

**Joanna Nowak\***

Laboratorium Mikrobiologii Reckitt Benckiser Production (Poland) Sp. z o.o.  
ul. Sikorkiego 1/31, 05-101 Nowy Dwór Mazowiecki

*Wpłynęło w kwietniu 2007 r.*

1. Wstęp. 2. Hydroksylazy fenolowe. 3. Genetyczna organizacja operonów katabolicznych degradacji fenolu. 4. Kontrola ekspresji operonów katabolizmu fenolu – białka regulatorowe. 4.1. Regulatory typu XylR/DmpR. 4.2. Regulatory typu GntR. 4.3. Regulatory typu AraC/XylS. 4.4. Regulatory typu LysR. 5. Podsumowanie

### **Structure and expression of catabolic operons for phenol degradation in bacteria**

**Abstract:** Phenol is a common environmental pollutant discharged from such industrial facilities as oil refineries and chemical plants. The initial step of aerobic degradation of phenol is catalyzed by phenol hydroxylase that incorporates one oxygen atom of molecular oxygen into the aromatic ring to form catechol. The second step is catalyzed by catechol 1,2-dioxygenase (*ortho* fission) or catechol 2,3-dioxygenase (*meta* fission). The initial hydroxylation is considered to be the rate-limiting step in the degradative pathway. To date, two types of bacterial phenol hydroxylases, single-component and multi-component type, have been identified.

Phenol degradative enzymes are coded in operons which are located on the chromosome or plasmids. The expression of phenol degradative genes is controlled by one or more regulatory proteins. These proteins belong to four different families of transcriptional regulators: LysR, XylR/DmpR, AraC/XylS and GntR.

Operons for phenol degradation can be adapted to create bacterial biosensors for the detection of industrial pollution. The understanding of regulatory mechanisms which govern the expression of the phenol catabolic pathway might be an important challenge in the application of bacterial regulatory systems in bioremediation and in the creation of bacterial biosensors for measuring the quality of soil and water.

1. Introduction. 2. Phenol hydroxylases. 3. Genetic organization of catabolic operons for phenol degradation. 4. Control of expression of operons for phenol catabolism – regulatory proteins. 4.1. XylR/DmpR family of regulatory proteins. 4.2. GntR family of regulatory proteins. 4.3. AraC/XylS family of regulatory proteins. 4.4. LysR family of regulatory proteins. 5. Summary

---

**Słowa kluczowe:** białka regulatorowe, degradacja, hydroksylazy fenolowe, operony  
**Key words:** regulatory proteins, degradation, phenol hydroxylase, operons

---

## **1. Wstęp**

Fenol jest częstym składnikiem ścieków przemysłowych pochodzących z przemysłu rafineryjno-petrochemicznego, farmaceutycznego, tekstylnego, z produkcji plastiku, żywic, z koksowni, zakładów metalurgicznych i fabryk barwników anilinowych [1, 28]. Związek ten zanieczyszcza rzeki i jeziora znajdujące się w pobliżu zakładów przemysłowych (jest dobrze rozpuszczalny w wodzie) lub odbierające z nich ścieki [28]. Jest szkodliwy dla człowieka i innych kręgowców, a także bezkręgowców i mikroorganizmów [32].

W biologicznych metodach usuwania fenolu ze środowiska są wykorzystywane mikroorganizmy, dla których związek ten stanowi źródło węgla i energii. Zdolność biodegradacji fenolu posiadają liczne eubakterie (z rodzajów *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* i *Variovorax*) [11, 40], niektóre grzyby i cyjanobakterie [36]. Wiele gatunków bakterii rozkła-

dających fenol wyizolowano oraz scharakteryzowano pod kątem funkcjonalnym i genetycznym [37, 40].

W warunkach tlenowych fenol ulega całkowitemu rozkładowi przez mikroorganizmy do dwutlenku węgla i wody. W pierwszym etapie degradacji hydroksylaza fenolowa (EC 1.14.13.7) wprowadza jeden atom tlenu cząsteczkowego do pierścienia aromatycznego fenolu, w wyniku czego powstaje catechol. W drugim etapie następuje proces rozszczepienia pierścienia aromatycznego pod wpływem dioksygenaz, które wprowadzają do pierścienia równocześnie dwa atomy tlenu. Otwarcie pierścienia może być typu *orto* lub *meta* i zachodzi z udziałem odmiennego zestawu enzymów [37]. W szlaku *orto* 1,2-dioksygenaza catecholowa (EC 1.13.11.1) katalizuje cięcie pierścienia aromatycznego catecholu do kwasu *cis,cis*-mukonowego. Natomiast w ścieżce *meta* 2,3-dioksygenaza catecholowa (EC 1.13.11.2) katalizuje konwersję catecholu do semialdehydu  $\alpha$ -hydroksymukonowego [2, 15]. Ostatnim etapem degradacji fenolu jest dalszy rozkład

---

\* Autor do korespondencji: Laboratorium Mikrobiologii Reckitt Benckiser Production (Poland) Sp. z o.o. ul. Sikorkiego 1/31, 05-101 Nowy Dwór Mazowiecki; joanna\_nowak@o2.pl

powstałych związków, z wytworzeniem intermediatów centralnych szlaków metabolicznych (bursztynian, acetylo-Co, pirogronian), które są włączane do szlaków metabolizmu pośredniego oraz wykorzystywane przez bakterie do syntezy składników komórkowych i energii [5].

