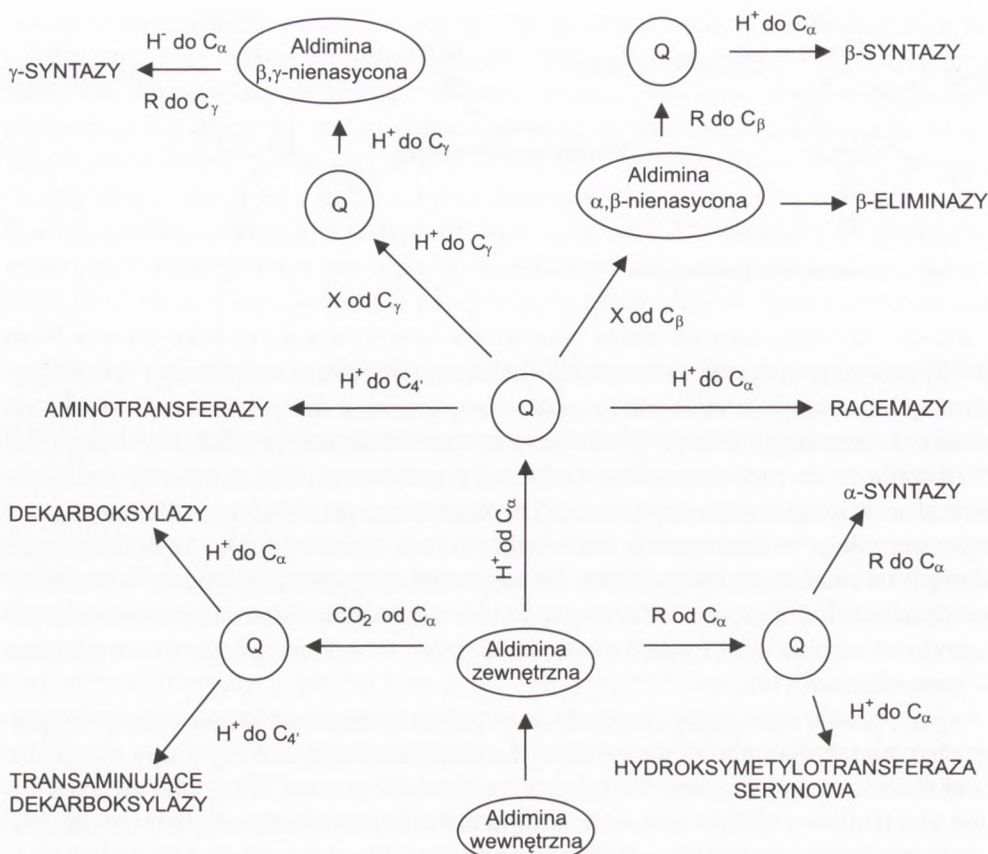
(PNP) powstaje wskutek kondensacji fosforanu 1-deoksy-D-ksylulozy i 4-fosfohydroksy-L-treoniny katalizowanej przez dwa enzymy: dehydrogenazę 4-fosfohydroksy-L-treoniny (PdxA, EC 1.1.1.262) i syntazę fosforanu pirydoksyny (PdxJ) (13). Następnie w obecności oksydazy fosforanu pirydoksyny (EC 1.4.3.5) PNP jest przekształcany do fosforanu pirydoksalu (14). Biosynteza pirydoksyny u drożdży i grzybów przebiega w inny sposób niż u bakterii (15). Pomimo braku kompleksowych danych na ten temat, stwierdzono, że u eukariontów azot pirydynowy w cząsteczce pirydoksalu nie pochodzi z treoniny (16). U człowieka fosforan pirydoksalu powstaje w wyniku fosforylacji pirydoksalu (rys. 1) dostarczanego do organizmu z pożywieniem (17).

PLP posiada dwie cechy, dzięki którym może katalizować szereg reakcji związanych z metabolizmem aminokwasów: za pośrednictwem swojej grupy aldehydowej może tworzyć wiązanie kowalencyjne z aminokwasami oraz, jako związek silnie elektrofilowy (dzięki obecności atomu azotu w pierścieniu aromatycznym), posiada zdolność przyciągania elektronów stabilizując w ten sposób ujemnie naładowane produkty pośrednie powstające podczas katalizy (18).

Pod nieobecność substratu grupa aldehydowa PLP tworzy zasadę Shiffa z grupą  $\epsilon$ -aminową lizyny znajdującej się w centrum katalitycznym enzymu. Fosforan pirydoksalu, będący niebiałkową grupą prostetyczną enzymów PLP-zależnych, może się wiązać z apoenzymem jeszcze przed ostatecznym fałdowaniem natywnego białka w komórce (np. w przypadku syntazy tryptofanowej) (19), lub pod koniec tego procesu (jak w przypadku hydroksymetylotransferazy serynowej) (20). Po związaniu się apoenzymu z fosforanem pirydoksalu za pomocą wiązania kowalencyjnego, następuje stabilizacja konformacji, która warunkuje aktywność enzymatyczną białka (21).

W obecności substratu (np. aminokwasu), jego grupa  $\alpha$ -aminowa wypiera grupę  $\epsilon$ -aminową lizyny, tworząc z fosforanem pirydoksalu tzw. aldiminę zewnętrzną. Aminokwas związany z PLP jest także związany z apoenzymem za pomocą wiązań wodorowych, w których uczestniczą aminokwasy występujące w centrum katalitycznym enzymu (22).

Reakcje transformacji aminokwasów katalizowane przez enzymy PLP-zależne są kilkietapowe. Specyficzność danej reakcji oraz rodzaj produktu końcowego za-



Rys. 2. Schemat szlaków metabolicznych, w których uczestniczą enzymy zawierające jako kofaktor PLP. Formy przejściowe produktów oznaczone jako Q mają charakter chinonowy (na podst. (17)).  $H^+$  do  $C_4'$  – przyłączenie protonu do węgla  $C_4$  (addycja);  $CO_2$  od  $C_\alpha$  – uwolnienie grupy  $-COO^-$  od węgla  $C_\alpha$  (dekarboksylacja); R od  $C_\alpha$  – uwolnienie grupy alkilowej  $-R$  od węgla  $C_\alpha$  (eliminacja); X od  $C_\gamma$  – uwolnienie podstawnika  $-X$  od węgla  $C_\gamma$  (eliminacja).

leży od przestrzennego położenia elektronów substratu i PLP. Aby określone wiązanie w cząsteczce substratu zostało zerwane, musi być ułożone prostopadłe do płaszczyzny orbitalu  $\pi$  cząsteczki wyszukującej elektrony, czyli PLP (23). Zatem reakcje z udziałem fosforanu pirydoksalu są stereoelektronospecyficzne. Schemat możliwych szlaków metabolicznych przedstawiono na rysunku 2.

