

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Laimonas Karvelis

KARBOKSIPIRIDINŲ DEGRADACIJOS BAKTERIJOSE TYRIMAS

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius 2012

Disertacija rengta 2006–2011 metais Vilniaus universiteto Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje.

Mokslinis vadovas:

Dr. Rolandas Meškys

(Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija 04 P)

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	6
ĮVADAS.....	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	10
1.1. PIRIDINO JUNGINIŲ SAVYBĖS.....	10
1.2. HIDROKSIPIRIDINŲ TRANSFORMACIJA.....	11
1.3. ALKILPIRIDINŲ TRANSFORMACIJA.....	20
1.4. KARBOKSILINTŲ PIRIDINŲ TRANSFORMACIJA.....	21
1.4.1. Pikolino rūgštis.....	21
1.4.2. Izonikotino rūgštis.....	25
1.4.3. Nikotinas.....	27
1.4.4. Nikotino rūgštis.....	34
1.5. DIKARBOKSILINTŲ PIRIDINŲ TRANSFORMACIJA.....	49
1.6. PIRIDOKSINO TRANSFORMACIJA.....	51
1.7. N-HETEROCIKLINIŲ JUNGINIŲ SKAIDYME DALYVAUJANTYS FERMENTAI.....	54
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI.....	58
2.1. REAGENTAI	58
2.2. BAKTERIJŲ KAMIENAI	59
2.3. PRADMENYS	59
2.4. TERPĖS IR AUGINIMO SĄLYGOS	60
2.5. TYRIMO METODAI.....	61
2.5.1. Chromosominės DNR skyrimas.....	61
2.5.2. Plazmidžių skyrimas šarminės denatūracijos metodu.....	62
2.5.3. DNR veikimas restrikcijos endonukleazėmis ir analizė.....	62
2.5.4. DNR elektroforezė agarozės gelyje.....	62
2.5.5. 16S rDNR polimerazės grandininė reakcija.....	63
2.5.6. DNR polimerazės grandininė reakcija.....	63
2.5.7. DNR fragmento skyrimas iš agarozinio gelio.....	63
2.5.8. DNR ligavimas.....	64
2.5.9. Kompetentinių E. coli ląstelių ruošimas ir klonavimas.....	64
2.5.10. Rekombinantinių baltymų indukcija E. coli ląstelėse.....	65
2.5.11. Genų bibliotekos kūrimas ir atranka.....	65
2.5.12. Nukleotidų sekos nustatymas.....	65
2.6. <i>De novo</i> peptidų sekos nustatymas.....	66
2.7. Baltymo erdvinės struktūros modeliavimas ir analizavimas....	67
2.8. Bakterijų atranka.....	67
2.9. Beląstelinio ekstrakto paruošimas.....	68
2.10. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje.....	68
2.11. Fermentų aktyvumo nustatymas.....	68
2.11.1. 5-Hidroksipikolinato 2-monooksigenazės aktyvumo nustatymas.....	68
2.11.2. Nikotinato 6-hidroksilazės aktyvumo nustatymas.....	69
2.11.3. 6-Hidroksinikotinato 3-monooksigenazės aktyvumo nustatymas.....	69

2.11.4.	Pikolinato 6-hidroksilazės aktyvumo nustatymas.....	69
2.11.5.	2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės aktyvumo nustatymas.....	70
2.11.6.	Deaminazių aktyvumo nustatymas.....	70
2.11.7.	Nuo NADH priklausomų reduktazių fermentinio aktyvumo nustatymas po baltymų elektroforezės.....	70
2.12.	Fermentų gryninimas.....	71
2.12.1.	Nikotino rūgšties 6-hidroksilazės iš <i>Sinorhizobium</i> sp. L-1 gryninimas.....	71
2.12.2.	2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės iš <i>Sinorhizobium</i> sp. L-1 gryninimas.....	72
2.12.3.	Pikolino rūgšties 6-hidroksilazės iš <i>Achromobacter</i> sp. JS18 gryninimas.....	73
2.12.4.	Nikotino rūgšties 6-hidroksilazės iš <i>Achromobacter</i> sp. JS18 kamieno gryninimas.....	74
2.12.5.	2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės iš <i>Achromobacter</i> sp. JS18 gryninimas.....	76
2.12.6.	5-Hidroksipikolinato 2-monooksigenazės iš <i>Pusillimonas</i> sp. 5HP gryninimas.....	77
2.13.	Baltymų molekulinės masės nustatymas gel-filtraciniu metodu.....	77
2.14.	Įvairių substratų skaidymas intaktinėse ląstelėse.....	78
2.14.1.	<i>Achromobacter</i> sp. JS18 intaktinėse ląstelėse.....	78
2.14.2.	<i>Pusillimonas</i> sp. 5HP intaktinėse ląstelėse.....	78
2.15.	Kiti metodai.....	78
3.	REZULTATAI IR IR JŲ APTARIMAS.....	79
3.1.	<i>Achromobacter</i> sp. JS18 tyrimas.....	80
3.1.1.	Piridinkarboksirūgščių biokonversija intaktinėmis <i>Achromobacter</i> sp. JS18 ląstelėmis.....	80
3.1.2.	Nikotinato dehidrogenazės iš <i>Achromobacter</i> sp. JS18 gryninimas ir tyrimas.....	87
3.1.3.	Pikolinato dehidrogenazės iš <i>Achromobacter</i> sp. JS18 gryninimas ir tyrimas.....	90
3.1.4.	2,5-Dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazės iš <i>Achromobacter</i> sp. JS18 gryninimas ir tyrimas.....	92
3.2.	<i>Pusillimonas</i> sp. 5HP tyrimas.....	95
3.2.1.	5-Hidroksipikolino rūgštį skaidančių bakterijų atranka..	95
3.2.2.	<i>Pusillimonas</i> sp. 5HP substratinis specifiškumas katabolizmo tyrimas intaktinėse ląstelėse.....	97
3.2.3.	<i>Pusillimonas</i> sp. 5HP ląstelėse indukuojamų baltymų tyrimas.....	102
3.2.4.	5-Hidroksipikolinato 2-monooksigenazės iš <i>Pusillimonas</i> sp. 5HP gryninimas ir tyrimas.....	103

3.3.	<i>Sinorhizobium</i> sp. L1 tyrimas.....	105
3.3.1.	<i>Sinorhizobium</i> sp. L1 substratinis specifiškumas.....	105
3.3.2.	β -pakeistų piridino junginių katabolizmo tyrimas ir katabolizme dalyvaujantys fermentai.....	106
3.3.3.	3.3.3. Nikotinato dehidrogenazės iš <i>Sinorhizobium</i> sp. L1 gryninimas ir tyrimas.....	108
3.3.4.	2,5-Dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazės iš <i>Sinorhizobium</i> sp. L1 gryninimas ir tyrimas.....	112
3.3.5.	2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės geno iš <i>Sinorhizobium</i> sp. L1 klonavimas ir analizė.....	116
3.3.6.	Rekombinantinės 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės iš <i>Sinorhizobium</i> sp. L1 raiška <i>E. coli</i> ląstelėse.....	123
4.	REZULTATŲ APIBENDRINIMAS.....	124
5.	IŠVADOS.....	128
6.	PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA.....	129
7.	PADĖKA.....	130
8.	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	131

SANTRUMPŲ IR TRIVIALIŲJŲ PAVADINIMŲ SĄRAŠAS

<i>asr</i>	atviras skaitymo rėmelis (genas)
<i>cyt c</i>	citochromas <i>c</i>
DCPIP	2,6-dichlorofenolindofenolis
DDT	ditiotreitolis
Dipikolino rūgštis	piridino-2,6-dikarboksilinė rūgštis
EDTA	<i>N, N', N'', N'''</i> -etilendiamintetraacto rūgštis
FAD	flavino adenino dinukleotidas
FMN	flavino adenino nukleotidas
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktozidas
Izonikotino rūgštis	piridino-4-karboksilinė rūgštis
MOPS	3-(<i>N</i> -morfolino)propansulfoninė rūgštis
MS	masių spektrometrija
NAD ⁺	nikotinamido adenindinukleotidas
NADH	redukuotas nikotinamido adenindinukleotidas
NADP ⁺	nikotinamido adenindinukleotido fosfatas
NADPH	redukuotas nikotinamido adenindinukleotido fosfatas
NBT	nitrot blue tetrazolio mėlis
Nikotino rūgštis	piridino-3-karboksilinė rūgštis
Pikolino rūgštis	piridino-2-karboksilinė rūgštis
PMS	fenazino metosulfatas
SDS	natrio dodecylsulfatasdodecilsulfatas
Tris	tris-(hidroksimetil)-aminometanas
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozidas

ĮVADAS

Visus atsinaujinančius anglies šaltinius galima suskirstyti į tris dideles grupes. Apie 75% visos masės tenka angliavandeniams, 20% ligninui ir tik 5% baltymams, nukleorūgštims, lipidams, terpenoidams ir alkaloidams. Apie 2/3 visų žinomų organinių junginių sudaro heterocikliniai junginiai. *N*-heterocikliniai junginiai yra plačiai paplitę gamtoje ir dalyvauja svarbiuose biologiniuose procesuose – atlieka elektronų-protonų pernešiklių funkciją, įeina į nukleotidų ar didžiaenergių junginių struktūrą. *N*-heterociklinė struktūra taip pat būdinga porfirinams, alkaloidams, kai kuriems toksinams ar įeina į kai kurių antibiotikų sudėtį.

Šalia biosferai įprastų *N*-heterociklinių junginių, atsiranda naujų junginių, kurie patenka į aplinką kartu su akmens anglies ir naftos perdirbimo produktais, pramonės atliekomis, dažais, pesticidais ir kt. Dėl savo stabilumo heterocikliniai junginiai kelia ilgalaikę ir rimtą grėsmę aplinkos ekologiškai pusiausvyrai. Dėl šių savybių *N*-heterocikliniai junginiai yra laikomi vienu iš pavojingiausių aplinkos teršalų. Didelė dalis heterociklinių junginių, anksčiau nebuvo sutinkamos natūraliame anglies ir azoto cikluose, todėl šios medžiagos yra vadinamos ksenobiotikais, t.y. medžiagomis nedalyvaujančiomis gamtinėje medžiagų apykaitoje.

Žinoma, kad užterštose vietose ilgos adaptacijos pasėkoje nuolat atsiranda mikroorganizmų galinčių įsisavinti ksenobiotikus kaip vienintelius anglies, azoto ir energijos šaltinius. Tokiu būdu aplinka apsivalo nuo teršalų. Ksenobiotikų degradacija yra aktuali „žaliajai chemijai“, nes *N*-heterociklinių junginių transformacijos metu dažnai susidaro vertingi junginiai. Šias reakcijas katalizuojantys fermentai taip pat gali būti panaudoti organinių junginių sintezėje.

Nepaisant plataus *N*-heterociklinių junginių paplitimo gamtoje, piridino ir jo junginių degradacija yra nepakankamai iširta. Naujų fermentų, skaidymo kelių taip pat katabolinių genų aptikimas pagilintų mūsų žinias ir supratimą apie mikroorganizmų biocheminę ir genetinę įvairovę. Naujų bakterinių

kamienų ir fermentų, dalyvaujančių biodegradacijos procesuose, suradimas gali atverti naujas galimybes vertingų organinių medžiagų sintezėje.

Šio darbo tikslas ištirti bakterijas skaidančias monokarboksipiridino rūgštis.

Darbo uždaviniai:

1. Išskirti ir identifikuoti naujus mikroorganizmus, skaidančius monokarboksipiridino rūgštis.
2. Nustatyti fermentus dalyvaujančius monokarboksipiridino rūgščių biodegradacijoje.
3. Nustatyti monokarboksipiridino rūgščių biodegradaciją koduojančius genus.

Mokslinis naujumas:

Šio darbo metu pirmą kartą buvo išskirtas bakterinis kamienas 5HP galintis skaidyti 5-hidroksipikolino rūgštį. Šio kamieno genetinė analizė parodė, kad tai *Pusillimonas* genties atstovas. Tokiu būdu pirmą kartą parodyta, kad *Pusillimonas* genties bakterijos gali dalyvauti *N*-heterociklinių junginių skaidyme. Nustatyta, kad *Pusillimonas* sp. 5HP ląstelėse indukuojami trys skirtingi piridino junginių metaboliniai keliai: 3-hidroksipiridino bei 5-hidroksipikolino ir nikotino rūgšties (skaidant 3-cianopiridiną ir/ar nikotino rūgštį). Visi šie metaboliniai keliai turi bendrą metabolitą – 2,5-dihidroksipiridiną. Pirmą kartą atrastas, dalinai išgrynintas ir charakterizuotas fermentas, katalizuojantis 5-hidroksipikolinato oksidacinį dekarboksilinimą.

Nustatyta, kad *Arthrobacter* sp. JS18 bakterijose yra indukuojami trys skirtingi piridino karboksirūgščių (pikolino, nikotino ir dipikolino) metabolizmo keliai. Identifikuota ir dalinai išgryninta pikolinato dehidrogenazė, pasižyminti naujomis katalizinėmis savybėmis. Pasiūlytas pikolino rūgšties skaidymo kelias *Arthrobacter* sp. JS18 bakterijose.

Išskirta *Sinorhizobium* sp. L1 bakterija, gebanti skaidyti 3-hidroksipiridiną ir nikotinatą. Parodyta, kad šių junginių metabolizmo keliai yra indukuojami, susidarant bendram metabolitui – 2,5-dihidroksipiridinui,

kuris yra oksiduojamas skirtingomis dioksigenazės izoformomis, priklausomai nuo metabolizmo kelio.

Nustatytos 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės iš *Achromobacter* sp. JS18 ir *Sinorhizobium* sp. L1 bakterijų amino rūgščių sekos. Iš *Sinorhizobium* sp. L1 bakterijų klonuota genų sanakaupa, koduojanti 2,5-dihidroksipiridino skaidymo kelią.

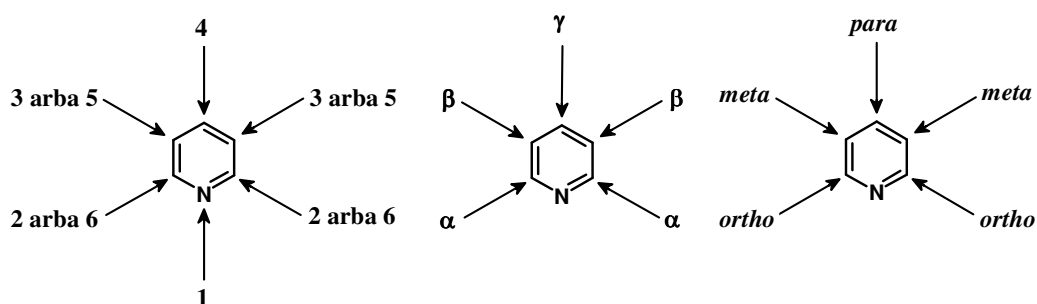
Ginamieji disertacijos teiginiai:

- *Achromobacter* sp. JS18 kamienas skaido piridin-2-karboksilinę, piridin-3-karboksilinę ir piridin-2,6-dikarboksilinę rūgštis.
- *Pusillimonas* sp. 5HP bakterijose indukuojami trys skirtingi piridino junginių skaidymo keliai.
- *Pusillimonas* sp. 5HP bakterijose 5-hidroksipiridin-2-karboksilinė rūgštis indukuoja 5-hidroksipiridin-2-karboksilinės rūgšties dehidrogenazės sintezę.
- *Sinorhizobium* sp. L1 bakterijose indukuojamos dvi skirtingos 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. PIRIDINO JUNGINIŲ SAVYBĖS

Piridinas – tai šešianaris heteroaromatinis junginys, kurio vienas iš anglies atomų yra pakeistas azotu. Jis lengvai reaguoja su rūgštimis, sudarydamas stabilias ketvirtines druskas. Dėl cikle esančio heteroatomo, kuris inaktyvuoja žiedą, ir rūgštinėje terpėje susidarančio piridino jono, piridinas sunkiai reaguoja su elektrofiliniais reagentais. Piridinui dalyvaujant elektrofilinio pakeitimo reakcijose, pakaitas yra kreipiamas į β padėtį. Pakaitai, priklausomai nuo jų prigimties, gali turėti aktyvuojantį ar inaktyvuojantį poveikį kito pakaito įvedimui į piridino žiedą. *Ortho*- ir *para*- orientuojantieji pakaitai, būdami α ar γ padėtyse, sąlygoja β elektrofilines atakas. Toks pakaitas, esantis piridino žiedo β padėtyje, naują pakaitą nukreipia į 2, silpniau į 4 ir 6 padėtis. Žymiai lengviau piridino žiedas dalyvauja nukleofilinio pakeitimo reakcijose. Taip yra todėl, kad elektrofilinio reagento prisijungimas α ar γ padėtyse leidžia krūviui pasiskirstyti azoto, o ne anglies atome. Laisvaradikalinės piridininių junginių reakcijos vyksta nukreipiant pakaitą daugiausia į α , rečiau – į β ir γ padėtis.



