

ФЕРМЕНТЫ ДЕСТРУКЦИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ НЕЙРОТОКСИНОВ

© 2004 г.

Е. Н. ЕФРЕМЕНКО,
С. Д. ВАРФОЛОМЕЕВ

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

I. Введение. II. Биологическая детоксикация фосфорорганических нейротоксинов. III. Микробная ортофосфатгидролаза. IV. Бактериальная кислая ортофосфатгидролаза. V. Параоксоназа млекопитающих. VI. Гидролиз ФОС в присутствии гидролитических ферментов разных классов. VII. Экспрессия генов ФОС-гидролизующих ферментов в различных объектах. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Интенсивное использование пестицидов широко вошло в практику ведения сельского хозяйства в экономически развитых странах мира, в том числе и в России. Фосфорорганические соединения (ФОС), представляющие собой эфиры ортофосфорной и алкилфосфоновых кислот, а также их производные, составляют более 40% от общего объема применяемых в мире пестицидов (табл. 1). Хотя применение химических средств защиты растений ведется в режиме, строго регламентируемом ГОСТами (4–6 кг/га) [9], тем не менее относительно низкая водорастворимость многих ФОС, их способность аккумулироваться в почве и сточных водах, а также сравнительно низкие скорости их естественного разложения приводят к тому, что ФО-пестициды обнаруживаются в различных сельскохозяйственных продуктах. Анализы продуктов питания свидетельствуют о наличии в них ФОС

Принятые сокращения: ФО — фосфорорганические; ОРН — ортофосфатгидролаза; ДФФ — диизопропилфторфосфат; ПОН — параоксоназа; ОРАА — кислая ортофосфатгидролаза; АChE — ацетилхолинэстераза; *opd* — ген ОРН; HDL — липопротеины высокой плотности; VX — O-этил-S-β-диизопропиламиноэтилметилфосфонат.

Адрес для корреспонденции: e-mail: efremenko@enzyme.chem.msu.ru

Авторы благодарят РФФИ за финансовую поддержку (грант № 02–04–48981).

Таблица 1
Структуры наиболее широко известных ФОС — пестицидов и боевых отравляющих веществ

№	Название вещества (синонимы)	Структура	№	Название вещества (синонимы)	Структура
1.	Параоксон		8.	Диазинон (базудин)	
2.	Паратион (тиофос)		9.	VX (США)	
3.	Метил-паратион		10.	VX (Россия)	
4.	Кумафос (ко-рал, резитокс)		11.	ДФФ	
5.	Малатион (карбофос)		12.	Зарин	
6.	Ацефат		13.	Зоман	
7.	Деметон-S		14.	Табун	

даже после жесткой технологической обработки и длительного срока хранения [22, 97]. Более того, ФОС находят даже в текстиле, выработанном из натурального сырья, собранного с обработанных пестицидами территорий [66].

Проникновение ФОС в организм человека и животных происходит путем диффузии через кожу, ингаляционным путем и перорально — с водой и продуктами питания. Воздействие ФОС на многие живые объекты достаточно хорошо изучено: все они являются ингибиторами холинэстераз. Следствием этого является накопление холина в синапсах центральной и периферической нервной системы, оказывающее нервно-паралитическое воздействие. Механизм ингибирования включает в себя необратимое фосфорилирование остатка серина в активном центре холинэстераз. Даже в незначительных количествах ФОС способны вызывать у человека острые отравления вплоть до летального исхода. Значения параметра LD_{50} , характеризующего токсичность боевых отравляющих веществ и некоторых ФО-пестицидов, приведены в табл. 2 [1, 2]. Наиболее важным фактором, определяющим токсичность ФОС, является реакционная способность фосфорного центра, которая, в свою очередь, определяется природой и размером групп, связанных с атомом фосфора. Соединения, в которых атом фосфора ковалентно связан с атомом кислорода, более токсичны, чем аналогичные соединения с атомом серы в таком же положении.

Таблица 2
Токсичность некоторых ФО-пестицидов и боевых отравляющих веществ по отношению к человеку [1, 2]

ФОС	LD_{50} , (мг/кг, через кожу)	LD_{50} , (мг/кг, перорально)
Параоксон	5	1
Паратион	100	18
Кумафос	**	90–110
Диазинон	450–900	150–600
Малатион	4000–6000	450–1000
Метилпаратион	350	25
Деметон-S	10	2
ДФФ	100	4
Табун	3	0,4
Зарин	1,5	0,014
Зоман	1,4	0,035
VX	0,1	0,008

** — плохо всасывается через кожные покровы.

Так, например, параоксон, в котором атом фосфора образует двойную связь с атомом кислорода, приблизительно в 20 раз более токсичен, чем паратион с аналогичной P—S связью.

Не менее серьезно мутагенное воздействие ФОС на млекопитающих. На сегодняшний день многочисленные данные свидетельствуют о возникновении хромосомных aberrаций лимфоцитов у жителей территорий, прилегающих к сельскохозяйственным зонам, подвергавшимся когда-либо обработке ФОС [3], а также у людей, которые были задействованы в производстве и применении ФОС [6].

Согласно экономическим расчетам, отказ от применения столь токсичных для человеческого организма соединений неизбежно привел бы к сокращению всего урожая в мире на 50% и вызвал бы рост цен на сельскохозяйственную продукцию в 4–5 раз [4]. По этой причине невозможность отказа от применения ФОС в различных отраслях сельского хозяйства приводит к тому, что важнейшей экологической и научной проблемой становится их обнаружение и детоксикация. Решением этой проблемы занимаются ученые многих стран мира на протяжении нескольких десятков лет, но именно в последние пять лет интенсивность проводимых исследований резко увеличилась. На сегодняшний день известно о существовании в европейских странах, преимущественно занимающихся сельским хозяйством — Италии [63], Болгарии [11], Греции [65], Испании [104], Польше [68] и др., национальных экологических и научных программ, предусматривающих колоссальные капиталовложения для решения проблем, связанных с применением ФОС и уничтожением ранее произведенных их запасов. При этом предполагается осуществление контроля над содержанием ФО-пестицидов в продуктах сельского хозяйства, водах рек и муниципальных отходах [8, 61]. Аналогичные исследования проводятся также в США [87, 92] и странах Азии (Китае [15], Японии [103]). Наряду с широкомасштабным использованием ФО-пестицидов следует подчеркнуть широкое применение ФОС рядовыми потребителями в качестве бытовых инсектицидов для уничтожения муравьев, тараканов и других насекомых в жилищах, на приусадебных участках, а также с целью защиты домашних и сельскохозяйственных животных от различных паразитов (клещей, блох и т.п.). Основным результатом этих мер — обнаружение с помощью методов жидкостной хроматографии присутствия ФОС в домашней пыли [38]. Именно этот факт определяет отношение к ФОС, как к серьезнейшему антропогенному фактору [113]. Следует также заметить, что к рассматриваемой группе веществ, состоящей преимущественно из пестицидов, относятся также и боевые отравляющие вещества (см. табл. 1), запасы которых должны быть уничтожены, согласно

Международной конвенции о сокращении химического оружия <<http://www.opcw.org/>>.

На современном этапе развития человечества, существует и приобретает определенную реальность [7, 119] угроза химического терроризма, предполагающего использование не только химического оружия массового поражения, но и его аналогов, в данном случае ФО-пестицидов. В связи с этим поиск эффективных путей деградации ФОС становится чрезвычайно актуальной проблемой.

В последнее время основное внимание уделяется проведению работ по детоксикации различных ФОС с помощью биологических систем, а значит, без риска применения жестких химических методов деградации, отрицательно влияющих на состояние окружающей среды. Как правило, «мягкие» условия включают неагрессивные среды и температурный режим в пределах 25–50 °С. В связи с этим современные исследования сфокусированы главным образом на следующих направлениях: поиск новых источников ферментов, гидролизующих ФОС; клонирование и секвенирование кодирующих их генов; выделение и анализ свойств ферментов; осуществление «рационального дизайна» ферментов с целью конструирования рекомбинантных белков с измененными каталитическими характеристиками; выполнение направленных мутаций, обеспечивающих специфическую внутриклеточную локализацию ферментов или их внеклеточную секрецию. Состоянию этих проблем и посвящена настоящая работа.

II. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕТОКСИКАЦИЯ ФОСФОРГАНИЧЕСКИХ НЕЙРОТОКСИНОВ

ФОС–ДЕГРАДИРУЮЩИЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ

Сразу после второй мировой войны были проведены первые целенаправленные поиски ФОС–деградирующих биологических объектов, и в 1946 г. впервые была показана возможность ферментативного гидролиза диизопропилфторфосфата (ДФФ), взятого в качестве субстрата, экстрактом сыворотки крови [67]. Ряд экспериментов, последовавших за этим открытием [49, 72, 73], выявил колоссальные технические сложности, связанные с выделением и изучением фермента, катализирующего гидролиз ДФФ. Вследствие этого подобные исследования были приостановлены.

В последующие двадцать лет интенсивно проводились работы с образцами почв, взятыми на территориях, регулярно обрабатываемых сельскохозяйственными пестицидами. В результате этого было установлено, что как среди про-, так и эукариотов существуют мик-

роорганизмы, способные осуществлять трансформацию ФОС путем их окисления и гидролиза. Следует заметить, что сообщения об обнаружении у различных микроорганизмов способности к деградации ФОС с образованием менее токсичных продуктов были противоречивы. Во-первых, использовались разные по химической структуре субстраты, к которым микроорганизмы проявляли наибольшее сродство, а во-вторых, максимальное внимание в этих исследованиях уделялось биотехнологическим аспектам, связанным с выделением и идентификацией культур, изучением влияния численности микробных клеток, pH, температурных условий и концентрации кислорода в среде на интенсивность метаболических процессов. Более того, в ходе исследований, проводимых различными авторами на этом этапе, огромное внимание уделялось вопросам, связанным с выяснением возможных путей метаболизма ФОС. Но и здесь не было однозначного мнения о том, например, какие микроорганизмы способны усваивать ФОС в качестве источника углерода, фосфора или азота. Так, в 1973 г. были выделены клетки *Pseudomonas sp.*, способные гидролизовать паратион и метаболизировать образующийся п-нитрофенол в качестве источника углерода и азота [102]. При этом было установлено, что 1 мМ метилпаратиона может быть биodeградирован на 99% в течение 48 ч.

Чуть позже А. Розенберг и М. Александер [94] выделили два штамма клеток *Pseudomonas sp.*, способных использовать продукты гидролиза различных ФОС в качестве единственного источника фосфора. В 1987 г. К. Рэк и Дж. Коатс выделили штамм *Pseudomonas*, способный использовать изофенфос в качестве единственного источника энергии и углерода [89], а Л. Нельсон в 1982 г. выделил штаммы *Bacillus* и *Arthrobacter*, способные осуществлять полную минерализацию паратиона [81]. Были опубликованы также сведения о том, что паратион может быть включен в трофическую цепочку микробных консорциумов как кометаболит [24, 82, 90]; при этом в качестве основного источника углерода в состав питательных сред должны быть введены глюкоза, дрожжевой экстракт или триптон. Другим авторам удалось обнаружить, что цианобактерии родов *Anabaena*, *Aulosira* и *Tolypothrix sp.* способны метаболизировать ФОС без каких-либо добавок питательных веществ [70, 71].