O wzrastającym zainteresowaniu enzymami PLP-zależnymi może świadczyć fakt, że w 2004 r. w *Annual Review of Biochemistry* ukazał się obszerny artykuł przeglądowy na ich temat. Zawiera on szczegółowe informacje dotyczące mechanizmu reakcji katalizowanych przez enzymy zależne od fosforanu pirydoksalu, ich specyficzności substratowej oraz czynników wpływających na przebieg tych reakcji (24).



### 3. Klasyfikacja enzymów PLP-zależnych

Duża różnorodność enzymów, w których grupą prostetyczną jest fosforan pirydoksalu, utrudniała ich systematykę i klasyfikację. Starano się je podzielić na grupy w zależności od budowy przestrzennej, rodzaju i mechanizmu katalizowanych reakcji bądź występowania.

Mehta i wsp. jako pierwsi zauważyli, że prawie wszystkie aminotransferazy można podzielić na grupy homologicznych białek (25), a rok później spostrzeżenie to rozszerzono w stosunku do wszystkich enzymów z witaminą B<sub>6</sub> jako grupą prostetyczną (3), wyłączając fosforylazy, u których występuje nieco inny mechanizm reakcji niż u pozostałych enzymów PLP-zależnych. W roku 1994 Alexander i wsp. podzielili enzymy PLP-zależne na trzy różne rodziny homologicznych białek (3): rodzina  $\alpha$  katalizująca reakcje na atomie węgla  $\alpha$  substratu, rodzina  $\beta$  katalizująca reakcje  $\beta$ -podstawienia i  $\beta$ -eliminacji, oraz rodzina  $\gamma$ , która katalizuje reakcje  $\gamma$ -podstawienia i  $\gamma$ -eliminacji. Schneider i wsp. (6) podzielili enzymy PLP-zależne na 5 grup na podstawie ich podobieństwa pod względem struktury trzeciorzędowej. Jansonius (4) podzielił te enzymy na 4 rodziny, wykluczając rodzinę fosforylaz. Fosforylazy zawierają fosforan pirydoksalu i wykazują podobieństwo strukturalne do pozostałych enzymów PLP-zależnych, ale w katalizowanych reakcjach wykorzystują fosforan pirydoksalu jako substrat, dlatego zostaną omówione osobno.

Nie wszystkie enzymy PLP-zależne można sklasyfikować na podstawie pochodzenia czy podobieństwa strukturalnego. Aminotransferaza D-aminokwasów i aminotransferaza aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach bocznych znacząco różnią się od pozostałych enzymów PLP-zależnych, dlatego też wydzielono dla nich osobną podgrupę.

Opracowanie oparto na podziale enzymów PLP-zależnych na trzy rodziny ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ), w zależności od atomu węgla substratu, przy którym zachodzi katalizowana reakcja (z nielicznymi wyjątkami). W tabeli zebrano przedstawicieli omawianych rodzin enzymów PLP-zależnych.

#### 3.1. Rodzina $\alpha$

Do tej rodziny należy większość aminotransferaz (przykładem jest aminotransferaza asparaginianowa) oraz transferazy (hydroksymetylotransferaza glicynowa, SerHM, EC 2.1.2.1; C-acetylotransferaza glicyny, GlyAcT, EC 2.3.1.29) i liazy (fenolo-liaza tyrozynowa, TPL, EC 4.1.99.2.; tryptofanaza, TNA, EC 4.1.99.1)

Aminotransferazy katalizują reakcje przeniesienia grupy aminowej z aminokwasów na oksokwasy. Aminotransferaza asparaginianowa (AAT, EC 2.6.1.1.) katalizuje przeniesienie grupy aminowej z asparagianu na 2-oksoglutaran. Enzym ten jest szeroko rozpowszechniony w przyrodzie. Występuje zarówno u bakterii (np. w *E. coli* (26)), drożdży (*S. cerevisiae* (27)), jak i w komórkach kręgowców (w for-



mie dwóch izoenzymów występujących w cytozolu i w mitochondriach (28)). Pomimo że enzymy te występują w tak różnych organizmach, ich centra aktywne wykazują wysokie podobieństwo strukturalne, co może wskazywać na pochodzenie od wspólnego przodka (29). Aminotransferaza asparaginianowa składa się z dwóch identycznych dwudomenowych podjednostek o masie cząsteczkowej ok. 45 kDa. Centrum aktywne enzymu znajduje się w szczelinie pomiędzy podjednostkami tworzącymi dimer (30). Fosforan pirydoksalu łączy się z apoenzymem za pomocą wiązania aldiminowego pomiędzy aldehydową grupą koenzymu, a  $\epsilon$ -aminową grupą Lys<sub>258</sub>. Każda podjednostka może wiązać jedną cząsteczkę PLP (31). Wśród innych aminokwasów biorących udział w wiązaniu bądź stabilizacji kofaktora i substratu znajdują się Gly<sub>108</sub>, Asn<sub>222</sub> i dwie reszty argininy, wiążące karboksylowe reszty substratów za pośrednictwem wiązań wodorowych (32).

Tabela

## Przedstawiciele poszczególnych rodzin enzymów PLP-zależnych

Rodzina	Nazwa enzymu	Numer enzymu (EC)	Przykładowe występowanie	Kod PDB
$\alpha$	aminotransferaza asparaginianowa	2.6.1.1	<i>Escherichia coli</i> (26)	1ars
	hydroksymetylotransferaza glicynowa	2.1.2.1	królik, <i>S. typhimurium</i> (6)	1cjo
	fenolo-liaza tyrozynowa	4.1.99.2	<i>C. freundii</i> , <i>E. herbicola</i> (34)	2tpl
	tryptofanaza	4.1.99.1	<i>P. vulgaris</i> (35)	1ax4
$\beta$	syntaza tryptofanowa	4.2.1.20	<i>B. subtilis</i> , <i>S. typhimurium</i> (40)	1ubs
	dehydrataza treoniny	4.2.1.16	<i>E. coli</i> (42)	1tdj
$\gamma$	$\beta$ -liaza cystationiny	4.4.1.8	<i>E. coli</i> (37)	1cl1
	$\gamma$ -liaza cystationiny	4.4.1.1	<i>S. cerevisiae</i> (38)	1n8p
	$\gamma$ -syntaza cystationiny	2.5.1.48	<i>E. coli</i> (38)	1cs1
<b>aminotransferazy D-aminokwasów</b>	aminotransferaza D-alaniny	2.6.1.21	<i>Bacillus</i> sp. (44)	1daa
	aminotransferaza aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu bocznym	2.6.1.42	<i>E. coli</i> (45)	1a3g
<b>dekarboksylazy</b>	dekarboksylaza tyrozyny	4.1.1.25	pietruszka (54)	1hq6
	dekarboksylaza tryptofanu	4.1.1.28	<i>Catharantus roseus</i> (barwinek) (54)	
	dekarboksylaza histydynowa	4.1.1.22	<i>Lactobacillus</i> sp. (54)	
<b>fosforylasy</b>	fosforylaza glikogenu	2.4.1.1	królik (55)	1a8i
	fosforylaza maltodekstryny	2.4.1.1	<i>E. coli</i> (56)	1ahp

Wszystkie aminotransferazy podzielone zostały na cztery podgrupy, z czego trzy, oprócz podgrupy III (aminotransferazy D-aminokwasów oraz aminotransferazy aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu) wykazują znaczne podobieństwo pod względem budowy przestrzennej (33). Określenie trójwymiarowej struktury aminotransferaz D-aminokwasów pozwoliło postawić hipotezę, że ta podgrupa ami-



notransferaz wyewoluowała niezależnie od pozostałych enzymów PLP-zależnych (25).

