

# ROSTLINNÉ CYTOCHROMY P450 A PEROXIDASY A JEJICH ÚLOHA PŘI DEGRADACI KONTAMINANTŮ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

LUDMILA CHROMÁ<sup>a</sup>, MARTINA MACKOVÁ<sup>a</sup>,  
TOMÁŠ MACEK<sup>b</sup>, VÁCLAV MARTÍNEK<sup>c</sup>  
a MARIE STIBOROVÁ<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, <sup>c</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2

Došlo dne 8.VI.2000

Klíčová slova: cytochrom P450, peroxidasa, metabolismus xenobiotik v rostlinách, fytoremediace, polutanty

## Obsah

1. Úvod
2. Přeměna xenobiotik v rostlinách
  - 2.1. Enzymy první fáze biotransformace xenobiotik
    - 2.1.1. Cytochromy P450
      - 2.1.1.1. Mechanismus katalýzy cytochromy P450
      - 2.1.1.2. Detoxikační reakce cytochromu P450
    - 2.1.2. Peroxidasy
      - 2.1.2.1. Mechanismus katalýzy peroxidasami
        - 2.1.2.1.1. Reakce katalyzované peroxidasami využívající  $H_2O_2$  v nepřítomnosti  $O_2$ , využívající  $O_2$  a využívající  $H_2O_2$  i  $O_2$
  - 2.2. Význam cytochromů P450 a peroxidas v oxidaci xenobiotik v rostlinách
3. Závěr

## 1. Úvod

S rozvojem technologických procesů se do životního prostředí začaly dostávat a postupně se v něm i hromadit cizorodé látky (xenobiotika), se kterými se organismy dříve nesetkaly. Jde o sloučeniny cíleně produkované a využívané v průmyslu nebo zemědělství. Na zdravotní stav organismů, včetně člověka, však nemají vždy pozitivní vliv. V tomto směru jsou největším problémem sloučeniny, které jsou pro organismy potenciálně toxické, a dále ty, které se v prostředí bioakumulují.

Řada xenobiotik (např. ropné deriváty, polycyklické aromatické uhlovodíky, halogenované uhlovodíky) nachází, vzhledem ke svým fyzikálním a chemickým vlastnostem, široké uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích. Naneštěstí však byly tyto látky donedávna používány bez podstatných

znalostí o jejich vlastnostech a chování v životním prostředí, nebyl kontrolován ani jejich únik do prostředí ani jejich působení na živé i neživé složky životního prostředí<sup>1</sup>. Dnes tyto látky v řadě případů představují, díky vysoké toxicitě a perzistenci, závažný problém pro přírodu a jejich odstranění je z mnoha hledisek velmi náročné.

V minulosti již byly navrženy specifické technologie, které by měly takové látky z životního prostředí odstraňovat. Klasické fyzikálně-chemické metody jsou většinou ekonomicky nákladné. Snahou je proto využívat nejen postupy levnější, ale pro životní prostředí i přirozenější a šetrnější, jako jsou biologické dekontaminace prostředí pomocí mikroorganismů či rostlin. Ty jsou v současnosti označovány jako bioremediace. Pro využití zelených rostlin k odstranění, zneškodnění nebo zadržení kontaminantů životního prostředí se užívá speciálnější označení – fytoremediace<sup>2,91</sup>. Vedle praktického využívání jsou uvedené procesy předmětem zájmu i teoretických oborů. Jde především o poznání chemismu dekontaminace a poznání enzymů, které jsou v mikroorganismech a rostlinách za metabolismus xenobiotik zodpovědné. Znalost enzymů přeměňujících xenobiotika je pro jejich efektivní odstranění stěžejní, neboť může posloužit k výběru organismů, v nichž jsou právě takové nejefektivnější enzymové systémy hojně zastoupeny. Zatímco u mikroorganismů jsou metabolické cesty odbourávání řady xenobiotik dobře prozkoumány, u rostlin jsou informace o přeměně cizorodých látek stále dosud nedostačující.

Rostlinná buňka obsahuje pestrou škálu enzymů, které jsou potenciálně schopné metabolizovat xenobiotika. Je tomu tak proto, že v rostlinných buňkách je syntetizována řada sloučenin složitých struktur v mnohých směrech podobných strukturám látek cizorodých.

## 2. Přeměna xenobiotik v rostlinách

Za biotransformaci xenobiotik jsou označovány procesy, které by měly vést k jejich snadnému vyloučení nebo potlačení jejich negativního působení v organismech. Je členěna na dva základní směry. V případě, že biotransformačními reakcemi dochází ke snížení toxicity sloučenin, je označována jako detoxikace. Jestliže však dochází k reakcím, které vedou ke zvýšení toxického účinku cizorodé látky, je biotransformace označována jako aktivace xenobiotik. Jde zejména o metabolickou aktivaci nemutagenních látek (promutagenů) na mutagenní produkty. Tato oblast není v tomto přehledu zahrnuta. Zájemce najde podrobné informace v přehledném článku<sup>92</sup>.

Biotransformace xenobiotik v živočišných organismech probíhá ve dvou fázích. V první fázi dochází k zabudování funkčních reaktivních skupin do skeletu lipofilního xenobiotika, či demaskování funkčních skupin již v molekule xenobiotika přítomných. Proto je někdy tato fáze nazývána funkcionalizační nebo derivatizační. Tím se zvyšuje polarita sloučeniny a možnost pro následnou konjugaci (2. fáze biotransformace). Převážná většina reakcí první fáze probíhá oxidačně (C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace,

dealkylace, deaminace, desulfurace a další). Nicméně některé reakce probíhají i redukčním mechanismem (nitro, azoredukce) nebo hydrolyticky. Druhá fáze biotransformace je označovaná jako konjugací, neboť při ní dochází k navázání (konjugaci) endogenních molekul (glukuronátu, sulfátu z aktivního sulfátu, glutathionu, cysteinu, glycinu apod.) na reaktivní funkční skupiny metabolitů zavedených do molekuly xenobiotika v první fázi biotransformace. Těmito reakcemi se ještě více zvýší polarita molekuly původně hydrofobní povahy a usnadní se tím její eliminace z buněk a exkrece z organismu močí a výkaly.

V metabolismu cizorodých látek v rostlinách nacházíme několik odlišností od procesů, které probíhají v organismech živočišných. Přeměna cizorodých látek rostlinami může být (na rozdíl od živočichů) členěna do tří fází<sup>3</sup>, neboť zde nedochází ke skutečnému, efektivnímu vylučování metabolitů xenobiotik. 1. fáze (rovněž označovaná jako derivatizační) zahrnuje opět enzymově katalyzované zavedení (či odkrytí) polárních skupin molekuly xenobiotika. U toxických sloučenin vedou reakce této fáze (podobně jako u živočichů) většinou ke tvorbě detoxikačních metabolitů. V řadě případů však dochází, jak již bylo výše uvedeno, i k aktivaci xenobiotik za tvorby toxičtějších produktů.

Jestliže již cizorodá látka obsahuje vhodnou funkční skupinu, její biotransformace v rostlinách probíhá reakcemi druhé fáze. Ta je v případě rostlin označována přesněji jako primární konjugace. Polárnější metabolity jsou spojovány kovalentní vazbou s molekulami endogenních hydrofilních sloučenin jako jsou např. některé sacharidy, aminokyseliny nebo glutathion. V případě toxických sloučenin jejich toxicita reakcemi této fáze výrazně klesá. Konjugáty jsou pak v rostlinách ukládány v některých částech buňky. Úložným místem pro rozpuštěné konjugáty jsou vakuoly. Některé produkty konjugací fáze procházejí ještě fází další, označovanou za 3. fázi biotransformace (nebo také za sekundární konjugaci), reakcemi s některými složkami buněčné stěny – s ligniny, pektiny, hemicelulosami. Uložení produktů vzniklých v druhé fázi ve vakuole předchází transport konjugátů přes membránu vakuoly. Bylo zjištěno, že podobně jako u živočichů se i v rostlinných buňkách vyskytuje ATP-dependentní membránový přenašeč, který se v rostlinách využívá právě pro transport do vakuol. Uvedený přenašeč konkrétně zprostředkovává přenos konjugátů glutathionu vznikajících v cytoplazmě do vnitřního prostoru vakuol. Přenašeč je v rostlinách lokalizován přímo v membráně tonoplastu. Podobá se savčímu membránovému přenašeči svojí citlivostí k vanadu a dalším inhibitorům.

Vakuolární pumpa je specifická pro glutathionové konjugáty, včetně oxidovaného glutathionu, glutathion (v redukovaném stavu) nebo cysteinové konjugáty transportovány nejsou<sup>4</sup>. Mechanismus přenosu není jasný. Pravděpodobně jsou dva modely – model pumpy (transmembránové proteiny tvoří pór, kterým mohou procházet hydrofilní substráty) a model „flip-flop“, při kterém se substrát váže na vnější část membrány a překlopením se dostane do vakuoly<sup>5</sup>. Komplexy glutathionu uložené ve vakuole mohou podléhat další úpravě, při níž se uplatňují především hydrolytické enzymy. Jejich produkty se poté většinou ukládají v buněčné stěně. Poločas rozpadu glutathionových konjugátů ve vakuole závisí na struktuře molekuly původního xenobiotika<sup>3</sup>.