Позже Н. Сетанатан и Т. Йошида выделили из грунта рисовых полей диазинон-деградирующие клетки *Flavobacterium sp.* (АТТС 27551) и впервые показали, что не только жизнеспособные клетки могут осуществлять трансформацию ФОС, но и бесклеточный экстракт может катализировать гидролиз хлорпирифоса и паратиона [80, 100]. Д. Мунике установил, что грубый экстракт из бактериальной куль-

туры, выращенной на среде, содержащей паратион, проявляет высокую гидролитическую активность по отношению к десяти различным ФОС [102]. При этом скорость ферментативного гидролиза паратиона была в 3000 раз выше скорости химического гидролиза. Другие ФОС-деградирующие бактерии *Pseudomonas diminuta* MG были выделены в виде чистой культуры в 1976 г., и именно эти бактерии стали в дальнейшем предметом интенсивных генетических и биохимических манипуляций [94].

Наряду с бактериями, у ряда грибов также была обнаружена способность к деградации различных ФО-пестицидов. Так, оказалось, что микроскопический гриб *Phanaerochaete chrisosporium* способен осуществлять деградацию большого числа ФОС, разнообразных по химической структуре [81]. Клетки гриба *Trichoderma viridae* способны гидролизовать фенитротрион и фенитрооксон — широко применяемые тиофосфорные пестициды [53]. Анализ тринадцати различных штаммов грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Trichoderma* на их способность метаболизировать малатион и дурсбан продемонстрировал, с одной стороны, наличие внутриклеточного накопления пестицидов, а с другой — интенсивную секрецию комплекса белков и прямую корреляцию между концентрацией внеклеточных белков и уровнем биодеградации ФОС [83]. В ходе экспериментов *in vivo* было установлено, что 0,5–1 мМ концентрация различных ФО-пестицидов (малатиона, паразофоса, метил-пиримифоса и профенофоса) в питательной среде (почвогрунте) является оптимальной для индукции процессов биодеградации и использования ФОС грибными культурами в качестве источников углерода и фосфора [45]. В таких условиях наибольшую метаболическую активность проявляют штаммы *Aspergillus flavus* и *Aspergillus sydowii*, которые в течение трех недель способны усваивать 0,3–1 г вышеперечисленных пестицидов, распределенных в 1 кг почвы.

Оказалось также, что отдельные виды водорослей могут метаболизировать присутствующие в сточных водах монокротофос и хиналфос, применяемые в качестве высокоэффективных инсектицидов, действие которых направлено против хлопкового червя. Среди представителей растительного мира также обнаружены отдельные виды, способные осуществлять гидролиз ФОС. Так, экстракты из ряски *Lemna minor*, многокоренника *Spirodela oligorhiza* и коровьего гороха *Vigna radiata* активно катализировали гидролиз зомана [50].

Одним из последних в длинной цепочке биологических объектов, где был обнаружен фермент, способный гидролизовать ДФФ, стал ганглий кальмара *Loligo vulgaris* [95, 96].

Таким образом, разнообразие биологических систем, способных проявлять на том или ином уровне детоксикационную активность по отношению к различным ФОС, год от года растет, и это приводит к необходимости систематизации знаний о том, какие именно ферменты клеток катализируют биоремедиационные процессы.

ФЕРМЕНТЫ, КАТАЛИЗИРУЮЩИЕ ГИДРОЛИЗ ФОС

На протяжении 40 лет с момента обнаружения потенциального биологического источника ни один из ферментов, катализирующих разложение ФОС, так и не был выделен в гомогенном состоянии и охарактеризован [43]. Только в конце 80-х годов прошлого века появились первые статьи, информировавшие о том, что, несмотря на многообразие источников, способных окислять и гидролизовать ФОС, лишь несколько ферментов было выделено из них и подробно изучено. При этом оказалось, что галофильные бактерии *Alteromonas* синтезируют два фермента, различающихся по молекулярной массе и обладающих гидролазной активностью по отношению к ДФФ [28, 29]. Один из этих ферментов был очищен более чем в 300 раз до гомогенного состояния, и было установлено, что он представляет собой одноцепочечный полипептид с молекулярной массой 62 кДа. Помимо ДФФ, фермент катализирует гидролиз зомана и зарина, но не проявляет каталитической активности по отношению к VX.

В термофильных бактериях *Bacillus stearothermophilus* был обнаружен фермент с молекулярной массой 84 кДа, обладающий гидролитической способностью по отношению к зарину и зоману, но не активный по отношению к ДФФ и VX [78].

Ген фермента, катализирующего гидролиз ФОС, выделенный из бактерий *Nocardia* sp., был клонирован в клетках *E. coli* и подробно охарактеризован [76]. Уровень его экспрессии под *lac* промотором в *E. coli* оказался в 15 раз выше, чем под нативным промотором. Секвенс данного гена сильно отличался от результатов секвенса гена аналогичного фермента, выделенного из *Pseudomonas diminuta* [77]. Кроме того, фермент из клеток *Nocardia* sp. NRRL B-16944 имел существенно меньшее сродство по отношению к этилпаратиону. В дальнейшем из клеток *Nocardioides simplex* NRRL B-24074, входящих в состав микробного консорциума, деградирующего кумафос, был также выделен и исследован новый фермент, гидролизующий ФОС [74]. Оказалось, что очищенный фермент является мономером с молекулярной массой 45 кДа и проявляет максимальную каталитическую активность по отношению к этилпаратиону. При этом для гидролиза ФОС данным ферментом не требуется присутствия в реакционной среде ионов двухвалентных металлов. Напротив, фермент, выделенный из клеток *Pseudomonas diminuta* [34, 35], обладал широким спек-

ром субстратной специфичности и высокой каталитической активностью в присутствии ионов Zn^{2+} или Co^{2+} .

Следует заметить, что в различных публикациях авторы применяли разные названия ферментов, согласно тем субстратам, к которым у них была выявлена наибольшая специфичность. В связи с этим названий ферментов было практически столько же, сколько и самих субстратов. Определенную путаницу вносили также те статьи, в которых, очевидно, описывался один и тот же фермент, но авторы называли его по-разному, например, органофосфатгидролаза или параоксоназа, или зоманаза, так как у него была обнаружена активность по отношению к трем разным субстратам. Вплоть до 1984 г. ферменты, гидролизующие параоксон, относили к числу арилэстераз, катализирующих гидролиз фенилацетата (ЕС 3.1.1.2). Однако, с обнаружением некоторых форм параоксоназ, не способных осуществлять гидролиз фенилацетата, в 1989 г. было решено изменить номенклатуру ферментов и выделить вышеуказанные ферменты под отдельным номером в группе ЕС 3.1.8, объединяющей гидролазы триэфиров фосфорной кислоты. Последние изменения в номенклатуру ферментов, гидролизующих ФОС, были внесены в 1993 г., когда часть ферментов, относящихся к группе фосфорорганических ангидролаз (ЕС 3.8.2.1) и катализирующих гидролиз связи $P-CN$, была отделена от ферментов, способных осуществлять гидролиз $P-F$ связи. Последняя совокупность ферментов была отнесена к новой подгруппе ЕС 3.1.8.2.

Согласно классификации, установившейся, наконец, десятилетие назад, ферменты по их способности гидролизовать ФО-пестициды и боевые отравляющие вещества (Е.С. 3.1.8.) подразделяются на две большие подгруппы:

1. Арилдиалкилфосфатазы, включающие параоксоназу, органофосфатгидролазу (ОРН) и фосфотриэстеразу (Е.С. 3.1.8.1.).
2. Диизопропилфторфосфатазы (ДФФазы), включающие зоманазу, зариназу и кислую органофосфатангидролазу (ОРАА) (Е.С. 3.1.8.2.).

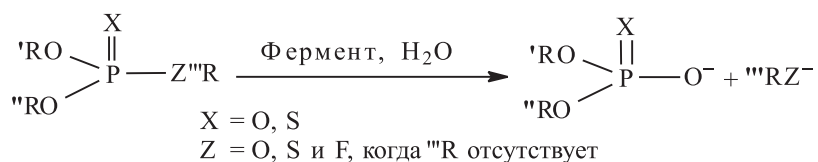
Таким образом, современная классификация основана на типе химической связи, которая расщепляется в процессе катализа. Арилдиалкилфосфатазы катализируют расщепление $P-O$ и $P-S$ связей, а диизопропилфторфосфатазы — $P-F$ связь [116].

К сожалению, даже высококвалифицированные специалисты, работающие в области исследований, связанных с указанными ферментами, плохо осведомлены об этой классификации и по-прежнему приводят в современных научных статьях разные названия ферментов. Это необходимо учитывать при трактовке опубликованных результатов, увязывая названия с вышеуказанными синонимами.

На сегодняшний день отдельно стоящим звеном остается параоксоназа/арилэстераза (ПОН), выделенная из сыворотки крови млекопитающих, которая сохранила за собой старый классификационный номер ЕС 3.1.1.2 и прочно закрепившееся за этим ферментом название, несмотря на новую классификацию.

Таким образом, под одним и тем же названием «параоксоназа» продолжают существовать два разных фермента, имеющих различные классификационные номера, источники выделения (микробного и животного происхождения) и каталитические свойства. На это следует обращать особое внимание при анализе литературных данных.

Суммируя информацию о специфическом ферментативном гидролизе ФОС, можно привести следующую обобщающую схему реакции, катализируемой ферментами вышеуказанных групп:



III. МИКРОБНАЯ ОРГАНОФОСФАТГИДРОЛАЗА

КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Арилдиалкилфосфатаза (Е.С. 3.1.8.1), которая в статьях упоминается чаще всего как ОРН и реже как фосфотриэстераза, обнаружена только в микробных источниках и представляет собой димер с молекулярной массой 72 кДа, состоящий из двух одинаковых субъединиц, содержащих по 336 аминокислотных остатков [33, 34]. Величина свободной энергии формирования белковой глобулы для ОРН составляет 44 ккал/моль [44], что примерно в два раза больше, чем у других димерных белков. В связи с этим существует предположение о том, что взаимодействие между мономерными субъединицами превосходит энтропийные потери, возникающие при образовании олигомерной структуры. ОРН является металл-зависимым ферментом и в активном центре каждой из субъединиц содержится по два иона Zn^{2+} или Co^{2+} . В ряде работ [18, 84, 85] было детально исследовано влияние ионов различных металлов на каталитическую активность ОРН и показано, что замена ионов Zn^{2+} или Co^{2+} в активном центре фермента на ионы других двухвалентных металлов, в частности, Cd^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , приводит к снижению, но не потере гидролитической активности.

Исследование субстратной специфичности ОРН [33, 34, 57, 91] позволило установить, что фермент в разной степени способен катализировать гидролиз Р–О, Р–F и Р–S связей в триэфирах фосфорной кислоты. В табл. 3 приведены кинетические параметры реакций гидролиза различных ФО-нейротоксинов, катализируемых ОРН. Видно, что наименьшую специфичность ОРН проявляет по отношению к ФОС с Р–S-связью.