Chociaż większość enzymów PLP-zależnych, należących do rodziny  $\alpha$  nie wykazuje znaczącego podobieństwa pod względem struktury I-rzędowej (oprócz budowy centrum aktywnego i miejsca wiązania fosforanu pirydoksalu), to wykazuje wysokie podobieństwo pod względem struktury III- i IV-rzędowej. Każdy enzym ma budowę oligomeryczną. W cząsteczce monomeru wyodrębnić można dwie domeny: dużą i małą. Największą homologię można zaobserwować w strukturze dużej domeny, która składa się z 7 odcinków o budowie  $\beta$ -wałdowej, otoczonych 8-9 odcinkami o strukturze  $\alpha$ -helisy. Małe domeny wykazują mniejsze wzajemne podobieństwo. Zbudowane są z 3 lub 4 odcinków o strukturze antyrównoległej  $\beta$ , otoczonych fragmentami o strukturze helisy  $\alpha$ . Małe domeny różnią się przede wszystkim pod względem budowy fragmentu N-terminalnego. Aktywność katalityczną wykazują homodimery lub homotetramery (jak w przypadku fenolo-liazy tyrozynowej i tryptofanazy) (6).

Fenolo-liaza tyrozynowa i tryptofanaza, pomimo że katalizują reakcje  $\beta$ -eliminacji (w których reakcja zachodzi przy atomie węgla  $\beta$  substratu), ze względu na podobieństwo strukturalne zaliczone zostały do rodziny  $\alpha$  enzymów PLP-zależnych. Fenolo-liaza tyrozynowa (TPL) katalizuje odwracalną reakcję rozkładu tyrozyny do fenolu, amoniaku i pirogronianu (34), natomiast tryptofanaza katalizuje analogiczną reakcję rozkładu tryptofanu do indolu, amoniaku i pirogronianu (35). TPL składa się z 4 podjednostek (o masie cząsteczkowej 51 kDa każda), w których można wyodrębnić małą domenę, dużą domenę, łącznik domen i ramię N-terminalne. Każda podjednostka składa się z 14 odcinków o charakterze  $\alpha$ -helisy i 16 o strukturze  $\beta$ -wałdowej. PLP związany z resztą Lys<sub>257</sub> zlokalizowany jest pomiędzy małą i dużą domeną każdej podjednostki (36). Centrum aktywne tego enzymu zbudowane jest analogicznie do reszty enzymów PLP-zależnych należących do rodziny  $\alpha$ .

### 3.2. Rodzina $\gamma$

Do rodziny tej należą nieliczne enzymy PLP-zależne katalizujące reakcje przy węglu  $\gamma$ , np.  $\beta$ -liaza cystationiny (CBL; EC 4.4.1.8.),  $\gamma$ -liaza cystationiny (CGL; EC 4.4.1.1.) i  $\gamma$ -syntaza cystationiny (CGS; EC 2.5.1.48.). Są to enzymy biorące udział w transformacji aminokwasów zawierających atom siarki. Produktem przejściowym w tych reakcjach jest cystationina, związek powstający na drodze kondensacji homocysteiny z seryną (37).

Enzymy CBL i CGS występują u bakterii, grzybów i roślin, natomiast występowanie CGL stwierdzono, jak dotychczas, tylko u człowieka i grzybów. CBL składa się z czterech identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej ok. 43 kDa i wiąże za pomocą Lys<sub>210</sub> jedną cząsteczkę PLP na monomer (38). W budowie monomeru CBL można wyróżnić 3 fragmenty: N-terminalne ramię (aminokwasy 1-60),



region wiążący PLP (aminokwasy 61-256) i region C-terminalny (aminokwasy 257-395). Ramię N-terminalne składa się z 3 helis  $\alpha$  i jednej struktury  $\beta$ -wałdowej, region wiązania PLP składa się z 7 odcinków o strukturze  $\beta$ -wałdowej otoczonej helisami  $\alpha$ , a region C-terminalny łączy się z domeną wiążącą PLP za pomocą  $\alpha$ -helisy i jest zbudowany z 4  $\alpha$ -helis oraz 4 antyrównoległych struktur  $\beta$ -wałdowych.

Enzym ten wykazuje aktywność jako tetramer, jednakże najczęściej występuje jako homodimer. Forma dimeryczna stabilizowana jest przez wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe i oddziaływania między centrami aktywnymi monomerów (3 wiązania wodorowe i mostek solny pomiędzy fosforanem pirydoksalu a Arg<sub>58</sub> sąsiedniego monomeru) (38).

Budowa centrum aktywnego enzymów rodziny  $\gamma$ , jak i struktura trzeciorzędowa ich monomerów wykazują znaczne podobieństwo do budowy aminotransferazy asparaginianowej, fenolo-liazy tyrozynowej i dekarboksylazy ornitynowej (ODC; EC 4.1.1.17; (39)), czyli do enzymów należących do rodziny  $\alpha$ . Największe podobieństwo można zauważyć w budowie regionu wiążącego PLP, natomiast największe różnice występują w obrębie małej, N-terminalnej domeny. Istnienie podobieństwa w budowie głównych fragmentów, odpowiedzialnych za katalizę i wałdowanie tych białek pozwala sugerować wspólne pochodzenie enzymów PLP-zależnych należących do rodzin  $\alpha$  i  $\gamma$  (37). Mało jest, jak dotąd, informacji na temat budowy większości enzymów należących do rodziny  $\gamma$ .