Pro konjugací reakce xenobiotik v rostlinách svědčí nález některých konjugátů. Byly např. izolovány *O*- $\beta$ -glukosylové

a (*O*-malonyl)-*O*- $\beta$ -D-glukosylové konjugáty herbicidu pentachlorofenolu či *N*-malonylové a *N*-glukosylové konjugáty dalších xenobiotik 4-chloranilinu a 3,4-dichloranilinu<sup>4</sup>. Rovněž enzymy odpovědné za tvorbu těchto konjugátů byly v rostlinných tělech prokázány, konkrétně v extraktech přípravných ze soji a pšenice.

V rostlinných buňkách se podařilo identifikovat určité enzymy obdobné těm, které se v savčích játrech účastní detoxifikačního procesu. Z enzymů participujících na 1. fázi biotransformace jsou to hlavně systémy monooxygenas (oxidas) se smíšenou funkcí s cytochromem P450 jako terminální oxidasou a popřípadě peroxidasy. Z konjugací enzymů jsou podobné živočišnému enzymu rostlinné glutathiontransferasy<sup>6</sup> a eventuálně sulfotransferasy a *N*-acetyltransferasy. Naopak *O*-glukosyl- a *O*-malonyltransferasy, ale také *N*-glukosyl- a *N*-malonyltransferasy se specifitou např. k chlorovaným xenobiotikům<sup>4</sup>, dále pak *O*- a *N*-glykosyltransferasy, jsou specifické pro rostliny.

Nedávné studie prokázaly, že v rostlinách jsou enzymy biotransformující xenobiotika přítomny v mnoha izoenzymových formách, které jsou úžeji substrátově specifické než je tomu u většiny obdobných enzymů živočišných, včetně specifity k určité poloze v molekule substrátu a stereochemii funkčních skupin. Tyto studie víceméně vyvrátily dřívější předpoklady, že xenobiotika jsou v rostlinách metabolizována díky široké substrátové specifitě enzymů sekundárního metabolismu<sup>3</sup>.

Studium specifity rostlinných enzymů, jejich molekulových hmotností, izoelektrického bodu a charakterizace jejich cDNA, prokázalo příbuznost některých skupin rostlinných enzymů účastnících se metabolismu cizorodých látek s enzymy, které plní tutéž funkci v organismu mikrobiálním i savčím<sup>7,8</sup>. I když evoluční příbuznost je zřejmá, mechanismus a působení selekčního tlaku, který přispěl k evoluci těchto enzymů v rostlinách, je zatím neznámý. Účast uvedených rostlinných enzymů na přeměně cizorodých látek je o to podivuhodnější, když si uvědomíme, že xenobiotika se do přírody dostala až v tomto století.

## 2.1. Enzymy první fáze biotransformace xenobiotik

Biotransformačních reakcí první fáze metabolismu xenobiotik rostlinami se účastní několik enzymových systémů. Z minoritně působících enzymů je třeba zmínit fenoloxidasy (lakasy) oxidující fenoly a polyfenoly a tyrosinasy. Flavinové monooxygenasy, které participují na oxidaci xenobiotik v živočišných organismech a plísních<sup>9</sup>, v rostlinách doposud nalezeny nebyly. Podstatnou úlohu při metabolismu xenobiotik v rostlinách hrají monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí (MFO – mixed function oxidases) s cytochromy P450 jako terminální oxidasou a dále pak peroxidasy. Proto se v další části práce věnujeme těmto dvěma typům enzymů.

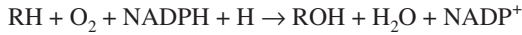
### 2.1.1. Cytochromy P450

Mikrosomální monooxygenasový systém je systém enzymů vázaných v membráně hladkého endoplazmatického retikula. Jako terminální oxidasu obsahuje hemoprotein cytochrom P450 (EC 1.14.14.1) (cit.<sup>10</sup>). Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je v proteinové molekule enzymu vázán hydro-

fobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu (pátý ligand železa protoporfyrinu IX). Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování uvedených hemoproteinů a odlišuje je od hemoproteinů ostatních (odlišné spektrální a katalytické vlastnosti)<sup>11–13</sup>. Šestáým ligandem je atom kyslíku molekuly vody.

#### 2.1.1.1. Mechanismus katalýzy cytochromu P450

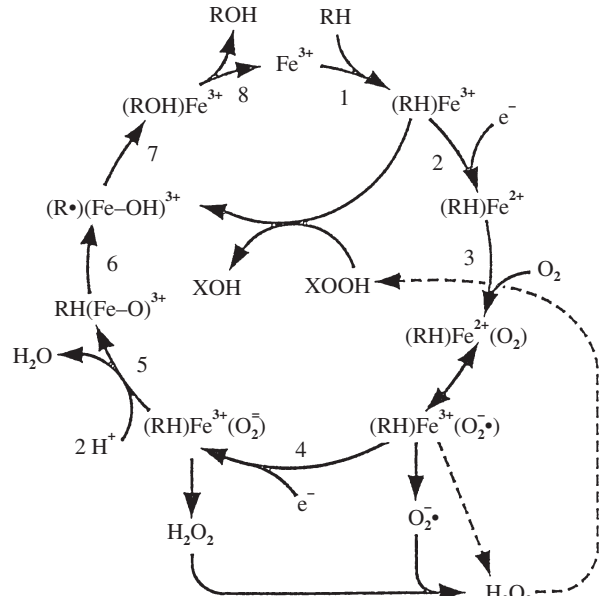
Cytochrom P450 spolupůsobí s dalším enzymem lokalizovaným v endoplazmatickém retikulu – NADPH:cytochrom P450 reduktasou – nebo dalšími enzymy mitochondrií. Většina reakcí, které lze sumárně vyjádřit jako



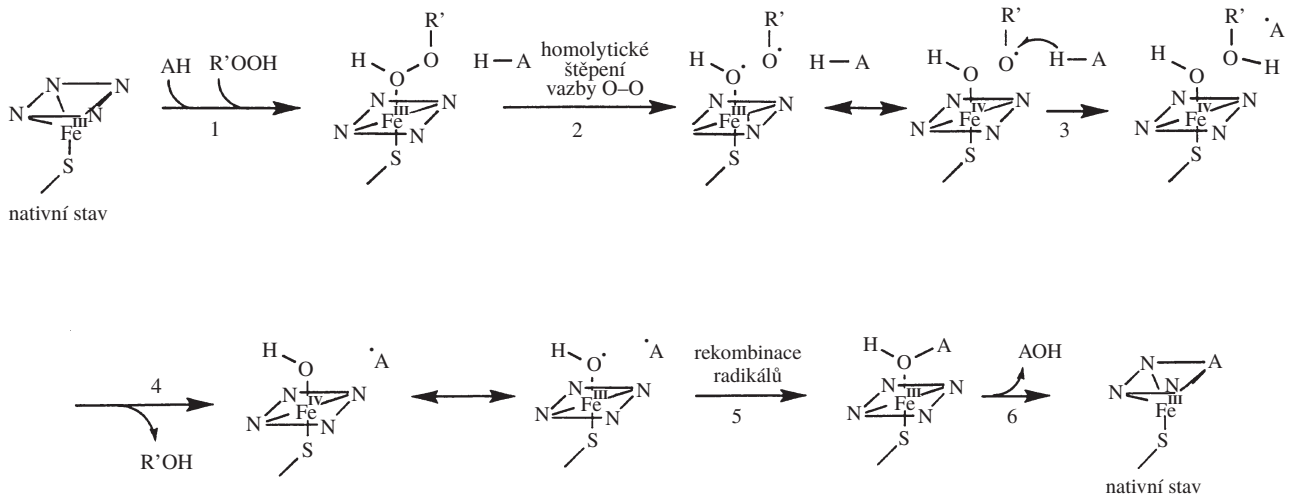
začíná přenosem elektronů z NADPH buď na NADPH:cytochrom P450 reduktasu v endoplazmatickém retikulu (kde je MFO systém lokalizován) nebo na ferredoxin reduktasu a nehemový Fe–S protein v mitochondriích, a poté na vlastní cytochromy P450. Redukovaný cytochrom P450 pak aktivuje molekulu kyslíku, z níž jeden atom je inkorporován do molekuly substrátu a druhý tvoří molekulu vody. Schéma reakčního cyklu cytochromu P450 je uvedeno na obrázku 1. Reakční sled pravděpodobně sestává alespoň z osmi kroků. Nejprve se váže substrát na ferri formu cytochromu P450 (reakce 1), přičemž se mění konformace molekuly enzymu (Fe v hemu se z formy hexakoordinované dostává do formy pentakoordinované). Poté dochází k přenosu elektronu z NADPH:cytochrom P450 reduktasy a  $\text{Fe}^{3+}$  cytochromu P450 je redukováno na  $\text{Fe}^{2+}$  (reakce 2). Na ion železa této formy enzymu se pak váže biatomická molekula kyslíku (ale též jiné ligandy, např. CO), za tvorby ternárního komplexu cytochrom P450– $\text{O}_2$ –substrát (reakce 3). Ternární komplex přechází do jiného mezomerního stavu, na ferri-superoxidový komplex, který je dále redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou (nebo jiným enzymem NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasou), za vzniku ferro-superoxidového

komplexu (reakce 4). Posledně jmenovaná reakce je finálním stupněm tzv. aktivační fáze reakčního cyklu cytochromu P450. Následně je štěpena biatomická molekula kyslíku, přičemž jeden atom kyslíku je redukován na vodu a druhý zůstane vázán na iontu Fe v hemu ve formě ferrioxenového komplexu (reakce 5). V dalším kroku dochází k odštěpení vodíkového atomu z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na ion železa hemu (reakce 6) (cit.<sup>14</sup>). Po reakci radikálů se uvolňuje hydroxylovaná molekula substrátu a nativní forma cytochromu P450 (obr. 1).