Таблица 3
Кинетические параметры реакции ферментативного гидролиза
ФО-нейротоксинов под действием ОРН

Субстрат	Тип связи	$k_{\text{cat}}, \text{с}^{-1}$	$K_m, \text{мМ}$	$k_{\text{cat}}/K_m, \text{М}^{-1}\text{с}^{-1}$
Параоксон	Р–О	3170	0,058	$5,5 \times 10^7$
Паратион	Р–О	630	0,24	$2,6 \times 10^6$
Метил-паратион	Р–О	76	0,84	$0,9 \times 10^5$
Кумафос	Р–О	600	0,39	$1,5 \times 10^6$
Малатион	Р–S	0,0067	0,14	50
Ацефат	Р–S	2,8	160	17,5
Деметон-S	Р–S	1,2	0,78	$1,5 \times 10^3$
VX	Р–S	0,3	0,44	680
ДФФ	Р–F	74,7	0,96	$7,8 \times 10^4$
Зарин	Р–F	56	0,7	$8,0 \times 10^4$
Зоман	Р–F	5	0,5	$1,0 \times 10^4$

В ряде последующих работ тех же авторов [47, 48] была исследована стереоспецифичность ОРН по отношению к серии хиральных и ахиральных производных параоксона, содержащих различные комбинации заместителей (метил, этил, изопропил и фенил). Исследование закономерностей гидролиза соединений такого рода было обусловлено тем, что тиоловые эфиры производных фосфоновых кислот, к которым относятся VX, зарин и зоман, содержат оптически активный фосфорный центр, и индивидуальные изомеры этих соединений характеризуются различным ингибирующим эффектом на ацетилхолинэстеразу (AChE). Анализ кинетических параметров реакций гидролиза исследованных субстратов, катализируемых ОРН, показал, что, во-первых, величина k_{cat} уменьшается для всех замещенных фосфотриэфилов в ряду $\text{Me} > \text{Et} > i\text{-Pr}$, а, во-вторых, величины k_{cat} и k_{cat}/K_m для $S_p(-)$ -энантиомеров, содержащих объемные заместители, превышают аналогичные величины для $R_p(+)$ -изомеров. Это свидетельствует о более предпочтительной ориентации *S*-изомера в активном центре для последующей нуклеофильной атаки. Таким образом, $R_p(+)$ -энантиомеры, которые быстрее инактивируют AChE, подвержены более медленному гидролизу под действием ОРН по сравнению с их менее токсичными аналогами — *S*-энантиомерами.

СТРУКТУРА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ОРГАНОФОСФАТГИДРОЛАЗЫ. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТА И ЕГО ИНГИБИТОРЫ

Установлено, что реакция гидролиза ФО-соединений, катализируемая ОРН, протекает по S_N2 -механизму с инверсией конфигурации атома фосфора [64]. Посредством сайт-направленного мутагенеза было определено, что замена шести из семи остатков гистидина в полипептидной цепи ОРН на Asp приводит к драматическому уменьшению каталитической активности фермента [60, 62]. Данные рентгеноструктурного анализа ОРН [13, 14, 112] показали, что шесть остатков His находятся непосредственно вблизи активного центра фермента, а четыре из них (His-55, His-57, His-201 и His-230) являются лигандами ионов металла в активном центре. Два иона металла связаны друг с другом посредством карбамиллированного остатка Lys-169. Структура активного центра Cd^{2+}/Cd^{2+} -замещенного фермента приведена на рис. 1 [14].

Анализ апо- и холо-форм фермента выявил значительные различия в их структурах. В апо-форме фермента остаток Lys-169 не модифицирован. Было продемонстрировано, что высокая концентрация бикарбоната ускоряет процесс формирования активного центра фермента при переходе апо-формы в холо-форму в присутствии ионов металла. При помощи ^{13}C ЯМР-спектроскопии было доказано, что

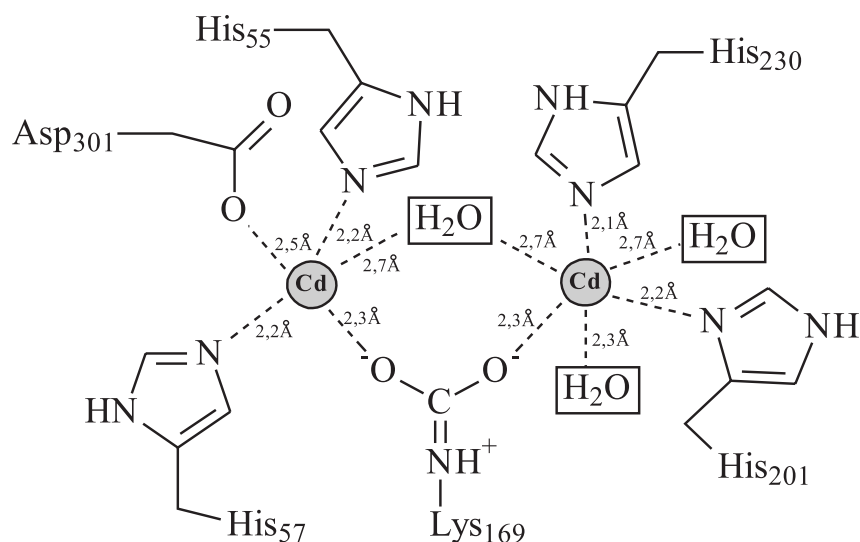


Рис. 1. Структура активного центра Cd^{2+} -содержащей орнанофосфатгидролазы [14].

в образовании карбамилированного остатка Lys принимает участие диоксид углерода.

Вторым мостиковым лигандом между ионами металла служит молекула воды. Координационная сфера одного из ионов металла имеет конфигурацию тригональной бипирамиды, а второго — октаэдрическую. Расстояние между ионами металла в активном центре составляет 3,8 Å.

Помимо функциональных групп фермента, принимающих непосредственное участие в катализе, предполагается существование трех гидрофобных участков, влияющих на связывание субстрата и определяющих, таким образом, специфичность фермента [44, 48]. Существует предположение о том, что одна из этих групп более приспособлена к взаимодействию с большими и разветвленными гидрофобными радикалами, в то время как для двух других групп более предпочтительными являются этокси-заместители у фосфорного центра. Поскольку вклад электростатических взаимодействий в связывание триэфиров фосфорной кислоты в активном центре фермента минимален, то, возможно, именно эти две группы аминокислотных остатков определяют субстратную специфичность и стереоселективность ОРН.

Кинетические исследования закономерностей взаимодействия органических аминов, вводимых в реакционную среду, с функциональными группами в активном центре фермента позволили прояснить роль ионов металла в катализе, осуществляемом ОРН [99]. Так, исследование влияния ряда аминов с различной геометрией и основностью на скорость ферментативного гидролиза параоксона показало, что по своему влиянию на ОРН амины могут быть разделены на две группы: 1) активирующие ОРН; 2) ингибирующие фермент или не оказывающие существенного воздействия на его каталитическую активность. Было установлено, что в интервале pH-оптимума ОРН (pH 8,5–9,5) эффект активации фермента пропорционален концентрации именно свободной, а не протонированной формы амина. Также было показано, что активирующее действие аминов на ОРН определяется как величиной pK_a амина (уменьшается в ряду пиперидин > диизопропиламин > диэтиламин), так и его структурными особенностями, а именно, меньшее активирующее действие оказывают третичные амины (триэтиламин) и амины с разветвленным радикалом (*трет*-бутиламин). Установлено, что активация ОРН аминами носит неконкурентный характер [99].

Согласно современным представлениям о механизме действия ОРН (рис. 2), субстрат взаимодействует с ионом Co^{I} , вытесняя мостиковую молекулу воды. Второй ион Co^{II} за счет координации понижает pK_a молекулы воды, способствуя образованию гидроксид-иона при значениях pH, близких к нейтральным.

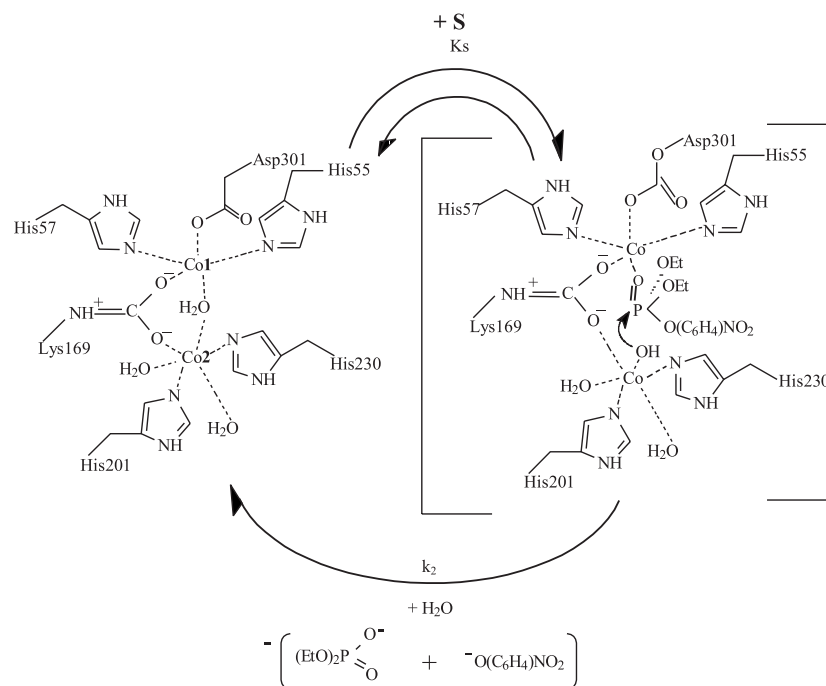


Рис. 2. Предполагаемый механизм действия органофосфатгидролазы [5].

При связывании амина с ионом Co^{2+} в координационной сфере иона Co^{2+} происходит замещение более слабого электронодонора — молекулы воды, на сильный донор электронов — амин. При этом увеличивается электронная плотность на ионе Co^{2+} , что, в свою очередь, приводит к увеличению нуклеофильности атакующего OH^-/H_2O -лиганда. Если атакующей частицей в реакции является молекула воды, то присутствие амина в координационной сфере иона Co^{2+} может способствовать ее депротонированию, то есть образованию сильного нуклеофила — гидроксид-иона. В наибольшей степени данный эффект проявляется, по всей видимости, в том случае, когда амин замещает молекулу воды, находящуюся в *транс*-положении по отношению к атакующему аква/гидроксо-лиганду. Известно, что лиганд, находящийся в *транс*-положении по отношению к уходящему лиганду, оказывает значительно более сильное влияние на скорость его элиминирования из комплекса, чем группы, находящиеся в *цис*-положениях. Величина *транс*-эффекта лиганда уменьшается в следующем порядке: $NR_3 > OH^- > H_2O$. Координация молекулы амина в *транс*-положении приводит к тому, что возрастает нуклеофильность «уходящего»

аква-лиганда, кроме того, он становится более лабильным и легче вступает в реакции замещения [5].

Таким образом, общее заключение о роли ионов металла в активном центре ОРН таково: один из ионов металла за счет координации с неэфирным атомом кислорода субстрата повышает электрофильность фосфорного центра, а второй ион служит промотором атакующего нуклеофила.