1.1 pav. Piridino atomų ir padėčių numeracijos.

Piridino karboksilinių rūgščių savybės tarpusavyje daugiau mažiau panašios: tirpumas, pK_a , lydymosi ir virimo temperatūros, bei cheminis reakingumas. Kai kurie junginiai pasižymi unikaliosiomis savybėmis: fluorescuoja ar suriša (chelatuoja) metalų jonus.

Piridino žiedą turinčių junginių biodegradacija tyrinėjama jau seniai, tačiau vis dar nėra tiksliai žinomi šių junginių skilimo mechanizmai. *N*-heterociklinių junginių biodegradacija gali vykti tiek aerobinėmis, tiek ir anaerobinėmis sąlygomis. Anaerobinio skaidymo metu *N*-heterociklinių junginių transformacija pradeda aromatinės sistemos redukcija. Aerobinis skaidymas dažniausiai pradamas hidroksilinimo reakcija, susidarant hidroksilintiems junginiams. Ir tik vėliau, skilus žiedui, susidaro alifatiniai *cis* konfigūracijos nesotieji junginiai, kurie yra redukuojami ar oksiduojami tolimesnių reakcijų metu (Kaiser ir kt., 1996). Alifatinų junginių prigimtis priklauso nuo piridino žiedo skilimo vietos. Lengviausiai piridino žiedas skyla tarp heteroatomo – C-2, C-2 – C-3 ir C-5 – C-6 anglies atomų. Piridino junginiai mikroorganizmų nėra vienodai lengvai skaidomi. Šių junginių biodegradacija lengviausiai vyksta tokia seka: piridinkarboksilinių rūgščių > piridino = monohidroksipiridinų > alkilpiridinų > aminopiridinų = halogenopiridinų (Fetzner, 1998).

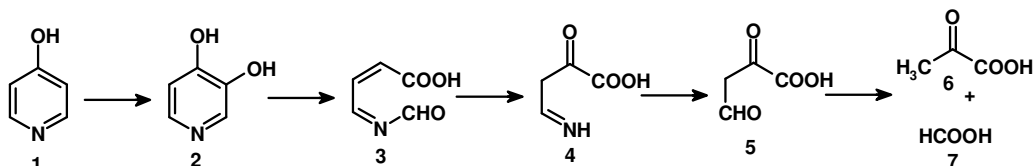
Piridinkarboksilinių rūgščių katabolizmas dažnai vyksta susidarant hidroksipiridinams, todėl pirmiausiai bus apžvelgta bakterinė hidroksipiridinų transformacija.

1.2. HIDROKSIPIRIDINŲ TRANSFORMACIJA

Tyrinėjant bipiridininių herbicidų, tokių kaip parakvato (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilio dichlorido) ir dikvato (1,1'-dietilen-2,2'-bipiridilio dibromido) bakterinį metabolizmą, buvo išskirti mikroorganizmai, utilizuojantys monohidroksilintus piridinus (Watson ir kt., 1974). Hidroksipiridinų transformacija prasideda nuo jų oksidacijos, susidarant di- ir/ar trihidroksipiridinams, ir tik po to vyksta heterociklo skilimas (Fetzner, 1998). Chemiškai aktyviausios oksidacijai yra hidroksilintų piridinų *ortho*- ir *para*-padėty. Tačiau pastebėta, kad tiek cheminės, tiek bakterinės oksidacijos metu pirmumas yra teikiamas *para*- padėčiai. Tokiu būdu 2- ir 3-hidroksipiridino

bakterinės oksidacijos produktas yra 2,5-dihidroksipiridinas, o 4-hidroksipiridino – 3,4-dihidroksipiridinas.

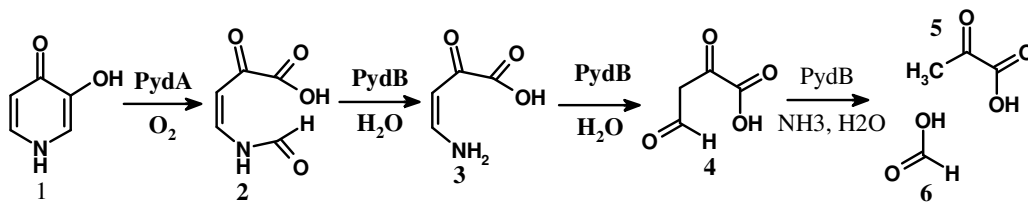
Detaliau žinomi du visiškai skirtingi hidroksipiridinų metabolizmo keliai. Pagal vieną iš jų yra transformuojamas 4-hidroksipiridinas (Watson ir kt., 1974). Pirmame etape 4-hidroksipiridinas yra hidroksilinamas į 3-ąją padėtį. Šią reakciją katalizuoja nuo NAD(P)H priklausoma 4-hidroksipiridino 3-hidroksilazė, išskirta iš *Agrobacterium* sp. 35S bakterijų. Fermentas yra tris kartus specifiškesnis NADH, nei NADPH. Fermentą gryninant amonio sulfatu buvo pastebėta, kad 4-hidroksipiridino 3-hidroksilazė netenka savo aktyvumo. Papildomai pridėtas FAD sąlygojo fermentinio aktyvumo atstatymą, tačiau FMN ar riboflavino poveikiui fermentas buvo inertiškas. Tokie sunkieji metalai kaip Cu ir Zn gana stipriai inhibuoja fermentą, bet jų slopinantis poveikis gali būti sumažintas EDTA ar GSH (Watson ir kt., 1974). 3,4-Dihidroksipiridino skilimą susidarant 3-formiminopiruvo ir skruzdžių rūgštims, katalizuoja 330 kDa dydžio dioksigenazė, išskirta iš to paties (*Agrobacterium* sp. 35S) kamieno. Fermento veikimui nereikia jokių papildomų kofaktorių, tik molekulinio deguonies. Tai ypač labili dioksigenazė, kuri beląsteliniame ekstrakto 4 °C temperatūroje jau po 3–4 val. visiškai netenka savo aktyvumo. Kitų fermentų, katalizuojančių šios dioksigenazės produkto 3-formiminopiruvo rūgšties deamininimą, susidarant 3-formilpiruvo rūgščiai, o vėliau ir suskaidymą iki skruzdžių ir piruvo rūgšties, paieška ir tyrimai atlikti nebuvo (1.2 pav.) (Watson ir kt., 1974).



1.2 pav. 4-Hidroksipiridino transformacija *Agrobacterium* sp. 35S ląstelėse. **1** – 4-hidroksipiridinas, **2** – 3,4-dihidroksipiridinas, **3** – 3-(N-formil)-formiminopiruvo rūgštis, **4** – 3-formiminopiruvo rūgštis, **5** – 3-formilpiruvo rūgštis, **6** – piruvo rūgštis, **7** – skruzdžių rūgštis.

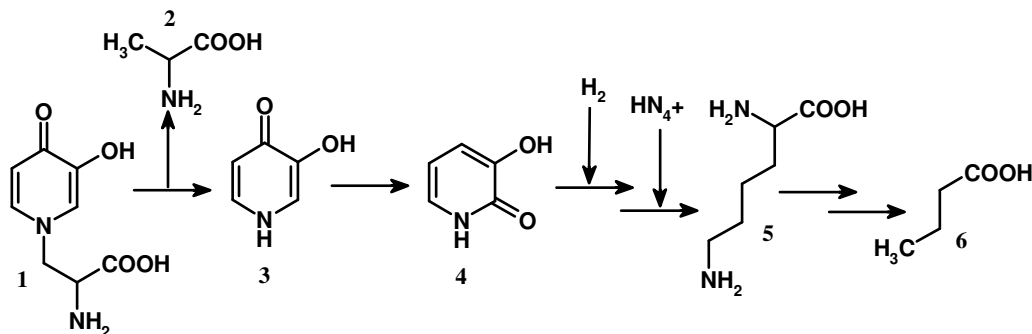
Žinių apie genus susijusius apie piridindiolių katabolizmą buvo gauta, tirinėjant mimozino degradaciją *Rhizobium* sp. TAL1145 kamieno (Borthakur

ir kt., 2003). Mimosinas – alkaloidas, produkuojamas *Leucaena leucocephala*, o gyvūnų ir bakterijų skaidomas penkiais būdais: 1) prijungiant prie β -D-gliukozės, 2) ir 3) skirtingais būdais oksiduojant alanino liekaną, susidarant mimosino rūgščiai, 4) ir 5) skirtingais būdais pašalinant alanino liekaną, susidarant 3,4-dihidroksipiridinui (Sethi ir kt., 1995). *Rhizobium* TAL1145 kamienas utilizuoja mimosiną (Mid^+) ir naudoją jį kaip vienintelį anglies ir azoto šaltinį (Borthakur ir kt., 2003). Įterpiant *Tn3Hogus*, *TnphoA* ir kanamicino atsparumo kasetę, buvo gauta dvylika TAL1145 mutantų su pažeista mimosino degradacija (Mid^-). 5,0 kb *PstI* fragmentas buvo klonuotas iš pUHR263 kosmidės, turinčios su mimosino degradacija susijusius *mid* genus. Šiame ir greta esančiame 0,9 kb *PstI* fragmentuose identifikuoti penki genai: *midA*, *midB*, *midC*, *midD*, ir *midR*, kurių pirmi trys koduoja mimosino ABC transporto baltymus, *midD* – aminotransferazę, reikalingą paversti mimosiną 3,4-dihidroksipiridinu, ir *midR* – reguliatorinis genas, koduojantis LysR-tipo transkripcijos aktyvatorių. *mid* genai yra specifiški *Rhizobium* Mid^+ kamienams, ir jų nėra kituose *Rhizobium*, *Sinorhizobium* ir *Bradyrhizobium* kamienuose (Borthakur ir kt., 2003). pUHR263 kosmidėje yra du struktūriniai genai: *pyrA* ir *pydB* koduojantys dioksigenazę ir hidroksilazę, dalyvaujančios 3,4-dihidroksipiridino skaldyme (1.3 pav). Trys genai: *pydC*, *pydD* ir *pydE* koduoja 3,4-dihidroksipiridino ABC transporto baltymus. Šie genai yra indukuojami 3,4-dihidroksipiridinu, nors *pyrA* ir *pydB* silpnai ekspresuojasi, nesant induktoriaus. *pyrA* ir *pydB* yra transkribuojami kartu, tuo tarpu *pydC*, *pydD* ir *pydE* transkribuojami nuo skirtingų promotorių. PydA ir PydB neturi homologų tarp *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, ir *Bradyrhizobium japonicum* dioksigenazių ir hidroksilazių (Awaya ir kt., 2005). *pydA* geno identifikavimas leido paneigti anksčiau egzistavusią nuomonę, kad 3,4-dihidroksipiridino dioksigenazės veikimui nėra reikalingi jokie papildomi kofaktoriai. PydA amino rūgščių analizė parodė esant geležies surišimo motyvui ir leido šį fermentą priskirti ekstradiolinių (nuo Fe(II) priklausomų) dioksigenazių grupei.



1.3 pav. Spėjama 3,4-dihidroksipiridino degradacijos schema *Rhizobium* sp. TAL1145 kamiene, sudaryta pagal *pyd* genų analizę. **1** – 3,4-dihidroksipiridinas, **2** – 3-(*N*-formil)-formiminopiruvo rūgštis, **3** – 3-formiminopiruvo rūgštis, **4** – 3-formilpiruvo rūgštis, **5** – piruvo rūgštis, **6** – skruzdžių rūgštis.

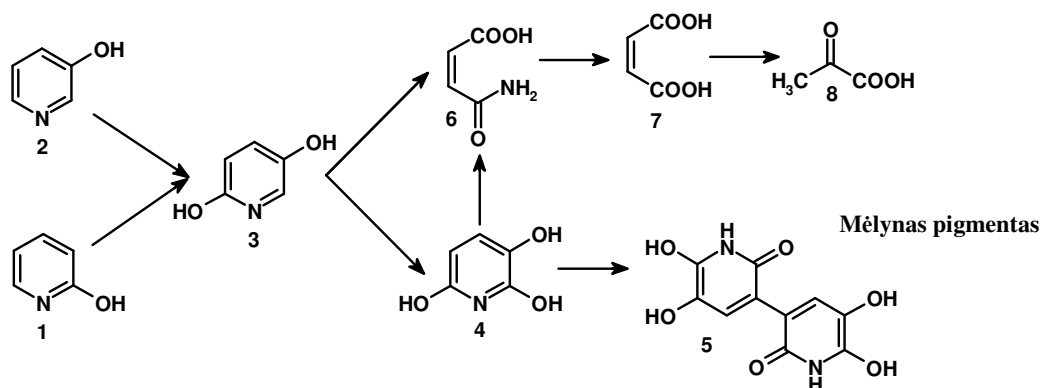
Anaerobinė mimosino degradacija aptikta *Synergistes jonesii* bakterijose (Rincon ir kt., 1998). Nustatyta, skaidant mimosiną vyksta 3,4-dihidroksipiridino izomerizacija, susidarant 2,3-dihidroksipiridinui (1.4 pav.). 3,4-Dihidroksipiridinas indukavo abiejų izomerų biokonversiją, o tuo tarpu 2,3-dihidroksipiridinas – tik 2,3-dihidroksiizomero biokonversiją. Fermentinis 2,3-dihidroksipiridino transformacijos aktyvumas buvo stebimas anaerobinėje aplinkoje, esant metilviologenui arba α -keto rūgštims, be to, specifinis aktyvumas padidėdavo, esant FAD ar KoA molekulėms (Rincon ir kt., 1998).



1.4 pav. Anaerobinė mimosino degradacijos schema *Synergistes jonesii* bakterijose. **1** – mimosinas, **2** – ananinas, **3** – 3,4-dihidroksipiridinas, **4** – 2,3-dihidroksipiridinas, **5** – ornitinas, **6** – propiono rūgštis.

2- ir 3-hidroksipiridinių bakterinė degradacija tyrinėjama jau gana seniai, tačiau kol kas nepavyko nustatyti jų pilnų transformacijos schemų individualiose mikroorganizmų kultūrose. Remiantis transformacijos produktais, aptiktais įvairiose mikroorganizmų grupėse, gebančiose skaidyti 2- ir/ar 3-hidroksipiridinus, sudaryta numanoma šių junginių biodegradacijos schema (1.5 pav.) (Kaiser ir kt., 1996). Nepavyko aptikti organizmų, kurie

galėtų hidroksilinti, susidarant ne 2,5-dihidroksipiridinui, tačiau yra žinoma, kad *Nocardia Z1* bakterijos, skaidančios piridiną, taip pat gali oksiduoti ir 3-hidroksipiridiną. Tokios oksidacijos produktai yra 2,3- ir 3,4-dihidroksipiridinai, tačiau toliau šie dioliai nėra toliau metabolizuojami (Houghton ir kt., 1972).



1.5 pav. 2- ir 3- hidroksipiridinų transformacija. **1** – 2-hidroksipiridinas, **2** – 3-hidroksipiridinas, **3** – 2,5-dihidroksipiridinas, **4** – 2,3,6-trihidroksipiridinas, **5** – 4,5,4',5'-tetrahydroksi-3,3'-diazadifenočinonas-(2,2'), **6** – maleamo rūgštis, **7** – maleino rūgštis, **8** – piruvo rūgštis.