### 3.3. Rodzina $\beta$

Przedstawicielem rodziny  $\beta$  jest syntaza tryptofanowa (TRPS; EC 4.2.1.20; (40)). Enzym ten jest heterodimerem o strukturze  $\alpha\beta\beta\alpha$ , składającym się z 2 podjednostek  $\alpha$  i 2 podjednostek  $\beta$ . Każda z podjednostek katalizuje inną, niezależną reakcję, ale ich aktywność jest uzależniona od działania całego kompleksu enzymatycznego (41). Podjednostka  $\alpha$  katalizuje reakcję rozkładu fosforanu indolo-glicerolu do indolu i aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Podjednostka  $\beta$  katalizuje syntezę tryptofanu z L-seryny i powstałego indolu. Centra aktywne obydwu podjednostek oddalone są od siebie o 25 Å i połączone tunelem białkowym, którym wędruje z podjednostki  $\alpha$  do podjednostki  $\beta$  indol, będący substratem w reakcji  $\beta$ -substitucji katalizowanej w tej domenie. Podjednostka  $\beta$  enzymu zawiera w swoim centrum aktywnym cząsteczkę PLP. Trójwymiarowa budowa enzymu nie przypomina jednak ani struktur rodziny  $\alpha$  ani rodziny  $\gamma$ . Co więcej, za wiązanie fosforanu pirydoksalu odpowiada Lys<sub>87</sub>, podczas gdy dla enzymów rodziny  $\alpha$  i  $\gamma$  jest to lizyna należąca do fragmentu 209-258 (3).

Innym enzymem należącym do rodziny  $\beta$  jest dehydrataza treoniny (TN; EC 4.2.1.16; (42)) z *E. coli*. Produkuje on na drodze  $\beta$ -eliminacji 2-oksomaślan z L-treoniny, bądź pirogronian z L-seryny. Natywny enzym składa się z 4 identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej około 56 kDa, w których to podjednostkach



można wyodrębnić region N-terminalny (region katalityczny zawierający PLP związany z resztą Lys<sub>62</sub>), region C-terminalny, będący domeną regulatorową oraz ramię łączące obydwie domeny (42). Podobieństwo strukturalne pomiędzy TRPS a TN jest niewielkie, a mimo to katalityczne regiony obu enzymów wykazują znaczną homologię (43).

#### 4. Pozostałe enzymy PLP-zależne

Nie wszystkie enzymy wykorzystujące fosforan pirydoksalu można zaliczyć do jednej z podanych rodzin, biorąc pod uwagę ich strukturę i stereochemię katalizowanych reakcji. Zupełnie odmienną strukturę trzeciorzędową wykazują aminotransferazy katalizujące reakcje D-aminokwasów i aminotransferazy aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu bocznym. Dlatego wydzielono dla nich osobną podgrupę. Również fosforylazy, które zależne są od PLP, mają inną budowę przestrzenną i zupełnie inny mechanizm reakcji (4,6,24).

##### 4.1. Aminotransferazy D-aminokwasów i aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu bocznym

Najlepiej zbadanymi enzymami PLP-zależnymi, które należą do tej grupy, są aminotransferaza D-aminokwasów (DAAT) z *Bacillus* sp. (44) i aminotransferaza aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu bocznym (BCAT) z *E. coli* (45). Są to małe enzymy o budowie homodimerskiej, których monomery zbudowane są z około 300 aminokwasów.

W monomerze aminotransferazy D-aminokwasów (33 kDa, 282 aminokwasy) można wyróżnić małą domenę N-terminalną (aminokwasy 1-120) składającą się z sześciu antyrównoległych arkuszy  $\beta$  z dwoma  $\alpha$ -helisami po bokach, oraz domenę C-terminalną (aminokwasy 121-282), w skład której wchodzi cztery arkusze  $\beta$  tworzące pseudo  $\beta$ -beczkę, otoczone kilkoma helisami  $\alpha$  (46). Centrum aktywne enzymu znajduje się na pętli pomiędzy  $\beta$ -beczką, a następną helisą w domenie C-terminalnej. Zaangażowana w wiązanie PLP jest grupa  $\epsilon$ -aminowa Lys<sub>145</sub> (47). Glutaminian Glu<sub>177</sub> wiąże się z pirydynowym azotem N1 grupy prostetycznej enzymu za pomocą wiązań wodorowych.

Struktura przestrzenna większości aminotransferaz D-aminokwasów różni się całkowicie od struktur aminotransferaz L-aminokwasów, wykazuje jednak duże podobieństwo strukturalne do aminotransferaz aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach bocznych (48). Centrum katalityczne DAAT jest lustrzanym odbiciem centrów katalitycznych aminotransferaz katalizujących przemianę L-aminokwasów, co sugeruje, że ewolucja obydwu rodzin enzymów dokonywała się na drodze konwergencji (44).



Aminotransferaza aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu bocznym (BCAT) występuje u bakterii jako pojedyncza forma (49), natomiast u człowieka i innych ssaków występuje w formie dwóch izoenzymów: mitochondrialnego i cytozolowego (50). Monomer ludzkiej mitochondrialnej aminotransferazy aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu bocznym zbudowany jest z 365 aminokwasów, które tworzą dwie domeny połączone ramieniem składającym się z 11 aminokwasów: małą domenę N-terminalną (aminokwasy 1-170) i dużą C-terminalną (aminokwasy 182-365) (48). Enzym ten wykazuje podobieństwo strukturalne do DAAT (28% homologii). Podstawową jednostką katalityczną BCAT jest dimer, a mimo to monomery enzymu mogą łączyć się w heksamer (51). Substratami w reakcjach katalizowanych przez BCAT mogą być, oprócz aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu bocznym, ich analogi o prostym łańcuchu oraz glutaminian. Jednakże asparaginian, alanina i aminokwasy aromatyczne nie są substratami dla BCAT (52). Ostatnio udowodniono, że BCAT może także efektywnie katalizować reakcje typowe dla  $\beta$ -liaz (53).

#### 4.2. Dekarboksylazy aminokwasów

Dekarboksylazy aminokwasów są to enzymy produkujące aminy biogenne i poliaminy. Obok aminotransferaz są one największą grupą enzymów PLP-zależnych o znacznej strukturze I-rzędowej. Badania pochodzenia i ewolucji dekarboksylaz aminokwasów przeprowadzone przez Sandmeier i wsp. (54) pozwoliły podzielić te enzymy na 4 grupy, z czego tylko druga grupa wykazuje podobieństwo strukturalne do aminotransferaz i enzymów PLP-zależnych z rodziny  $\alpha$ . Należą do niej m.in. dekarboksylaza tyrozyny (EC 4.1.1.25.), dekarboksylaza tryptofanu (EC 4.1.1.28) i dekarboksylaza histydyny (EC 4.1.1.22). W centrum aktywnym tych enzymów, podobnie jak w aminotransferazie asparaginianowej (3), występują dwa aminokwasy konserwatywne: lizyna, wiążąca PLP i kwas asparaginowy, który wiąże azot pirydynowy grupy prostetycznej enzymu. Budowa przestrzenna wszystkich dekarboksylaz oraz ich specyficzność substratowa pozwoliła postawić hipotezę o dywergencyjnej ewolucji tych enzymów. W procesie ewolucji doszło do rozszerzenia specyficzności substratowej wspólnego przodka dekarboksylaz eukariotycznych dopiero po ich oddzieleniu się od prokariotycznych dekarboksylaz. Na przykład eukariotyczna dekarboksylaza histydynowa jest bliżej spokrewniona z eukariotycznymi dekarboksylazami aminokwasów aromatycznych (33-55% podobieństwa), niż z jej bakteryjnymi odpowiednikami (18-20%) (54).