В связи с тем, что ионы металла играют столь важную роль для ОРН, все металл-хелатирующие агенты, в частности, *o*-фенантролин, этилендиаминтетраацетат и 2,6-пиридин дикарбоксилат являются сильными ингибиторами фермента [23, 34]. Установлено также, что из 20 аминокислот только цистеин и гистидин способны образовывать координационную связь с ионом металла в активном центре фермента и инактивировать ОРН [34]. β -Меркаптоэтанол, дитиотреитол и дитиоэритритол конкурентно ингибируют ОРН, при этом значения констант ингибирования, определенные для данных соединений [34], более чем на порядок превышают K_m для параоксона.

Использование органических растворителей часто является необходимым условием для изучения ферментативного гидролиза мало-растворимых в воде ФО-нейротоксинов. В связи с этим было изучено влияние различных растворителей на кинетические свойства ОРН. В ряде работ [16, 17, 98] была продемонстрирована инактивация ОРН в присутствии таких органических растворителей, как 1,4-диоксан, ацетонитрил, этанол, метанол, пропанол, диметилформамид и диметилсульфоксид, которые являются конкурентными ингибиторами фермента. Причем была установлена определенная корреляция между величиной ингибирующего воздействия растворителя на ОРН и его полярностью [98]. Поскольку связывание незаряженных триэфиров фосфорной кислоты в активном центре носит гидрофобный характер, то уменьшение полярности реакционной среды приводит, по-видимому, к снижению скорости переноса субстрата в гидрофобное микроокружение активного центра фермента. Таким образом, использование полярных растворителей с высоким значением величины диэлектрической проницаемости предпочтительнее для проведения ферментативного гидролиза ФО-соединений с применением ОРН.

IV. БАКТЕРИАЛЬНАЯ КИСЛАЯ ОРГАНОФОСФАТАНГИДРОЛАЗА

Диизопропилфторфосфатаза, упоминаемая в литературе чаще всего как кислая органофосфатангидролаза (ОРАА) (Е.С. 3.1.8.2.), была обнаружена в нескольких штаммах галофильных бактерий рода

Alteromonas [28], но хорошо изучена только та, которая была выделена и очищена до гомогенного состояния из трех штаммов: *Alteromonas* sp. JD6.5, *A. haloplanktis* и *A. undina* [19, 29]. Было установлено, что ОРАА представляет собой внутриклеточный металлофермент с молекулярной массой в среднем около 55 кДа; его рН- и температурный оптимум действия составляют 8,0 и 50 °С, соответственно (табл. 4), а для проявления каталитической активности необходимо присутствие ионов Co^{2+} или Mn^{2+} [21]. Структура активного центра этого фермента до сих пор не известна, но в связи с обнаружением ингибирующего действия на фермент таких веществ, как *p*-хлорбензоат ртути и *N*-этиленмид, высказано предположение о существенной роли сульфгидрильной группы для проявления ферментативной активности. Обнаружено увеличение скорости реакции, катализируемой ферментом, в 3–5 раз катионом NH_4^+ ; выявлен конкурентный характер ингибирования ОРАА мипафоксом.

Данные табл. 4 также отражают субстратную специфичность этого фермента. С целью выяснения его потенциальной роли в метаболизме фосфора у бактерий был проведен сравнительный анализ аминокислотной последовательности ОРАА [20] и других белков с привлечением базы данных по белкам NCBI. Было выявлено наличие 50%-ной гомологии данного белка с X-Про дипептидазой (известной также под названием пролидаза (ЕС 3.4.13.9)), выделенной из различных бактериальных источников. Кроме того, у всех проанализированных ферментов, включая ОРАА, установлено наличие пяти консервативных аминокислотных остатков, а именно: Asp244, Asp255, His336, Glu381 и Glu420. Предполагается, что эти аминокислотные остатки могут

Таблица 4
Сравнительные характеристики ОРАА, выделенной из различных штаммов *Alteromonas* [19, 21, 29]

Характеристика	<i>A. sp.</i> JD 6.5	<i>A. haloplanktis</i>	<i>A. undina</i>
Молекулярный вес	60 кДа	50 кДа	53 кДа
рН-оптимум	8,5	7,5	8,0
Температурный оптимум	50 °С	40 °С	55 °С
k_{cat} , сек ⁻¹			
– ДФФ	1820	691	1403
– Зарин	611	308	426
– Зоман	3145	1667	2826
– Табун	85	255	368
– Параоксон	124	***	***
– VX	0	***	***

*** данные отсутствуют

принимать непосредственное участие в формировании активного центра ОРАА. Следует заметить, что, несмотря на несомненное сходство физико-химических характеристик ОРАА и пролидазы (очень близкие значения оптимумов рН и температуры, активация в присутствии одних и тех же ионов металлов), каталитическая активность пролидазы по отношению к ФОС в 200–500 раз меньше, чем у ОРАА. Это позволяет думать о существовании различных центров связывания у этих ферментов.

V. ПАРАОКСОНАЗА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Из всех известных параоксоназ (ПОН) млекопитающих наиболее изучен человеческий сывороточный фермент, менее подробно — кроличий [114]. У млекопитающих ПОН существует в двух формах: мембраносвязанной и циркулирующей в крови. Содержание ПОН в сыворотке в несколько раз превосходит количество фермента в органах и тканях [10]. В организме ПОН тесно связана с комплексом липопротеинов высокой плотности (HDL-фракция или аполипопротеины) [12, 55], и долгое время не удавалось отделить ПОН от этого комплекса. Лишь в 1991 г. сразу в двух лабораториях были предложены новые методы очистки сывороточной ПОН кролика и человека, позволяющие отделить фермент от HDL-комплекса с помощью детергента [39, 40]. В связи с тем, что выделение фермента в гомогенном виде без следов липопротеинов или ПАВ сильно затруднено, до сих пор не проведен рентгеноструктурный анализ ПОН, и трехмерная структура его активного центра, а также аминокислотные остатки, входящие в его состав, не определены.

Известно, что ПОН млекопитающих является Ca^{2+} -зависимым ферментом и имеет два металл-связывающих центра [56]. Один из них связывает кальций, необходимый для проявления стабильности фермента, другой — служит для катализа. У ПОН из сыворотки крови человека оба кальций-связывающих центра ($K_{\text{дис1}} = 6,7 \cdot 10^{-7}$ М и $K_{\text{дис2}} = 1,2 \cdot 10^{-4}$ М) характеризуются существенно меньшими значениями константы диссоциации, чем у кроличьего фермента ($K_{\text{дис1}} = 4,5 \cdot 10^{-8}$ М и $K_{\text{дис2}} = 1,9 \cdot 10^{-5}$ М). Предполагается, что именно эта разница объясняет причину большей устойчивости кроличьей ПОН по сравнению с человеческой к воздействию ингибирующих агентов, связывающих ферментативный кальций, например, к этилендиаминтетраацетату [58]. Возможно, различие констант диссоциации является также одной из причин большей устойчивости кроличьего фермента к денатурирующему воздействию додецилсульфата натрия. Установлено, что потеря ферментом одного эквивалента кальция приводит к полной инактив-

вазии ПОН, причем каталитическая активность не восстанавливается последующим добавлением Ca^{2+} [40]. Предполагается, что один из ионов кальция повышает электрофильность фосфорного центра за счет координации, и, таким образом, определяет каталитическую активность фермента, а другой влияет на стабильность ПОН, участвуя в поддержании конформации активного центра [115].

При изучении рекомбинантных ПОН [51, 52] было установлено, что 12 аминокислотных остатков играют существенную роль в проявлении каталитической активности фермента по отношению к параоксону. Среди них остатки гистидина, которые, как предполагается, могут быть промоторами нуклеофила в активном центре; SH-группа Cys-283, способная служить нуклеофилом активного центра; остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот, участвующие в координации ионов Ca^{2+} и остаток триптофана, который, благодаря своей гидрофобности может влиять на связывание субстрата. Изоэлектрическая точка ПОН, независимо от источника выделения, составляет 5,1, а рН-оптимум действия фермента — 9,5 [40, 105]. Что касается кинетических параметров реакции гидролиза ФОС, катализируемой ПОН, то следует заметить, что пока не определены концентрации активных центров фермента в препаратах сыворотки, так как для них не найдены подходящие титранты. В связи с этим в литературе нет расчетных значений $k_{\text{кат}}$. Для человеческой ПОН вместо $k_{\text{кат}}$ приводятся значения V_{max} и K_m , а для кроличьей сывороточной ПОН кинетические характеристики вообще не представлены. По разным литературным источникам [37, 40, 105], значения K_m для человеческой ПОН в отношении параоксона варьируют от 0,2 до 0,5 мМ, что, по-видимому, связано со степенью очистки препаратов ПОН. Установлено, что фенилацетат является ингибитором смешанного типа гидролиза параоксона. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей ОРН, ОРАА и ПОН не выявил какой-либо гомологии между этими белками [41].

VI. ГИДРОЛИЗ ФОС В ПРИСУТСТВИИ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ РАЗНЫХ КЛАССОВ

Различные метаболические процессы, протекающие в биологических объектах, включают множество стадий, на которых происходит расщепление пептидной или фосфоэфирной связей гидролитическими ферментами. Известен также ряд ферментов класса гидролаз, способных катализировать неспецифический гидролиз ФОС. Некоторые из этих белков являются металлоферментами и имеют определенное сходство в строении активного центра с ОРН.

Щелочная фосфатаза (ЕС 3.1.3.1) является неспецифической фосфомоноэстеразой, катализирующей гидролиз эфиров фосфорной кислоты, приводя к образованию неорганического фосфата или переносу фосфатной группы на спирт. Фермент обнаружен как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. В организме человека существует, по крайней мере, четыре изоформы этого фермента. Щелочная фосфатаза представляет собой гомодимерный металлофермент с молекулярной массой 89 кДа, содержащий по одному активному центру в каждой субъединице. Структура активного центра щелочной фосфатазы представлена на рис. 3 [54, 111]. Активный центр фермента содержит два иона Zn^{2+} и один ион Mg^{2+} . Один ион цинка (Zn_1) образует координационные связи с двумя остатками гистидина (His-331 и His-412), обоими атомами кислорода карбоксильной группы остатка Asp-327 и молекулой воды. Другой ион цинка (Zn_2) координирован с имидазолом остатка His-370 и одним из атомов кислорода карбоксильной группы остатков Asp-51 и Asp-369. Расстояние между двумя ионами Zn^{2+} составляет 3,94 Å. На основании этой структуры [111] был предложен механизм действия фермента, схема которого представлена на рис. 4.

Фермент взаимодействует с фосфомоноэфиром, образуя фермент-субстратный комплекс. Показано, что в образующемся комплексе фосфат координирован через атом кислорода с ионом Zn_2 , а кислород уходящей спиртовой группы образует координационную

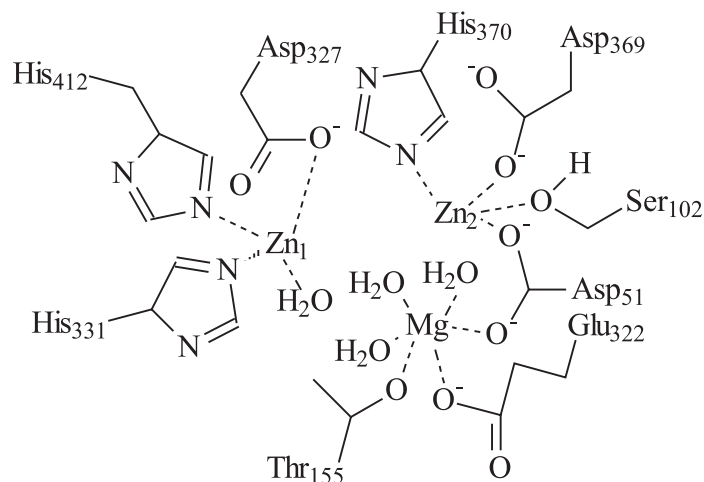


Рис. 3. Структура активного центра щелочной фосфатазы, выделенной из клеток *E. coli* [111].