Bacillus brevis bakterijos be 2-hidroksipiridino galėjo įsisavinti ir izonikotino rūgštį. Manoma, kad 2-hidroksipiridino transformacija vyksta susidarant 2,5-dihidroksipiridinui, nes auginant šias bakterijas terpėje su 2-hidroksipiridinu kultūriniam skystyje susidaro žalios spalvos pigmentas. Toks pat pigmentas susidaro 2,5-dihidroksipiridino autooksidacijos metu. Beląsteliniam ekstrakte, gautame užauginus šią bakterinę kultūrą terpėje su 2-hidroksipiridinu, buvo aptikti 2-hidroksipiridino oksigenazės, 2,5-dihidroksipiridino dioksinazės ir maleamo rūgšties deaminazės fermentiniai aktyvumai. Buvo nustatyta, kad visi šie fermentai yra indukuojami 2-hidroksipiridinu, nes ląstelėse, auginantose su gintaro rūgštimi, tokie fermentiniai aktyvumai nebuvo aptikti (Sharma ir kt., 1984).

Yra žinoma, kad hidroksilintų piridinų degradacijoje dalyvauja tiek monooksigenazės, tiek ir dioksinazės. Bakterijų savybė skaidyti 2-hidroksipiridiną ir sintetinti mėlynos spalvos pigmentą yra susijusi su monooksigenazės fermentiniu aktyvumu. Tiriant 2-hidroksipiridino

biodegradaciją įvairiuose *Arthrobacter* genties kamienuose (*A. crystallopoietes*, *A. pyridinolis*, *A. viridescens*) buvo užfiksuota fermentinė 2-hidroksipiridino oksidacija. Buvo nustatyta, kad reakcija vyksta, esant ekvivalentiniams substrato, NADH ir deguonies kiekiams, tačiau fermentas nebuvo išgrynintas, o apie jo savybes žinoma labai mažai. Nustatyta, kad fermentas yra stimuliuojamas FMN, bet ne FAD ar riboflavinu. Tačiau FMN funkcija liko neišaiškinta. Pagal katalizuojamą reakciją, t.y. hidroksilo grupės įvedimas prie C-5 atomo 2-hidroksipiridine, todėl fermentui buvo suteiktas pavadinimas ir numeris: 2-hidroksipiridino 5-monooksigenazė (Gupta ir kt., 1975). 2-Hidroksipiridino 5-monooksigenazės fermentinis aktyvumas buvo aptiktas kitų *Arthrobacter* sp. PY22 ir *Arthrobacter oxydans* PY21 kamienų, gebančių skaidyti 2-hidroksipiridiną, beląsteliniuose ekstraktuose (Semėnaitė, 2003). Šiuose beląsteliniuose ekstraktuose esančios 2-hidroksipiridino 5-monooksigenazės gryninimo metu buvo nustatyta, kad tai dvikomponentis fermentinis kompleksas, sudarytas iš FMN reduktazės ir galinės oksigenazės. Ši fermentinė sistema buvo išgryninta iš *Arthrobacter* sp. PY22 kamieno. Tikrasis oksigenazės kosubstratas yra FMNH₂, kurį tiekia nuo NADH priklausoma FMN reduktazė. Oksigenazės molekulinė masė – 58,2 ir 56,6 kDa, nustatyta skirtingais metodais, buvo labai panaši. FMN reduktazės molekulinė masė gauta lygi 32,2 kDa. Tiriant 2-hidroksipiridino 5-monooksigenazės biosintezės ypatybes *Arthrobacter* sp. PY22 kamieno, buvo nustatyta, kad tai 2-hidroksipiridinu indukuojamas baltymas. Tačiau nei viename iš aukščiau minėtų bakterinių kamienų 2,5-dihidroksipiridino oksigenazės, katalizuojančios 2,5-dihidroksipiridino transformavimą, aktyvumas užregistruotas nebuvo.

Iš dirvožemio išskirtos *Nocardia* sp. bakterijos galėjo vieninteliu anglies šaltiniu naudoti 2-hidroksipiridiną, piridino-*N*-oksidą ar piridiną (Shukla ir kt., 1986). Auginant ląsteles skystoje terpėje su šiais substratais, nebuvo aptikti jokie dihidroksipiridinai, tačiau auginimo terpėje esant 2-hidroksipiridinui ar piridino-*N*-oksidui visuomet susidarydavo mėlynos spalvos pigmentas. Šis pigmentas charakterizuotas kaip 4,5,4',5'-tetrahidroksi-3,3'-

diazadifenočinonas-(2,2'), kuris yra 2,3,6-trihidroksipiridino autooksidacijos produktas. Tai vienas iš įrodymų, kad šių junginių transformacija *Nocardia* sp. bakterijose vyksta susidarant di- ir trihidroksilintiems piridinams. Ląstelės, adaptuotos augti terpėje su 2-hidroksipiridinu ar piridino-N-oksidu, taip pat galėjo oksiduoti ir 2,5-dihidroksipiridiną. Tačiau 2,5-dihidroksipiridinas nebuvo skaidomas bakterijų, prieš tai augintų terpėje su piridinu (Shukla ir kt., 1986). Literatūroje yra duomenų, kad ne tik *Rhodococcus* ir *Nocardia*, bet ir *Arthrobacter* genčių bakterijos gali skaidyti 2-hidroksipiridiną susidarant mėlynos spalvos pigmentui. Tolimesniais transformacijos metabolitais buvo identifikuotos maleamo, maleino ir piruvo rūgštys (Kaiser ir kt., 1996).

Arthrobacter crystallopoietes bakterijoms įsisavinti 2-hidroksipiridiną, kaip vienintelį anglies šaltinį yra stebimas mėlynos spalvos pigmento susidarymas. Auginant šias bakterijas ant standžios terpės su 2-hidroksipiridinu, tarp pigmentą formuojančių (Pig⁺) kolonijų, atsiradavo ir pigmento neformuojančių (Pig⁻) kolonijų. Pig⁻ bakterijos neskaidė 2-hidroksipiridino. Pastarųjų atsiradimo dažnis yra 0,26% per generaciją. Pigmento neformavimo priežastis 63 MDa kriptinė plazmidė, kurioje išsidėstę su 2-hidroksipiridino biodegradacija susiję genai. Pig⁻ kolonijų skaičių galima padidinti paveikus mitomicinu C ar akridino oranžiniu, kurie stabdo plazmidinės DNR replikaciją. Tai dar kartą patvirtina, kad 2-hidroksipiridino metabolizmą lemiantys genai *A. crystallopoietes* ląstelėse yra išsidėstę plazmidėje. *A. pyridinolis* ir *A. viridescens* bakterijų genai, lemiantys 2-hidroksipiridino transformaciją, yra lokalizuoti chromosomoje nėra prarandami (Weinberger ir kt., 1978). Duomenų, kad hidroksipiridino metabolizmą lemiantys genai gali būti išsidėstę taip vadinamose, degradacinėse plazmidėse yra ir daugiau. *Arthrobacter* sp. PY21 kamieno bakterijos gali įsisavinti 2-hidroksipiridiną, formuodamos mėlynos spalvos pigmentą. Šiose bakterijose buvo aptikta didelė plazmidė, kurią pradėję klonai negalėjo skaidyti 2-hidroksipiridino. Paveikus bakterijas etidžio bromidu ir novobiocinu – plazmidės praradimas buvo atitinkamai 98 ir 85% (Bondareva ir kt., 2000).

Mėlynąjį pigmentą gali formuoti įvairios bakterijų gentys ir iš skirtingų pradinių medžiagų, jas oksiduojant iki 4,5,4',5'-tetrahidroksi-3,3'-diazadifenochinono-(2,2'). Šio pigmento susidarymas stebimas *Arthrobacter* sp. bakterijoms transformuojant nikotiną, *Bacillus* sp. – nikotino ir izonikotino rūgštis, *Rhodococcus opacus* – 2-hidroksipiridiną, *Arthrobacter crystallopoietes* – 2- ir 3-hidroksipiridinus. Šarminėje ir neutralioje aplinkoje pigmentas yra mėlynas, o rūgštinėje – raudonai rudas. Analogiško žalios spalvos pigmento, vėliau virstančio tamsiai rudu (sepija), yra stebimas terpėje kaupiantis 2,5-dihidroksipiridinui, kuris lengvai autooksiduojasi. Tokio pigmento susidarymas stebimas, auginant *Bacillus brevis* terpėje su 2-hidroksipiridinu (Sharma ir kt.; 1984), neidentifikuotas Gram-neigiamas (Khana ir kt, 1977) ir *Achromobacter* sp. 2L (Houghton., 1972) genties bakterijasbei *Pseudomonas putida* S16 kamieno *hpo* (2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės) geno delecijos mutantus, terpėje su nikotinu.

Iš dirvožemio išskirtos, bet neidentifikuotos Gram-neigiamos bakterijos skaidė 3-hidroksipiridiną formuodamos žalios spalvos pigmentą (λ_{\max} 660 nm) (Khana ir kt., 1977). Šios bakterijos galėjo oksiduoti 2,5-dihidroksipiridiną ir maleamo rūgštį, tačiau 2-, 4-hidroksipiridinas ar maleino rūgštis nebuvo skaidomi. 3-Hidroksipiridino metabolizmo inhibavimas arsenitu, leido beląsteliniame ekstrakte aptikti keto rūgštis. Pagrindinė rūgštis buvo piruvo, α -oksooglutarato rūgštis tebuvo pėdsakai. Ląstelių, augintų terpėje su 3-hidroksipiridinu, beląsteliniame ekstrakte buvo aptikti 2,5-dihidroksipiridino oksidazės ir maleamo rūgštis deaminazės aktyvumai. Šie aktyvumai nebuvo aptikti ląstelėse, augintose terpėje su gintaro rūgštimi (Khana ir kt., 1977).

Literatūroje yra duomenų apie dioksigenazes, dalyvaujančias hidroksipiridinių biodegradacijoje. Dažnai 2- ir 3-hidroksipiridinai yra oksiduojami, susidarant 2,5-dihidroksipiridinui. Tolimesnę reakciją katalizuoja dioksigenazė, kuri suskaldo heterociklą, susidarant maleamo rūgščiai – katabolizmas vyksta maleamo rūgštis keliu. Iš *Achromobacter* sp. G2 kamieno, skaidančio 2-hidroksipiridiną, ir *Achromobacter* sp. 2L – 3-hidroksipiridiną, dalinai išgrynintos skirtingos 2,5-dihidroksipiridino

dioksidogenazės (Cain ir kt., 1974). Abiejų fermentų iš G2 ir 2L bakterijų molekulinės masės yra labai panašios – atitinkamai 340 kDa ir 330 kDa. Nors dioksidogenazės beląsteliniam ekstrakto ilgą laiką išlikdavo stabilios, tačiau gryninimo eigoje greitai prarasdavo savo aktyvumą. Abiejų fermentų aktyvumui atstatyti buvo reikalingi Fe^{2+} jonai. Dioksidogenazę iš G2 kamieno taip pat stimuliuojančiai veikė ir ditiotreitolis, o fermento iš 2L kamieno aktyviam veikimui papildomai buvo reikalingas L-cisteinas. Tačiau nei ditiotreitolis, nei dimerkaptopropanolis, nei merkaptopoetanolis įtakos fermento stabilumui neturėjo (Cain ir kt., 1974).

Daugiau duomenų apie 2,5-dihidroksipiridino dioksidogenazę yra gauta tiriant *Pseudomonas putida* kamienus skaidančius nikotino rūgštį (Gauthier ir kt., 1971). Iš *P. putida* N-9 kamieno buvo išskirta dioksidogenazė kristalinėje formoje. Išgrynintas fermentas turi tik vienintelį sugerties maksimumą 280 nm spektro srityje. Išgryninto baltymo molekulinė masė yra 242 kDa. Taip pat nustatyta, kad fermentas sudarytas iš 6-ių subvienetų, po 39,5 kDa, tačiau duomenų apie subvienetų identiškumą nėra. Šios dioksidogenazės specifinis aktyvumas yra 38,3 U/mg baltymo. Kaip ir daugelio dioksidogenazių, jos kofaktoriumi yra kintamo valentingumo metalų jonai – Fe^{2+} jonai. Ši dioksidogenazė yra labai labili – jau po 48 val. 0 °C temperatūroje ji visiškai praranda katalizinį aktyvumą. Fermentą stabilizuojančiai ir stimuliuojančiai veikia ditiotreitolis. Šią dioksidogenazę inhibavo tik chelatoriai ir oksidatoriai (Gauthier ir kt., 1971). Iš *P. putida* KT2440 kamieno išskirta 2,5-dihidroksipiridino dioksidogenazė poliakrilamidiniame gelyje migruoja kaip 39 kDa dydžio baltymas, kuris yra koduojama *nicX* geno (Jimenez ir kt., 2008). Gel-filtracinė ir rentgeno struktūrinė analizė patvirtino, kad natyvus fermentas yra heksamerinės struktūros. Be to nustatytos K_M ir V_{max} vertės, kurios atitinkamai yra 70 μM ir 2,3 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Analizuojant fermentą indukuotos plazmos emisijos spektroskopija nustatyta, kad geležies jonų ir baltymo monomero molių santykis yra artimas 1 (Jimenez ir kt., 2008). Rekombinantinė 2,5-dihidroksipiridino dioksidogenazė iš *P. putida* S16 bakterijų skiriasi nuo aukščiau minėtų ne tik amino rūgščių seka (tik 43% identiškų a.r.

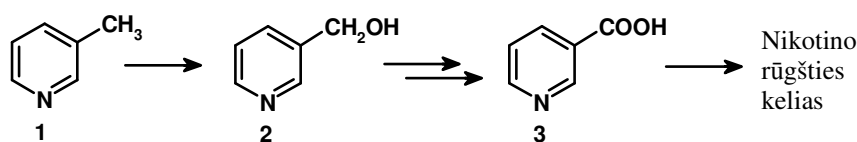
lyginant su KT2440 kamieniu), bet ir fermento savybėmis. Šio fermento K_M yra tik $0,168 \mu\text{M}$, V_{max} $7,0 \mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ir k_{cat} $11,0 \text{s}^{-1}$. Esminis šio fermento skirtumas nuo anksčiau minėtųjų yra pH optimumas. Dioksidogenazei iš S16 kamieno jis yra 6,5, tuo tarpu iš N-9 ir KT2440 kamienų – apie 8 (Tang ir kt., 2012).

Hidroksilinti piridino junginiai susidaro ne tik piridino junginių degradacijos metu. Mikroorganizmams oksiduojant piridiną (Korosteleva ir kt., 1981; Zefirov ir kt., 1994), alkilpiridinus (Lee ir kt., 2006), piridinkarboksilines rūgštis ar skaidant chinolino darinius. *Pseudomonas putida* K1 kamieniui, skaidant 4-metilchinoliną, susidaro 2,6-dihidroksi-4-metilpiridin-3-propenoinė rūgštis. *Comamonas testosteroni* 63 kamieniui, skaidant chinoliną ir 3-metilchinoliną, susidaro trihidroksipiridinas (Fetzner ir kt., 1998), o *Aerococcus* sp. skaidant kinureno rūgštį, susidaro 5- β -(karboksietil)-4,6-dihidroksipikolino rūgštis (Kaiser ir kt., 1996). Gan plačiai yra paplitę *N*-hidroksi-piridoniniai antibiotikai. Grybai sintetina kordipiridonų, tenelinų grupės antibiotikus. Įdomiausia yra tenelinų biosintezė: piridino žiedas yra gaunamas iš pirola. Citochromui P450 oksiduojant aciltetramo rūgštį vyksta persigrupavimas, susidarant 3-acil-4-hidroksipiridonui (Halo ir kt., 2008). *Streptomyces achromogenes* sintetina antibiotiką rubradiriną, kuris sudarytas iš rubransarolo, 3-amino-4-hidroksi-7-metoksikumarino, D-rubranitrozės ir 3,4-dihidroksidipikolinato (Kim ir kt., 2008).