#### 4.3. Fosforylazy

Przykładem fosforylaz, czyli enzymów katalizujących odwracalną lizę określonych substratów za pomocą cząsteczki ortofosforanu, jest fosforylaza glikogenu (EC 2.4.1.1.) (55) i fosforylaza maltodekstryny (56). W ich centrum aktywnym wy-



stępuje fosforan pirydoksalu i jest on związany z apoenzymem za pomocą grupy  $\epsilon$ -aminowej lizyny. Mechanizm reakcji katalizowanych przez fosforylaza jest zupełnie inny niż w przypadku pozostałych enzymów PLP-zależnych, a mimo to enzymy te wykazują znaczne podobieństwo strukturalne do innych przedstawicieli tej nadrodziny (6). Substrat w reakcji fosforylacji (ortofosforan w formie  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) jest położony pomiędzy fosforanem pirydoksalu a cząsteczką glikogenu. Ortofosforan oddaje proton na atom tlenu przy anomerycznym węglu glukozy, jednocześnie przejmując proton z cząsteczki PLP. Jon karboniowy będący związkiem przejściowym, ulega atakowi przez ortofosforan, co prowadzi do powstania  $\alpha$ -glukozo-1-fosforanu. W reakcji fosforylacji grupa 5'-fosforanowa PLP jest zatem zarówno donorem jak i akceptorem protonów (57).

Fosforylaza glikogenu jest wielodomenowym enzymem złożonym z domeny N-terminalnej zbudowanej z 310 aminokwasów i domeny C-terminalnej, którą tworzy 360 aminokwasów. Część C-terminalna posiada miejsce charakterystyczne dla wiązania dinukleotydów, ale wiąże w nim fosforan pirydoksalu. W części N-terminalnej znajduje się centrum aktywne, w którym lizyna zostaje ufosforylowana podczas reakcji fosforolizy. Inaczej niż w przypadku innych enzymów PLP-zależnych, azot pirydynowy fosforanu pirydoksalu nie wiąże się z białkiem (55).

## 5. Zastosowanie i znaczenie enzymów PLP-zależnych

Enzymy PLP-zależne uczestniczą w procesach życiowych komórek roślin, zwierząt i mikroorganizmów. Biorą one bezpośredni udział w metabolizmie aminokwasów i ich pochodnych, a także uczestniczą w szlakach przemian aminocukrów oraz innych metabolitów zawierających grupę aminową (58).

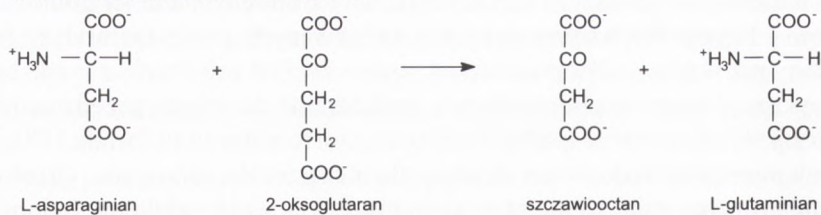
Selektywne zahamowanie aktywności niektórych enzymów PLP-zależnych u mikroorganizmów pozwoliłoby na skuteczniejszą walkę z patogenami. W związku z tym enzymy te stanowią coraz częściej cząsteczki docelowe dla farmaceutyków.

Mutacje i defekty w strukturze enzymów PLP-zależnych mogą powodować poważne zakłócenia szlaków metabolicznych i choroby warunkowane genetycznie. Przykładem może być homocystynuria, schorzenie spowodowane przez liczne mutacje w genie  $\beta$ -syntazy cystationiny (CBS), polegające na zahamowaniu syntezy cystationiny z homocysteiny. Krążąca w organizmie zwiększona ilość homocysteiny powoduje chorobę wieńcową, osteoporozę i opóźnienie rozwoju umysłowego (59).

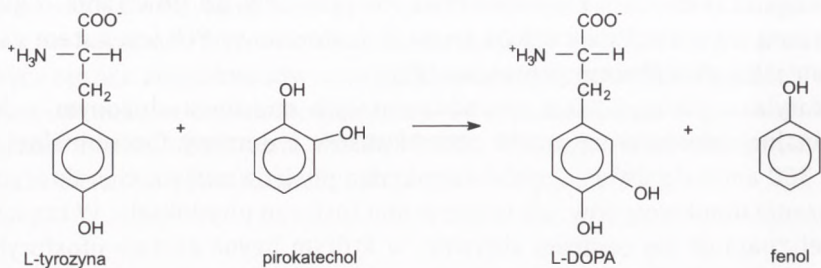
Enzymy PLP-zależne znajdują zastosowanie głównie w produkcji aminokwasów, ich pochodnych i produktów ich biotransformacji. W zależności od specyficzności danego enzymu, warunków reakcji oraz użytych reagentów, możemy otrzymać szeroką gamę produktów, od prostych oksokwasów i amin po rozbudowane skomplikowane alkaloidy (8,9).

Podajemy przykłady zastosowań enzymów PLP-zależnych w różnych gałęziach gospodarki, z uwzględnieniem przemysłu farmaceutycznego.

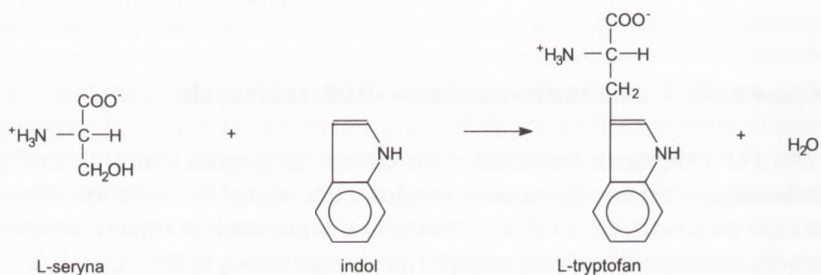
**AMINOTRANSFERAZA ASPARGINIANOWA**



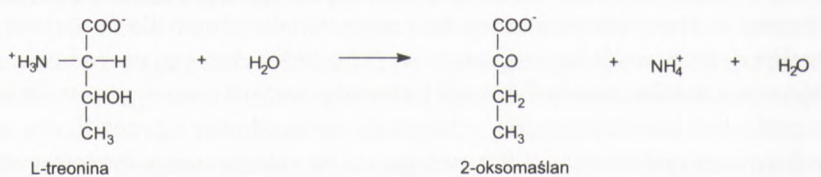
**FENOLO-LIAZA TYROZYNOWA**



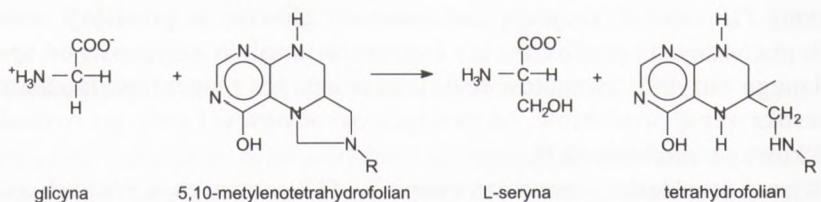
**SYNTAZA TRYPTOFANOWA (podjednostka β)**



**DEHYDRATAZA TREONINY**



**HYDROKSYMETYLOTRANSFERAZA GLICYNY**



Rys. 3. Przykłady reakcji katalizowanych przez enzymy PLP-zależne.