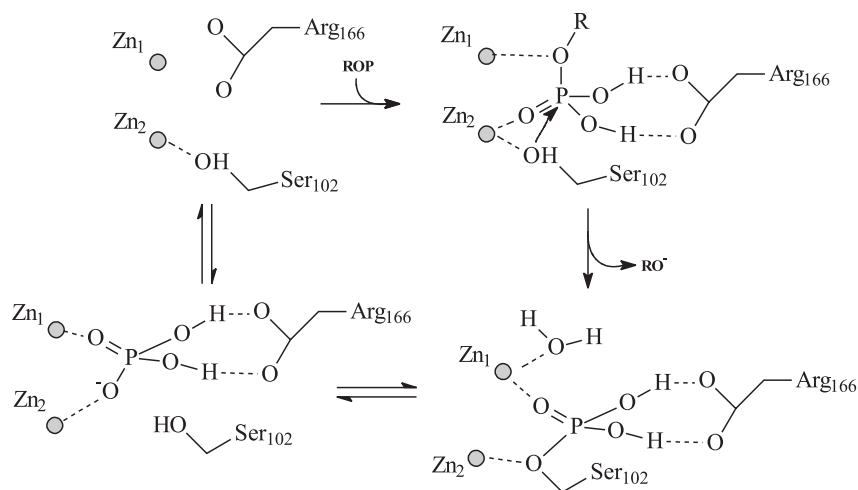


Рис. 4. Схема предполагаемого механизма действия щелочной фосфатазы [46].

связь с ионом $Zn1$. Образование двух водородных связей между гуанидином остатка Arg-166 и оставшимися атомами кислорода фосфорного эфира способствует стабилизации переходного состояния. Остаток Arg-166 играет важную роль на каждом этапе реакции, но не существенен для катализа. Мутанты, в которых остаток Arg-166 заменен остатком другой аминокислоты, сохраняет более 80% своей исходной активности. Далее следует нуклеофильная атака остатка Ser-102 гидроксильной группой, координированно связанной с ионом $Zn2$, приводящая к образованию ковалентного интермедиата, имеющего конфигурацию тригональной бипирамиды. Этот интермедиат в свою очередь, подвергается нуклеофильной атаке координированной $Zn1$ молекулой воды с образованием нековалентного комплекса фермента с фосфат-ионом [46]. Таким образом, в результате двух последовательных S_N2 реакций сохраняется стереохимическая конфигурация фосфорного центра. Ион Mg^{2+} не принимает прямого участия в катализе. Предполагается, что данный ион играет важную структурную роль, способствуя формированию микроокружения активного центра, благоприятного для осуществления катализа.

Кислая фосфатаза (ЕС 3.1.3.2) является широко распространенной неспецифической фосфомоноэстеразой. Фермент обнаружен в различных тканях млекопитающих, в растениях (красная фасоль обыкновенная, пшеница, батат и др.), в дрожжах (*Schizosaccharomyces pombe*, *Rhodotorula glutinis* и др.), в бактериях (*E. coli*, *Zymomonas mobilis*, *Propionibacterium acnes*) и в грибах (*Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *A. ficuum*) [30, 110, 118]. Для микроорганизмов характерно наличие нескольких

различных кислых фосфатаз. Кислые фосфатазы делятся на два подкласса — металл-зависимые и металл-независимые.

Металл-зависимая кислая фосфатаза имеет бинуклеарный $\text{Fe(III)}-\text{Me(II)}$ активный центр и гидролизует эфиры и ангидриды фосфорной кислоты. Все кислые фосфатазы данного подкласса, выделенные из млекопитающих, являются мономерными протеинами с $\text{Fe(III)}-\text{Fe(II)}$ активным центром и молекулярной массой около 35 кДа. Наиболее глубоко изучены кислые фосфатазы из растительных источников, являющиеся $\text{Fe(III)}-\text{Zn(II)}$ -зависимыми димерными металлоферментами с молекулярной массой около 111 кДа [56, 106].

Структура активного центра металл-зависимой кислой фосфатазы (на примере кислой фосфатазы, выделенной из красной фасоли) и механизм катализа представлены на рис. 5 [56]. Реакция гидролиза эфиров фосфорной кислоты происходит по механизму бимолекулярного нуклеофильного замещения ($\text{S}_{\text{N}}2$). Субстрат связывается с Me(II) , после чего следует атака гидроксид-ионом, координированным с ионом Fe^{3+} . Фосфатная группа субстрата связывается с ионом Zn^{2+} через один из неэтерифицированных атомов кислорода, замещая молекулу воды в координационной сфере иона металла. Взаимодействуя с Zn(II) и двумя остатками гистидина, молекула субстрата ориентируется для линейной атаки гидроксид-ионом, связанным с Fe(III) , в результате чего происходит обращение конфигурации атома фосфора через пентакоординационное переходное состояние [56].

pH-оптимум для данной фосфатазы равен 5,9. Два значения pK_{a} , которые могут быть определены из графика pH-зависимости, равные, соответственно, 4,8 и 6,9, указывают на то, что в катализе принимают участие две ионизованные группы, одна из которых вступает в реакцию в протонированной, а другая — в депротонированной форме. Существует предположение о том, что при более низких значениях pH протонируется гидроксид-ион (атакующий нуклеофил), а при более высоких — депротонируется субстрат, что ведет к понижению электрофильности атакуемого атома фосфора. Реакция гидролиза моноэфиров фосфорной кислоты металл-независимыми кислыми фосфатазами происходит через образование ковалентного промежуточного соединения с остатком гистидина (фосфорилгистидина) в активном центре [30]. Активный центр кислой фосфатазы, выделенной из зародышей пшеницы, по своему строению очень близок к активному центру кислой фосфатазы, выделенной из красной фасоли (см. рис. 5). Оба фермента являются металл-зависимыми, механизм гидролиза моноэфиров фосфорной кислоты так же, как и в случае ОРН, включает координацию субстрата с одним из ионов металла с последующей нуклеофильной атакой аква/гидроксо лигандом, координированным с другим ионом металла.

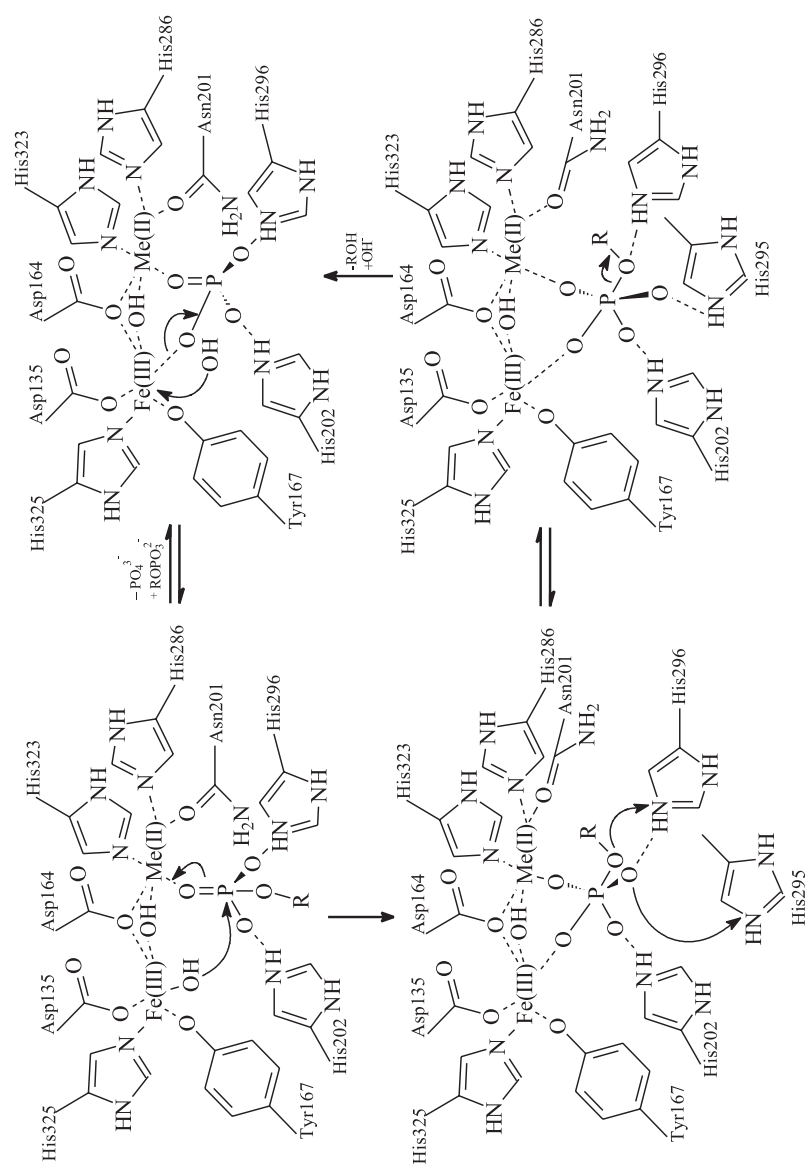


Рис. 5. Структура активного центра и механизм действия кислой фосфатазы, выделенной из красной фасоли [56].

Аминопептидазы катализируют реакцию отщепления ряда аминокислотных остатков от N-концевой последовательности протеинов и полипептидов. Эти ферменты имеют обширную субстратную специфичность и широко распространены в бактериях, дрожжах, растениях и в тканях животных. Описанные в литературе бинуклеарные аминопептидазы, такие как лейцин-аминопептидаза, метионин-аминопептидаза из *E. coli* и аминопептидаза из *Aeromonas proteolytica* [108, 109], имеют необычный активный центр по сравнению с моонуклеарными Zn^{2+} -зависимыми протеазами, такими как термолизин, карбоксипептидазы и эндопептидазы. Активные центры этих ферментов, в отличие от моонуклеарных металл-зависимых протеаз, не содержат богатого остатками гистидина микроокружения каталитического центра. На основании данных рентгеноструктурного анализа [107, 109] был предложен механизм действия лейцин-аминопептидазы, согласно которому оба иона Zn^{2+} в активном центре выполняют функцию кислот Льюиса, внутримолекулярная нуклеофильная атака происходит координированным мостиковым гидроксид-ионом.

Очевидно, что металл-зависимые ферменты составляют значительную часть гидролаз [120]. Для большинства этих ферментов реализуется общий механизм катализа, включающий в себя координацию субстрата с последующей нуклеофильной атакой координированным аква/гидроксо лигандом. Ионы металла, однако, могут выполнять и другие функции, такие как содействие отрыву уходящей группы, индуцирование конформационных изменений в молекуле субстрата и, наконец, поддержание каталитически активной конфигурации активного центра фермента. Необходимо отметить, что специфичность фермента по отношению к субстрату определяется константой устойчивости комплекса иона металла в активном центре с молекулой субстрата, гидрофобными взаимодействиями (в случае гидролиза триэфиров фосфорной кислоты), электростатическими взаимодействиями и др.