1.3. ALKILPIRIDINŲ TRANSFORMACIJA

Alkilintų piridinių biodegradacija yra būdinga bakterijoms, grybams ir mielėms. Šių junginių transformacija gali vykti trimis keliais: (1) heterociklo oksidacija, susidarant hidroksipiridinui arba piridino-N-oksidiui; (2) šoninės grandinės oksidacija, susidarant hidroksialkilpiridinui (1.6 pav.); (3) heterociklinio žiedo atidarymas (1.4 pav). Šiame skyriuje trumpai apžvelgsime tik šoninės grandinės oksidaciją susidarant piridino karboksilinei rūgščiai.

Pirmą kartą bakterijų gebėjimas oksiduoti 3-metilpiridino metilo grupę iki karboksilinės buvo pastebėtas *Nocardia*, *Candida*, *Mycobacterium* ir *Arthrobacter* genčių bakterijose (Parshikov ir kt., 1994). Išskirtas *Pseudomonas* sp. KM-3 kamienas, gebantis transformuoti 3-metilpiridiną į 3-hidroksimetilpiridiną, oksiduojant alkilo grupę. Kaip tolimesnis metabolitas buvo aptiktas ir 3-karboksipiridinas (Korosteleva ir kt., 1981) (1.6 pav.). Tačiau priešingai nei *Pseudomonas fluorescens* bakterijų vykdomoje 3-karboksipiridino transformacijoje, tarp metabolitų nebuvo surasta nei 2,5-dihidroksipiridino, nei maleamo rūgšties.



1.6 pav. 3-Metilpiridino transformacija *Pseudomonas* sp. KM-3 ląstelėse. **1** – 3-metilpiridinas, **2** – 3-hidroksimetilpiridinas, **3** – nikotino rūgštis.

Tiriant *Mycobacterium bovis* BCG kamieną, buvo gauti duomenys biogenetiškai susiejantys nikotino rūgštį ir 3-hidroksimetilpiridiną. Buvo stebimas tiek 3-hidroksimetilpiridino virstimas nikotinatų, tiek ir atvirkštinis virstimas (Gross ir kt., 1968).

1.4. KARBOKSILINTŲ PIRIDINŲ TRANSFORMACIJA

1.4.1. Pikolino rūgštis

Karboksipiridino rūgščių degradacija susijusi su hidroksipiridino degradacija tuo, kad dažnai susidaro tie patys tarpiniai metabolitai – di-, trihidroksipiridiniai ar karboksilinti dihidroksipiridiniai. Piridino žiedas atidaromas, esant nemažiau kaip dviem hidroksi grupėms, papildomai gali būti ir karboksi grupė (Kaiser ir kt., 1996).

Iš pikolino rūgšties yra sintetinamas herbicidas pikloramas. Pikolino rūgštis ir jos amidas taip pat yra ir kito herbicido – dikvato fotolitinis produktas. Nors šie herbicidai yra gana dažnai naudojami žemės ūkyje, tačiau jų biodegradacija yra mažai tirta (Kaiser ir kt., 1996). Pikolino rūgšties dariniai yra gan plačiai paplitę gamtoje – *N*-metilpikolino rūgštis (horminas) yra augalų

hormonas. Iš Japonijos jūros nuosėdų išskirtų *Nocardia* sp. bakterijų augimo metu, terpėje susidarydavo 5-hidroksipikolino rūgštis (Makareva ir kt., 1989). Streptomicetai sintetina antibiotikus: 1) ciklinius peptidus, kurių sudėtyje yra 3-hidroksipikolino rūgštis, 2) ar į nukleotidus panašius, turinčius 5-hidroksipikolino rūgštį. Šie hidroksilinti junginiai susidaro ne iš alifatinių junginių, o iš pikolino rūgšties dehidrogenazių poveikyje. Pikolino rūgšties biosintezės pirmtakas yra *L*-lizinas ar α -aminoadipo rūgštis, iš kurių susidaro Δ 1-piperidein-2- ar 6-karboksilinė rūgštis (He, 2006). Pastarąją veikiant oksidaciniam fermentams, susidaro pikolino rūgštis. Dar vienas pikolino rūgšties biosintezės kelias buvo surastas ištyrus 2-aminofenolio skaidymą. *Pseudomonas* sp. AP-3 bakterijose. Oksiduojuant šį junginį susidaro 2-aminomukono rūgšties 6-pusiaualdehidas, kurio aldehido ir amino grupės spontaniškai reaguoja tarpusavyje, susidarant pikolino rūgščiai (Takenaka ir kt., 1998). Grybas *Pyricularia oryzae* gamina pikolino rūgštį, kuri yra augalų, pvz., ryžių, augimo slopiklis (Kessmann ir kt., 1994).

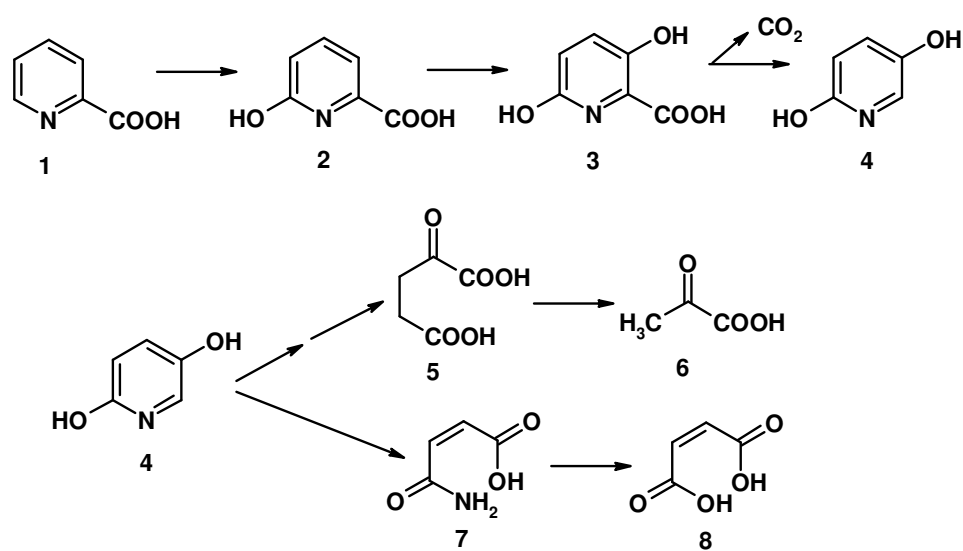
Literatūroje yra duomenų, kad pikolino rūgšties asimiliacijoje dalyvauja *Aerococcus*, *Rhodotorula*, *Arthrobacter* ir *Bacillus* genčių bakterijos (Ohsugi ir kt., 1981). Pikolino rūgšties degradacijoje dalyvauja ir *Arthrobacter picolinophilus* DSM20665 bakterijos (vėliau priskirtos *Rhodococcus erythropolis* bakterijų grupei) (Koch ir kt., 1995). Pastaraisiais metais atsirado duomenų, kad *Streptomyces* sp. Z2 bakterijos taip pat gali dalyvauti pikolinato degradacijoje (Zheng ir kt., 2009). Iki tol *Streptomyces* bakterijos buvo nurodomos tik kaip pikolinato producentės (antibiotikų biosintezėje).

Visais žinomais pikolino rūgšties degradacijos atvejais skaidymas prasideda hidroksilinimu į 6-ąją padėtį. Aptikus šios reakcijos fermentinį aktyvumą buvo pabandyta nustatyti fermento prigimtį. Tyrimai parodė, kad pikolinato dehidrogenazės aktyvumas bakterijose labai priklausė nuo molibdeno jonų, esančių augimo terpėje, bei volframato jonų, kurie specifiskai inhibuoja molibdeninius fermentus (Siegmond ir kt., 1990).

Buvo parodyta, kad neidentifikuotos Gram-neigiamos bakterijos gali deamininti pikolinamidą, o po to hidroksiliti susidariusią pikolino rūgštį 6-oje

padėtyje (Orpin ir kt., 1972). Hidroksilinantį fermentas išsėda į nuosėdas, esant 38 000 g. Hidroksilinimui reikalingas tik NAD^+ , o anaerobinėmis sąlygomis fermentas veikė, esant metileno mėliui. Flavina hidroksilinimo nestimuliuo (Orpin ir kt., 1972).

Bacillus sp. bakterijos pikolino rūgštį pradeda metabolizuoti taip pat hidroksilindamos C-6 atomą (Kaiser ir kt., 1996). Nustatyta, kad deguonis šiai reakcijai yra paimamas iš vandens. *Bacillus* sp. vykdomos pikolino rūgšties biodegradacijos tarpiniu metabolitu buvo nustatyta 3,6-dihidroksipikolino rūgštis ir 2,5-dihidroksipiridinas. Auginant šias bakterijas terpėje su pikolino rūgštimi ir papildomai esant inhibitoriui arsenitui, buvo išskirtos ketorūgštys – piruvo ir α -oksoglutaro (1.7 pav.).



1.7 pav. 2-Pikolino rūgšties transformacija. **1** – 2-pikolino rūgštis, **2** – 6-hidroksipikolino rūgštis, **3** – 3,6-dihidroksipikolino rūgštis, **4** – 2,5-dihidroksipiridinas, **5** – α -oksoglutaro rūgštis, **6** – piruvo rūgštis, **7** – maleamo rūgštis, **8** – maleino rūgštis.

Arthrobacter picolinophilus pikolino rūgštį oksiduoja susidarant 6-hidroksipikolino rūgščiai, tačiau tolimesnių metabolitų aptikti nepavyko tačiau bakterijose buvo aptiktas didelis kiekis du, penkis, šešis, septynis ir devynis anglies atomus turinčių dikarboksilių rūgščių. Manoma, kad iš šių ilgų grandines turinčių dikarboksilių rūgščių yra sintetinamas destiobiotinas, kuris

buvo identifikuotas kaip vienas iš metabolitų (Kaiser ir kt., 1996). Tiriant *Arthrobacter picolinophilus*, pavyko dalinai išgryninti pikolinato hidroksilazę (Tate ir kt., 1974). Tyrimai parodė, kad tai yra membraninis baltymas. Fermentą stabilizuojančiai veikė redukuojančios medžiagos (ditiotreitolis) ir sacharozė. Fermentas buvo stimuliuojamas Fe^{2+} jonais, o Mn^{2+} , Ca^{2+} ir Mg^{2+} įtakos neturėjo. Tuo tarpu Hg^{2+} , Cu^{2+} jonai inhibavo fermentą, Zn^{2+} ir Co^{2+} jonai silpnai. Taip pat fermentas pasirodė esąs jautrus chelatoriams. Nors flavino analogas chinakrinas, inhibavo fermentą, bet aktyvumas buvo atstatomas FMN. Pikolino rūgšties hidroksilazė veikė, esant dirbtiniams elektronų akceptoriams: metileno mėliui, DCPIP, neutraliam raudoniui ir citochromui *c*. Jokio aktyvumo nebuvo aptikta su nikotiniais nukleotidais. Be to, fermentas pasirodė esąs labai specifiškas pikolino rūgščiai, joks aktyvumas nebuvo stebimas su kitomis piridino rūgštimis, tarp jų chinolino ir 3-hidroksipikolino rūgštimis. Pikolinato hidroksilazės molekulinė masė nustatyta gel-filtraciniu metodu buvo 230 kDa (Tate ir kt., 1974). Šie duomenys iš esmės skiriasi nuo Orpin ir bendraautorių gautų duomenų apie pikolinato hidroksilazę (Orpin ir kt., 1972). Tai rodo, kad bakterijose tą pačią reakciją katalizuojantys fermentai gali būti skirtingos prigimties.

Hidroksilinti pikolino rūgšties metabolitai susidaro piridinodikarboksilinių rūgščių biodegradacijos metu. Pvz., *Alcaligenes* sp. UK21 bakterijos metabolizuoja chinolino rūgštį, ją hidroksilindamas 6-oje pozicijoje. Kitame degradacijos etape dalyvauja dekarboksilazė, kuri pašalina 3-ioje pozicijoje esančią karboksilo liekaną, susidarant 6-hidroksipikolino rūgščiai (Uchida ir kt., 2003). *m*-Ftalio rūgštį skaidantis CC9M kamienas galėjo skaidyti ir dipikolino rūgštį. Pagrindiniu metabolitu buvo identifikuota 2,3-dihidroksipikolino rūgštis. Tačiau šis junginys nėra stabilus ir esant šarminiam pH lengvai fotolizuojasi, susidarant 8-iems skirtingiems produktams, iš kurių 6 yra suvartojami CC9M kamieno bakterijų. (Amador ir kt., 1990). Manoma, kad 3-hidroksidipikolino rūgšties degradacija gali vykti dviem skirtingais keliais: atidarant žiedą, pagrindiniu metabolitu esant α -

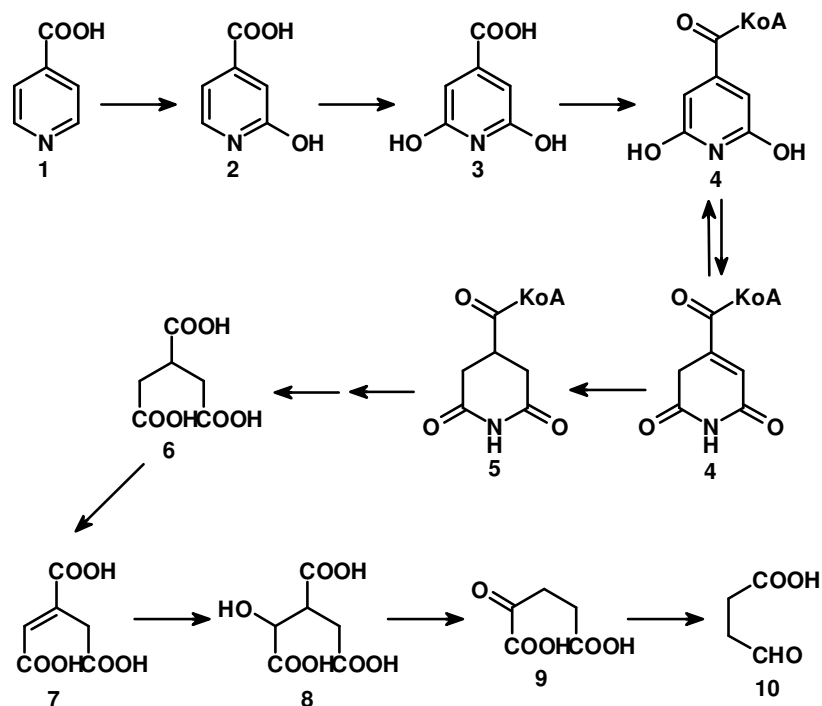
ketoglutaratui, arba susidarant 2,3-dihidroksipikolinatui, kuris yra dekarboksilinamas, susidarant 2,3-dihidroksipiridinui (Kaiser ir kt., 1996).

Į hidroksilintas piridino rūgštis negalima žiūrėti tiesmukiškai kaip į antrinius metabolizmo produktus. Nes šie junginiai gali būti katabolizmo galutiniai produktai – pirminiai degradacijos metabolitai. Pavyzdžiui, vienas iš pikolino rūgšties biosintezės kelių yra iš *L*-lizino, susidarant pipekolino rūgščiai, kuri vėliau yra oksiduojama. 3-Hidroksipikolino rūgštis sutinkama streptomicetų produkuojamuose cikliniuose peptidiniuose antibiotikuose. Nėra iširta kaip ir kada antibiotikų biosintezės metu susidaro ši rūgštis: oksiduojant pikolino rūgštį į 3-hidroksipikolino rūgštį ir vėliau prijungiant prie peptido ar prijungiant pikolino rūgštį prie peptido ir tik vėliau oksiduojant, taip kaip tai vyksta nikomicino X ir Z atvejais. Nikomicino atveju yra susintetinamas visas antibiotikas ir tik paskutiniosios stadijos metu pikolinoilo darinys yra hidroksilinamas 5-oje pozicijoje (Moon ir kt., 2010).

Natūralu, kad esant junginių producentams gali būti ir šių junginių skaidytojai. Tačiau kol kas nėra žinoma 3- ir 5-hidroksipikolino rūgšties įsisavinantys mikroorganizmai. Kol kas yra žinomas tik vienintelis pikolino rūgšties skaidymo kelias – hidroksilinant 6-oje pozicijoje.