## 5.1. Enzymy PLP-zależne jako producenci farmaceutyków

### 5.1.1. Fenolo-liaza tyrozynowa

Głównym zastosowaniem fenolo-liazy tyrozynowej jest produkcja 3,4-dihydroksyfenyloalaniny (L-DOPA), 2,3,4-trihydroksyfenyloalaniny (L-TOPA) oraz innych pochodnych L-tyrozyny. L-DOPA jest prekursorem dopaminy, neuroprzekaźnika centralnego układu nerwowego oraz adrenaliny i noradrenaliny. Związki te wpływają na samopoczucie i sprawność ruchową. Ich brak ma wpływ na rozwój schizofrenii. W chorobie Parkinsona maleje ilość dopaminy, dlatego też w schorzeniu tym podaje się L-DOPE. Związek ten jest produkowany głównie metodą enzymatyczną, z zastosowaniem TPL immobilizowanej na zeolicie (60), lub przez zmodyfikowane genetycznie komórki *E. coli* (8).

Główną reakcją katalizowaną przez TPL jest rozkład tyrozyny do fenolu, pirogronianu i amoniaku. Reakcja ta jest odwracalna i przy wysokim stężeniu pirogronianu i amoniaku, oraz zastąpieniu fenolu innymi związkami aromatycznymi (np. pirokatechol, pirogalol, halogenkowe pochodne fenolu), można w łatwy sposób otrzymać szereg pochodnych L-tyrozyny, m.in. pochodne tyrozyny zawierające w pierścieniu aromatycznym takie podstawniki jak Cl-, Br-, NO<sub>2</sub>- itp. (61).

W przypadku fenolo-liazy tyrozynowej rozważa się wykorzystanie tego enzymu do oczyszczania ścieków przemysłowych obciążonych fenolem. W tym celu, w badaniach laboratoryjnych wykorzystano szczep *Symbiobacterium thermophilum* (10). Przy wysokim stężeniu amoniaku i pirogronianu z fenolu powstaje L-tyrozyna. Można ją łatwo rozdzielić za pomocą filtracji, gdyż jest nierozpuszczalna w wodzie. Po oczyszczeniu można ją stosować jako dodatek do pasz i podłoży mikrobiologicznych.

### 5.1.2. Dekarboksylaza glutaminianowa

Dekarboksylaza glutaminianowa katalizuje powstanie kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego na drodze dekarboksylacji kwasu glutaminowego. Kwas  $\gamma$ -aminomasłowy jest neuroprzekaźnikiem w centralnym układzie nerwowym (otwiera specyficzne kanały dla jonów chlorkowych, umożliwia działanie Valium) oraz prekursorem wielu farmaceutyków. Kwas  $\gamma$ -aminomasłowy produkowany jest przez komórki *E. coli* GADK10, w których uzyskano nadprodukcję dekarboksylazy glutaminianowej (62).

### 5.1.3. Dekarboksylaza tryptofanowa

Enzym ten katalizuje syntezę tryptaminy z tryptofanu. Amina ta jest substratem w reakcjach biosyntezy monoterpenoidowych alkaloidów indolowych, ma-



jących szerokie zastosowanie w medycynie (63). Należą do nich m.in. winblastyna i winkrystyna (stosowane w leczeniu nowotworów) (64). Poza tym tryptamina jest prekursorem serotoniny i melatoniny.

Produkcja alkaloidów indolowych z roślin jest bardzo kosztowna i pracochłonna (utrudniona izolacja alkaloidów, niskie stężenie produktów), a duża liczba centrów chiralnych w cząteczkach tych związków powoduje ogromne problemy w chemicznej syntezie produktu o odpowiednich właściwościach.

Dekarboksylaza tryptofanowa (TDC, EC 4.1.1.28) jest jednym z dwóch najważniejszych enzymów biorących udział w szlaku syntezy indolowych alkaloidów i dlatego wzbudziła ogromne zainteresowanie naukowców. Efektem tych zainteresowań są m.in. transgeniczne komórki roślinne (np. komórki rośliny tropikalnej *Catharantus roseus*) wykazujące wysoką aktywność TDC, zdolne w ten sposób do wydajnej produkcji tryptaminy (65).

## 5.2. Enzymy PLP-zależne jako cel farmaceutyków

### 5.2.1. Racemaza alaninowa

Racemaza alaninowa jest enzymem katalizującym reakcje racemizacji L- i D-alaniny. Biorąc pod uwagę, że D-alanina jest składnikiem peptydoglukanu, zahamowanie aktywności tego enzymu może doprowadzić do zahamowania procesu biosyntezy ściany komórkowej bakterii. W związku z tym wysiłki naukowców skupiają się na poszukiwaniu specyficznego inhibitora tego enzymu, gdyż znane do tej pory inhibitory racemazy alaninowej działają na inne enzymy PLP-zależne, co może prowadzić do poważnych zaburzeń metabolicznych i neurologicznych (11). Poszukuje się także specyficznych inhibitorów aminotransferazy D-aminokwasów, który to enzym katalizuje proces produkcji innych składników ściany komórkowej (m.in. kwasu D-glutaminowego).

### 5.2.2. Syntaza kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyowego

S-adenozylometionina jest związkiem, z którego w komórkach roślinnych powstaje etylen, przyspieszający proces dojrzewania owoców. Związkiem przejściowym w biosyntezie etylenu jest kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksyowy (ACC), produkowany przez syntazę ACC, enzym PLP-zależny, katalizujący reakcję powstania ACC z S-adenozylometioniny na drodze specyficznej eliminacji. Nadmiar etylenu w owocach i warzywach powoduje szybkie ich przejrzenie i gnicie. Zahamowanie ekspresji genu syntazy ACC (np. za pomocą antysensowego RNA) pozwoliłoby hodować warzywa i owoce (pomidory, melony, truskawki) o dłuższej trwałości (66).