Vedle kyslíku může cytochrom P450 pro oxidativní reakce

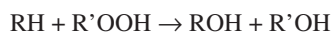


Obr. 1. Reakční cyklus cytochromu P450 (upraveno podle cit.<sup>14</sup>); RH – substrát, ROH – monoxygenní produkt, XOOH – peroxy-sloučenina (alternativní donor kyslíku), Fe – atom hemového železa enzymu



Obr. 2. Pravděpodobný mechanismus peroxidase aktivity cytochromu P450;  $\text{R}'\text{OOH}$  – organický peroxid nebo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , AH – substrát,  $\text{R}'\text{OH}$  – alkohol vzniklý redukcí hydroperoxidu nebo voda vzniklá redukcí  $\text{H}_2\text{O}_2$ , AOH – oxidovaná molekula substrátu

využívat peroxidy a peroxikyseliny. Ty se stávají donorem atomu kyslíku. Podobně mohou reagovat i hydroperoxidy vzniklé peroxidací lipidů, např. hydroperoxid kyseliny linoleové. Běžně používaným substrátem cytochromu P450 je kumoylhydroperoxid, v jehož přítomnosti dochází např. k N-demethylačním reakcím. Podobná stereochemie i regioselektivita NADPH-dependentní a hydroperoxid-dependentní oxidace katalyzované cytochromy P450 naznačuje, že aktivovaná forma enzymu je u obou mechanismů stejná<sup>14</sup> (obr. 1). Sumární rovnice peroxidasové aktivity cytochromů P450 je potom následující:



kde RH je substrát, R'OOH je hydroperoxid, ROH hydroxylovaný produkt reakce a R'OH alkohol vzniklý redukcí hydroperoxidu. Předpokládaný mechanismus peroxidasové aktivity cytochromu P450 je podrobněji zobrazen na obrázku 2. Nejprve se na nativní cytochrom P450 váže hydroperoxid a oxidovaný substrát (reakce 1). Následně dochází k homolytickému štěpení vazby O–O v hydroperoxidu, za vzniku hydroxylového radikálu (který je vázán na Fe hemu) a příslušného alkoxylového radikálu (reakce 2). Tento alkoxylový radikál odštěpí atom vodíku z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu (reakce 3). Redukovaný hydroperoxid se uvolní z enzymu (reakce 4). Hydroxylový radikál a radikál substrátu spolu reagují za vzniku hydroxylovaného substrátu (reakce 5), který se uvolní a cytochrom P450 se vrátí do nativního stavu (reakce 6) (cit.<sup>15</sup>).

Reakce s organickými hydroperoxidy probíhá, na rozdíl od reakce v přítomnosti NADPH a O<sub>2</sub>, neuspořádaným mechanismem, takže vazba peroxidu není závislá na vazbě substrátu. Některé hydroperoxidy mohou dokonce sloužit jako redukovatelné i oxidovatelné substráty. Účinnost oxidace organických substrátů peroxidasovou aktivitou cytochromu P450 je obvykle nižší než reakce za přítomnosti NADPH a O<sub>2</sub>, a to především z důvodů významné destrukce enzymu. Bylo např. zjištěno, že inaktivace cytochromu P450 působením H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nebo kumoylhydroperoxidu je způsobena degradací hemu na reaktivní fragmenty. Tyto fragmenty se pak mohou kovalentně vázat do aktivního centra enzymu, a tak jej ireverzibilně inaktivovat<sup>16</sup>.

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (izoenzymech, izoformách), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry (stupně) homologie jejich primární struktury (pořadí aminokyselin) proteinových molekul. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za zkratkou P450. Následuje velké písmeno označující podrodinu<sup>17</sup>. Jednotlivé isoenzymy jsou pak označeny číslem za písmenem podrodiny. Např. isoenzym P450 1A2 je členem podrodiny A náležející do enzymové rodiny 1. Do stejné rodiny náleží cytochromy P450, u kterých byla nalezena více než 40 % homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů, do stejné podrodiny pak ty, které vykazují homologii více než 60 % (cit.<sup>18</sup>). Pro zjednodušení Nebert a spolupracovníci navrhli nové systematické názvosloví genů a forem P450 (cit.<sup>19</sup>), ve kterém se formy P450 označují zkratkou CYP (CYtochrom P450), za níž pak následují označení rodin a podrodin podle výše uvedených kritérií. Výsledné označení příslušného enzymu je pak např. pro cytochrom P450 1A2 zkracováno na CYP1A2. Označení rostlinných cytochromů P450 je obdobné.

Vedle CYP51 jsou rostlinné cytochromy P450 řazeny do rodin CYP71 až CYP97 (tab. I). Za číslo rodiny jsou opět řazena písmena podrodin a číslo určitého enzymu podrodiny.

Cytochromy P450 byly nalezeny v mnoha rostlinách, a lze předpokládat, že alespoň některé z nich jsou přítomné prakticky ve všech rostlinných druzích (např. CYP51 katalyzující biosyntézu sterolů)<sup>20,21</sup>. Stále více příkladů také ukazuje, že se cytochromy P450 v rostlinách vyskytují v mnoha formách (izoenzymech), není však doposud známo, zda jejich multiplacita je tak vysoká jako v živočišných tkáních. Dodnes rovněž není přesně známo, zda mají cytochromy P450 rostlin tak širokou substrátovou specifitu jako enzymy živočišné. Jak již bylo výše zmíněno, v současnosti se řada laboratoří spíše přiklání k názoru o výskytu mnoha isoenzymů cytochromů s poměrně vyhraněnou substrátovou specifitou. Ale ani toto tvrzení není konečné, neboť rostlinné cytochromy P450 nejsou ještě z hlediska substrátové specifity dostatečně prozkoumány. Navíc, zdaleka ne všechny dosud známé isoenzymy byly také z rostlin izolovány a kineticky charakterizovány. Identifikace genů rostlinných cytochromů P450 a poznání biochemických funkcí těchto enzymů je v současnosti centrem pozornosti většiny výzkumů týkajících se rostlinných cytochromů P450. Ironií těchto výzkumů je však skutečnost, že většina genů cytochromů P450 nebyla ještě klonována a navíc, i v případě těch genů, které již klonovány byly, nebyla dosud určena přirozená funkce příslušného enzymu *in vivo* (tab. I) (cit.<sup>22</sup>).

#### 2.1.1.2. Detoxikační reakce cytochromu P450

Ekonomicky významnou funkcí rostlinných cytochromů P450, která je pouze částečně vysvětlena, je jejich úloha v detoxikaci herbicidů<sup>23–27</sup>. Selektivní aktivita cytochromů P450 vysvětluje selektivitu herbicidů u různých rostlinných druhů. Výbava jednotlivých rostlinných druhů specifickými cytochromy P450 umožňuje u jednoho druhu rostlin herbicidy detoxikovat, zatímco u druhých zůstávají buď ve formě původní nebo se metabolizují na dokonce biologicky aktivnější formu.

Velké množství rostlinných cytochromů P450 participuje na biosyntetických reakcích sekundárních rostlinných metabolitů jako jsou terpeny, alkaloidy, ligniny, fytosteroly, fytalexiny, pigmenty, gibereliny a eventuálně i dalších<sup>22,28–31</sup>. V poslední době byla také prokázána katalytická aktivita různých cytochromů P450 v metabolismu xenobiotik. V řadě případů byla účast rostlinných cytochromů P450 na oxidaci xenobiotik prokázána pouze nepřímou, s využitím mikrosomální frakce připravené z rostlinných pletiv a inhibitorů uvedených enzymů<sup>23,24,29,32,33</sup>. Činit závěry pouze z takových experimentů je však poněkud nepřesné. Rostlinné mikrosomy obsahují totiž vedle cytochromů P450 ještě další enzymy, konkrétně peroxidasy, které mohou být za oxidaci xenobiotik také zodpovědné<sup>25,34–36</sup>.