В связи с этим интересными представляются исследования, направленные на изучение способности ряда ферментов с различными активными центрами (металл-зависимых и имеющих другие функциональные группы) катализировать гидролиз ФОС. Это позволит прояснить роль иона металла, не участвующего в координации субстрата для катализа, а также будет способствовать поиску ферментов, способных гидролизовать ФО-нейротоксины при более кислых значениях pH, чем ранее представленные ферменты.

Была исследована возможность катализа реакции гидролиза параксона в присутствии щелочной фосфатазы, субтилизина, трипсина, папаина, ангиотензин-превращающего фермента, Zn^{2+} -содержащей

карбоксипептидазы А, $Zn^{2+}Co^{2+}$ -термолизина и кислой фосфатазы, выделенной из зародышей пшеницы. Полученные экспериментальные данные суммированы в табл. 5.

Термолизин, субтилизин и карбоксипептидаза А не проявляют никакой активности по отношению к параоксону в интервале рН 6,5–9,0 и 0,5–1,2 мМ концентрации субстрата в реакционной среде. Гидролиз параоксона наблюдался в присутствии трипсина. Механизм гидролиза параоксона этой сериновой протеазой аналогичен, вероятно, механизму взаимодействия ФО-нейротоксинов с остатком серина в активном центре АСhЕ. Процесс гидролиза параоксона в присутствии трипсина, по всей видимости, не носит каталитического характера вследствие необратимого фосфорилирования остатка серина. Папаин проявляет почти такую же активность в реакции гидролиза параоксона, что и трипсин, однако скорость реакции увеличивается примерно в 2–3 раза при добавлении нуклеофила (имидазола). рН–оптимум такой реакции составляет 8,0.

Интересные результаты получены для кислой фосфатазы. Было обнаружено, что кислая фосфатаза способна значительно ускорять гидролиз параоксона при слабокислых значениях рН. Процесс носит каталитический характер, субстрат полностью гидролизует в результате ферментативной реакции. На рис. 6 приведена зависи-

Таблица 5
Каталитическая активность гидролитических ферментов разных классов по отношению к параоксону

Фермент	Условия проведения исследований; обнаруженная каталитическая активность по отношению к параоксону
Субтилизин	рН 6,0–9,0; [параоксон] = 0,5–1,2 мМ; 22 °С, 30 °С; Ферментативный гидролиз отсутствует в течение 2 сут.
Трипсин	рН 6,0–9,0; [параоксон] = 0,5–1,2 мМ; 22 °С, 30 °С; За 24 ч гидролизует 1 мкМ параоксона при рН 9,0
Папаин	рН 7,0–9,0; [параоксон] = 0,5–1,2 мМ; 20 °С, 30 °С; За 24 ч гидролизует 1 мкМ параоксона при рН 8,0
Zn^{2+} -зависимая карбоксипептидаза А	рН 7,0–9,0; [параоксон] = 0,5–1,2 мМ; 20 °С, 30 °С; Ферментативный гидролиз отсутствует в течение 2 сут.
Zn^{2+} и Co^{2+} -зависимый термолизин	рН 7,0–9,0; [параоксон] = 0,5–1,2 мМ; 20 °С, 30 °С; Ферментативный гидролиз отсутствует в течение 2 сут.
Ангеотензинпревращающий фермент	рН 9,0; 10^{-6} М Zn^{2+} ; 37 °С; $K_m = 1,9 \times 10^3$ М; $k_{кат} = 7,7 \times 10^{-3}$ с $^{-1}$
Кислая фосфатаза	рН 2,5–7,0; 22 °С; $K_m = 1,8 \times 10^{-3}$ М; $V_m/[E] = 0,4$ мин $^{-1}$
Щелочная фосфатаза	рН 8,0–9,0; 30 °С; $K_m = 7,3 \times 10^{-2}$ М; $V_m/[E] = 7,8$ мин $^{-1}$

мость каталитической константы реакции гидролиза параоксона в присутствии кислой фосфатазы от рН, из которой следует, что рН-зависимость фермента является колоколообразной и рН-оптимум действия в этой реакции составляет 4,5–5,5. Рассчитанное значение $V_m/[E]$ для реакции гидролиза параоксона, катализируемой кислой фосфатазой, составляет $0,40 \pm 0,05 \text{ мин}^{-1}$. Полученное значение $V_m/[E]$ значительно ниже аналогичного параметра для ОРН. Интересно, что ранее не сообщалось о ферментах, катализирующих гидролиз триэфиров фосфорной кислоты при кислых значениях рН.

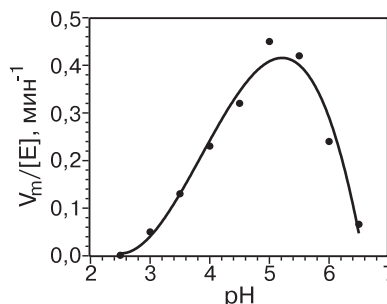


Рис. 6. рН-зависимость реакции гидролиза параоксона, катализируемой кислой фосфатазой.

VII. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ФОС-ГИДРОЛИЗУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕКТАХ

В последнее время особый интерес представляют исследования, связанные с клонированием генов ФОС-гидролизующих ферментов, а именно ОРН, ОРАА и ПОН, и направленные на получение дополнительной информации о свойствах этих ферментов и создание их супер-продуцентов. Наиболее интенсивно эти работы проводятся с ОРН.

В качестве клеток-хозяев для экспрессии гена ОРН (*opd*) используются различные биологические системы: бактериальные клетки *E. coli* и *Streptomyces lividans*, нитевидный гриб *Gliocladium virens*, клетки насекомых, а именно, личинок гусениц, эмбрионы мухи *Drosophila melanogaster* и культура клеток муравьев sf9 (*Spodoptera frugiperda*). Каждая из этих систем имеет определенные преимущества для решения тех или иных проблем, связанных с изучением свойств фермента, в частности, его стабильности, активности и клеточной секреции. Так, экспрессия ОРН в клетках *E. coli* позволила провести исследования с использованием сайт-направленного мутагенеза для изучения структуры активного центра и изменения специфичности фермента. Для этого *opd* ген был выделен из клеток *Pseudomonas diminuta* MG и *Flavobacterium sp.* ATTC 27551 и секвенирован [77], а белок экспрессирован в различных системах.

Ген экспрессировали в клетках *E. coli* FM5 под контролем P_L -промотора фага λ . Было показано, что введение солей двухвалентных металлов в среду роста для трансформированных клеток приводит,

как и в случае с нативной ОРН, к увеличению специфической активности фермента до 20 раз. Согласно данным ДНК-секвенса, аминокислотный состав рекомбинантного белка аналогичен составу аминокислот нативной ОРН, отмечено также, что N-концевой метионин удаляется при экспрессии белка в клетках *E. coli*.

С помощью плазмиды pCL1 был трансформирован гриб-сапрофит *Gliocladium virens* [25]. Вестерн-блот анализ клеточного экстракта подтвердил образование процессивной формы фермента в грибе. Максимальный уровень ОРН-активности был зарегистрирован через 168 ч культивирования, и кинетика накопления ферментативной активности в клетках была скоррелирована с ростом биомассы.

Рекомбинантная генетическая система была получена путем комбинирования бактериального нативного гена и грибной экспрессионной системы и успешно трансформирована в почвенный гриб *Gliocladium virens*. Гибридный ген получили путем комбинирования конститутивного промотора и сигнала трансляции из грибного гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы со структурным участком бактериального гена ОРН. Несколько векторов, различающихся по длине промоторного и терминирующего участков, использовались для трансформации природного штамма *Gliocladium virens*. В результате в некоторых трансформантах было обнаружено наличие ОРН-активности.

ОРН клонировали из штамма *Flavobacterium sp.* (ATTC 27551) в клетки *Streptomyces lividans*, затем фермент был выделен и очищен до гомогенного состояния [86]. На сегодняшний день это единственный известный случай получения секретируемой ОРН. Анализ физико-химических характеристик рекомбинантного белка показал, что секретируемый фермент состоит из единственной полипептидной цепи с молекулярной массой 35 кДа. Температурный оптимум этого фермента составляет 45 °С, а рН-оптимум равен 9,0. Очищенная рекомбинантная ОРН [26, 36, 86] имеет те же каталитические характеристики, что и нативная [33, 34, 75] (табл. 6). Для обеспечения высокоэффективной секреции ОРН из клеток *Streptomyces livdans* была создана конструкция, в которой нативную сигнальную последовательность β-галактозидазы из *Streptomyces* заменили сигнальной последовательностью из клеток *Flavobacterium sp.* Это привело к увеличению содержания ОРН в культуральной жидкости и уменьшению образования клеточных ассоциатов.

Ген *opd*, выделенный из *Pseudomonas diminuta*, был переклонирован в бакуловирусную систему экспрессии [36]. Клетки насекомых *Spodoptera frugiperda* (клетки sf9), находящиеся на стадии развития личинок, инфицировались рекомбинантным бакуловирусом, в резуль-

Таблица 6
Характеристики нативной и рекомбинантной ОРН из различных источников

Микробный источник ОРН	K _m , mM для параоксона (рН 9,0)	рН-оптимум
<i>Pseudomonas diminuta</i> [33, 34]	0,058	8,0–9,0
<i>Flavobacterium</i> species ATCC 27551 [75]	0,032	8,0–9,0
<i>E.coli</i> (ген <i>opd</i> из <i>Pseudomonas diminuta</i> [26])	0,013	8,0–9,0
<i>Streptomyces lividans</i> (ген <i>opd</i> из клеток <i>Flavobacterium</i> sp.) [86]	0,015	9,5
<i>Spodoptera frugiperda</i> (ген <i>opd</i> из клеток <i>Pseudomonas diminuta</i>) [36]	0,010	8,0–9,5

тате чего клетками синтезировался активный фермент. Через 120 ч после инфицирования величина летальной дозы по параоксону для инфицированных личинок увеличивалась в 280 раз по сравнению с обычными личинками.

Для экспрессии *opd* гена в культуре тканей насекомых (клетках sf9) был использован рекомбинантный бакуловирус *Autographa californica* ядерного полиэдрома [27]. Фермент, синтезируемый в инфицированных клетках sf9, подвергался дальнейшей посттрансляционной модификации и, по данным вестерн-блот анализа, обнаруживал сходство с ОРН, экспрессируемой в различных бактериальных клетках. По данным N-концевого секвенса, в ферменте, экспрессируемом в культуре тканей насекомых, обнаруживался остаток Gly-29, в отличие от экспрессии ОРН в клетках *E. coli*, где этот остаток удалялся и Ser-30 становился N-концевым остатком.