Enzymy uczestniczące w rozkładzie fenolu (hydroksylazy fenolowe, dioksygenazy katecholowe) kodowane są w operonach zlokalizowanych w chromosomie bakteryjnym lub plazmidach. Operony te mogą być utworzone przez 2 do 15 genów, których ekspresja jest kontrolowana przez jedno lub kilka białek regulatorowych.

Dokładne poznanie działania systemów regulatorowych operonów „fenolowych” umożliwi w przyszłości wykorzystanie ich w bioremediacji środowisk zanieczyszczonych fenolem oraz w konstrukcji mikroorganizmów modyfikowanych genetycznie, służących jako biosensory w monitorowaniu jakości środowisk wodnych i glebowych [13].

W ciągu ostatnich kilkunastu lat prowadzone są badania mające na celu poznanie molekularnych podstaw bakteryjnego procesu degradacji fenolu. W artykule przedstawiony zostanie aktualny stan wiedzy na temat enzymów zaangażowanych w degradację fenolu oraz mechanizmów regulacji ekspresji kodujących je genów.

## 2. Hydroksylazy fenolowe

Obecnie znanych jest kilkanaście hydroksylaz fenolowych (PHs) pochodzących z bakterii należących do rodzajów *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Ralstonia* i *Alcaligenes*

(Tab. I). Enzymy te podzielono na dwa typy: jednoskładnikowe (sPH) i wieloskładnikowe (mPH).

Jednoskładnikowe hydroksylazy fenolowe zbudowane są z jednego rodzaju białka. Wyjątkiem jest enzym wyizolowany z *Bacillus thermoglucosidasius* A7, który składa się dwóch homodimerycznych białek: PheA1 i PheA2. Białko PheA2 to NADH-zależna reduktaza flavinowa, która dostarcza oksygenazie (PheA1) FADH do katalizowania *orto*-hydroksylacji fenolu [17].

Hydroksylazy fenolowe *Pseudomonas* sp. EST1001 i *Pseudomonas R. pickettii* PKO1 są do siebie podobne. Składają się z pojedynczego białka o masie cząst. ok. 70 kDa, które zawiera FAD jako grupę prostetyczną. Całkowicie inaczej zbudowana jest sPH u *Bacillus stearothermophilus* BR219. Jest znacznie mniejszą, a jej kofaktorem jest NADH. Wykazuje silne podobieństwo do białka actV, hydroksylazy antybiotykowej z *Rhodococcus* i gatunków z rodzaju *Streptomyces* [16]. Sekwencje aminokwasowe hydroksylazy z *Bacillus thermooleovorans* A2 i *B. thermoglucosidasius* A7 różnią się znacznie od znanych hydroksylaz fenolowych [8].

Wieloskładnikowe hydroksylazy fenolowe składają się z 6 podjednostek (tylko niektórym przypisano określone funkcje). Największa z nich (60 kDa), LmPH, zawiera centrum katalityczne [37].

W genomie większości mikroorganizmów znajdują się geny kodujące tylko jeden rodzaj wieloskładnikowej monoooksygenazy. U nielicznych bakterii rozkładających fenol występuje dodatkowa wieloskładnikowa monoooksygenaza, uczestnicząca w degradacji innego związku aromatycznego. Na przykład u *Ralstonia metallidurans* CH34 jest to monoooksygenaza toluenu-ben-

Tabela I

Hydroksylazy fenolowe

Organizm	Enzym	Gen/y	Lokalizacja genu/ów	Piśmiennictwo
<b>A) jednoskładnikowe</b>				
<i>Pseudomonas</i> sp. EST1001	PheA	<i>pheA</i>	plazmid (pEST1412)	[27]
<i>P. (R.) pickettii</i> PKO1	TbuD	<i>tbuD</i>	chromosom	[19, 21]
<i>Bacillus thermoleovorans</i> A2	PheA	<i>pheA</i>	chromosom	[8]
<i>B. thermoglucosidasius</i> A7	PheA	<i>pheA1, pheA2</i>	chromosom	[9, 17]
<i>B. stearothermophilus</i> BR219	PheA	<i>pheA</i>	plazmid (pGGO1)	[16]
<b>B) wieloskładnikowe</b>				
<i>Pseudomonas</i> sp. CF600	Dmp	<i>dmpKLMNOP</i>	plazmid V1150 chromosom	[25]
<i>P. putida</i> P35X	Phh	<i>phhKLMNOP</i>	chromosom	[24]
<i>P. putida</i> BH	Phe	<i>pheA1A2A3A4A5A6</i>	chromosom	[32]
<i>P. putida</i> H	Phl	<i>phlABCDEF</i>	plazmid PGH1	[22]
<i>Burkholderia kururiensis</i> KP23	Phk	<i>phkABCDEF</i>	chromosom	[39]
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NCIB 8250	Mop	<i>mopKLMNOP</i>	chromosom	[10, 30]
<i>Comamonas testosteroni</i> TA441	Aph	<i>aphKLMNOP</i>	chromosom	[3,4]
<i>C. testosteroni</i> R5	Phc	<i>phcKLMNOP</i>	chromosom	[34]
<i>Ralstonia</i> KN1	Phy	<i>phyZABCDE</i>	chromosom	[23]
<i>R. eutropha</i> E2	Pox	<i>poxABCDEF</i>	chromosom	[12]

zeniu, zaś u *Pseudomonas stutzeri* – monoooksygenaza toluenu/o-ksylenu [6].