Přeměna xenobiotik purifikovanými cytochromy P450 v rekonstituovaném systému s NADPH:cytochrom P450 reduktasou (EC 1.6.2.4.) byla prokázána pouze v několika případech. Cytochrom P450 izolovaný z avokáda, za přítomnosti NADPH:cytochrom P450 reduktasy, katalyzoval oxidaci (N-demethylaci) xenobiotika 4-chloro-N-methylanilinu<sup>37</sup>. Rychlost demethylace však byla řádově vyšší za katalýzy peroxidasovou aktivitou tohoto enzymu s kumoylperoxidem jako kosubstrátem, než v rekonstituovaném systému s reduktasou. Demethylace tohoto substrátu byla také měřena v kvasinkách transfor-



Tabulka I  
Klonované geny rostlinných cytochromů P450

Rodina/podrodina cytochromu P450	Název enzymu	Rostlinný druh
CYP51	obtusifoliol 14 $\alpha$ -demethylasa	<i>Sorghum bicolor</i>
CYP71A1	<sup>a</sup>	<i>Persea americana</i>
CYP71A2	<sup>a</sup>	<i>Solanum melongena</i>
CYP71A3	<sup>a</sup>	<i>Solanum melongena</i>
CYP71A4	<sup>a</sup>	<i>Solanum melongena</i>
CYP71A5	<sup>a</sup>	<i>Nepeta racemosa</i>
CYP71A6	<sup>a</sup>	<i>Nepeta racemosa</i>
CYP71B1	<sup>a</sup>	<i>Thlaspi arvense</i>
CYP71B7	<sup>a</sup>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP71C1	HBOA- <i>N</i> -synthasa <sup>b</sup>	<i>Zea mays</i>
CYP71C2	2-OI hydroxylasa <sup>c</sup>	<i>Zea mays</i>
CYP71C3	HBOA- <i>N</i> -hydroxylasa	<i>Zea mays</i>
CYP71C4	2-OI hydroxylasa	<i>Zea mays</i>
CYP71D6	<sup>a</sup>	<i>Solanum chacoense</i>
CYP71D7	<sup>a</sup>	<i>Solanum chacoense</i>
CYP72A1	<sup>a</sup>	<i>Catharanthus roseus</i>
CYP73A1	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Helianthus tuberosus</i>
CYP73A2	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Phaseolus aureus</i>
CYP73A3	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Medicago sativa</i>
CYP73A4	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Catharanthus roseus</i>
CYP73A5	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP73A9	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Pisum sativum</i>
CYP73A10	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Petroselinum crispum</i>
CYP73A12	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Zinia elegans</i>
CYP73A13	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Populus tremuloides</i>
CYP73A16	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Populus kitakamiensis</i>
CYP73A?	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Populus kitakamiensis</i>
CYP73A?	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Populus kitakamiensis</i>
CYP74A1	allenoxid synthasa	<i>Linum usitatissimum</i>
CYP74A2	„rubber particle protein“	<i>Parthenium argentatum</i>
CYP74A3	allenoxid synthasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP74B	lyasa hydroperoxidu mastných kyselin	<i>Capsicum annuum</i>
CYP75A1	flavonoid 3'5'-hydroxylasa	<i>Petunia hybrida</i>
CYP75A2	flavonoid 3'5'-hydroxylasa	<i>Solanum melongena</i>
CYP75A3	flavonoid 3'5'-hydroxylasa	<i>Petunia hybrida</i>
CYP75A4	flavonoid 3'5'-hydroxylasa	<i>Gentiana triflora</i>
CYP76A1	<sup>a</sup>	<i>Solanum melongena</i>
CYP76A2	<sup>a</sup>	<i>Solanum melongena</i>
CYP76B1	<sup>a</sup>	<i>Helianthus tuberosus</i>
CYP77A1	<sup>a</sup>	<i>Solanum melongena</i>
CYP77A2	<sup>a</sup>	<i>Solanum melongena</i>
CYP78A1	<sup>a</sup>	<i>Zea mays</i>
CYP78A2	<sup>a</sup>	<i>Phalaenopsis</i> sp.
CYP79	tyrosin- <i>N</i> -hydroxylasa	<i>Sorghum bicolor</i>
CYP80	berbamuninsynthasa	<i>Berberis stolonifera</i>
CYP82	<sup>a</sup>	<i>Pisum sativum</i>
CYP83	<sup>a</sup>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP84	ferulátsynthasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP85	<sup>a</sup> (syntéza brassinosteroidů?)	<i>Lycopersicon esculentum</i>
CYP86	<sup>a</sup>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP88	<sup>a</sup> (syntéza gibberelinů?)	<i>Zea mays</i>
CYP89A2	<sup>a</sup>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP90	kathasteron 23-hydroxylasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Tabulka I – pokračování

Rodina/podrodina cytochromu P450	Název enzymu	Rostlinný druh
CYP92A2	<sup>a</sup>	<i>Nicotiana tabacum</i>
CYP93A1	<sup>a</sup>	<i>Glycine max</i>
CYP93A2	<sup>a</sup>	<i>Glycine max</i>
CYP97B1	<sup>a</sup>	<i>Pisum sativum</i>

<sup>a</sup> Neznámý, <sup>b</sup> HBOA – 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-on, <sup>c</sup> 2-OI hydroxylasa – indolin-2-on hydroxylasa, upraveno podle cit.<sup>22</sup>

movaných rekombinantním cytochromem P450 CYP71A1 z avokáda<sup>38</sup>, což potvrdilo, že CYP71A1 avokáda je za demethylaci uvedeného substrátu zodpovědný. Rekombinantní rostlinná cinnamát-4-hydroxylasa CYP73A (EC 1.14.13.11.) (z hlífz *Helianthus tuberosus*) produkovaná také v kvasinkách je sice vysoce specifická k přirozenému substrátu<sup>32,39,40</sup>, ale demethyluje rovněž herniarin<sup>39,40</sup>, hydroxyluje 2-naftoovou kyselinu<sup>32,41</sup> a oxygenuje dalších pět xenobiotických substrátů zahrnujících herbicid chlorotoluron<sup>39,40</sup>. Podobně jako řada živočišných cytochromů P450, jsou i rostlinné cytochromy P450 inducibilními enzymy. Takovým zástupcem je např. inducibilní CYP76B1, jenž byl izolován z *Helianthus tuberosus*. Je enzymem, který katalyzuje dealkylaci modelového xenobiotika 7-ethoxykumarinu a metabolizuje také xenobiotika další (alkoxykumariny, alkoxyresorufiny) a několik herbicidů na bázi fenylmočoviny<sup>42</sup>. Dalším zástupcem rostlinných enzymů, který oxiduje herbicidy skupiny fenylmočoviny, je produkt genu CYP cDNA pro CYP71A10 (cit.<sup>43</sup>). Cytochrom P450 izolovaný z mikrosomů cibulek tulipánů (*Tulipa fosteriana*) rekonstituovaný s NADPH:cytochrom P450 reduktasou katalyzuje oxidaci xenobiotik *N*-nitrosaminů, azobarviv a aminopyrinu<sup>36,44-46</sup>. S prudkým rozvojem molekulární biologie lze jen doufat, že bude připraveno daleko větší množství rekombinantních rostlinných cytochromů P450, které mohou být snadněji purifikovány, a u nichž může být přesněji objasněna jejich substrátová specifita vůči cizorodým substrátům.

### 2.1.2. Peroxidasy

Peroxidasy (EC 1.11.1.7) jsou enzymy, které redukují peroxid vodíku (nebo jiné peroxidy) za současné oxidace další sloučeniny (endogenní i xenobiotika). Funkcí společnou pro všechny peroxidasy je schopnost detoxikovat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Spektrum sloučenin, které se spoluúčastní rozkladu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je velmi široké. Svou širokou substrátovou specifikou se peroxidasy blíží MFO systému obsahujícímu cytochrom P450 jako terminální oxidasu. Substráty jsou látky organické i anorganické. Mezi nejlepší substráty peroxidas lze řadit fenoly a aromatické aminy<sup>47,48</sup>. Dlouhou dobu nebyly peroxidasy přímo zařazovány mezi enzymy 1. fáze biotransformace xenobiotik, v současnosti je však známo, že svými reakcemi na metabolismu xenobiotik participují, a to jak v organismech živočišných (např. peroxidasa prostaglandin H synthasa ledvin a močového měchýře)<sup>49</sup>, tak především v rostlinách. Jejich obsah v rostlinách je totiž vysoce významný.

Typickou vlastností peroxidas je schopnost katalyzovat velké množství různých typů reakcí:

- klasické peroxidasové redoxní reakce (vedoucí k dehydrogenaci),
- halogenace a dehalogenace (halogenperoxidasy, thyroid peroxidasa),
- oxidace halogenidů (myeloperoxidasa),
- oxidační kondenzace aromatických aminů,
- oxidační polykondenzace fenolu a jeho derivátů (vznik ligninu),
- dekarboxylační reakce (např. dekarboxylace kyseliny indolyloctové),
- oxidační štěpení azoskupiny (vznik diazoniového iontu),
- disproportionace peroxidu vodíku (peroxidasy a nedávno nalezená katalasa-peroxidasa),
- oxygenace, hydroxylace,
- N- a O-demethylace.