### 5.2.3. Dekarboksylaza ornitynowa

Dekarboksylaza ornitynowa jest enzymem biorącym udział w pierwszym etapie biosyntezy poliamin i amin biogennych (12). Z aminokwasu ornityny powstaje na drodze dekarboksylacji putrescyna, z niej na zasadzie wydłużania łańcucha węglowego o jednostkę propyloaminową powstają spermidyna i spermina. Poliaminy te wiążą się z DNA w młodych komórkach, wspomagając ich podział. Nadekspresja tego enzymu może powodować raka trzustki i prostaty. Zahamowanie aktywności dekarboksylazy ornitynowej jest pożądane w leczeniu tych nowotworów oraz niektórych chorób wywoływanych przez pasożyty (np. śpiączka afrykańska powodowana przez *Trypanosoma brucei*) (67).

### 5.2.4. Hydroksymetylotransferaza serynowa

Jest to enzym występujący we wszystkich komórkach prokariotycznych i eukariotycznych. Katalizuje syntezę glicyny z seryny, z jednoczesnym przeniesieniem grupy hydroksymetylowej na kwas tetrahydrofoliowy tworząc 5,10-metyleno-tetrahydrofolian. Ten ostatni jest głównym źródłem grup metylowych (68), koniecznych m.in. w biosyntezie zasad azotowych. Zwiększona aktywność tego enzymu powoduje wzrost biosyntezy DNA i przyspieszone podziały komórek. Dlatego zahamowanie aktywności hydroksymetylotransferazy w komórkach intensywnie dzielących się może być skutecznym sposobem walki z nowotworami (69).

## 6. Podsumowanie

Enzymy PLP-zależne biorą udział w metabolizmie i transformacji aminokwasów w całym świecie ożywionym, od bakterii po rośliny i zwierzęta wyższe. Dzięki specjalnym właściwościom fosforanu pirydoksalu możliwe są reakcje eliminacji i substytucji na węglu  $\alpha$ ,  $\beta$ , bądź  $\gamma$  aminokwasowego substratu. Na tej podstawie Alexander i wsp. podzielili prawie wszystkie enzymy PLP-zależne o znanej strukturze przestrzennej, na trzy rodziny  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  (3). Wszystkie enzymy w obrębie swojej rodziny, pomimo różnic w sekwencji aminokwasowej, wykazują podobieństwa co do struktury przestrzennej i budowy centrum aktywnego. Dunathan i Voet (2) postawili hipotezę, że wszystkie enzymy PLP-zależne wyewoluowały ze wspólnego przodka, na zasadzie dywergencji, z biegiem czasu rozszerzając swoją aktywność w stosunku do coraz większej liczby różnych substratów i rodzajów katalizowanych reakcji. Należy zaznaczyć, że jednak nie wszystkie enzymy PLP-zależne pochodzą od tego samego przodka. Dekarboksylazy aminokwasów (z wyjątkiem podgrupy II, rozdz. 4.2), fosforylasy czy aminotransferazy D-aminokwasów i aminotransferazy aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu bocznym nie wykazują podo-



bieństwa do pozostałych enzymów, dlatego też nie zostały zaliczone do żadnej z trzech podstawowych grup ewolucyjnych.

Dzięki dynamicznemu rozwojowi krystalografii, w latach 1997-2001 podwoiła się liczba rozwiązyanych struktur białek zdeponowanych w bazach danych (24). Mimo to nadal brakuje wielu informacji dotyczących kontroli szlaków biotransformacji i mechanizmu inhibicji enzymów PLP-zależnych. Jedynie rodzina  $\alpha$  enzymów PLP-zależnych została bardzo dobrze poznana pod względem struktury przestrzennej, pozostałe rodziny mają w bazach danych tylko nielicznych przedstawicieli.

Zaangażowanie enzymów PLP-zależnych w podstawowe dla życia szlaki metaboliczne skłoniło naukowców do badań nad budową i funkcjami tych enzymów. Poznanie dokładnego mechanizmu katalizy i czynników wpływających na specyficzność substratową pozwoli na opracowanie skutecznych i specyficznych inhibitorów poszczególnych enzymów, występujących u patogenów. Jednakże zapotrzebowanie na produkty katalizy niektórych enzymów zawierających fosforan pirydoksalu (np. L-DOPA, kwas  $\gamma$ -aminomasłowy), skłania naukowców do opracowywania skutecznych i efektywnych metod produkcji tych związków za pomocą enzymów PLP-zależnych.

## Literatura

- Braunstein A. E., Shemyakin M. M., (1953), *Biokhimiya*, 18, 393-411.
- Dunathan H. C., Voet J. G., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 3888-3891.
- Alexander F. W., Sandmeier E., Mehta P. M., Christen P., (1994), *Eur. J. Biochem.*, 219, 953-960.
- Janssonius J. N., (1998), *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8, 759-769.
- Mehta P. K., Christen P., (2000), *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 74, 129-184.
- Schneider G., Kack H., Lindqvist Y., (2000), *Structure*, 8, R1-R6.
- Percudani R., Peracchi A., (2003), *EMBO Reports*, 4, 850-854.
- Foor F., Morin N., Bostian K. A., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3070-3075.
- Nagasawa T., Utagawa T., Goto J., Kim C. J., Tani Y., Kumagai H., Yamada H., (1981), *Eur. J. Biochem.*, 117, 33-40.
- Lee S. G., Hong S. P., Sung M. H., (1996), *Enzyme Mikrob. Technol.*, 19, 374-377.
- Mustata G. I., Briggs J. M., (2002), *J. Comp.-Aid. Mol. Des.*, 16, 935-953.
- Kern A. D., Oliveira M. A., Coffino P., Hackert M. L., (1999), *Structure*, 7, 567-581.
- Laber B., Maurer W., Sharf S., Stepusin K., Schmidt F. S., (1999), *FEBS Lett.*, 449, 45-48.
- Lam H. M., Winkler M. E., (1992), *J. Bacteriol.*, 174, 6033-6045.
- Ehrenschaft M., Daub M. E., (2001), *Eur. J. Bacteriol.*, 183, 3383-3390.
- Tazuya K., Adachi Y., Masuda K., Yamada K., Kumaoka H., (1995), *Biochim. Biophys. Acta*, 1244, 113-116.
- Fonda M. L., Marker C. W., (1982), *Am. J. Clin. Nutr.*, 35, 1391-1399.
- John R. A., (1995), *Biochim. Biophys. Acta*, 1248, 81-96.
- Wu T-H, Osés-Prieto J. A., Iriarte A., Martínez-Carrion M., (2003), *Biochim. Biophys. Acta*, 1647, 315-320.
- Cai K., Schirch D., Schirch V., (1995), *J. Biol. Chem.*, 268, 22281-22291.
- Bettati S., Benci S., Campanini B., Raboni S., Chirico G., Beretta S., Schnackerz K. D., Hazlett T. L., Gratton E., Mozzarelli A., (2000), *J. Biol. Chem.*, 275, 40244-40251.