1.4.2. Izonikotino rūgštis

Analogiškai pikolino rūgščiai yra metabolizuojama izonikotino rūgštis (4-karboksipiridinas). *Sarcina* sp. ir *Bacillus* sp. bakterijos šios rūgšties transformaciją pradeda heterociklo oksidacija, susidarant 2-hidroksiizonikotino rūgščiai, kuri vėliau verčiama 2,6-dihidroksiizonikotino rūgštimi (citrazinatu) (Kaiser ir kt., 1996). Manoma, kad kitų reakcijų metu heterociklas yra suardomas. Skilimo produktas nėra aptiktas, bet identifikuotas gintaro rūgšties pusiau aldehidas (1.10 pav.) (Gupta ir kt., 1979), tačiau jokio oksidacinio fermentinio aktyvumo nebuvo aptikta.



1.8 pav. Izonikotino rūgšties transformacija *Bacillus*, *Sarcina* ir *Mycrococcus* genčių bakterijose. **1** – izonikotinatas, **2** – 2-hidroksiisonikotinatas, **3** – 2,6-dihidroksiisonikotinatas (citrazinatas), **4** – citrazil-KoA, **5** – 2,6-dioksopiperidino-4-karboksil-KoA, **6** – propano-1,2,3-trikarboksilatas, **7** – izocitratas, **8** – *cis*-akonitatas, **9** – α -ketoglutaratas, **10** – gintaro rūgšties pusiau aldehydas.

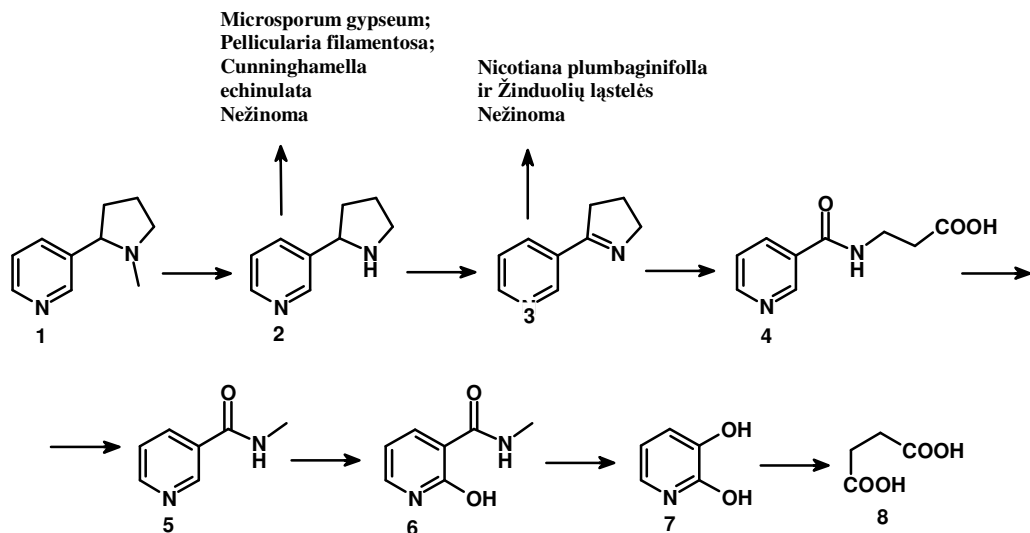
Tiriant izonikotinato degradaciją *Mycobacterium* sp. INA1 bakterijoje buvo nustatyta, kad citrazinatas yra prijungiamas prie kofermento A ir pilnai redukuojamas. Aptikti ne tik izonikotinato ir 2-hidroksiisonikotinato dehidrogenazių aktyvumai, bet ir citrazil-KoA sintetazės ir citrazil-KoA reduktazės aktyvumai (Kretzer ir kt., 1991). Iš šios bakterijos trimis gryninimo etapais izonikotinato dehidrogenazė buvo išgryninta iki homogeniškumo. Šio fermento molekulinė masė, nustatyta natyvioji gradientinės baltymų elektroforezės ir gel-filtraciniu metodais, yra 125 kDa ir 250 kDa, atitinkamai. Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis rodė tris baltymų juosteles: 83, 31 ir 19 kDa. Fermentiniame komplekse buvo identifikuotas molibdenas, geležis, labili rūgštinė siera ir FAD molekulė, santykiu 1:4:4:1 kiekvienam protomerui (125 kDa). Molibdeninis kofaktorius buvo identifikuotas kaip molibdopterino citozino dinukleotidas. Šis fermentas be

izonikotinato efektyviai (17% izonikotinato aktyvumo) oksiduoja chinolino-4-karboksirūgštį (Kretzer ir kt., 1993).

N-metilizonikotino rūgšties degradacija Gram-teigiamose 4Cl bakterijose vyksta hidroksilinant į antrąją padėtį ir po to demetilinant, susidarant 2-hidroksiizonikotino rūgščiai (Kost ir kt., 1978). Bet *Achromobacter* sp. D bakterijose, skaidymas vyksta visai kitu keliu nei izonikotinato. Naudojant intaktines ląsteles, buvo identifikuotos gintaro ir skruzdžių rūgštys bei metilaminas. Intaktinės ląstelės praktiškai nevaržo jokių hidroksilintų darinių, o *N*-metilizonikotinato suvaržymas suaktyvėdavo į reakcijos mišinį pridėjus NADH. Šie duomenys leido padaryti prielaidą, kad *N*-metilizonikotinas pirmiausia yra redukuojamas į *N*-metil-1,4-dihidroizonikotinatą ir tuomet atakuojamas oksigenazės bei suskaldomas iki alifatinių junginių (Wright ir kt., 1972), taip pat kaip ir vykstant piridino degradacijai.

1.4.3. Nikotinas

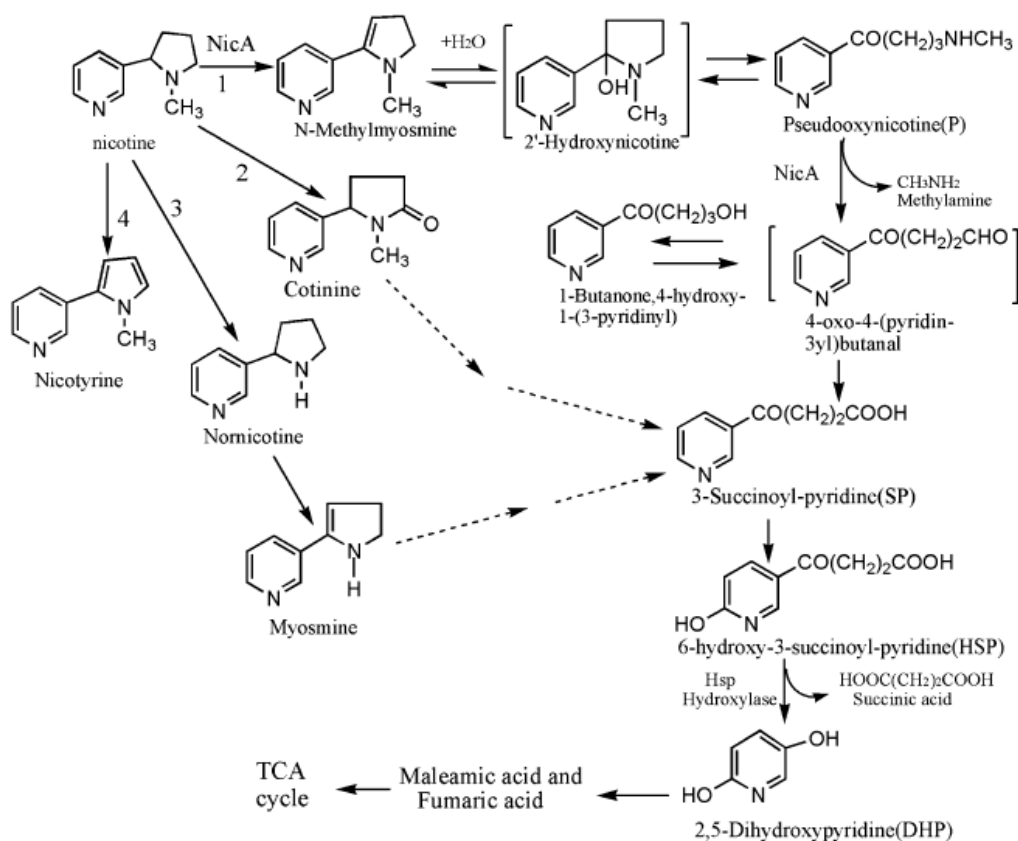
Nikotino ir nikotino rūgšties degradacija, kai kuriose bakterijų rūšyse yra susijusi ar vyksta panašiai. Yra aptikta bakterijų galinčių skaidyti abu šiuos junginius susidarant tam pačiam metabolitui – 2,5- ar 2,6-dihidroksipiridinui, 6-hidroksi-, 2,6-dihidroksinikotino rūgščiai, ar nikotino rūgšties analogams – 6-hidroksipseudooksinikotinui, 6-hidroksi-3-sukcinoilpiridinams ir 3-sukcinoilpiridinams (Kaiser ir kt., 1996). Nikotino degradacija yra neblogai ištirta – detaliam žinomi trys nikotino degradacijos keliai bakterijose, grybuose neseniai surastas visiškai naujas degradacijos kelias (1.9 pav.) nors kituose eukariotuose skaidymo kelias praktiškai nežinomas (Meng ir kt., 2010).



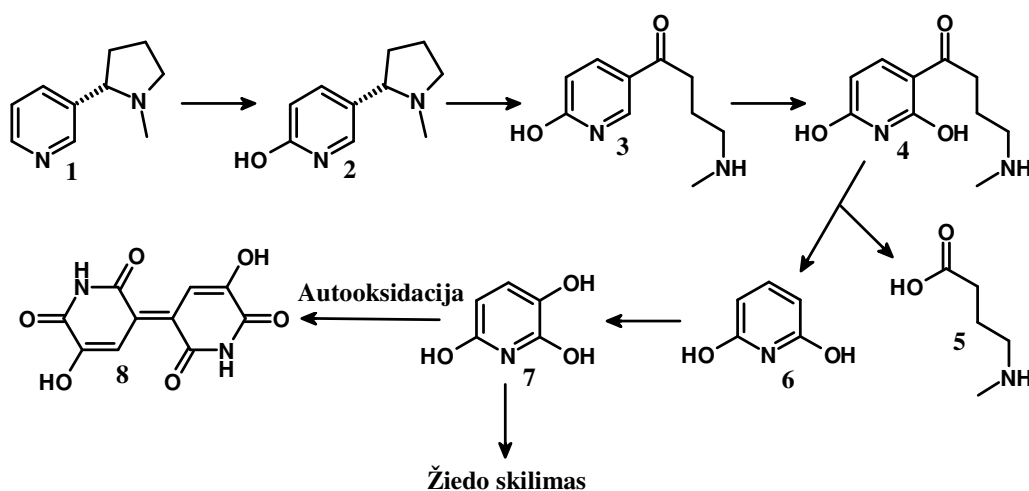
1.9 pav. Spėjamas nikotino transformacijos kelias *Aspergillus oryzae* 112822 kamiene. **1** – nikotinas, **2** – normnikotinas, **3** – miosminas, **4** – spėjamas tarpinis produktas, **5** – *N*-metilnikotinamidas, **6** – 2-hidroksi-*N*-metilnikotinamidas, **7** – 2,3-dihidroksipiridinas, **8** – gintaro rūgštis.

Nikotino degradacija bakterijose gali vykti dviem būdais: atakuojant pirolo arba piridino žiedą. Metabolizmas, kuriam būdinga pirolo žiedo ataka pirmojoje stadijoje, dažniausiai sutinkamas *Pseudomonas* genties bakterijose. Pirolo žiedas gali būti labai skirtingai atakuojamas, žinomi net keturi skaidymo keliai vien *Pseudomonas* genties bakterijose (1.10 pav.) (Li ir kt., 2010).

Kitas nikotino degradacijos kelias, kai pirmojoje stadijoje atakuojamas piridino žiedas, sutinkamas *Arthrobacter nicotinovorans*, *A. oxydans* ir *Pseudomonas* sp. P-34 ir JTS-0006 kamienuose. Piridino žiedas yra oksiduojamas 6-oje pozicijoje, susidarant 6-hidroksi-*L*-nikotinui, ir tik sekančių reakcijų metu yra atakuojamas ir atidaromas pirolo žiedas (1.11 pav.) (Brandsch, 2006).



1.10 pav. Spėjami L-nikotino transformacijos kelias *Pseudomonas* spp. bakterijose. 1-asis kelias randamas *Pseudomonas putida* S16; 2-asis ir 3-ias – *Pseudomonas* sp. Nic22 ir HF-1; 4-asis – *Pseudomonas* sp. HF-1. Pagal Li ir kt. (2010).



1.11 pav. L-nikotino transformacijos kelias *Arthrobacter nicotinovorans* DSM420 ir *Nocardioides* sp. JS614 bakterijose. **1** – L-nikotinas, **2** – 6-hidroksi-L-nikotinas, **3** – N-metilaminopropil-(6-hidroksipiridil-3)-ketonas, **4** – N-metilaminopropil-(2,6-dihidroksipiridil-3)-ketonas, **5** – γ -N-metilaminobutano rūgštis, **6** – 2,6-dihidroksipiridinas, **7** – 2,3,6-trihidroksipiridinas, **8** – „mėlynas pigmentas“. Pagal Baitsch ir kt. (2001).

Duomenys apie genus susijusius su nikotino degradacija bakterijose, pasirodė, kai iš Gram-teigiamų bakterijų, *Arthrobacter oxidans*, buvo išskirta 157,8 kb dydžio plazmidė, turinti L-nikotino degradacijos genus (Brandsch ir kt., 1984). Vėliau šie duomenys buvo patikslinti, tai – 165,139 kb katabolinė plazmidė, kurios apie 35% atviro skaitymo rėmelių vis dar yra nežinomos funkcijos ir apie 50% yra susiję su angliavandenių, amino rūgščių ir sarkozino, nikotino metabolizmu bei molibdeninio kofaktoriaus biosintezės (Igloi ir kt., 2003).

Nors L-nikotino metabolizmo kelias yra tas pats, o metabolizme dalyvaujančių fermentų molekulinės masės ir amino rūgščių sekos yra labai panašios, skirtingose bakterijose genai, susiję su šios medžiagos metabolizmu, gali būti lokalizuoti skirtingai. Pavyzdžiui, L-nikotino degradacijos genai *Arthrobacter nicotinovorans* DSM420 bakterijose yra lokalizuoti pAO1 megaplazmidėje, o *Nocardioides* sp. JS614 bakterijose – chromosomoje (Ganas ir kt., 2008).

L- ir D-nikotinas *Arthrobacter nicotinovorans* DSM420 bakterijose, yra skaidomi vienodai: susidarant 6-hidroksi-L- ar 6-hidroksi-D-nikotinui, kuriuos oksiduoja skirtingos oksidazės, susidarant tam pačiam metabolitui – 6-hidroksimetilmiosminui. Genai koduojantys abi 6-hidroksinikotino oksidazes yra lokalizuoti pAO1 megaplazmidėje. Galima būtų manyti, kad fermentai katalizuojantys stereoizomerų oksidaciją turėtų būti labai panašūs, tačiau taip nėra. Vienas iš skirtumų yra tai, kad molibdeno jonai yra svarbūs nikotino dehidrogenazės ir 6-hidroksi-L-nikotino oksidazės indukcijai, o 6-hidroksi-D-nikotino oksidazės atveju šie jonai įtakos praktiškai neturi (Grether-Beck ir kt., 1994). Kiti skirtumai matomi lyginant fermentų amino rūgščių sekas. 6-Hidroksi-D-nikotino oksidazė yra sudaryta iš subvieneto, kurio molekulinė masė apie 49 kDa ir turi kovalentiškai prijungtą FAD, o 6-hidroksi-L-nikotino oksidazė yra sudaryta iš dviejų subvienetų, kurių vieno molekulinė masė yra apie 47 kDa ir kiekvienas monomeras turi nekovalentiškai prijungtą FAD. Nors abi oksidazės reaguoja su deguonimi ir negali veikti, esant

vienelektroniniam akceptoriumi, 6-hidroksi-*D*-nikotino oksidazė gali panaudoti dvielektroninį akceptoriumi, tuo tarpu 6-hidroksi-*L*-nikotino oksidazė to daryti negali. Be to, flavino radikalas yra gaunamas skirtingais būdais: 6-hidroksi-*D*-nikotino oksidazės atveju, veikiant $S_2O_4^{2-}$, o 6-hidroksi-*L*-nikotino oksidazės atveju, veikiant šviesa ir esant EDTA. Taip pat, abiejų oksidazių amino rūgščių sekos yra labai skirtingos. 6-hidroksi-*L*-nikotino oksidazės amino rūgščių seka yra panašesnė į eukariotinių monoamino oksidazių, nei į prokariotinių. Be to, atitinkama genų koduojančios DNR G+C procentas yra artimesnis eukarinei monoamino oksidazei, ir aiškiai mažesnis nei G+C procentas, esantis *A. nicotinovorans* pAO1 plazmidės DNR. Apibendrinus šiuos duomenis, Schenk ir Decker pasiūlė prielaidą, kad 6-hidroksi-*L*-nikotino oksidazės genas evoliucionavo po horizontalios genų pernašos iš eukariotinio pirmtako (Schenk ir kt., 1999).