Peroxidasy jsou většinou hemoglykoproteiny<sup>50</sup>, jejichž prostetickou skupinu tvoří obvykle ferriprotoporfyrin IX. Železo této skupiny je pentakoordinované<sup>51,52</sup>, přičemž pátý ligand tvoří dusík histidinového zbytku proteinové části enzymu. Existují peroxidasy s pozmeněným porfyrinovým skeletem nebo v nich porfyrinový skelet dokonce chybí. Takové peroxidasy obsahují např. ionty manganu (Mn<sup>2+</sup>) nebo vanadu (V<sup>5+</sup>) (cit.<sup>50</sup>). Právě podle charakteru aktivního místa jsou peroxidasy členěny do tří skupin – hemové peroxidasy, vanadové peroxidasy a ostatní peroxidasy. Nejpočetnější je skupina peroxidas, jejichž katalytické centrum obsahuje hem.

Obsah sacharidů se u jednotlivých peroxidas velmi liší. Relativní molekulová hmotnost funkční peroxidasy se pohybuje v rozmezí 42 000–158 000 (cit.<sup>50</sup>).

O peroxidasách je známo, že se vyskytují ve velkém množství forem (pravděpodobně izoenzymů). Například křenová peroxidasa (HRP – horseradish peroxidase) se vyskytuje ve čtrnácti formách, laktoperoxidasa v šesti až deseti, myeloperoxidasa ve třech<sup>50,53</sup>. Jsou-li tyto formy skutečnými izoenzymy, které jsou dány i geneticky podmíněnými rozdíly v primární sekvenci aminokyselin nebo jsou to formy vzniklé posttranslačními modifikacemi není známo. Dokonce se zvažuje, nejedná-li se i o arteficiální rozdíly způsobené extrakcí, izolací či způsobem stanovení<sup>54</sup>.

Rostlinné peroxidasy vykazují jasnou příbuznost, což vyplývá z jejich aminokyselinových sekvencí. Peroxidasy křenu, tuřínu, tabáku a brambor jsou homologní v rozmezí 36–50 % (cit.<sup>51</sup>). Mezi kationtovou peroxidasou ředkve a křenovou peroxidasou typu C byla dokonce nalezena 73–81 % homologie. Kationtové peroxidasy jsou více konzervovány během evoluce než aniontové.

V rostlinných buňkách jsou peroxidasy bohatě zastoupeny. Mohou být buď volné (přítomné v cytoplazmě, vakuolách,

mezibuněčném prostoru) nebo vázané (v buněčné stěně, plazmatické membráně nebo organelových membránách). Vazba může být iontová, ale i kovalentní. Distribuce souvisí s bazicitou peroxidas. Ve volné formě jsou především aniontové formy, zatímco kationtové jsou spíše vázané ve strukturách<sup>56</sup>. Peroxidasy byly nalezeny prakticky ve všech rostlinných plechtech (kořeny, stonky, listy, jehlice a další). Je zajímavé, že se peroxidasová aktivita v rostlinách zvyšuje v průběhu stárnutí a jako reakce na stres (biotický jako virová, mikrobiální infekce, požer hmyzem aj., či abiotický, např. vysoká koncentrace solí, přítomnost těžkých kovů, organických toxických látek apod.)<sup>57,89,90</sup>. Další funkcí peroxidas v rostlinách je zapojení do regulace růstu. Peroxidasy zřejmě soustavnou reakcí regulují hladinu růstového hormonu auxinu<sup>58</sup> a jsou rovněž klíčovými molekulami v procesech rychlé adaptace rostlin při změně vnějšího prostředí<sup>58</sup>. Peroxidasy lokalizované v buněčné stěně se podílejí na vychytávání radikálů, které poškozují membrány. Hrají také významnou roli při všech oxidačně-kondenzačních procesech tj. především procesech lignifikace. Při růstu buněčné stěny jsou do ní upevňovány monomery, které se prostřednictvím peroxidas řetězí, poté zesílují, a tak formují matrix buněčné stěny. Jiné peroxidasy (ligninperoxidasa, manganperoxidasa) mají schopnost lignin depolymerovat. Tyto enzymy jsou sekretovány dřevokaznými houbami (např. *Phanerochaete chrysosporium*)<sup>59</sup>. Jsou účinné v přeměně řady substrátů, které jsou typickými xenobiotiky (např. benzo[*a*]pyren, pyren, benzo[*a*]anthracen, anthracen, polychlorované fenoly, azobarviva)<sup>60</sup>. Nedávno byly uvedené peroxidasy detegovány i v rostlinných buňkách<sup>61</sup>. Jejich přímá úloha při biotransformaci xenobiotik v rostlinách však doposud nebyla prokázána.

Zajímavý je enzym nalezený v plísni bílé hniloby, přeměňující derivát anthracenu – barvivo Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (cit.<sup>62</sup>). I když je v literatuře označován jako RBBR-oxidasa nebo RBBR-oxygenasa, důkaz, že skutečně patří do skupiny oxidas či oxygenas dosud chybí. Vzhledem k tomu, že k přeměně RBBR jako substrátu je nezbytná přítomnost peroxidu vodíku, existuje reálný předpoklad, že jde o zvláštní typ peroxidasy<sup>62</sup>. Přesný mechanismus, stejně jako struktura enzymu, nejsou dosud známy. Enzym vykazující aktivitu k uvedenému substrátu (RBBR) byl nalezen i v buňkách určitých rostlinných druhů<sup>63</sup>.

V praxi byly některé rostlinné peroxidasy užity při dekontaminaci půd obsahujících fenolové sloučeniny. V jiných experimentech byl detoxikační efekt zprostředkovaný peroxidasami obsaženými v rostlinné tkáni zjištěn nejen pro fenoly<sup>64,65</sup>, ale i pro aromatické aminy<sup>66</sup>. Uvedené sloučeniny byly oxidovány na volné radikály nebo na chinony a chinoniminy. Tyto reaktivní oxidační produkty dále reagovaly a poskytovaly oligomery nerozpustné ve vodě. V půdním prostředí se pak takové produkty vázaly na humus, čímž výrazně poklesla toxicita výchozích látek<sup>67,68</sup>. Klibanov se spolupracovníky (cit.<sup>69</sup>) navrhli, že by oxidační reakce zprostředkované křeno-*novými* peroxidasami mohly být využívány pro odstranění fenolů, anilinů a jiných aromatických sloučenin z vodných roztoků. Stejně reakce byly také testovány při dekontaminaci půdních sedimentů. Zpětné uvolňování detoxikovaných polutantů z oligomerů nebo humusu probíhá jen ve velmi malém měřítku, proto by oxidační reakce mohly být považovány za snadný a bezpečný způsob dekontaminace. Křenové peroxidasy jsou rostlinnými enzymy, které jsou v současnosti nejvíce

studovány z hlediska jejich potenciálního využití k odstraňování polutantů z prostředí.

#### 2.1.2.1. Mechanismus katalýzy peroxidasami

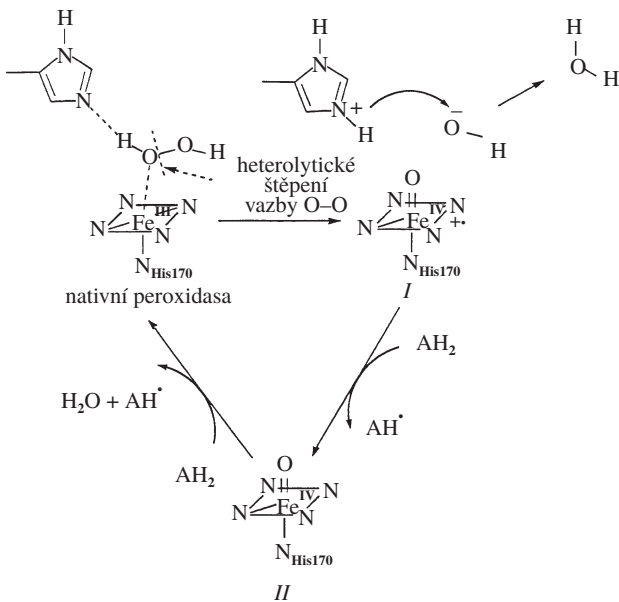
Charakteristickým rysem hemových peroxidas je jejich schopnost existovat v různých oxidačních stavech. Dosud byly v literatuře popsány následující oxidační stavy peroxidas<sup>50,70-73</sup>:

1. Nativní peroxidasa [hemové železo je v tomto stavu peroxidasy ve ferri formě ( $\text{Fe}^{3+}$ )].
2. Redukovaná forma molekuly peroxidasy. V té je hemové železo ve ferro formě ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Efektivní oxidační číslo hemu je dvě.
3. Sloučenina *I*. Při interakci nativního enzymu s  $\text{H}_2\text{O}_2$  nebo jiným peroxidem (ROOH) se tvoří intermediát o dva oxidační ekvivalenty vyšší než nativní (klidový) stav molekuly. Jedná se tedy o efektivní oxidační číslo pět. Tento intermediát je pokládán za oxyferryporfyrinový  $\pi$ -kation radikál, ve kterém je jeden oxidační ekvivalent obsažen ve ferrylovém železe ( $\text{Fe}^{4+}$ ) a druhý ekvivalent je v porfyrinovém skeletu jako  $\pi$ -kation radikál<sup>74,75</sup>. Sloučenina *I* je nestabilní intermediát s poločasem rozpadu menším než minuta. Tento intermediát je typický pro mechanismus působení HRP a má charakteristickou zelenou barvu.
4. Sloučenina ES. Tato forma peroxidas vzniká obdobně jako sloučenina *I*. Tvoří se pouze v některých peroxidasách (např. v cytochrom *c* peroxidase) a má charakteristickou červenou barvu. Sloučenina ES má také o dva oxidační ekvivalenty více než příslušná nativní peroxidasa. Jeden oxidační ekvivalent je obsažen v iontu  $\text{Fe}^{4+}$ , ale druhý je nesen některou aminokyselinou proteinové části molekuly (např. v cytochrom *c* peroxidase je to *Trp* 191, v prostaglandin *H* synthase *Tyr* 385) (cit.<sup>76,77</sup>).
5. Sloučenina *II*. Vzniká jednoelektronovou redukcí sloučeniny *I* nebo sloučeniny ES. Celkové efektivní číslo je čtyři. Poločas života uvedeného intermediátu je větší než jedna hodina. Sloučenina *II* křenové peroxidasy má červenou barvu.
6. Sloučenina *III*. Při reakci nativního enzymu se superoxidovým anion radikálem ( $\text{O}_2^-$ ) nebo při reakci redukované (ferro) formy peroxidasy s molekulárním kyslíkem vzniká sloučenina *III* (označovaná též jako oxyperoxidasa)<sup>78</sup>.
7. Sloučenina X. Tato forma peroxidas vzniká reakcí nativního enzymu s chloritanem ( $\text{ClO}_2^-$ ). Poločas sloučeniny X je několik dní.
8. Sloučenina EOX. Sloučenina EOX vzniká interakcí halogenidů ( $\text{X}^-$ ) se sloučeninou *I*.

Některé výše zmíněné stavy peroxidas jsou uvedeny na obrázcích 3–5.

##### 2.1.2.1.1. Reakce katalyzované peroxidasami využívající $\text{H}_2\text{O}_2$ v nepřítomnosti $\text{O}_2$ , využívající $\text{O}_2$ a využívající $\text{H}_2\text{O}_2$ i $\text{O}_2$

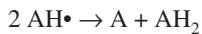
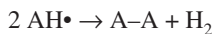
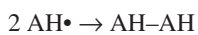
Vazbou  $\text{H}_2\text{O}_2$  nebo jiného peroxidu (ROOH) na nativní peroxidasu se tento enzym aktivuje. Vzniká sloučenina *I* (případně sloučenina ES), která je o dva oxidační ekvivalenty nad nativním enzymem<sup>74,75</sup>. Tato sloučenina nese aktivovaný kyslík. V nativní peroxidase je železo pentakoordinované<sup>51,52</sup>, proximálním ligandem je dusík histidylového zbytku proteinové molekuly. Po reakci s  $\text{H}_2\text{O}_2$  vzniká ferrylporfyrinový

Obr. 3. Reakční mechanismus peroxidasy za účasti  $\text{H}_2\text{O}_2$ 

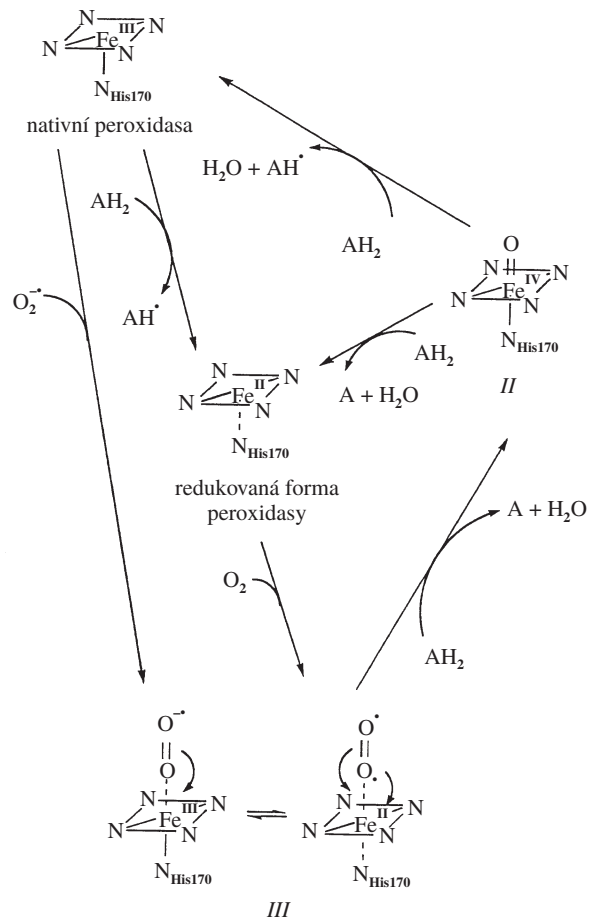
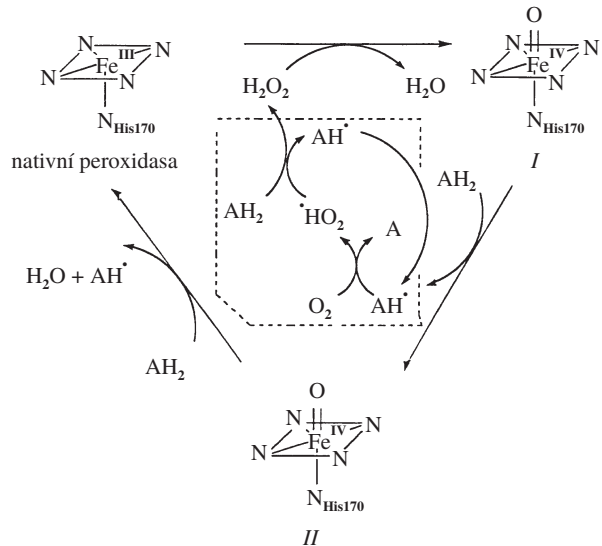
$\pi$ -kation radikál (sloučenina *I*), ve kterém je na místě šestého ligandu vázán aktivovaný kyslík. Vzhledem k tomu, že železo v oxidačním čísle pět (V) není stálé, vyskytuje se ve sloučenině *I* i ES v oxidačním čísle čtyři (IV) a chybějící ekvivalent je přítomný buď na hemu (v případě sloučeniny *I*) nebo na aminokyselinovém zbytku proteinu, nejčastěji Trp a Tyr (v případě sloučeniny ES).

Reakcí sloučeniny *I* (případně ES) se substrátem (donorem elektronů) vzniká sloučenina *II* (cit.<sup>74,75</sup>) a radikál substrátu. Tímto elektronem se doplní deficit na porfyrinovém skeletu nebo na aminokyselinovém zbytku. Bylo zjištěno, že sloučenina *I* oxiduje substrát 10–100× rychleji než sloučenina *II* (cit.<sup>79</sup>). Cyklus se uzavírá reakcí sloučeniny *II* s další molekulou substrátu, přičemž se obnoví peroxidasa v základním, nativním stavu (obr. 3).

Radikály vzniklé jednoelektronovou oxidací substrátu pak mohou reagovat buď za vzniku polymeračních nebo oxidačních produktů:



Peroxidasový cyklus odpovídá modifikovanému ping-pongovému mechanismu, kterého se účastní dvě molekuly redukčního a jedna molekula oxidačního substrátu. Oxidace substrátu ( $\text{AH}_2$ ) peroxidasami je zprostředkována dvěma jednoelektronovými přenosy. Existují však výjimky. Bylo totiž zjištěno, že např. jodidy jsou oxidovány sloučeninou *I* thyroïdperoxidasy reakcí přenášející dva elektrony. V tomto případě není sloučenina *II* intermediátem reakce. Podobně mohou být oxidovány i aromatické sulfidy na sulfoxidy. Stabilita sloučeniny *I* závisí na koncentraci  $\text{H}_2\text{O}_2$ . V nepřítomnosti re-

Obr. 4. Reakce vzniku sloučeniny *III* za přítomnosti  $\text{O}_2$ 

Obr. 5. Vznik superoxidového anionradikálu reakcí radikálu s kyslíkem

dukčního substrátu je peroxidasa velkým množstvím peroxidu degradována.



Některé sloučeniny mohou být oxidovány peroxidasou i v nepřítomnosti peroxidu. Jedná se např. o hydrochinony, naftochinony a kyselinu indolyloctovou<sup>80,81</sup>. Možný mechanismus reakcí je znázorněn na obrázku 4. Předpokládá se participace sloučeniny III.

Reakce, při kterých se využívá  $H_2O_2$  i  $O_2$  jsou zdrojem řetězových reakcí. Radikály vzniklé z donorů elektronů jednoelektronovou oxidací za přítomnosti  $H_2O_2$  jsou nestabilní a je-li přítomen kyslík, reagují s ním. Tato reakce následně generuje superoxidový anionradikál, který sám oxiduje jiné molekuly donorů elektronů. Uvedeným způsobem jsou zahajovány řetězové reakce volných radikálů (obr. 5). Například oxidace NADH na  $NAD^+$  může probíhat touto cestou, přičemž enzymová oxidace NADH je daleko méně efektivní než radikálové řetězové procesy. Vzniklý radikál ( $NAD\bullet$ ) redukuje  $O_2$  na  $O_2\bullet$  za vzniku  $NAD^+$ , následuje jednoelektronová oxidace další molekuly NADH pomocí  $O_2\bullet$  za vzniku  $NAD\bullet$  a celý cyklus se opakuje<sup>82</sup>.