### 3. Genetyczna organizacja operonów katabolicznych degradacji fenolu

Opisano organizację genów w operonach katabolicznych degradacji fenolu kilkunastu szczepów bakterii, które wyizolowano z gleb zanieczyszczonych fenolem lub ze ścieków rafinerijno-petrochemicznych (Tab. II). Operony zlokalizowane są w chromosomie bakteryjnym lub plazmidach. Przykładem operonu plazmidowego kodującego enzymy szlaku *meta* jest operon *dmp* u *Pseudomonas* sp. CF600 [25], zaś kodującego enzymy szlaku *orto* operon *phe* u *Pseudomonas* sp. EST1001 [27]. Do operonów o chromosomowo kodowanej drodze *orto* należą: *mop* u *Acineto-*

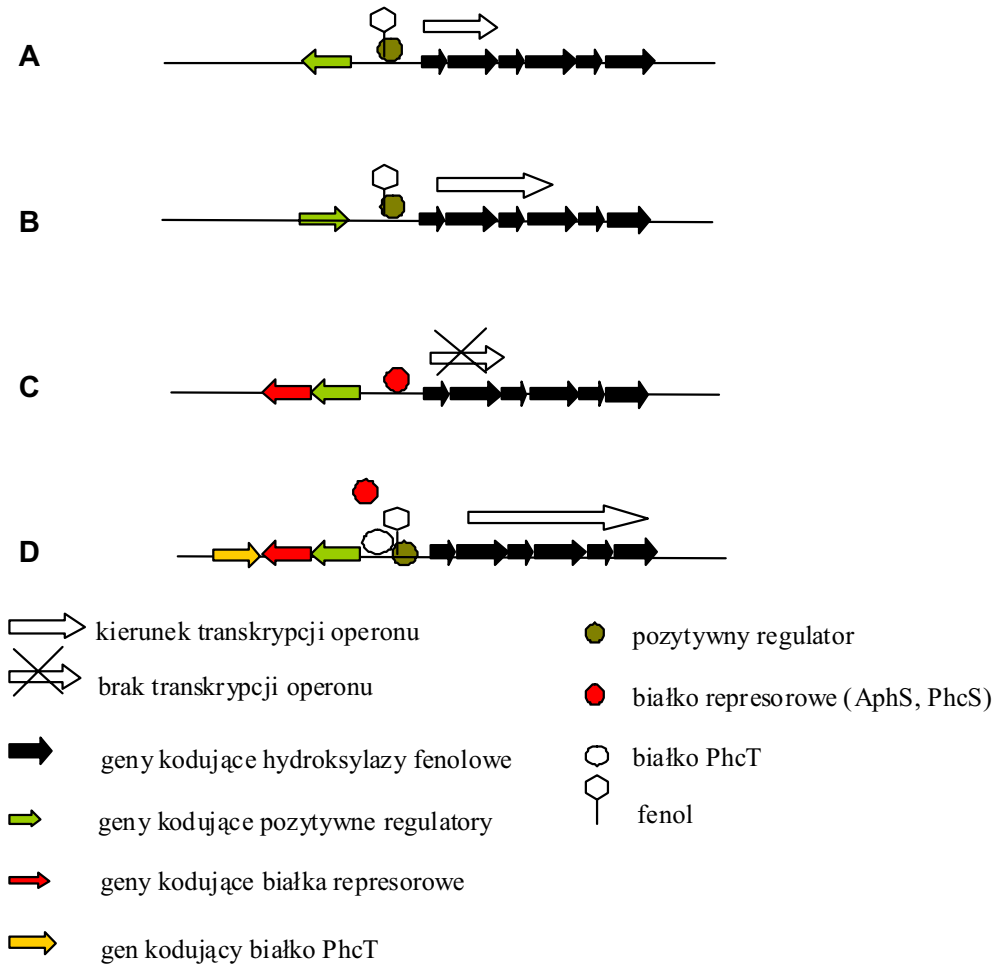
*bacter calcoaceticus* NCIB8250 [10]; a o chromosomowo kodowanym szlaku *meta*: *phh* u *P. putida* P35X [24], *aph* u *Comamonas testosteroni* TA441 [3, 4], *phe* u *C. testosteroni* R5 [34], *phy* u *Ralstonia* KN1 [23], *pox* u *R. eutropha* E2 [12]. Wyjątkową budowę ma operon u *Pseudomonas (Ralstonia) pickettii* PKO1, bowiem zawiera zarówno geny szlaku *orto* (*pheB*), jak i *meta* (*tbuE*), które kodują odpowiednio 1,2-dioksygenazę katecholową i 2,3-dioksygenazę katecholową [18].

W chromosomie *Pseudomonas putida* znajduje się dodatkowo operon rozkładu katecholu *catBCA*, składający się z genów kodujących enzymy uczestniczące w degradacji fenolu – enzym *cis,cis*-mukoniano-laktonowy (*catB*), izomerazę mukonolaktenu (*catC*) i 1,2-dioksygenazę katecholową (*catA*). Powyżej operonu *catBCA* znajduje się gen regulatorowy *catR*, który jest transkrybowany w odwrotnym kierunku niż operon [14].