22. Hayashi H., (1995), *J. Biochem.*, 118, 463-473.
23. Dunathan H. C., (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 55, 712-716.
24. Eliot A. C., Kirsch J. F., (2004), *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 383-415.
25. Mehta P. K., Hale T. I., Christen P., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 214, 549-561.
26. Okamoto A., Higuchi T., Hirotsu K., Kuramitsu S., Kagamiyama H., (1994), *J. Biochem.*, 116, 95-107.
27. Jeffrey C. J., Barry T., Doonan S., Petsko G. A., Ringe D., (1998), *Protein Sci.*, 7, 1380-1387.
28. Porter P. B., Barra D., Bossa F., Cantalupo G., Doonan S., Martini F., Shhehan D., Wilkinson S. M., (1981), *Comp. Biochem. Physiol.*, 69B, 737-746.
29. Winefield C. S., Farnden K. J. F., Reynolds P. H. S., Marshall C. J., (1995), *J. Mol. Evol.*, 40, 455-463.
30. Kirsch J. F., Eichele G., Ford G. C., Vincent M. G., Jansonius J. N., Gehring H., Christen P., (1984), *J. Mol. Biol.*, 174, 497-525.
31. Malashkewich V. N., Strokopytov B. V., Borisov V. V., Dauter Z., Wilson K. S., Torchinsky M. Y., (1995), *J. Mol. Biol.*, 247, 111-124.
32. Yano T., Kuramitsu S., Tanase S., Morino Y., Kagamiyama H., (1992), *Biochemistry*, 31, 5878-5887.
33. Gribskov M., Luthy R., Eisenberg D., (1990), *Methods Enzymol.*, 183, 146-159.
34. Kumagai, H., Yamada, H., Matsui, H., Oksishi, H., Ogata, K., (1970), *J. Biol. Chem.*, 250, 1767-1772.
35. Snell E. E., (1975), *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 42, 287-333.
36. Antson A. A., Demidkina T. V., Gollnick P., Dauter Z., von Tersch R. L., Long J., Berezhnoy S. N., Phillips R. S., Harytyunyan E. H., Wilson K. S., (1993), *Biochemistry*, 32, 4195-4206.
37. Clausen T., Huber R., Laber B., Prohlfenz H-D., Messerschmidt A., (1996), *J. Mol. Biol.*, 262, 202-224.
38. Martel A., Bouthier de la Tour C., Le Goffic F., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147, 656-671.
39. Momany C., Ernst S., Ghosh R., Chang N-L., Hackert M. L., (1995), *J. Mol. Biol.*, 252, 643-655.
40. Hyde C. C., Ahmed S. A., Padlan E. A., Wilson Miles E., Davies D. R., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 17857-17871.
41. Miles E. W., (1991), *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 64, 93-172.
42. Gallagher D. T., Gilliliand G. L., Xiao G., Zondlo J., Fisher K. E., Chinchilla D., Eisenstein E., (1998), *Structure*, 6, 465-475.
43. Lawther R. P., Wek R. C., Lopes J. M., Perevia V., Taillon B. E., Hatfield G. W., (1987), *Nucl. Acids Res.*, 15, 2137-2155.
44. Sugio S., Petsko G. A., Manning J. M., Soda K., Ringe D., (1995), *Biochemistry*, 34, 9661-9669.
45. Okada K., Hirotsu K., Sato M., Hayashi H., Kagamiyama H., (1997), *J. Biochem.*, 122, 637-641.
46. Tanizawa K., Masu Y., Asano S., Tanaka H., Soda K., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 2445-2449.
47. Peisach D., Chipman D. M., van Ophem P. W., Manning J. M., Ringe D., (1998), *Biochemistry*, 37, 4958-4967.
48. Okada K., Hirotsu K., Sato M., Hayashi H., Kagamiyama H., (1997), *J. Biochem.*, 121, 637-641.
49. Kamitori S., Odagaki Y., Inoue K., Kuramitsu S., Kagamiyama H., Matsuura Y., Higuchi T., (1988), *J. Biochem.*, 105, 671-672.
50. Hutson S. M., Fenstermacher D., Mahar C., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 3618-3625.
51. Yennawar N., Dunbar J., Conway M., Hutson S., Farber G., (2001), *Acta Crystallogr., D Biol., Crystallogr.*, 57, 506-515.
52. Davoodi J., Drown P. M., Bledsoe R. K., Wallin R., Reinhart G. D., Hutson S. M., (1998), *J. Biol. Chem.*, 273, 4982-4989.
53. Cooper A. L., Bruschi S. A., Conway M., Hutson S. M., (2002), *Biochem. Pharmacol.*, 65, 181-192.
54. Sandmeier E., Hale T. I., Christen P., (1994), *Eur. J. Biochem.*, 221, 997-1002.
55. Sprang S., Fletterick R. J., (1979), *J. Mol. Biol.*, 131, 523-551.
56. Watson K. A., Schinzel R., Palm D., Johnson L. N., (1997), *EMBO J.*, 1997, 1, 1-14.
57. McLaughlin P. J., Stuart D. I., Klein H. W., Oikonomakos N. G., Johnson L. N., (1984), *Biochemistry*, 23, 5862-5873.
58. He X. M., Liu H. W., (2002), *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 701-754.
59. Kraus J. P., Janosik M., Kozich V., Mandell R., Shih V., et al., (1999), *Hum. Mutat.*, 13, 362-375.
60. Seetharam G., Saville B. A., (2002), *Enzyme and Microbiol. Technology*, 31, 747-753.



61. Nagasawa T., Utagawa T., Goto J., Kim Ch. J., Tani Y., Kumagai H., Yamada H., (1981), *Eur. J. Biochem.*, 117, 33-40.
62. Plokhov A. Yu., Gusyatiner M. M., Yampolskaya T. A., Kaluzhsky V. E., Sukhareva B. S., Schulga A. A., (2000), *Appl. Biochem. Biotechnol. – Part A. Enzyme Engineering and Biotechnology*, 88, 257-265.
63. Faccini P. J., Huber-Allanach K. L., Tari L. W., (2000), *Phytochemistry*, 54, 121-138.
64. Geerlings A., Redondo F. J., Contin A., Memelink J., van der Heijden R., Verpoorte R., (2001), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 420-424.
65. Whitmer S., Cancel C., Hallard D., Goncalves C., Verpoorte R., (1998), *Plant Physiol.*, 116, 853-857.
66. Yang S. F., Oetiker J. H., (1998), *J. Jap. Soc. Horticul. Sci.*, 67, 1209-1214.
67. Jackson L. K., Brooks H. B., Osterman A. L., Goldsmith E. J., Philips M. A., (2000), *Biochemistry*, 39, 11247-11257.
68. Blakley R. L., (1955), *Biochem. J.*, 61, 315-323.
69. Renwick S. B., Snell K., Baumann U., (1998), *Structure*, 6, 1105-1116.