Ген *opd* был перенесен в эмбрион *Drosophila melanogaster* путем Р-элемент-зависимой транспозиции [88]. Хромосомное расположение консервативных наследуемых трансгенных локусов различается от штамма к штамму и обеспечивает различную экспрессивность всего генетического материала насекомого. Индукция *opd* гена под контролем термочувствительного промотора *hsp70 Drosophila* обеспечила синтез стабильного и активного внутриклеточного фермента, который накапливается в больших количествах при повторной индукции. Накопление ОРН в трансгенных клетках *Drosophila melanogaster* повышает их устойчивость к воздействию параоксона.

Большое количество генно-инженерных исследований было направлено на получение ОРН с измененной субстратной специфичностью. Анализ данных табл. 3 свидетельствует о том, что сродство ОРН существенно выше к соединениям, представляющим собой ФО-пестициды, а не боевые отравляющие вещества. В связи с этим

многочисленные эксперименты были направлены на увеличение скорости ферментативного гидролиза ДФФ, зарина, зомана и VX, катализируемого рекомбинантной ОРН [42, 92, 117]. Было установлено, что только единственный мутант, содержащий замену His254 на аргинин и замену His257 на лейцин, имел значение k_{cat} для деметона-S, являющегося аналогом VX, в 15 раз больше по отношению к нативному белку. При этом наблюдалось существенное ухудшение сродства такого фермента к ряду других субстратов, включая ДФФ, для которого k_{cat} снижался в 100 раз [31, 32].

Появились работы, представляющие результаты экспрессии ОРН в составе бифункциональных фьюжен-белков. Несмотря на то, что ранее было проведено большое количество исследований, связанных с экспрессией *opd* гена в различных системах, оказалось, что использование для этих целей клеток *E. coli* чаще всего было самым эффективным. Поэтому все исследования, направленные на получение фьюжен-белков, проводились именно в этих клетках. Так был сконструирован и экспрессирован в периплазме разных штаммов клеток *E. coli* рекомбинантный белок ОРН с доменом целлюлазы из клеток *Clostridium sp.*, ответственным за сорбцию фермента на высокомолекулярном субстрате [79, 93]. Экспрессированный в клетках *E. coli* JM105 фьюжен-белок локализовался на поверхности клеточной стенки. Такая генетическая модификация ОРН привела к более чем двукратному снижению величины K_m , но позволила авторам разработки осуществить иммобилизацию фермента на поверхности целлюлозных носителей [69].

Другим примером конструирования фьюжен-белков с ОРН-активностью являются работы, в которых в качестве второго белка использовался эластинподобный полипептид [101]. При этом гидрофобность рекомбинантного белка резко увеличивалась, что расширяло возможности создания новых иммобилизованных форм фермента с использованием гидрофобных носителей. Однако при этом наблюдалось снижение каталитических характеристик фермента по всем субстратам как минимум на 10%.

Самые разнообразные генетические конструкции были созданы для экспрессии фьюжен-белка на основе ОРН и зеленого флуоресцирующего белка (GFP) в клетках *E. coli* BL21 [121, 123]. Было показано, что введение в среду 2 мМ хлорида кобальта в процессе роста клеток приводит так же, как и в случае нативной ОРН, к существенному увеличению активности фермента. В ходе этих исследований впервые было установлено отсутствие линейной зависимости между концентрацией индуктора, введенного в среду, и уровнем синтеза ОРН [123].

С целью увеличения уровня экспрессии ОРН сконструировали белок, в котором GFP был соединен с двумя копиями ОРН таким образом, что последовательность структурных элементов в таком фьюжен-белке может быть записана следующим образом: GFP–ОРН–ОРН [124]. В результате наблюдался более высокий выход ОРН по сравнению с аналогичной конструкцией, кодирующей синтез одной копии фермента.

Создание еще более сложных конструкций фьюжен-белков, содержащих одновременно, например, олигогистидиновую последовательность, GFP, энтерокиназу и ОРН [122], вероятно, нельзя считать целесообразным с точки зрения упрощения процедуры очистки основного белка и контроля над этим процессом. Наряду с уникальностью всех полученных белковых конструкций, содержащих ОРН, в целом следует отметить крайне низкие уровни экспрессии фьюжен-белков даже после оптимизации их структур и условий экспрессии. Количество таких белков составляло не более 0,1% от массы всех синтезируемых белков в клетке.

Что касается исследований, связанных с получением рекомбинантной ОРАА, то здесь объем информации существенно меньше, вероятно, в силу того, что доступность гена этого фермента крайне ограничена из-за его определенного стратегического значения. Известно, что для экспрессии гена ОРАА с целью изучения свойств фермента использовали плазмиду pTC6513 и клетки *E. coli* [20], а для суперпродукции ОРАА брали те же клетки, но другую плазмиду — pSE420, которая обеспечивала синтез фермента до 150–200 мг/л [21].

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как следует из обзора, ферментативный гидролиз играет одну из ключевых ролей в детоксикации фосфорорганических соединений в реальных биологических системах и *in vitro*. Представленная информация является достаточно «горячей» с точки зрения современности полученных научных результатов. Объем информации о ферментах, способных осуществлять гидролиз ФОС, позволяет сегодня проводить новые исследования, направленные на осознанное изменение свойств этих ферментов и получение высоко экспрессионных систем, способных обеспечить получение ферментов в количествах, необходимых для решения многочисленных прикладных задач. Среди них необходимо отметить создание всевозможных иммобилизованных препаратов, обладающих высокой ферментативной активностью и стабильностью, готовых к применению в аналитических целях и непосредственного гидролиза ФОС. Исследования субстратной специфич-

ности описанных выше ферментов остаются по-прежнему актуальными, так как спектр ФО-пестицидов постоянно расширяется за счет синтезированных *de novo*. Прогнозируя дальнейшее развитие исследований, связанных с ферментативным гидролизом ФОС, следует обратить внимание на тот факт, что практически оптимум действия всех ферментов лежит в щелочной области pH, тогда как большинство продуктов гидролитических реакций вызывает существенное снижение pH среды, что, естественно, приводит к инактивации ферментов. В связи с этим поиск новых и модификация известных ферментов с целью проведения стабильного ферментативного катализа при нейтральных значениях pH будут основными направлениями исследований в этой области.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов Н.С. Химическое оружие на рубеже двух столетий. (1994) М.: А/О Изд. группа Прогресс, 174 с.
2. Вредные вещества в промышленности. Справочник для химиков, инженеров и врачей. / Ред. Лазарев Н.В., Гадаскина И.Д. (1977) Л.: Химия, III, 608 с.
3. Задорожный В.А., Петров Б.Р., Олещенко В.Ф., Кириленко В.А. (1981) Вестник дерматол. и венерол., 48–51.
4. Захаренко В.А. (1988) Журнал ВХО, 6, 618–624.
5. Ефременко Е.Н., Сергеева В.С. (2001) Изв. Акад. наук. Сер. Химич., 1743–1749.
6. Краснюк Е.П., Лубянова И.П. (1989) Профессиональные заболевания работников сельского хозяйства. / Ред. Ю.И.Кундиев, Е.П.Краснюк. К.: Здоровье, 38–50.
7. Курочкин В.К., Петрунин В.А., Ситников В.Б., Фокин Е.А., Шульга В.Я., Сафронов Г.А. (1997) Токсикол. Вестник, 11–17.
8. Курочкин И.Н. (2003) Биосенсорные системы для целей химической и биологической безопасности: Дисс. док. хим. наук. М.: МГУ им.М.В.Ломоносова, 385 с.
9. Мельников Н.Н. (1988) Журнал ВХО, 6, 602–609.
10. Aldridge, W.N. (1953) Biochem. J., 53, 110–124.
11. Ali, A.J. (1993) Anal. Lab. (Bulg.), 2, 210–213.
12. Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo-Parmo, S.L., La Du B.N. (1998) J. Clin. Invest., 101, 1581–1590.
13. Benning, M.M., Kuo, J.M., Raushel, F.M., Holden, H.M. (1994) Biochemistry, 33, 15001–15007.
14. Benning, M.M., Kuo, J.M., Raushel, F.M., Holden, H.M. (1995) Biochemistry, 34, 7973–7978.
15. Cai, C. P., Liang, M., Wen R. R. (1995) Chromatographia, 40, 417–420.
16. Caldwell, S.R., Newcomb, J.R., Schlecht, K.A., Raushel, F.M. (1991) Biochemistry, 30, 7438–7444.
17. Caldwell, S.R., Raushel, F.M. (1991) Appl. Biochem. Biotechnol., 31, 59–73.
18. Chae, M.Y., Omburo, G.A., Lindahl, P.A., Raushel, F. M. (1993) J. Am. Chem. Soc., 115, 12173–12174.
19. Cheng, T.-C., Harvey S.P., Stroup, A.N. (1993) Appl. Environ. Microbiol., 59, 3138–3140.
20. Cheng, T.-C., Liu, L., Wang, B., Wu, J., DeFrank, J.J., Anderson D.M., Rastogi V.K., Hamilton, A.B. (1997) J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 18, 49–55.

21. Cheng, T.-C., Rastogi, V.K., DeFrank, J.J. (1998) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **864**, 253–258.
22. Coulibaly, K. (1994) Temperature and pH decomposition of organophosphate pesticides in water and beef muscule. PhD. Int. Order # DA 9508801. Kansas: Kansas Univ., 179 p.
23. Danilova, I.G., Ryabov, A.D., Varfolomeev, S.D. (1997) *J. Mol. Cat., Part A: Chemical*, **118**, 161–166.
24. Daughton, C. G., Hsies, D. P. H. (1977) *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 175–184.
25. Dave, K.I., Lauriano, C., Xu, B., Wild, J.R., Kenerley, C.M. (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 352–358.
26. Dave, K.I., Miller, L.L., Wild, J. R. (1993) *Chem. Biol. Interact.*, **87**, 55–68.
27. Dave, K.I., Phillips, L., Luckow, V.A., Wild J.R. (1994) *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **19**, 271–284.
28. DeFrank, J., Beaudry, W., Cheng, T., Harvey, S., Stroup, A., Szafraniec, L. (1993) *Chem. Biol. Interact.*, **87**, 141–148.
29. DeFrank, J.J., Cheng, T.-C. (1991) *J. Bacteriol.*, **173**, 1938–1943.
30. Dibeneditto, J., Mura, U. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **522**, 122–129.
31. DiSoidi, B., Grimsly, J.K., Lai, K., Wild, J.R. (1999) *Biochemistry*, **38**, 2866–2872.
32. DiSoidi, B., Miller, C.E., Lai, K., Grimsly, J.K., Wild, J.R. (1999) *Chem. Biol. Interact.*, **119–120**, 211–223.
33. Donarski, J.W., Dumas, D.P., Heitmeyer, D.P., Lewis, V.E., Raushel, F.M. (1989) *Biochemistry*, **28**, 4650–4655.
34. Dumas, D.P., Caldwell, S.R., Wild, J.R., Raushel, F.M. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 19659–19665.
35. Dumas, D.P., Durst, H.D., Landis, W.G., Raushel, F.M., Wild, J.R. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.*, **277**, 155–159.
36. Dumas, D.P., Wild, J.R., Raushel, F.M. (1990) *Experientia*, **46**, 729–731.
37. Eckerson, H.W., Wyte, C.M., La Du, B.N. (1983) *Am. J. Hum. Genet.*, **35**, 1126–1138.
38. Fukushima, M., Yamaguchi, Y. (1994) *Biochemistry*, **23**, 74–76.
39. Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C., Crabb, J.W. (1991) *Biochemistry*, **30**, 10133–10140.
40. Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N. (1991) *Drug Methab. & Dispos.*, **19**, 100–106.
41. Gold, R.S., Wales M.E., Grimsly, J.K., Wild, J.R. (2000) *Enzymes in Action: Green Solutions for Chemical Problems.* / Ed. Zwanenburg, B., Mikolajczyk, M, Kielbasinski, P., Dordrecht/Boston/London: Kluw. Acad. Publ., 263–286.
42. Gopal, S., Rastogi, V., Ashman, W., Mulbry, W. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**, 516–519.
43. Grimsley, J.K., Rastogi, V.K., Wild, J.R. (1998) *Bioremediation: Principles and Practice Bionergadation Technology Developments.* / Ed. Sikdar, S.K., Irvine, R.L., Notre Dame/Indiana: Technomic Publishing Company Inc., **II**, 577–613.
44. Grimsley, J.K., Scholtz, J.M., Pace, C.N., Wild, J.R. (1997) *Biochemistry*, **32**, 14366–14374.
45. Hasan, H.A. (1999) *Folia Microbiol (Praha)*, **44**, 77–84.
46. Holtz, K.M., Stec, B., Kantrowit, E.R. (1999) *J. Biol. Chem.*, **254**, 8361–8354.
47. Hong, S.-B., Raushel, F.M. (1999) *Chem Biol Interact.*, **119–120**, 225–234.
48. Hong, S.-B., Raushel, F.M. (1999) *Biochemistry*, **38**, 1159–1165.
49. Hoskin, F.C.G., Trick, G.S. (1955) *Can. J. Biochem. Physiol.*, **33**, 963–969.
50. Hoskin, F.C., Walker, J.E, Mello, C.M. (1999) *Chem. Biol. Interact.*, **119**, 399–404.
51. Josse, D. Xie W., Masson, P., Lockridge, O. (1999) *Chem. Biol. Interact.*, **119–120**, 71–78.