Ekspresuojant *E. coli* bakterijose *L*-nikotino dehidrogenazę ir 6-hidroksi-*L*-nikotino oksidazę iš *Arthrobacter nicotinovorans*, buvo išaiškinta, kad *L*-nikotino ir 6-hidroksi-*L*-nikotino pernaša į ląsteles vyksta palengvintos difuzijos būdu, o ne dėl pasyvaus ar aktyvaus transporto (Ganas ir kt., 2009).

Nikotino dehidrogenazė (NDH) iš *Arthrobacter nicotinovorans* yra panaši į kitas ksantinių hidroksilazes. Paprastai tokie fermentai yra sudaryti iš trijų subvienetų: didžiojo 70-100 kDa subvieneto, turinčio molibdeninį kofaktorių, vidutinio 23-35 kDa subvieneto ir mažojo 15-25 kDa subvieneto. Kiti molibdopteriną turintys fermentai yra sudaryti iš 1, 2 ar 4 subvienetų (Gladyshev ir kt., 1996). NDH iš *A. nicotinovorans* yra sudaryta iš trijų 30,011, 14,924 ir 87,677 kDa dydžio subvienetų ir turi savyje FAD, Fe-S klasterį seleną ir molibdopteriną, kaip kofaktorių. Remiantis NDH subvienetų sekų analizės rezultatais, paaiškėjo, kad fermentas panašus į eukariotinę ksantinių dehidrogenazę (XDH), bet ne į žinomus molibdeną turinčius bakterinius fermentus. Remiantis palyginamąja analize, mažiausias subvienetas (NDHB) turi Fe-S klasterį, vidutinio dydžio subvienetas (NDHA) suriša FAD molekulę, o didžiausias subvienetas (NDHC) panašus į XDH molibdopteriną surišantį domeną. NDH fermentas *A. nicotinovorans* ląstelėse yra randamas tirpioje ir su

membranomis asocijuotoje formose. Volframas inhibuoja fermentinį aktyvumą, bet ne baltymo sintezę, ir jam esant padidėja su membranomis asocijuotos formos kiekis (Grether-Beck ir kt., 1994).

Pseudomonas ir *Arthrobacter* genties bakterijoms skaidant nikotiną, susidaro 6-hidroksi-3-sukcinoilpiridinas, kuris vėliau yra verčiamas 2,5-dihidroksipiridinu. Šią reakciją katalizuoja 6-hidroksi-3-sukcinoilpiridino hidroksilazė. Pagal funkciją, šis fermentas yra panašus į 6-hidroksinikotinato 3-monooksigenazę. Abu fermentai yra nuo NADH priklausomi ir panašios molekulinės masės: 38 kDa (hidroksilazė) (Tang ir kt., 2008) ir 42 kDa (monooksigenazė), tačiau amino rūgščių sekose nėra jokio panašumo. Be to, 6-hidroksi-3-sukcinoilpiridino hidroksilazės amino rūgščių sekoje nėra FAD/NADH-surišimo motyvų. Be to, 6-hidroksi-3-sukcinoilpiridino hidroksilazės substratas yra sukcinilo grupė, o ne tik karboksi, kaip 6-hidroksinikotinato 3-monooksigenazės atveju. Šie fermentai galėjo skirtingai evoliucionuoti, taip kaip nutiko 6-hidroksi-*L*- ir 6-hidroksi-*D*-nikotino oksidazėms.

A. nicotinovorans ląstelėms skaidant nikotiną, terpėje susidaro mėlynos spalvos pigmentas. Tyrimai parodė, kad oksidacijos metu susidaro 2,6-dihidroksipiridinas, kuris toliau yra oksiduojamas nikotinu indukuojamos 2,6-dihidroksipiridino 3-hidroksilazės. Išgrynintas fermentas absorbavo matomą šviesą, būdingą flavinams (sugerties maksimumai: 384 ir 455 nm). Kadangi flavinas yra stipriai susirišęs su fermentu ir gryninimo eigoje neatsiskiria, manoma, kad flavinas yra prostetinė grupė. Hidroksilazė yra tris kartus specifiskesnė NADH-ui nei NADPH-ui. Fermento gryninimo eigoje buvo pastebėta, kad ši hidroksilazė yra dviejų subvienetų fermentinis kompleksas. Abu fermentai vienas nuo kito yra lengvai atskiriami jonų mainų (pvz. DEAE-celiuliozės) chromatografijos metu. I-asis subvientas oksiduoja 2,6-dihidroksipiridiną, susidarant 2,3,6-trihidroksipiridinui, o II-asis suskaldo heterociklą. Fermentinį kompleksą inhibuoja sunkiųjų metalų (Cu^{2+} , Zn^{2+} ir Hg^{2+}) jonai. Fermentas praranda aktyvumą dializės arba saugojimo metu $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, dėl to tyrimų metu buvo stabilizuojamas etanoliu arba

gliceroliu. Oksidacijos reakcijos stecheometrija susidarant mėlynam pigmentui yra tokia: 2,6-dihidroksipiridinas/NADH/O₂ = 1/1/1. 2,6-dihidroksipiridino 3-hidroksilazės molekulinė masė nustatyta gel-filtracijos metodu buvo apie 89 kDa (Holmes ir kt., 1972). Šie duomenys kiek skiriasi, nuo Treiber (Treiber ir kt., 2008) pateiktų duomenų. Jie molekulinę masę gel-filtraciniu metodu nustatė esant 113 kDa. Taigi, 2,6-dihidroksipiridino-3-hidroksilazė yra homodimeras. Rekombinantinė 2,6-dihidroksipiridino-3-hidroksilazės kristalų erdvinė struktūra buvo nustatyta rentgeno spindulių difrakcijos metodu. Tyrimai leido padaryti prielaidą, kad flavinas yra redukuojamas NADH, būdamas *išorinėje*-pozicijoje. Po to persisuka į *vidinę*-poziciją, kur sąveikauja su deguonimi. Aktyvaus centro geometrija autorių pastūmėjo link minties, kad peroksiflavinas yra protonizuotas tirpikliu, kas padidina šio elektrofiliškumą. Substratas yra aktyvuojamas dviejų histidinių pirolo žiedų azotais, kurie gali priimti protoną nuo substrato C6 hidroksilo, kas leidžia susidaryti nukleofiliniam C3 atomui. Tuomet šis nukleofilinis anglies atomas atakuoja elektrofilinį hidroperoksido grupę (Treiber ir kt., 2008). Fermento amino rūgščių sekoje yra randami būdingi FAD/NAD, bet kiek pakeisti playginus su tradiciniais surišimo motyvai, tačiau kiek pakeisti: GXGXXG – pakeistas alternatyviu GXSTXXG, o DXXXGXDGXK motyve įkrautos polinės aminorūgštys yra pakeistos neįkrautomis poline (D→N) ar hidrofiline (K→A) a.r. (nuorodos). GDAAH motyve H yra pakeistas į V (Baitsch ir kt., 2001).

Kaip minėta anksčiau, veikiant 2,6-dihidroksipiridino-3-hidroksilazei, susidaro reaktyvus trihidroksipiridinas, kuris ore labai greitai autooksiduojasi į mėlyną pigmentą („nicotine blue“) – 4,5,4',5'-tetrahidroksi-3,3'-diazadifenočinoną-(2,2'). Tiriant *A. nicotinovorans* ląstelių ekstraktą, pavyko aptikti reduktazę, kuri redukavo mėlynąjį pigmentą iki trihidroksipiridino. Fermentas savo sudėtyje turi nekovalentiškai prijungtą FMN, ir redukcijai gali panaudoti NADH ar NADPH, bet pastarąjį mažesniu efektyvumu. Ši reduktazė nėra specifiška substratui, ir gali redukuoti kitus chinonus: 1,4-naftochinoną, 1,4-benzochinoną, 2,6-dichlofenolindofenolą, menadioną, durachinoną. Ši

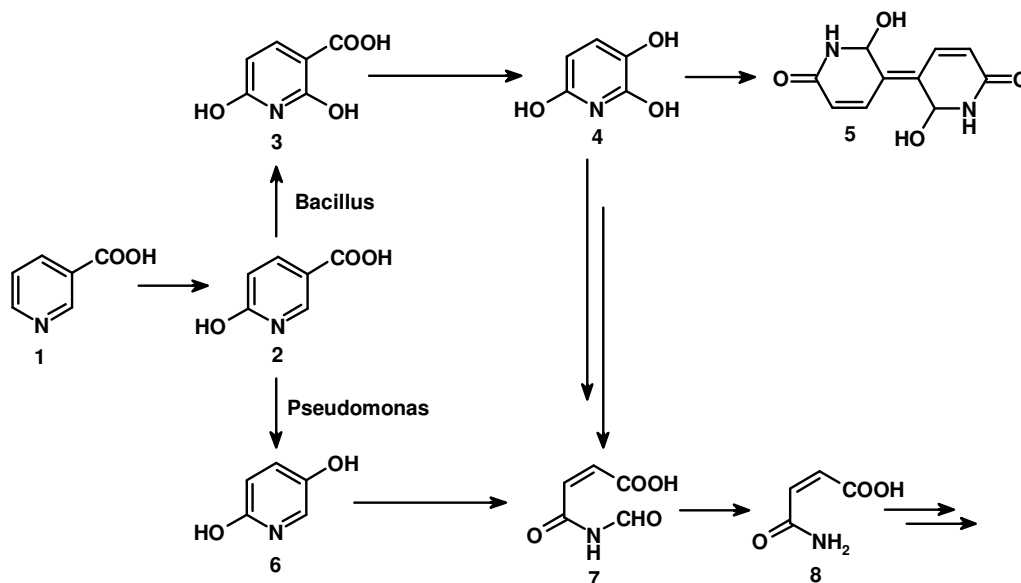
oksidoreduktazė yra sudaryta iš 204 aminorūgščių ir turi LFVTPEYNXXXXXXXXLKNAIDXXS motyvą, būdingą flavininių chinono reduktazių NADH2 šeimai. Joje nėra NAD(P)H surišimo AXGXXG motyvo, būdingo daugumai chinonų reduktazių, bet yra SXGXXG motyvas, randamas panašiuose baltymuose. Ši NAD(P)H-„nicotine blue“ oksidoreduktazė gali apsaugoti ląstelę nuo viduląstelinio mėlynojo pigmento vienelektronės redukcijos, kurios metu gali susidaryti semichinoniniai radikalai ir potencialiai toksiškos reaktyviojo deguonies formos (Mihasan ir kt., 2007).

1.4.4. Nikotino rūgštis

Nikotino rūgšties (3-karboksipiridino) biodegradacijos pradiniai etapai atskirose mikroorganizmų grupėse vyksta skirtingai, išskyrus pirmąjį etapą, kai nikotino rūgštis verčiama 6-hidroksinikotino rūgštimi. Išskiriami du pagrindiniai nikotino rūgšties transformacijos keliai – išliekant aromatinei sistemai iki žiedo atidarymo ir aromatinio žiedo redukcija. Beveik visuomet nikotino rūgštis yra hidroksilinama 6-oje padėtyje, yra žinomas tik vienas atvejis, kai ji hidroksilinama 2-oje padėtyje (Schrader ir kt., 2002). Tyrimai su intaktinėmis *Pseudomonas fluorescens* bakterijomis parodė, kad nikotino rūgšties metabolizmui yra svarbi laisva 6-oji padėtis, o 2-oji ir 5-oji gali būti užblokuotos. Ląstelės, prieš tai augusios neindukcinėmis sąlygomis, lengvai galėjo augti su 6-hidroksinikotino ir 5-fluoronikotino rūgštimis, tačiau negalėjo augti su kitokiais halogenintais dariniais, taip pat 2-hidroksinikotino ir 2,6-dihidroksinikotino rūgštimis. Intaktinės ląstelės, prisitaikiusios augti su nikotino rūgštimi, 2- ir 5-fluoronikotino ar nikotino rūgštis oksidavo panašiu greičiu, 5-chloronikotino rūgštį – žymiai lėčiau, o 5-bromonikotino rūgšties apskritai neoksidavo (Hughes, 1955).

Pirmasis nikotino rūgšties degradacijos etapas *Pseudomonas fluorescens* bakterijose yra hidroksilinimas 6-oje pozicijoje (Hughes, 1954; Hunt, 1958). Kitas etapas – oksidacinis dekarboksilinimas, susidarant 2,5-dihidroksipiridinui (Behrman ir kt., 1957), kuris dioksigenazės poveikyje suskaldomas iki

alifatinių produktų. *Bacillus* sp. bakterijos iš nikotino rūgšties susidariusią 6-hidroksinikotino rūgštį toliau oksiduoja iki 2,6-dihidroksinikotino rūgšties. Pastaroji oksidacinio dekarboksilinimo metu virsta 2,3,6-trihidroksipiridinu. 2,3,6-Trihidroksipiridinas toliau yra oksiduojamas suskaldant heterociklą iki maleamo ir skruzdžių rūgščių (1.12 pav.). Susidarius dideliame 2,3,6-trihidroksipiridino kiekiui, pastarasis ore oksiduojasi iki mėlynos spalvos pigmento (Kaiser ir kt., 1996).



1.12 pav. Nikotino rūgšties transformacija *Pseudomonas fluorescens* ir *Bacillus* sp. ląstelėse. **1** – nikotino rūgštis, **2** – 6-hidroksinikotino rūgštis, **3** – 2,6-dihidroksinikotino rūgštis, **4** – 2,3,6-trihidroksipiridinas, **5** – mėlynas pigmentas, **6** – 2,5-dihidroksipiridinas, **7** – N-formilmaleamo rūgštis, – maleamo rūgštis.