O peroxidasách (konkrétně např. HRP) je známo, že za přítomnosti  $H_2O_2$  i  $O_2$  katalyzují také reakce, při nichž dochází k inkorporaci kyslíku do molekuly substrátu (hydroxylační a oxygenační reakce). Některé takové reakce vyžadují přítomnost kosubstrátu, přičemž zahrnují jednoelektronovou oxidaci tohoto kosubstrátu na radikál. Ten pak reaguje s biatomickou molekulou kyslíku za tvorby peroxylového radikálu ( $ROO\bullet$ ), jenž je zodpovědný za inkorporaci kyslíku do molekuly substrátu<sup>83,84</sup>. HRP také katalyzuje některé reakce typické pro cytochrom P450 (např. N-dealkylace, hydroxylace benzylmethylenové skupiny). Ve většině těchto případů není zdrojem inkorporovaného atomu kyslíku peroxid vodíku ani molekulární kyslík. Předpokládá se, že pro takové reakce je jako zdroj kyslíku využívána molekula vody<sup>85</sup>.

## 2.2. Význam cytochromů P450 a peroxidas v oxidaci xenobiotik v rostlinách

Přesná funkce a účinnost rostlinných peroxidas a cytochromů P450 v první fázi biotransformace xenobiotik není dosud zcela jasná. Je stále otevřenou otázkou, zda za oxidační reakce v rostlinách zodpovídají především cytochromy P450, podobně jako u živočichů, nebo hrají v oxidaci xenobiotik majoritní úlohu peroxidasy<sup>34–36,86–88</sup>.

Po srovnání metabolismu benzo[a]pyrenu rostlinnými mikrosomálními enzymy a peroxidasami byla již v roce 1991 vyslovena hypotéza o majoritní úloze peroxidas při transformaci tohoto a eventuálně i dalších xenobiotik v rostlinách<sup>34</sup>. Hypotéza byla založena na několika faktech. Reakční i substrátová specifita rostlinných peroxidas vůči sloučeninám, které jsou pro rostliny xenobiotiky, jsou velice široké. Naopak membránový systém rostlinných cytochromů P450 vykazuje užší substrátovou specifitu. Cytochromy P450 se vyskytují pouze v mikrosomální buněčné frakci, a navíc ve velmi nízkých koncentracích. Naproti tomu se peroxidasy nacházejí ve všech částech rostliny a v daleko vyšších koncentracích. Jsou přítomny v intracelulárním i extracelulárním prostoru a jsou dokonce často transportovány i do místa působení. Afinita rostlinných peroxidas k exogenním substrátům je vysoká. Při studiu metabolismu xenobiotik rostlinnými systémy byla pozorována větší podobnost metabolitů několika xenobiotik

(např. právě uvedeného benzo[a]pyrenu) *in vivo* s metabolity vytvořenými *in vitro* peroxidasami než s produkty cytochromu P450 (cit.<sup>34</sup>).

Zda-li skutečnost odpovídá uvedenému hypotetickému předpokladu není však dosud experimentálně dostatečně ověřeno. Hypotéza byla podpořena např. výsledky zjištěnými v naší laboratoři. Jedná se o nález, že aktivita peroxidas rostlinných buněk v tkáňových kulturách koreluje se schopností oxidovat polychlorované bifenyly (PCB) (cit.<sup>63</sup>). Výsledky je však nutné doplnit poznatky o obsahu a aktivitě cytochromů P450 v uvedených tkáňových kulturách a jejich vztahu k degradaci PCB a o poznání oxidace těchto látek izolovanými enzymy *in vitro*. Situace v rostlinných buňkách je zřejmě daleko složitější. Další nejnovější poznatky totiž naopak prokazují, že za oxidaci jiných xenobiotik (*N*-nitrosaminů a azobarviva Sudanu I) jsou v rostlinných mikrosomech zodpovědné především cytochromy P450 (cit.<sup>36</sup>). Tato studie tedy naopak svědčí o větším významu rostlinných cytochromů P450.

Pro vysvětlení přesné úlohy peroxidas a cytochromů P450 v metabolismu endogenních a exogenních substrátů u rostlin jsou tedy rozhodně nutné další studie<sup>16</sup>. Nezodpovězené otázky se týkají především přesné substrátové specifity izolovaných cytochromů P450 a izolovaných rostlinných peroxidas a srovnání metabolismu několika dalších typů xenobiotik *in vivo* s konverzí těchto sloučenin izolovanými rostlinnými enzymy *in vitro*. Jedná se o studium úlohy právě uvedených dvou hemových enzymů (cytochromů P450 a peroxidas) rostlin, a to při biotransformaci vybraných typů xenobiotik; *i*) vysoce toxických (karcinogenních) sloučenin a *ii*) rekalcitrančních chemikálií, které patří mezi těžko odbouratelné residuální kontaminanty ve složkách životního prostředí.

## 3. Závěr

Poznání úlohy rostlinných enzymů (cytochromů P450 a peroxidas) při přeměně různých typů chemických sloučenin *in vitro*, zapojení těchto enzymů do metabolismu cizorodých látek v rostlinných buňkách *in vivo* a určení metabolitů těchto reakcí a jejich potenciální toxicity, je důležité nejen pro základní výzkum, ale je významné i z praktického hlediska. Je totiž možné do budoucna počítat s využitím poznatků z této oblasti především k odstraňování cizorodých látek z rozličných složek životního prostředí. Bioremediace prostřednictvím mikroorganismů je v dnešní době používána v širokém měřítku v zahraničí i v naší republice. Využití rostlin pro podobné účely – fytofarmacie – však zatím tak široké uplatnění nenašla, je však považována ze velice perspektivní oblast výzkumu i aplikace (cit.<sup>91</sup>). Je tomu tak proto, že metabolismus cizorodých látek v rostlinách nebyl zdaleka tak podrobně studován a vhodné rostlinné druhy tak ani nemohly být pro remediaci vybrány. Poznání osudu xenobiotik při jejich biotransformaci v rostlinách je tedy pro možnost a urychlení praktického využití rostlin a popřípadě jejich enzymového aparátu samotného v remediaci nezbytné.

*Autoři děkují za podporu Grantové agentury ČR (grant 203/99/1628) and Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy ČR (grant VS 96141).*