Tabela II

Przykłady operonów katabolicznych degradacji fenolu. Podkreślono geny kodujące enzymy szlaku *meta* (2,3-dioksygenaza katecholowa) i *orto* (1,2-dioksygenaza katecholowa)

Operon	Organizm	Lokalizacja operonu	Geny operonu i ich produkty	Piśmiennictwo
<i>pheBA</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. EST1001	plazmid (pEST1412)	<i>pheB</i> – 1,2-dioksygenaza katecholowa; <i>pheA</i> – hydrosylaza fenolowa	[27]
<i>pheBA</i>	<i>Bacillus thermo-</i> <i>leovorans A2</i>	chromosom	<i>pheB</i> – 2,3-dioksygenaza katecholowa; <i>pheA</i> – hydrosylaza fenolowa	[8]
<i>dmpKLMNOPQBCD</i> <i>EFGHI</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. szczep CF600	plazmid (pVI150)	<i>dmp</i> KLMNOP – podjednostki hydrosylazy fenolowej; <i>dmpB</i> – 2,3-dioksygenaza katecholowa	[25]
<i>phhKLMNOPQB</i>	<i>Pseudomonas putida</i> P35X	chromosom	<i>phh</i> L MNOP – składniki hydrosylazy fenolowej; <i>phhB</i> – 2,3-dioksygenaza katecholowa; <i>phhQ</i> – małe białko podobne do ferrodoksyny	[24]
<i>pheA1A2A3A4A5A6</i>	<i>P. putida</i> BH	chromosom	<i>pheA1A2A3A4A5A6</i> – podjednostki hydrosylazy fenolowej	[32]
<i>catBCA</i>	<i>P. putida</i> PaW85	chromosom	<i>catA</i> – 1,2-dioksygenaza katecholowa; <i>catB</i> – enzym mukoniano-laktonowy; <i>catC</i> – izomeraza mukonolaktenu	[26]
<i>phlABCDEFGHIJKL</i>	<i>P. putida</i> H	plazmid (pPGH1)	<i>phl</i> ABCDEEF – podjednostki hydrosylazy fenolowej	[22]
<i>phkABCDEFG</i>	<i>Burkholderia kururiensis</i> KP23	chromosom	<i>phk</i> ABCDEF – podjednostki hydrosylazy fenolowej; <i>phkG</i> – białko podobne do ferrodoksyny	[39]
<i>mopKLMNOPcatA</i>	<i>Acinetoacter calcoaceticus</i> NCIB 8250	chromosom	<i>mop</i> KLMNOP – podjednostki hydrosylazy fenolowej; <i>catA</i> – 1,2-dioksygenaza katecholowa	[10]
<i>aphKLMNOPQB</i>	<i>Comamonas testosteroni</i> TA441	chromosom	<i>aphK</i> – montuje aktywny składnik oksygenazy; <i>aphL,N,O</i> – składnik hydrosylazy; <i>aphM</i> – optymalny turnover hydrosylazy; <i>aphP</i> – składnik reduktazy; <i>aphQ</i> – białko podobne do ferrodoksyny; <i>aphB</i> – 2,3-dioksygenaza katecholowa; <i>aphR</i> – aktywator transkrypcyjny	[3, 4]
<i>pheKLMNOPQB</i>	<i>C. testosteroni</i> R5	chromosom	<i>phe</i> KLMNOP – podjednostki hydrosylazy fenolowej; <i>pheB</i> – 2,3-dioksygenaza katecholowa	[34]
<i>phyZABCDEFG</i>	<i>Ralstonia</i> KN1	chromosom	<i>phy</i> ZABCDE – podjednostki hydrosylazy fenolowej; <i>phyF</i> – białko podobne do ferrodoksyny; <i>phyG</i> – 2,3-dioksygenaza katecholowa	[23]
<i>poxABCDEFG</i>	<i>Ralstonia eutropha</i> E2	chromosom	<i>pox</i> ABCDEF – hydrosylaza fenolowa; <i>poxG</i> – białko podobne do ferredoksyny	[12]



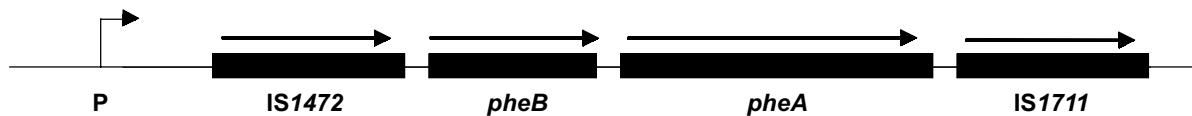
Rys. 1. Organizacja genów wieloskładnikowych hydroksylaz fenolowych w operonach:  
 A – *dmp*, *phh*, *mop*, *phl*, *pheA*; B – *pox*; C – *aph*; D – *phc*

We wszystkich operonach katabolicznych degradacji fenolu geny kodujące pozytywne regulatory są przeciwnie zorientowane względem genów strukturalnych. Wyjątkiem od tej reguły jest operon *pox* u *R. eutropha* E2 (Rys. 1), w którym gen *poxR* kodujący białko regulatorowe PoxR, ma orientację taką samą jak geny operonu [37]. Geny jednoskładnikowych hydroksylaz fenolowych są zlokalizowane poniżej, a wieloskładnikowe powyżej, genu kodującego dioksygenazę katecholową [21, 37].

Geny kataboliczne są często oflankowane sekwencjami insercyjnymi (IS), które zwiększają możliwość wymiany genów pomiędzy różnymi replikonami i go-

spodarzami. W ten sposób zbudowany jest operon *pheBA* umożliwiający degradację fenolu *Pseudomonas* sp. EST1001 (Rys. 2). Geny *pheB* i *pheA*, kodujące 1,2-dioksygenazę katecholową i monooksygenazę fenolową, są oflankowane przez dwa różne elementy IS (IS1472 i IS1711). Poszczególne geny oraz elementy IS operonu są kotranskrybowane z tego samego promotora [27].

Szczepy *P. putida* posiadające plazmidy, które kodują operon *pheBA* wykorzystano w bioremediacji *In situ* środowiska zanieczyszczonego fenolem. Zaobserwowano rozprzestrzenienie się wprowadzonego operonu *pheBA* w obrębie mikroflory lokalnej rzeki.