Azorhizobium, *Pseudomonas*, *Bacillus* ir kt. bakterijose, nikotinato dehidrogenazės nerodo jokio aktyvumo su nikotiniais nukleotidais (nors ir turi fermentiniame komplekse NADP⁺ oksidazę), tačiau yra aktyvūs esant fenazino metosulfatui (PMS) ar kalio fericianidui (Kitts ir kt., 1989), metileno mėliui (Hirschberg ir kt., 1971), tetrazolinams dažams (Hirschberg ir kt., 1972) ir kai kuriems kitiems dirbtiniams elektronų akceptoriams. Tiriant pastarosios grupės nikotinato, tuo pačiu ir 6-hidroksinikotinato, dehidrogenazes iš *Bacillus* sp. DSM2923 buvo nustatyta, kad kultivuojant fermento kiekis priklauso nuo terpėje esančių molibdeno jonų koncentracijos

(Nagel ir kt., 1989). Analogiškus duomenis gavo Grether-Beck ir bendraautoriai tirdami nikotino dehidrogenazę ir 6-hidroksinikotino oksidazę *Arthrobacter nicotinovorans* bakterijose (Grether-Beck ir kt., 1994). Be to, jie nustatė, kad molibdeno jonų antagonistu volframoto jonai slopina tik fermentų aktyvumą, bet ne baltymų sintezę. Nikotinato ir 6-hidroksinikotinato dehidrogenazės iš *Bacillus* sp. DSM2923, yra sudaryti iš kelių subvienetų, ir jų molekulinės masės gelių filtracijos metodu buvo nustatytos esant apie 400 ir 450 kDa. Abu fermentai reakcijoje su substratais parodė sugerties sumažėjimą ties 450 nm, kas leidžia daryti prielaidą, kad jų sudėtyje yra flavino (Hirschenberg ir kt., 1971). Tiriant nikotinato hidroksilazę išskirtą iš *Pseudomonas ovalis* KB1 kamieno, buvo nustatyta, kad tai su membrana asocijuotas fermentinis kompleksas, susijęs su elektronų transporto grandine, turinčia *b*- ir *c* tipo citochromus, kurie yra redukuojami nikotinatu ir NADH. Hidroksilinimas vyksta esant deguoniui, fericianidui, metileno mėliui, 2,6-dichlorofenolindofenoliui (DCPIP) ir PMS, kaip elektronų akceptoriams. Fermentinis kompleksas yra sudarytas iš azidui jautrios nikotinato oksidazės ir azidui nejautrios NADH oksidazės. Spektriniai tyrimai, fermentinio komplekso oksidacija anglies monooksidu ir redukcija ditionitu, leido išskirti du CO prisijungimo pigmentus: citochromą *o* (absorbcijos maksimumas 417 nm) ir kitą komponentą, kurio absorbcijos maksimumas buvo 425 nm bangos ilgyje. Citochromas *o* negalėjo būti redukuojamas NADH ir gintaro rūgštimi, bet galėjo būti redukuojamas nikotinatu, kaip ir „425“ CO prijungiantis pigmentas (Jones ir kt., 1972). Iš detalesnių tyrimų buvo padaryta išvada, kad su nikotinato dehidrogenaze susiję citochromai yra skirtingi nei randami kvėpavimo (gintaro rūgšties ar NADH dehidrogenazės) grandinėje (Jones, 1973). Šiuos duomenis patvirtino tyrimai panaudojant indukuotų ir neindukuotų nikotino rūgštimi *Pseudomonas fluorescens* TN5 kamieno ląstelių baltyminių ekstraktų. Indukuotų ląstelių baltyminis ekstraktas turi ryškias sugerties smailes ties 418, 521 ir 550 nm, būdingas citochromams. Išgrynintos nikotinato dehidrogenazės iš *Pseudomonas fluorescens* TN5 kamieno aktyvumui yra reikalingi fericianidas, PMS ar nitro blue tetrazolis (NBT). Be

to, šis fermentas nėra labai substratui specifiškas ir gali efektyviai hidroksilinti 3-piridinsulfono ir pirazinoinę rūgštis. Fermentas efektyviai veikia 6,0–9,0 pH intervale bei yra stabilus žemesnėje nei 50 °C laipsnių temperatūra. Fermentas yra mažai jautrus chelatoriams, bet ypač jautrus sulfhidriliniams reagentams, kas parodo svarbų disulfidinių tiltelių vaidmenį formuojant erdvinę baltymo struktūrą (Hurh ir kt., 1994).

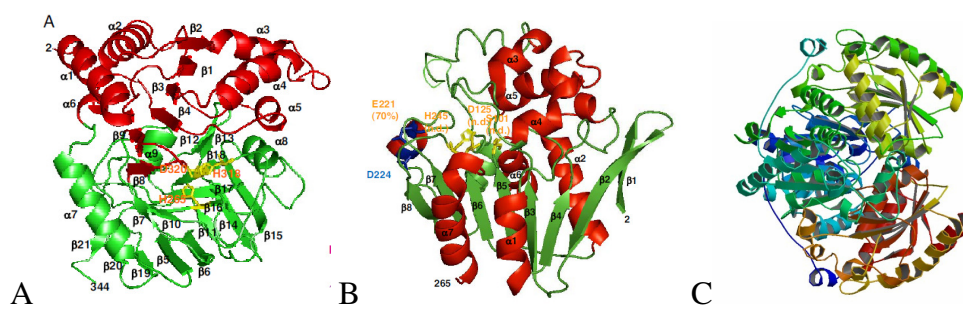
Duomenų apie [2Fe-2S] klasterį turinčio subvieneto funkciją buvo gauta, kai Yang ir bendraautorai sėkmingai klonavo ir ekspresavo nikotinato dehidrogenazių iš *Comamonas testosteroni* JA1 (Yang ir kt., 2009) ir *Pseudomonas putida* KT2440 genus *Escherichia coli* ir *Pseudomonas entomophila* L48 ląstelėse. Abi dehidrogenazės struktūriškai panašios – turi [2Fe-2S] centrą, citochromo ir aldehido-ksantino oksidazėms būdingus molibdeną surišančius fragmentus. Abiem atvejais, [2Fe-2S] centras yra atskirame subviene. Esminis skirtumas tarp šių nikotinato dehidrogenazių yra substratinis specifiškumas – dehidrogenazė iš *C. testosteroni* gali hidroksilinti ir 3-cianopiridiną. Buvo sukurtos hibridinės nikotinato dehidrogenazės: nikotinato dehidrogenazė iš *P. putida* turėjo mažąjį subvienetą (su [2Fe-2S] centru) iš *C. testosteroni* ir atvirkščiai – nikotinato dehidrogenazė iš *C. testosteroni* turėjo mažąjį subvienetą (su [2Fe-2S] centru) iš *P. putida*. Tokiu būdu buvo gauta hibridinė *P. putida* dehidrogenazė, kuri galėjo hidroksilinti ir 3-cianopiridiną. Šie tyrimai parodė, kad [2Fe-2S] centrą turintis domenas, o ne molibdeną surišantis katalizinis domenas yra atsakingas už 3-cianopiridino hidroksilinimą. Dar lieka nežinoma kurios tiksliai amino rūgštys yra atsakingos už 3-cianopiridino surišimą (Yang ir kt., 2010).

Anksčiau iškelta prielaida, kad 6-hidroksinikotinato 3-monooksigenazė, katalizuojanti oksidacinį dekarboksilinimą susidarant 2,5-dihidroksipirininui, savo sudėtyje turi flaviną, buvo patvirtinta vėlesniais tyrimais. Iš *Pseudomonas fluorescens* TN-5 bakterinio kamieno išskirtos 6-hidroksinikotinato 3-monooksigenazės veikimui yra reikalingi O₂, NADH ir FAD. Fermentas, 385 amino rūgščių polipeptidas, poliakrilamidiniame gelyje, denatūruojančiomis sąlygomis, migruoja kaip 42 kDa dydžio baltymas. Tiriant fermento savybes

buvo pastebėta, kad holofermentas sudarytas iš apofermento ir kofermento FAD, kuris jungiasi apofermento N-gale. Be to N-gale yra FAD ir NAD(P) surišime dalyvaujančios sekos GXGXXG, DXXXGXDGXXK, kurioje K yra pakeista H, o C-gale – GDAAH seka, kurioje antroji A pakeista C. Kofermento ir apofermento kiekiai yra ekvimoliniai. Didžiausias fermentinis aktyvumas buvo nustatytas, esant pH 7,6 ir 35 °C temperatūrai. Fermentas praktiškai nekatalizavo 6-hidroksinikotinato homologų oksidacijos, o nikotino rūgštis pasirodė esanti konkurentiniu slopikliu. Visiška fermento inhibicija Ag^+ , Cu^{2+} ir Hg^{2+} jonais, *p*-chlormerkuribenzoatu, 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzenu) ir dalinė (69%) – *N*-etilmaleimidu, leidžia daryti išvadą, kad SH grupės atlieka svarbų vaidmenį fermento aktyviame centre. Tiriant monooksigenazės substratinį specifiškumą paaiškėjo, kad fermento aktyvumui yra svarbi aromatinė substrato sistema ir hidroksilo bei karboksilo grupės. Didžiausias aktyvumas buvo pasiektas su 4-hidroksibenzoine rūgštimi, 6% nuo 6-hidroksinikotinatino aktyvumo. Reakcijos metu susidarė hidrochinonas. Kiti junginiai – 3- ir 2-hidroksibenzoatai, 2-hidroksinikotinas ir 6-hidroksipirazinai buvo panaudojami kaip substratai esant mažiau nei 0,5% nuo 6-hidroksinikotinatino aktyvumo. Gebėjimas katalizuoti hidroksikarboksilinius aromatinius junginius mažėja tokia pakaitų padėties kryptimi: *para*-, *meta*- ir *ortho*-. Susidaręs 2,5-dihidroksipiridinas tolimesnės oksidacijos metu suskaldomas iki maleamo rūgšties (Nakano ir kt., 1999).

Nikotino rūgšties degradacijoje dalyvaujantys fermentai yra pradėti gryninti ir apibūdinti prieš penkis dešimtmečius. Tačiau genai, koduojantys šiuos baltymus, buvo atrasti tik neseniai. Jimenez ir bendraautorai aprašė *Pseudomonas putida* KT2440 kamieno, genų sandarą (*nic* genus), dalyvaujančius aerobinėje nikotino rūgšties degradacijoje (Jimenez ir kt., 2008). Tai *nicAB* – nikotinato dehidrogenazė, *nicC* – 6-hidroksinikotinato 3-monooksigenazė, *nicX* – 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazė, *nicD* – *N*-formilmaleamato deformilazė, *nicF* – maleamato deaminazė ir *nicE* – maleino rūgšties izomerazė bei reguliaciniai NicR ir TetR tipo genai (Jimenez ir kt., 2008). Jimenez ir bendraautorai pateikė 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės

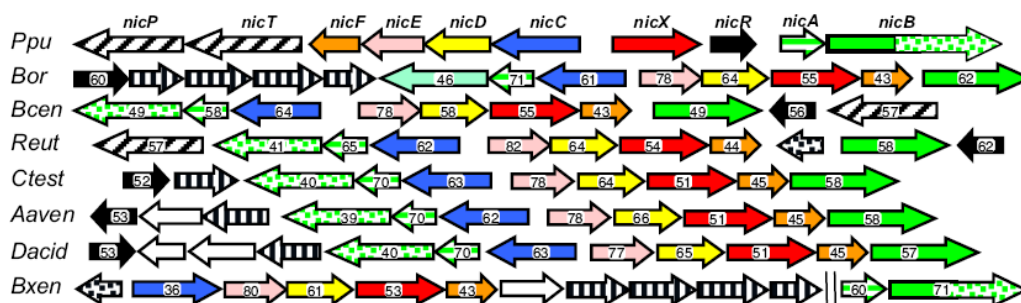
struktūros modelį. Šios struktūros N-gale (1-123 ir 177-191 a.r.) esantys regionai yra atpažįstami kaip Rossmann'o klostė su centriniais šešiais β -lakštais ($\beta 2$ - $\beta 1$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ - $\beta 9$ - $\beta 8$), apsuptais α -spiralėmis ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$) iš abiejų galų. C-galinis domenas yra organizuotas į du antiparalelinius β -lakštus ($\beta 21$ - $\beta 20$ - $\beta 19$ - $\beta 5$ - $\beta 6$ - $\beta 11$ - $\beta 14$ - $\beta 15$ ir $\beta 7$ - $\beta 10$ - $\beta 16$ - $\beta 17$ - $\beta 18$ - $\beta 12$ - $\beta 13$), kurie formuoja pseudo β -statinę, uždengtą $\alpha 7$ ir $\alpha 8$ spiralėmis (1.13 pav.) (Jimenez ir kt., 2008). Sumodeliuotoje struktūroje autoriai išskyrė H265, H318 ir D320 amino rūgštis kaip katalitines. Tokiu būdu C-galinis domenas yra katalitinis, o N-galinis yra atsakingas už dimerizaciją. Deja, nėra aišku ar polimerizacijoje dalyvauja tik N-galas ar ir C-galas, nes natyvus fermentas yra heksameras.



1.13 pav. Modeliniai (A) *nicX* ir (B) *nicD* ir (C) nustatytos *nicF* kristalinės struktūros vaizdai.

Atlikdami N-formilmaleamo rūgšties deformilazės tikslinę konservatyvių amino rūgščių mutagenzę, Jimenez ir bendraautoriai nustatė katalizinę triadą, kurios amino rūgščių pasikeitimas alaninu lemia visišką katalizinio aktyvumo praradimą. Šiai katalizinei triadai priklauso S101, D125 ir H245. Katalizei taip pat yra svarbios D224 ir E221 amino rūgštys, kurių pakeitimas alaninu lemia 70% aktyvumo praradimą, lyginant su natyviu baltymu. Deformilazės amino rūgščių sekoje yra randamas α/β hidrolazėms būdingas nukleofilinių (98-G-H-S-M-G-104) amino rūgščių motyvas, ji yra unikali α/β hidrolazė, pasižyminti deformilaziniu aktyvumu. Dėl didelio maleamo rūgšties deaminazės (*nicF*) konservatyvumo Jimenez ir bendraautoriai kataliziniai triadai priskyrė D31, K121 ir C154. *nicE* geno produkto (izomerazės) amino rūgščių palyginimas leido išskirti du konservatyvius cisteinus (C104 ir C222), kurie tiesiogiai dalyvauja katalizėje (Jimenez ir kt., 2008).

Nikotino rūgšties degradacijos genų (*nic*) sandraupos palyginimas su analogiškomis sandraupomis, esančiomis skirtingose bakterijų grupėse, leidžia išskirti genų ketvertą – *nicE*, *nicD*, *nicX* ir *nicF*, kurie praktiškai visuomet būna apsupti iš vienos pusės *nicC* ir iš kitos pusės – *nicA* ir *nicB* (1.14 pav.). Genų ketverto eiliškumas yra beveik identiškas visose bakterijose (Jimenez ir kt., 2008).



1.14 pav. *Pseudomonas putida* KT2440 kamieno *nic* genų sandraupos genetinės organizacijos palyginimas su panašiomia sandraupomis skirtingose bakterijose. Pagal Jimenez ir kt. (2008).

Vėliau, šalia reguliacinio *nicR* buvo rastas *nicS* reguliacinis genas. NicS ir NicR transkripcijos represoriai veikia kartu ir sudaro reguliacinį žiedą, kontroliuojantį „aukščiau“ (t.y. nikotinato dehidrogenazės) ir „žemiau“ (t.y. visų kitų degradacijos fermentų) esančių nikotinato degradacijoje dalyvaujančių genų ekspresiją. Tai leidžia visiškai neišeikvoti nikotinato, ląstelei augant minimalioje mitybinėje terpėje (Jimenez ir kt., 2011).

Decker ir Bleeg yra pastebėję, kad *Arthrobacter oxydans* bakterijose, genai susiję su nikotino rūgšties biodegradacija yra indukuojami (Decker ir kt., 1965). Atitinkamų fermentų sintezė yra represuojama terpėje esant ir gliukozės, ir amoniako, bet ne tik vieno iš jų. Indukuojamų hidroksilazių aktyvumai nėra aptinkami iki pirmos indukcijos valandos. Kadangi lag periodas indukuojant nikotino rūgštimi yra kiek ilgesnis nei indukuojant 6-hidroksinikotino rūgštimi, manoma kad tikrasis induktorius yra pastarasis junginys. Induktoriais gali būti 2- ir 6-hidroksinikotino, 2-aminonikotino, 5- ir 6-fluoronikotino, nikotino rūgštys ir nikotinamidas (Hirschberg ir kt., 1972).