## LITERATURA

1. Sandermann H.: *TIBS* 17, 82 (1992).
2. Cunningham S. D., Ow D. W.: *Plant. Physiol.* 110, 715 (1996).
3. Sandermann H.: *Pharmacogenetics* 4, 225 (1991).
4. Marrs K. A.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 127 (1996).
5. Coleman J. O. D., Blahe-Kalff M. M. A., Davies T. G. E.: *Trends Plant Sci.* 2, 146 (1997).
6. Kreuz K., Tommasini R., Martinoia E.: *Plant Physiol.* 111, 349 (1996).
7. Toungh Y.-P.S., Hsieh T.S., Tu C.P.D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 31 (1990).
8. La Roche S. D., Leisinger T.: *J. Bacteriol.* 172, 164 (1990).
9. Sariaslani F. S.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 9, 171 (1989).
10. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: *Chem. Listy* 93, 229 (1999).
11. Anzenbacher P., Dawson J. H., Kitagawa T.: *J. Mol. Struct.* 214, 149 (1989).
12. Anzenbacher P., Hudeček J., Stiborová M., Larroque C., Lange R., Heibel G., Hildebrandt P., v knize: *Cytochrome P-450. Biochemistry and Biophysics* (Archakov A. I., Bachmanova G. I., ed.), str. 1. INCO-TNC, Moscow 1992.
13. Hudeček J., Baumruk V., Anzenbacher P., Munro A. W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 811 (1998).
14. Coon M. J., Ding X., Pernecky S. J., Vaz A.D.N.: *FASEB J.* 6, 669 (1992).
15. Hollenberg R. F.: *FASEB J.* 6, 686 (1992).
16. He K., Bornheim L. M., Falick A. M., Maltby D., Yin H., Correia M. A.: *Biochemistry* 37, 17448 (1998).
17. Nelson D. R., Kamataki T., Waxman D. J., Guengerich F. P., Estabrook R. W., Feyereisen R., Gonzales F. J., Coon M. J., Gunsalus I. C., Gotoh O., Okada K., Nebert D. W.: *DNA Cell Biol.* 12, 1 (1993).
18. Spatzenegger M., Jaeger W.: *Drug Metab. Rev.* 27, 397 (1995).
19. Nebert D. W., Nelson D. R., Adesnik M., Coon M. J., Esrabrook R. W., Gonzales F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper B., Levin W., Phillips J. R., Sato R., Waterman M. R.: *DNA Cell Biol.* 8, 1 (1989).
20. Riviére J. L., Cabanne F.: *Biochimie* 69, 743 (1987).
21. Werck-Reichhardt D.: osobní sdělení.
22. Chapple C.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 311 (1998).
23. Moreland D. E., Corbin F. T., McFarland J. E.: *Pestic. Biochem. Physiol.* 45, 43 (1993).
24. Moreland D. E., Corbin F. T., McFarland J. E.: *Pestic. Biochem. Physiol.* 47, 206 (1994).
25. Bolwell P., Bozak K., Zimmerlin A.: *Phytochemistry* 37, 1491 (1997).
26. Frear D. S.: *Drug Metabol. Drug Interact.* 12, 329 (1995).
27. Thies F., Backhaus T., Bossmann B., Grimme L. H.: *Plant Physiol.* 112, 361 (1996).
28. Durst F., Benveniste I.: *Handbook Exp. Pharmacol.* 105, 293 (1993).
29. Durst F., O'Keefe D. P.: *Drug Metabol. Drug Interact.* 12, 171 (1995).
30. Schuller M.: *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 235 (1996).
31. Tijet N., Helvig C., Pinot F., Le Bouaguin R., Lesot A., Durst F., Salaun J. P., Benveniste I.: *Biochem. J.* 332, 583 (1998).
32. Schalk M., Batard Y., Sever A., Nedelkina S., Durst F., Werck-Reichhardt D.: *Biochemistry* 36, 15253 (1997).
33. Batard Y., LeRet M., Schalk M., Robineau T., Durst F., Werck-Reichhardt D.: *Plant J.* 14, 111 (1998).
34. Stiborová M., Anzenbacher P.: *Gen. Physiol. Biophys.* 10, 209 (1991).
35. Chiappella C., Ysern P., Riera J., Llagostera M.: *Mutat. Res.* 329, 11 (1995).
36. Stiborová M., Schmeiser H. H., Frei E.: *Phytochemistry*, v tisku.
37. O'Keefe D. P., Leto K. J.: *Plant Physiol.* 89, 1141 (1989).
38. Bozak K. R., O'Keefe D. P., Christoffersen R. E.: *Plant Physiol.* 100, 1976 (1992).
39. Pierrel M. A., Batard Y., Kazmaier M., Mignotte-Vieux C., Durst F., Werck-Reichhardt D.: *Eur. J. Biochem.* 224, 835 (1994).
40. Urban P., Werck-Reichhardt D., Teutsch H. G., Durst F., Regnier S., Kazmaier M., Pompon D.: *Eur. J. Biochem.* 222, 8812 (1994).
41. Durst F., Benveniste I., Schalk M., Werck-Reichhardt D.: *Methods Enzymol.* 272, 259 (1996).
42. Robineau T., Batard Y., Nedelkina S., Cabello-Hurtado F., LeRet M., Sorokine O., Didierjan L., Werck-Reichhardt D.: *Plant Physiol.* 118, 1049 (1998).
43. Siminzsky B., Corbin F. T., Ward E. R., Fleischmann T. J., Dewey R. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1750 (1999).
44. Hansíková H., Frei E., Anzenbacher P., Stiborová M.: *Gen. Physiol. Biophys.* 13, 149 (1994).
45. Hansíková H., Frei E., Schmeiser H. H., Anzenbacher P., Stiborová M.: *Plant Sci.* 110, 53 (1995).
46. Stiborová M., Hansíková H.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61, 1689 (1996).
47. Meunier B.: *Biochimie* 69, 3 (1987).
48. Stiborová M., Asfaw B., Anzenbacher P.: *FEBS Lett.* 232, 378 (1988).
49. Eling T. E., Thompson D. C., Foureman G. L., Curtis J. F., Hughes M. F.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 1 (1990).
50. Neidelman S. L., Giegert J., v knize: *Biohalogenation*. Ellins Horwood Limited, London 1986.
51. Smulevich G.: *Biochemistry* 33, 7398 (1994).
52. Smulevich G., English A. M., Martini A. R., Marzocchi M. P.: *Biochemistry* 30, 772 (1991).
53. Hoyle M. C.: *Plant Physiol.* 60, 787 (1977).
54. Borchert R., Decedue C. J.: *Plant Physiol.* 62, 794 (1978).
55. Fujiyama K., Takemura H., Shinmyo A., Ohada H., Takano M.: *Gene* 89, 163 (1990).
56. Grison R., Pilet P.: *J. Plant Physiol.* 37, 1180 (1986).
57. Castillo F. J., Penel C., Grepin H.: *Plant Physiol.* 74, 846 (1984).
58. Van Huystee R. S., Chibbar R. N.: *Cur. Top. Biol. Med. Res.* 13, 155 (1986).
59. Farel R. L., Murtagh K. E., Tien M., Mosuch M. D., Kirk T. J.: *Enzyme Microb. Technol.* 11, 322 (1989).
60. Field J. A., Jong E., Feijoo-Costa G., Bont J. A. M.: *TIBTECH* 11, 44 (1993).

61. Kučerová P., Poláchová L., Macek T., Burkhard J., Tříška J., Macková M.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 42, 250 (1998).
62. Vyas B. R. M., Molitoris H. P.: *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3919 (1995).
63. Kučerová P., Macková M., Poláchová L., Burkhard J., Demnerová J., Macek T.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 1497 (1999).
64. Dec J., Bollag J. M.: *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1132 (1994).
65. Nicell J. A., Bewtra K., Biswas N., Taylor K. E.: *Water Res.* 27, 1629 (1993).
66. Klibanov A. M., Morris E. D.: *Enzyme Microbiol. Technol.* 3, 119 (1981).
67. Bollag J. M., Shuttleworth K. L., Auderson D. H.: *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3086 (1998).
68. Shannon M. J. R., Bartha R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1719 (1988).
69. Klibanov A. M., Tu T. M., Scott K. P.: *Science* 221, 259 (1983).
70. Gaspar J., Penel C., Greppin H.: *Bull. Groupe Polyphenols* 23, 259 (1986).
71. Nakamura M., Yamaruki J., Nahagava H., Ohtaki S.: *J. Biol. Chem.* 258, 3878 (1983).
72. Dunford H. B.: *Heme Peroxidases*. Wiley-VCH, New York 1999.
73. Stiborová M., Frei E., Schmeiser H. H., Wiessler M.: *Carcinogenesis* 13, 1221 (1992).
74. Aasa R., Vangart T., Dunford M.: *Biochim. Biophys. Acta* 391, 259 (1986).
75. Sitter A., Recreks C., Ternner J.: *J. Biol. Chem.* 260, 7517 (1985).
76. Mauro J. K.: *Biochemistry* 27, 6243 (1988).
77. Sivaraja M., Goodin D. B., Smith M., Hoffmann B. M.: *Science* 245, 738 (1989).
78. Rodriguez-Lopez J. N., Smith A. T., Thorneley R. N.: *J. Biol. Chem.* 272, 389 (1997).
79. Hayashi Y., Yanazaki J.: *J. Biol. Chem.* 254, 9101 (1979).
80. Sukhybani A. A., Khowaiter S. H.: *Acta Chim. Hung* 120, 93 (1985).
81. Duran N., Brunet J., Gallardo H.: *Biochem. Educ.* 12, 173 (1984).
82. Yokota K., Yamazaki J.: *Biochemistry* 16, 1913 (1977).
83. Ortiz de Montellano P. R., Grab L. A.: *Biochemistry* 26, 5310 (1987).
84. MacDonald J. D., Dunford H. B.: *Arch. Biochem. Biophys.* 272, 185 (1989).
85. Anzenbacher P., Niwa T., Tolbert L. M., Sirimanne S. R., Guengerich F. P.: *Biochemistry* 35, 2511 (1996).
86. Gichner T., Cabrera López G., Wagner E. D., Plewa M. J.: *Mutat. Res.* 306, 165 (1994).
87. Gichner T., Stavreva D. A., Čeřovská N., Wagner E. D., Plewa M. J.: *Mutat. Res.* 331, 127 (1995).
88. Plewa M. J., Wagner E. D., Stavreva D. A., Gichner T.: *Mutat. Res.* 350, 163 (1996).
89. Macek T., Macková M., Očenášková J., Demnerová K., Pazlarová J., Křen V., v knize: *Plant Peroxidases* (Obinger C., Burner U., Ebermann R., Penel C., Grepin H., ed.). Univ. of Geneva, Geneva 1996.
90. Macková M., Ferri E. N., Demnerová K., Macek T.: *Chem. Listy* 95, 130 (2001).
91. Macek T., Macková M., Káš J.: *Biotechnol. Adv.* 18 (1), 23 (2000).
92. Plewa M. J., Wagner E. D.: *Annu. Rev. Genet.* 27, 93 (1992).

**L. Chromá<sup>a</sup>, M. Macková<sup>a</sup>, T. Macek<sup>b</sup>, V. Martínek<sup>c</sup>, and M. Stiborová<sup>c</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*, <sup>b</sup>*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, <sup>c</sup>*Department of Biochemistry, Faculty of Natural Science, Charles University, Prague*): **Plant Cytochromes P450 and Peroxidases and Their Role in Degradation of Environmental Contaminants**

Transformation of various xenobiotics by plant cells usually proceeds in three phases: derivatization of the xenobiotic to a more polar and reactive agent (phase 1), conjugation (phase 2) and secondary conjugation (phase 3) with endogenous molecules. The mixed-function oxidases with cytochromes P450 as terminal oxidases and peroxidases belong to the enzymes of phase 1. These enzymes, in addition to other functions, probably play an important role in the metabolism of xenobiotics in plants. The mechanisms of detoxification are described.