Rys. 2. Organizacja operonu *pheBA* *Pseudomonas* sp. EST1001  
 czarne prostokąty – otwarte ramki odczytu; linie ciągłe – regiony niekodujące; strzałki – kierunek transkrypcji;  
*pheB* – gen kodujący 1,2-dioksygenazę katecholową; *pheA* – gen kodujący monooksygenazę fenolową;  
 IS1472, IS1711 – sekwencje insercyjne; P – promotor

Geny *pheBA* z jednego lub obu flankujących sekwencji odwróconych zostały nabyte przez rodzime szczepy *Pseudomonas*. Operon wykrywano w plazmidach, z wyjątkiem jednego przypadku, w którym geny *pheBA* znaleziono w chromosomie szczepu gospodarza [27].

#### 4. Kontrola ekspresji operonów katabolizmu fenolu – białka regulatorowe

Operony kataboliczne degradacji fenolu podlegają ścisłej kontroli genetycznej. Ekspresja jest regulowana na etapie transkrypcji, z udziałem białek regulatorowych. Dotychczas zidentyfikowano 10 białek tego typu, które należą do czterech różnych rodzin: LysR, GntR, AraC/XylS oraz XylR/DmpR (Tab. III) [35]. W ich budowie wyróżnia się dwie domeny funkcjonalne: wiązania DNA oraz łączącą substrat i odpowiedzialną za oligomeryzację białka do formy natywnej. Białka typu XylR/DmpR posiadają dodatkowo domenę wiązania i hydrolizy ATP. Białka regulatorowe należące do poszczególnych rodzin różnią się budową i konformacją przestrzenną, organizacją domen w obrębie łańcucha polipeptydowego oraz mechanizmem działania [13].

Tabela III

Białka regulatorowe kontrolujące transkrypcję operonów degradacji fenolu

Rodzina	Regulator	Regulowany operon	Písmienictwo
<b>LysR</b>	<b>CatR</b>	<i>catBCA (pheBA)</i>	[13, 26]
<b>Gnt</b>	<b>AphS</b>	<i>aphKLMNOPQB</i>	[4]
	<b>PhcS</b>	<i>phcKLMNOPQB</i>	[33]
<b>AraC/XylS</b>	<b>PhcT</b>	<i>phcKLMNOPQB</i>	[33]
<b>XylR/DmpR</b>	<b>DmpR</b>	<i>dmpLMNOPQBCDEFGHI</i>	[13]
	<b>TouR</b>	<i>touABCDEF</i>	[13]
	<b>MopR</b>	<i>mopKLMNOP</i>	[30]
	<b>PhhR</b>	<i>phhKLMNOPQB</i>	[24]
	<b>PhIR</b>	<i>phIABCDEF</i>	[22]
	<b>AphR</b>	<i>aphKLMNOPQB</i>	[3, 4]
	<b>PhcR</b>	<i>phcKLMNOPQB</i>	[33]
	<b>PhkR</b>	<i>phkABCDEF</i>	[39]
	<b>PoxR</b>	<i>poxABCDEF</i>	[12]

Białka regulatorowe wiążą się z DNA w ściśle określonym miejscu. Regulatory typu LysR przyłączają się w obrębie sekwencji RBS (Recognition Binding Site) i ABS (Activator Binding Site), które leżą powyżej sekwencji promotorowych operonów katabolicznych degradacji fenolu. Natomiast białka regulatorowe z pozostałych rodzin wiążą się tylko z sekwencjami RBS. Wszystkie regulatory są syntetyzowane w postaci nieaktywnych monomerów, które po związaniu induktora oligomeryzują do formy aktywnej [13].

Najlepiej poznanym białkiem regulującym transkrypcję genów kodowanych przez operon degradacji fenolu jest białko DmpR. Sekwencję aminokwasową tego białka porównano z sekwencjami innych białek regulatorowych. Okazało się, że większość z nich jest w ok. 50% podobna, białko PhhR jest prawie identyczne, zaś białko MopR wykazuje wysoki stopień podobieństwa (71% identyczności) tylko w domenie wiązania i hydrolizy ATP. Domena A MopR wykazuje taki sam stopień podobieństwa (41%) do domeny A DmpR, jak do domeny A XylR. Zatem wydaje się, że jednostki kontrolujące transkrypcję dla operonów biodegradacji wyewoluowały niezależnie od genów katabolicznych, które regulują [30].

#### 4.1. Regulatory typu XylR/DmpR

Większość białek regulatorowych kontrolujących transkrypcję operonów katabolicznych degradacji fenolu należy do rodziny XylR/DmpR (Tab. III). Najlepiej poznano budowę, funkcję i mechanizm działania białka DmpR, kontrolującego transkrypcję dużego operonu degradacji fenolu obecnego w plazmidzie pVI150 u szczepu *Pseudomonas* sp. F600 [13, 38]. Innymi znanymi regulatorami z tej rodziny są białka MopR, PhhR, PhIR [38], AphR [3] i PhcR [34].

Białka z rodziny XylR/DmpR należą do regulatorów typu NtrC i wykazują znaczne podobieństwo do siebie na poziomie sekwencji aminokwasowej. Ponadto zawierają podobne strukturalnie, niezależne domeny pełniące różne funkcje [13, 38]. Centralna domena C promuje tworzenie otwartego kompleksu. W jej obrębie występuje siedem wysoce konserwatywnych regionów (od C1 do C7). Trzy z nich (C1, C4 i C7) biorą udział w wiązaniu i hydrolizie ATP. C-terminalna domena D zawiera motyw HTH odpowiedzialny za wiązanie DNA (przyłącza się do sekwencji enhancera) i proces dimeryzacji białka. Jest ona połączona z N-kończącą domeną A za pomocą krótkiego łącznika międzydomenowego (domena B). Domena A oddziałuje z induktorem, co wywołuje prawdopodobnie niewielkie zmiany konformacyjne w domenie C, niezbędne do ujawnienia jej własności hydrolitycznych [13, 35].