52. Josse, D., Xie W., Renault, F., Rochu, D., Scopfer, L.M., Masson, P., Lockridge O. (1999) *Biochemistry*, **38**, 2816–2825.
53. Karns, J.S., Muldoon, M.T., Mulbry, W.W., Derbyshire, M.K., Kearney, P.C. (1987) *Biotechnol. in Agricul. Chem.*, 156–170.
54. Kim, E.E., Wyckoff, H.W. (1991) *J. Mol. Biol.*, **218**, 449–464.
55. Kitchen, B.J., Masters, C.J., Winzor, D.J. (1973) *Biochem. J.*, **135**, 93–95.
56. Klabunde, T., Ströter, N., Früöhlich, R., Witzel H., Krebs, B. (1996) *J. Mol. Biol.*, **259**, 737–748.
57. Kolakowski, J.E., DeFrank, J.J., Harvey, S.P., Szafraniec, L.L., Beaudry, W.T., Lai, K., Wild, J.R. (1997) *Biotransform.*, **15**, 297–312.
58. Kuo, C.-L., La Du, B.N. (1995) *Drug Metabol. Dispos.*, **23**, 235–244.
59. Kuo, C.-L., La Du, B.N. (1998) *Drug Metabol. Dispos.*, **26**, 653–660.
60. Kuo, J.M., Rauchel, F.M. (1994) *Biochemistry*, **33**, 4265–4272.
61. Lacarte, S., Barcelo, D. (1995) *J. Chromatogr. A*, **712**, 103–112.
62. Lai, K., Dave, K.I., Wild, J.R. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 16579–16584.
63. Leoni, V., Cariechia, A.M., Comi, R., Martini, F. (1995) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **54**, 870–877.
64. Lewis, V.E., Donarski, W.J., Wild, J.R., Raushel, F.M. (1988) *Biochemistry*, **27**, 1591–1597.
65. Loukas, Y.L., Vyza, E.A., Valizaki, A.P. (1995) *Analyst (U.K.)*, **120**, 533–538.
66. Luchini, L.C., Peres, T.B., de Andrea, M.M. (2000) *J. Environ. Sci. Health B*, **35**, 51–59.
67. Mazur, A. (1946) *J. Biol. Chem.*, **164**, 271–289.
68. Mazurek, M., Witkiewicz, A. (1994) *Chem. Anal. (Warsaw)*, **40**, 531–542.
69. Mee-Hie, Cho C., Mulchandani, A., Chen, W. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2026–2030.
70. Megharaj, M., Madhavi, B.R., Sreenivasulu, C., Umamaheswari, A., Venkateswarlu, K. (1994) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **53**, 292–297.
71. Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Rao, A.S. (1987) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **39**, 251–256.
72. Mounter, L.A., Floyd, C.S., Chanutin, A. (1953) *J. Biol. Chem.*, **204**, 221–232.
73. Mounter, L.A., Tuck, K.D. (1956) *J. Biol. Chem.*, **221**, 537–541.
74. Mulbry, W. (2000) *Microbiol. Res.*, **154**, 285–288.
75. Mulbry, W., Del Valle, P., Karns, J. (1996) *J. Pest. Sci.*, **46**, 35–40.
76. Mulbry, W., Karns, J. (1989) *J. Bacteriol.*, **171**, 6740–6746.
77. Mulbry, W., Karns, J.S., Kearney, P.C., Nelson, J.O., McDaniel, C.S., Wild, J.R. (1986) *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 926–930.
78. Mulbry, W., Kearney, P.C. (1991) *Crop Prot.*, **10**, 334–346.
79. Mulchandani, P., Chen, W., Mulchandani, A., Wang, J., Chen, L. (2001) *Biosens. Bioelectr.*, **16**, 433–437.
80. Munnecke, D.M. (1976) *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 7–13.
81. Nelson, L.M. (1982) *Soil Biol. Biochem.*, **14**, 219–222.
82. Nelson, L.M., Yaron, B., Nye, P.H. (1982) *Soil Biol. Biochem.*, **14**, 223–227.
83. Omar, S.A. (1998) *Biodegradation*, **9**, 327–336.
84. Omburo, G.A., Kuo, J.M., Mullins, L.S., Raushel, F. M. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 13278–13283.
85. Omburo, G.A., Mullins, L.S., Raushel, F. M. (1993) *Biochemistry*, **32**, 9148–9155.
86. Payne, G.F., DelaCruz, N., Copppella, S.J. (1990) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 395–400.
87. Pei, L., Omburo, G., McGuinn, W. D., Petricovics, I., Dave K., Raushel, F. M., Wild, J.R. (1994) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **124**, 296–301.

88. Phillips, J.R., Xin, J.H., Kirby, K., Milne, C.P., Krell, P. O., Wild, J.R. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **87**, 8155–8159.
89. Racke, K., Coats, J. (1987) J. Agric. Food Chem., **35**, 94–99.
90. Rani, N.L., Lalithakumari, D. (1994) Can. J. Microbiol., **40**, 1000–1006.
91. Rastogi, V.K., DeFrank, J.J., Cheng, T.-C., Wild, J.R. (1997) Biochem. Biophys. Res. Comm., **241**, 294–296.
92. Raushel, F., Holden, H.M. (2000) Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., **74**, 51–93.
93. Richins, R.D., Mulchandani, A., Chen, W. (2000) Biotechnol. Bioeng., **69**, 591–596.
94. Rosenberg, A., Alexander, M. (1979) Appl. Environ. Microbiol., **37**, 886–891.
95. Scharff, E.I., Koepke, J., Fritzsche, G., Lucke, C., Ruterjans, H. (2001) Structure with Folding & Design., **9**, 493–502.
96. Scharff, E.I., Lucke, C., Fritzsche, G., Koepke, J., Hartleib, J., Ruterjans, H. (1998) Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., **57** (Pt.1), 148–149.
97. Schenck, F.J., Wagner, R. (1995) Food. Addit. Contam., **12**, 535–541.
98. Sergeeva, V.S., Efremenko, E.N., Kazankov, G.M., Varfolomeyev, S.D. (1999) Biotechn. Techniq., **13**, 479–483.
99. Sergeeva, V.S., Efremenko, E.N., Kazankov, G.M., Varfolomeyev, S.D. (2000) J. Mol. Catal. B: Enzym., **10**, 571–576.
100. Sethanathan, N., Yoshida, T. (1973) Can J. Microbiol., **19**, 873–875.
101. Shimazu, M., Mulchandani, A., Chen, W. (2003) Biotechnol. Bioeng., **81**, 74–79.
102. Siddaramappa, R., Rajaram, K.P., Sethunathan, N. (1973) Appl. Microbiol., **26**, 846–849.
103. Sode, K., Nakamura, H. (1997) Biotechnol. Lett., **19**, 1239–1242.
104. Sogorb, M.A., Vilanova, E. (2002) Toxicol. Lett., **128**, 215–228.
105. Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Camper, S.A., La Du, B.N. (1995) Genomics, **30**, 431–438.
106. Sträter, N., Klabunde, T., Tucker, P., Witzel, H., Krebs, B. (1995) Science, **268**, 1489–1492.
107. Sträter, N., Lipscomb, W. (1995) Biochemistry, **34**, 9200–9210.
108. Sträter, N., Lipscomb, W. (1995) Biochemistry, **34**, 14792–14800.
109. Taylor, A. (1993) Trends Biochem. Sci., **18**, 167–172.
110. Ullah, A.H., Cummins, B.J. (1988) Prep. Biochem., **18**, 37–65.
111. Vallee, B.L., Auld, D.S. (1993) Biochemistry, **32**, 6493–6500.
112. Vanhooke, J.L., Benning, M.M., Raushel, F.M., Holden, H.M. (1996) Biochemistry, **35**, 6020–6025.
113. Varfolomeyev, S., Kurochkin, I., Efremenko, A., Efremenko, E. (2002) Pure. Appl. Chem., **74**, 2311–2316.
114. Vilanova, E., Sogorb, M.A. (1999) Crit. Rev. Toxicol., **29**, 21–57.
115. Vitarius, J.A., Sultatos, L.G. (1995) Life Sci., **56**, 125–134.
116. Walker, C. (1993) Chem. Biol. Interac., **87**, 17–24.
117. Watkins, L.M., Mahoney, H.J., McCulloch, J.K., Raushel, F.M. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 25595–25601.
118. Watmack, P.P., Van Etten, R.L. (1991) Arch. Biochem. Biophys., **258**, 621–623.
119. Wheelis, M. (2002) Pure. Appl. Chem., **74**, 2247–2251.
120. Wilcox, D.E. (1996) Chem. Rev., **96**, 2435–2458.
121. Wu, C.F., Cha, H.J., Rao, G., Valdes, J.J., Bentley, W.E. (2000) Appl. Microbiol. Biotechnol., **54**, 78–83.
122. Wu, C.F., Cha, H.J., Valdes, J.J., Bentley, W.E. (2002) Biotechnol. Bioeng., **77**, 212–218.

123. *Wu, C.F., Valdes, J.J., Bentley, W.E.* (2001) *Biotechnol. Prog.*, **17**, 606–611.
124. *Wu, C.F., Valdes, J.J., Rao G., Bentley, W.E.* (2001) *Biotechnol. Bioeng.*, **75**, 100–103.