Białka regulatorowe z rodziny XylR/DmpR, w odróżnieniu od regulatorów z innych rodzin, aktywują ekspresję operonów katabolicznych w wyniku oddziaływania z polimerazą RNA zależną od czynnika transkrypcyjnego  $\sigma^{54}$ . Białka te przyłączają się do ok. 60-kb sekwencji, zlokalizowanej powyżej miejsca inicjacji transkrypcji, zwanej UAS (Upstream Activating Sequences). Następnie oddziałują z  $\sigma^{54}$ RNAP, co powoduje wygięcie fragmentu DNA, które umożliwia powstanie otwartego kompleksu i inicjację transkrypcji. Białka XylR/DmpR są aktywne w postaci hepta- lub heksametrów [13].

Białka typu XylR/DmpR są atrakcyjnymi kandydatami do genetycznej manipulacji. Można za pomocą mutagenезy zmodyfikować domenę sensorową, bez naruszania funkcji wiązania DNA i aktywacji transkrypcji. W ten sposób powstaną nowe białka, które będą ulegać aktywacji przez ksenobiotyki będące niewykrywalne przez „dzikie” białka. Takie zmienione regulatory mogą zwiększyć dotychczasowy zakres wykrywanych przez biosensory związków chemicznych. Modyfikując domenę sensorową białek regulatorowych typu NtrC można stworzyć pochodne białka zdolne do wykrywania cząsteczek fenolowych powszechnie wykorzystywanych w przemyśle [38].

#### 4.2. Regulatory typu GntR

Dwa z dotychczas poznanych białek regulatorowych uczestniczących w regulacji transkrypcji operonów katabolicznych degradacji fenolu należą do rodziny GntR. Są to białka AphS i PhcS, które regulują ekspresję u dwóch szczepów *Comamonas testosteroni*, R5 i TA441. W nieobecności substratu (fenol) wiążą się do dwóch specyficznych miejsc w regionie promotorowym pomiędzy pierwszym genem strukturalnym a genem kodującym pozytywny regulator i hamują transkrypcję genów katabolicznych (Rys. 1C) [4]. Geny *phcS* i *aphS* wchodzi w skład małych operonów (*phcRS* i *aphRS*), które zawierają gen kodujący regulator typu NtrC/XylR [35].

U bakterii z rodzaju *Comamonas* w kontroli ekspresji operonu niosącego geny degradacji fenolu biorą udział również pozytywne regulatory. Na przykład u *C. testosteroni* R5 występują dodatkowo białka PhcR i PhcT [37].

#### 4.3. Regulatory typu AraC/XylS

Regulatory transkrypcji należące do rodziny AraC/XylS charakteryzują się odmienną lokalizacją domen funkcjonalnych. N-końcowy fragment łańcucha polipeptydowego, zwany również domeną regulatorową, odpowiada za oligomeryzację i wiązanie efektorów. Natomiast C-koniec białka bierze udział w wiązaniu DNA i oddziaływaniu z polimerazą RNA. Zawiera on dwa motywy HTH w obrębie wysoce konserwatywnego regionu [13].

Jedynym znanym regulatorem z rodziny AraC/XylS biorącym udział w kontroli ekspresji genów szlaków degradacji fenolu jest białko PhcT, wyizolowane z *C. testosteroni* R5. Wzmacnia ono aktywację transkrypcji promotora operonu *phc* poprzez oddziaływanie z innym regulatorem, PhcR. Białko PhcT wiąże się do regionu pomiędzy genem *phcR* a operonem *phc*, co powoduje represję ekspresji *phcR* (Rys. 1D) [35].

Białko PhcT wykazuje 19% homologii i 45% podobieństwa do XylS, kontrolującego ekspresję genów szlaku *meta* rozkładu toluenu kodowanego przez plazmid pWWO *P. putida* [33].

#### 4.4. Regulatory typu LysR

Białko CatR, należące do najliczniejszej u *Prokaryota* rodziny LysR (LTTR), kontroluje ekspresję dwóch operonów katabolicznych u *P. putida*: *pheBA* degradacji fenolu i *catBCA* rozkładu pirokatechiny (Tab. III). Jak wszystkie regulatory transkrypcji typu LysR posiada domenę rozpoznającą DNA o strukturze helisa-skręt-helisa (HTH) na N-końcu łańcucha polipeptydowego [13, 29]. Do DNA wiążą się dwa dimery białka CatR – jeden z miejscem RBS, drugi z sekwencjami ABS. Po przyłączeniu induktora, którym jest *cis,cis*-mukonian, białko regulatorowe zmienia swoją konformację oraz przesuwa region oddziaływania w kierunku sekwencji ABS. Umożliwia to rozpoznanie i przyłączenie podjednostki  $\alpha$  polimerazy RNA (RNAP) do regionu zlokalizowanego pomiędzy RBS a ABS zwanego motywem UP. Zwiększa do powinowactwo RNAP do promotora i inicjuje ekspresję genów struktury. Prawdopodobnie białko regulatorowe w obecności induktora zmniejsza napięcie torsyjne w DNA, co ułatwia powstanie otwartego kompleksu, który jest niezbędny do rozpoczęcia transkrypcji [7, 13, 20, 35].

Białko CatR ma niskie powinowactwo do regionu w obrębie genu *catB*, zwanego inhibitorowym miejscem wiązania (IBS), które prawdopodobnie zapobiega nadmiernie wysokiej ekspresji z operonu *catBCA*. Powinowactwo CatR do IBS rośnie wraz ze wzrostem stężenia induktora (*cis,cis*-mukonian). Regiony IBS zidentyfikowano również w operonie *pheBA* [35].

### 5. Podsumowanie

Spośród enzymów uczestniczących w degradacji fenolu najlepiej zbadano hydroksylazy fenolowe. Podzielono je na dwa typy: jednoskładnikowe (sPH) i wieloskładnikowe (mPH). Wieloskładnikowe hydroksylazy fenolowe są uważane za główny enzym w środowisku naturalnym [37].

Bakteryjne operony degradacji fenolu są zlokalizowane w chromosomie lub plazmidach. Większość z nich koduje enzym szlaku *meta*, 2,3-dioksygenazę katecholową. U jednego z przebadanych szczepów rozkładających fenol wykryto operon zawierający zarówno 2,3-dioksygenazę katecholową, jak i 1,2-dioksygenazę katecholową, które kodują oba typy rozszczepienia pierścienia benzenowego, *orto* i *meta*.

Operony degradacji fenolu mogą być utworzone przez 2 do 15 genów, których ekspresja jest kontrolo-

wana przez jedno lub kilka białek regulatorowych. Większość białek regulatorowych kontrolujących transkrypcję operonów degradacji fenolu należy do rodziny XylR/DmpR. Pozostałe należą do rodziny LysR, AraC/XylS oraz GntR.

Identyfikacja nowych białek regulatorowych należących do rodziny XylR/DmpR, może być pomocna przy opracowywaniu nowych systemów biosensorycznych o większym zakresie wykrywanych związków.

## Piśmiennictwo

- Annadurai G., Lee J.-F.: Application of artificial neural network model for the development of optimized complex medium for phenol degradation using *Pseudomonas pictorum* (NICM 2074). *Biodegradation*, **18**, 383–392 (2007)
- Antizar-Ladislao B., Lopez-Real J.M., Beck A.J.: Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated waste using composting approaches. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **34**, 249–289 (2004)
- Arai H., Akahira S., Ohishi T., Maeda M., Kudo T.: Adaptation of *Comamonas testosteroni* TA441 to utilize phenol: organization and regulation of the genes involved in phenol degradation. *Microbiology*, **144**, 2895–2903 (1998)
- Arai H., Akahira S., Ohishi T., Kudo T.: Adaptation of *Comamonas testosteroni* TA441 to utilization of phenol by spontaneous mutation of the gene for a trans-acting factor. *Mol. Microbiol.* **33**, 1132–1140 (1999)
- Baj J., Markiewicz Z. (red): *Biologia molekularna bakterii*. Wyd. Naukowe PWN. Warszawa 2006
- Cafaro V., Izzo V., Scognamiglio R., Notomista E., Capasso P., Casbarra A., Pucci P., Di Donato A.: Phenol Hydroxylase and Toluene/o-Xylene Monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: Interplay between Two Enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2211–2219 (2004)
- Chugani S.A., Parsek M.R., Chakraborty A.M.: Transcriptional Repression Mediated by LysR Type Regulator CatR Bound at Multiple Binding Sites. *J. Bacteriol.* **180**, 2367–2372 (1998)
- Duffner F.M., Mueller R.: A novel phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2: nucleotide sequence and analysis of the genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**, 37–45 (1998)
- Duffner F. M., Kirchner U., Bauer M. P., Muller R.: Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. *Gene*, **256**, 215–221 (2000)
- Ehrt S., Schirmer F., Hillen W.: Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *Mol. Microbiol.* **18**, 13–20 (1995)
- Gurujeyalakshmi G., Oriol P.: Isolation of Phenol-Degrading *Bacillus stearothermophilus* and Partial Characterization of the Phenol Hydroxylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 500–502 (1989)
- Hino S., Watanabe K., Takahashi N.: Phenol hydroxylase cloned from *Ralstonia eutropha* strain E2 exhibits novel kinetic properties. *Microbiology*, **144**, 1765–1772 (1998)
- Hupert-Kocurek K., Mrozik A., Łabużek S.: Białka regulatorowe w kontroli ekspresji genów degradacji związków o strukturze aromatycznej u bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. *Post. Mikrobiol.* **45**, 97–106 (2006)
- Kasak L., Horak R., Nurk A., Talik K., Kivisaar M.: Regulation of the Catechol 1,2-dioxygenase- and Phenol Monooxygenase-Encoding pheBA Operon in *Pseudomonas putida* PaW85. *J. Bacteriol.* **175**, 8038–8042 (1993)
- Kibret M., Somitsch W., Robra K.-H.: Characterization of phenol degrading mixed population by enzyme assay. *Wat. Res.* **34**, 1127–1134 (2000)
- Kim I.Ch., Oriol P.J.: Characterization of the *Bacillus stearothermophilus* BR219 Phenol Hydroxylase Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1252–1256 (1995)
- Kirchner U., Westphal A.H., Muller R., van Berkel W.J.H.: Phenol Hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7 Two-protein Component Monooxygenase with a Dual Role for FAD. *J. Biol. Chem.* **278**, 47545–47553 (2003)
- Kukor J.J., Olsen R.H.: Genetic Organization and Regulation of a meta Cleavage Pathway for Catechols Produced from Catabolism of Toluene, Benzene, Phenol, and Cresols by *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J. Bacteriol.* **173**, 4587–4594 (1991)
- Kukor J.J., Olsen R.H.: Complete Nucleotide Sequence of tbuD, the Gene Encoding Phenol/Cresol Hydroxylase from *Pseudomonas pickettii* PKO1, and Functional Analysis of the Encoded Enzyme. *J. Bacteriol.* **174**, 6518–6526 (1992)
- McFall S.M., Chugani A.S., Chakraborty A.M.: Transcriptional activation of the catechol and chlorocatechol operons: variations on a theme. *Gene*, **223**, 257–267 (1998)
- Merimaa M., Heinaru E., Liivak M., Redler E., Heinaru A.: Grouping of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase genes among phenol- and p-cresol-degrading *Pseudomonas* species and biotypes. *Arch. Microbiol.* **186**, 287–296 (2006)
- Muller Ch., Petruschka L., Cuypers H., Burchhardt G., Herrmann H.: Carbon Catabolite Repression of Phenol Degradation in *Pseudomonas putida* Is Mediated by the Inhibition of the Activator Protein PhlR. *J. Bacteriol.* **178**, 2030–2036 (1996)
- Nakamura K., Ishida H., Iizumi T.: Constitutive Trichloroethylene Degradation Led by tac Promotor Chromosomal Integrated Upstream of Phenol Hydroxylase Genes of *Ralstonia* sp. KN1 and Its Nucleotide Sequence Analysis. *J. Biosci. Bioengineering*, **89**, 47–54 (2002)
- Ng L., Ch., Shingler V., Sze Ch.Ch., Poh Ch.L.: Cloning and sequences of the first eight genes of the chromosomally encoded (methyl)phenol degradation pathway from *Pseudomonas putida* P35X. *Gene*, **151**, 29–36 (1994)
- Nordlund I., Powlowski J., Shingler V.: Complete Nucleotide Sequence and Polypeptide Analysis of Multicomponent Phenol Hydroxylase from *Pseudomonas* sp. Strain CF600. *J. Bacteriol.* **172**, 6826–6833 (1990)
- Parsek M.R., Shinabarger D.L., Rothmel R.K., Chakraborty A.M.: Roles CatR and cis,cis-Muconate in Activation of the catBC Operon, Which Is Involved in Benzoate Degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **174**, 7798–7806 (1992)
- Peters M., Tomikas A., Nurk A.: Organization of the horizontally transferred pheBA operon and its adjacent genes in the genomes of eight indigenous *Pseudomonads* strains. *Plasmid*, **52**, 230–236 (2004)
- Prpich G.P., Daugulis A.J.: Enhanced biodegradation of phenol by a microbial consortium in a solid-liquid two phase partitioning bioreactor. *Biodegradation*, **16**, 329–339 (2005)
- Rothmel R.K., Aldrich T.L., Houghton J.E., Coco W.M., Ornston L.N., Chakraborty A.M.: Nucleotide Sequencing and Characterization of *Pseudomonas putida* catR: a Positive Regulator of the catBC Operon Is a Member of the LysR family. *J. Bacteriol.* **172**, 922–931 (1990)

30. Schirmer F., Ehrt S., Hillen W.: Expression, Inducer Spectrum, Domain Structure, and Function of MopR, the Regulator of Phenol Degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *J. Bacteriol.* **179**, 1329–1336 (1997)
31. Shingler V., Moore T.: Sensing of Aromatic Compounds by the DmpR Transcriptional Activator of Phenol-Catabolizing *Pseudomonas* sp. Strain CF600. *J. Bacteriol.* **176**, 1555–1560 (1994)
32. Takeo M., Maeda Y., Okada H., Miyama K., Mori K., Ike M., Fujita M.: Molecular Cloning and Sequencing of the Phenol Hydroxylase Gene from *Pseudomonas putida* BH. *J. Ferment. Bioengineering*, **79**, 485–488 (1995)
33. Teramoto M., Ohnishi K., Harayama S., Watanabe K.: An AraC/XylS Family Member at a High Level in a Hierarchy of Regulators for Phenol-Metabolizing Enzymes in *Comamonas testosteroni* R5. *J. Bacteriol.* **184**, 3941–3946 (2002)
34. Teramoto M., Harayama S., Watanabe K.: PhcS Represses Gratuitous Expression of Phenol-Metabolizing Enzyme In *Comamonas testosteroni* R5. *J. Bacteriol.* **183**, 4227–4234 (2001)
35. Tropel D., van der Meer J.R.: Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 474–500 (2004)
36. Tsai S-Ch., Tsai L-D., Li J-K.: An Isolated *Candida albicans* TL3 Capable of degrading Phenol at Large Concentration. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 2358–2367 (2005)
37. Watanabe K.: Linking Genetics, Physiology and Ecology: an Interdisciplinary Approach for Advancing Bioremediation. *J. Biosci. Bioengineering*, **94**, 557–562 (2002)
38. Wise A. A., Kuske Ch. R.: Generation of Novel Bacterial Regulatory Proteins That Detect Priority Pollutant Phenols. *Appl. Environment. Microbiol.* **66**, 163–169 (2000)
39. Zhang H., Luo H., Kamagata Y.: Characterization of the Phenol Hydroxylase from *Burkholderia kururiensis* KP23 Involved in Trichloroethylene Degradation by Gene Cloning and Disruption. *Microbes Environment*, **18**, 167–173 (2003)
40. Zhang X., Gao P., Chao Q., Wang L., Senior E., Zhao L.: Microdiversity of phenol hydroxylase genes among phenol-degrading isolates of *Alcaligenes* sp. from an activated sludge system. *FEMS Microbiol. Letters*, **237**, 369–375 (2004)