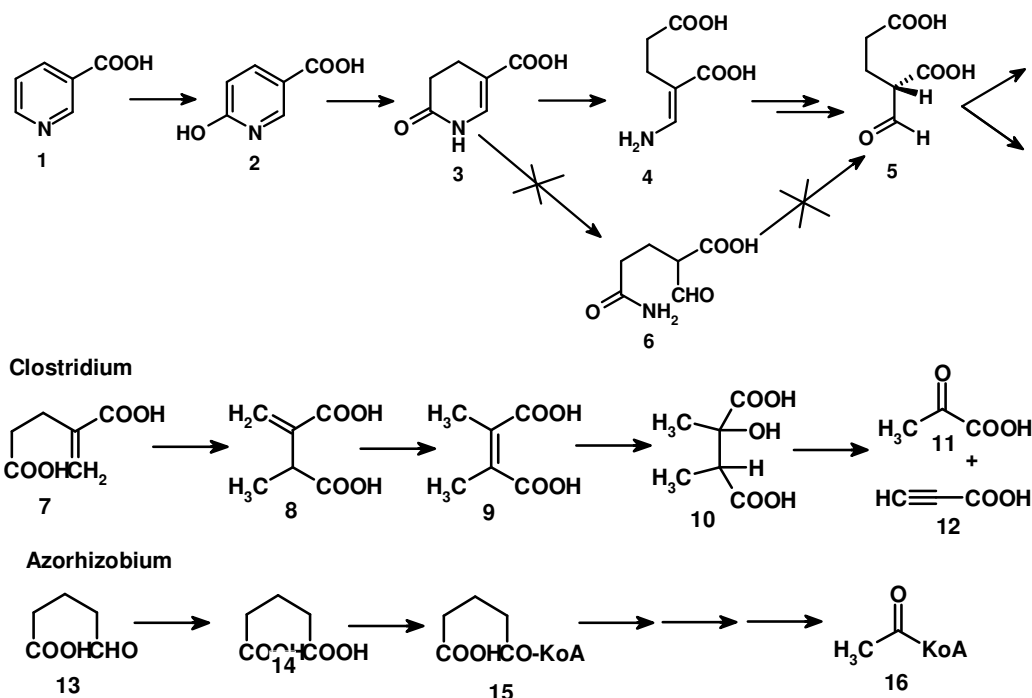
Genai susiję su nikotino ir nikotino rūgšties degradacija gali būti išsidėstę ne tik chromosomoje, bet ir plazmidėje. *Pseudomonas convexa* 1 kamiene (Pc1) surasta didelė NIC plazmidė (Thacker ir kt., 1978). Ši plazmidė koduoja su nikotino ir nikotino rūgšties metabolizmu susijusius genus. Abiejų junginių degradacija vyksta susidarant tam pačiam metabolitui – 2,5-dihidroksipiridinui. Bakterijos, netekusios NIC plazmidės, negali įsisavinti nei nikotino, nei nikotino rūgšties kaip vienintelio anglies šaltinio. *P. putida* bakterijose, su nikotinato metabolizmu susiję genai yra išsidėstę chromosomoje ir susieti su kitomis katabolinėmis funkcijomis, tokiomis kaip benzoato, *p*-hidroksibenzoato, šikimato, kvinato, mandelato, fenilacetato, histidino, tirozino ir fenilalanino degradacija. Tokia skirtinga su nikotino rūgšties degradacija susijusių genų lokalizacija gali būti paaiškinta skirtinga *P. putida* ir *P. convexa* evoliucija. (Thacker ir kt., 1978). pNIC plazmidė gali būti pernešama konjugacijos būdu. Įdomu tai, kad kai PpG1 NIC+ egzokongugantas yra donoras, o PpG1 yra recipientas, kartu su nikotinato degradacijos genais yra pernešami genai iš chromosomos. Visais kitais plazmidės pernašos iš vieno kamieno į kitą atvejais, jokia chromosominių genų pernaša nevyksta. Tai leido padaryti išvadą, kad NIC plazmidės konjugacinės pernašos iš *P. convexa* (Pc1) į *P. putida* (PpG1) metu, ši skyla į nepriklausomą „vaisingumo“ faktorių T ir neperduodamą NIC struktūgos genų plazmidę (Thacker ir kt., 1979).

Kaip yra valdomi su nikotinu ir nikotino rūgštimi susiję genai nėra tiksliai žinoma, bet nikotino rūgšties biodegradacijos tyrimai *Aspergillus nidulans* grybuose leido išskirti nikotinatą indukuojamus 5 asr. Nikotinato hidroksilazės ORF *hxnS*, turi 2Cys2His cinko pirštų transkripcijos faktorių. *hxnP* ORF yra labai panašus į tipišką nikotino transporto geną iš *S. cerevisiae*. Abu šie genai yra kontroliuojami *hxnR* (Fernandez-Martin ir kt., 1999).

Rhizobium meliloti RCR2011 kamiene, genai atsakingi už trigonelino (*N*-metilnikotinato) metabolizmą yra susiję su *nif-nod* genais simbiotinėje pSym megaplazmidėje ir yra išsidėstę *trc* lokuse. Tyrimai parodė, kad *trc* genai yra organizuoti į mažiausiai keturis transkripcijos vienetus, ir trys iš jų yra indukuojami trigonelinu. Nei vienas iš pagrindinių ar simbiotinių reguliatorinių

genų – *ntrA*, *dctB/D*, ir *nodD* nėra susijęs su trigonelino katabolizmu. *trc* genai yra indukuojami visose simbiozės stadijose (Boivin ir kt., 1990).

Visiškai kitoks nikotino rūgšties transformacijos kelias būdingas *Azorhizobium caulinodans* ir *Clostridium* sp. (*Eubacterium barkeri*) genties bakterijoms, kurios 6-hidroksinikotino rūgštį ne oksiduoja, o redukuoja iki 4,5-dihidro- ar 1,4,5,6-tetrahidro-6-oksonikotino rūgščių. Iš *Clostridium* sp. bakterijų dalinai išgrynintos reduktazės veikimui yra reikalingi redukuotas feredoksinas arba redukuotas metilo viologeno dažas, kaip elektronų donoras. Fermentas greitai inaktyvuojamas deguonimi, be to, yra jautrus geležį chelatuojantiems reagentams (Holcenberg ir kt., 1969). Tolimesnis 4,5-dihidro- ar 1,4,5,6-tetrahidro-6-oksonikotino rūgščių metabolizmas vyksta per bendrą abiemis bakterijų gentims, tarpinį metabolitą – 2-formilglutaro rūgštį. Šios rūgšties metabolizmas *Azorhizobium* ir *Clostridium* bakterijose yra skirtingas. *Clostridium* sp. bakterijose 2-formilglutaro rūgšties skaidymas vyksta susidarant nesočioms rūgštims, o galutiniai produktai yra piruvo ir propiono rūgštys (1.15 pav.) (Kaiser ir kt., 1996). Esant terpėje dideliame piruvo rūgšties kiekiui, susidaro α -metilenglutaro rūgštis. Tyrimai su alifatinėmis rūgštimis parodė, kad piruvo ir pieno rūgštys nėra būtini propioninės rūgšties tarpininkai (Tsai ir kt. 1966). *Azorhizobium caulinodans* bakterijose, 2-formilglutaro rūgšties metabolizmas pereina į glutaro rūgšties kelią. Transeterifikacijos metu susidaro glutaril-KoA. Ši per keturias stadijas, susidarant krotonil-KoA, β -hidroksibutiril-KoA ir acetoacetyl-KoA, suskaldoma iki dviejų acetyl-KoA molekulių (Kitts ir kt., 1992). Kitts ir bendraautoriai manė, kad ciklas skyla tarp N1 ir nesotaus C2 atomo susidarant 2-formilglutaril-5-amidui, tačiau 2008-ais metais Krebs ir bendraautoriai paskelbė duomenis parodydami, kad skyla amidinis ryšys tarp N1 ir oksido C6 atomo (1.16 pav.) (žiūrėti toliau).



1.15 pav. Nikotino rūgšties transformacija *Clostridium* sp. ir *Azorhizobium caulinodans* ląstelėse. **1** – nikotino rūgštis, **2** – 6-hidroksinikotino rūgštis, **3** – 1,4,5,6-tetrahidro-6-oksonikotino rūgštis, **4** – 2-(enamino)-gliutaro rūgštis, **5** – 2-formilgliutaro rūgštis, **6** – 2-formilgliutaril-5-amidas, **7** – α -metilengliutaro rūgštis, **8** – metilitakono rūgštis, **9** – dimetilmaleino rūgštis, **10** – 2,3-dimetil-2-hidroksi gintaro rūgštis, **11** – piruvo rūgštis, **12** – propiono rūgštis, **13** – gliutaro rūgšties pusiau aldehidas, **14** – gliutaro rūgštis, **15** – gliutaril-KoA, **16** – acetil-KoA.

A. caulinodans ORS571 kamienas nikotino rūgštį gali naudoti kaip anabolinį substratą NAD^+ sintezei ir kaip katabolinį substratą – anglies ir azoto šaltinį. Fermentiniai tyrimai parodė, kad katabolinių fermentų kiekiai buvo didesni ląstelėse augintose su nikotinatū kaip azoto šaltiniu, nei ląstelėse augintose su papildomu amonio jonų kiekiu. Iš ląstelių išskirta nikotinato 6-hidroksilazė pasirodė esanti su membrana asocijuota ir jos katalizuojamos reakcijos elektronų donoras yra ne NADP^+ , o deguonis. Fermentinis kompleksas yra jautrus cianidui, *N*-fenilimidazolui ir azidui. Po fermento inhibicijos cianidu nevyko NAD^+ ir NADP^+ redukcija. Papildomai pridėjus nikotinato ir fericianido buvo fermentiškai redukuojami ne tik NAD^+ ir NADP^+ , bet ir metileno mėlis. Vektorių įterpimo būdu buvo gauti mutantai, negalintys katabolizuoti nikotino rūgšties, tačiau augimui vis dar reikėjo

mikrokiekių nikotino rūgšties. Tokiu būdu buvo gautas *A. caulinodarans* NAD⁺ auksotrofas. (Kitts ir kt., 1989).

Nikotinato 6-hidroksilazė iš *Clostridium (Eubacterium) barkeri* bakterijų yra nuo NADP⁺ priklausoma ir randama fermentiniame komplekse su NADPH oksidaze ir diaforaze (Holcenberg ir kt., 1969). Fermentiniam aktyvumui yra reikalingi Fe(II) jonai, redukuotas gliutationas ir pirofosfatas. Nesant bent vienam iš šių elementų, aktyvumas nėra stebimas. Fermentas iškrinta į nuosėdas esant 45-62 % amonio sulfato kiekiui. Šios hidroksilazės pH optimumas priklauso nuo buferinės sistemos ir kinta pH 7,5-9,0 intervale. Fermentas yra specifiškas savo substratams: iš daugelio išbandytų substrato analogų, fermentiniu aktyvumu (30% nuo nikotino rūgšties aktyvumo) pasižymėjo tik pirazino 2-karboksilinė rūgštis. Nustatytos K_M reikšmės yra 110 μM nikotinatui, 830 μM pirazino-2-karboksilinei rūgščiai ir 28 μM NADP⁺. Tiriant fermento stabilumą buvo pastebėta, kad geriausiai jį stabilizuoja glicerolis ir didelis kiekis KCl (0,4 M). Optimaliausia saugojimui buferio pH reikšmė yra apie 8,2 (Gladyshev ir kt., 1996). Fermentas turi dvi dideles sugerties smailes ties 275 ir 465 nm ir tris mažesnes ties 360, 430 ir 550 nm. Tai leido įtarti, kad fermento sudėtyje yra papildomų kofaktorių. Tyrimai parodė 6 sieros, 11 geležies jonų ir 1,5 FAD molekulių buvimą kiekvienai fermento molekulei. Išgryninto fermento molekulinė masė buvo išskaičiuota iš sedimentacijos koeficiento, baltymo koncentracijos ir difuzijos konstantos, tokiu būdu buvo gauta apie 300 kDa molekulinė masė. (Holcenberg ir kt., 1969). Vėlesniais tyrimais molekulinė masė buvo nustatyta gel-filtracijos metodu – nuo 400 iki 120 kDa, bet didžiausias baltymų kiekis eliuavosi kaip 160 kDa dydžio baltymas. Ši baltymo masė vis keitėsi kiekviename gryninimo etape, dėl svarbaus seleninio baltyminio komplekso praradimo. Denatūruojančiomis sąlygomis poliakrilamidiniame gelyje fermentas migruoja kaip keturi: 50, 37, 33 ir 23 kDa polipeptidai. Nustatyti kiti šio fermento kofaktoriai ir jų kiekiai: nenustatytos formos selenas, molibdopteras, Fe-S centras ir FAD. Jų stecheometrija yra 5-7 Fe, 1 FAD ir 1 molibdenas kiekvienam 160 kDa baltyminiam protomerui (Gladyshev ir kt., 1996). Fe-S

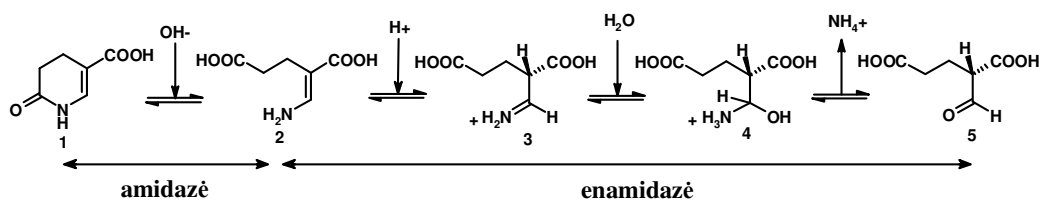
centras yra svarbus oksidaciniam aktyvumui, o selenas, kuris yra koordinuotas su molibdenu, molibdopterininiame komplekse yra svarbus hidroksilaziniam aktyvumui (Gladyshev ir kt., 1994). Ši hidroksilazė nėra panaši į žinomas hidroksilazes, išskyrus panašias subvienetų mases, be to subvienetų N-galinės sekos neturi homologų su žinomais molibdeną turinčiais fermentais, todėl yra sunku pasakyti, kuris subvienetas yra atsakingas už seleno koordinavimą su molibdeno kofaktoriumi. Dėl fermento gebėjimo hidroksilinti nikotinato analogus, turinčius teigiamą krūvį aromatiniam žiede manoma, kad ji turi neigiamai įkrautą susirišimo su nikotinatu ir jo analogais vietą. Nikotinato 6-hidroksilazė yra efektyviai redukuojama NADPH, tačiau nėra aišku, kodėl nikotinas nėra efektyvus reduktorius. Vienas iš galimų paaiškinimų yra tas, kad nikotino rūgšties oksidacija yra dviejų elektronų procesas, todėl molibdeno, esančio fermente, oksidacijos laipsnis greičiau yra +6 nei +5. Kita neįprasta hidroksilazės savybė yra susijusi su ypač maža fermento inaktivacija cianidu. Tai bandoma paaiškinti tuo, kad molibdenas nėra koordinuotas su galine sulfo grupe, taip kaip kitose žinomose molibdeną turinčiose hidroksilazėse (Gladyshev ir kt., 1996).

Wagener ir bendraautoriai detaliau ištyrė šį fermentą. Rentgeno spindulių difrakcijos metodu nustatė nikotinato dehidrogenazės iš *Eubacterium barkeri* kristalinę struktūrą. Be to, analizuodami fermento aktyvų centrą daugybinių bangų anomalios dispersijos metodu nustatė, kad selenas yra kovalentiškai prijungtas prie molibdeno, ir užima bei atlieka tą pačią funkciją kaip ir sulfido ligandas kitose molibdeninėse hidroksilazėse. Pagal pritaikytus modelinius skaičiavimus paaiškėjo, kad selenas akseleruoja kritinio hidrido pernašą nuo substrato seleno ligandui. Pagal šio modelio skaičiavimus, reakcijos koordinatėse, tarpinių produktų, susidarant seleno hidridui, energija yra mažesnė, nei analogiškų sulfido hidridų. Tokiu būdu ištyrus nikotinato hidroksilazės $\text{MoO}(\text{OH})\text{Se}$ aktyvų centrą, buvo parodyta nauja seleno skaidymo ir reaktyvumo funkcija (Wagener ir kt., 2009)

Genetiškai identifikuoti nikotinato dehidrogenazės iš *Eubacterium barkeri* sanaują pavyko tik 2006 (Alhapel ir kt., 2006). Dehidrogenazė yra

koduojama *ndhF* (FAD subvienetas), *ndhS* (2 x (2Fe-2S) subvienetas) ir *ndhM* ir *ndhL* (molibdopterininių) subvienetų. *ndhL* ir *ndhM* genai persidengia 17-bp ir formuoja du atskirus transkripcijos vienetus, atskiruose skaitymo rėmeliuose. *ndhM* formuoja Shine-Dalgarno seką. *ndhL* geno terminalinis kodonas yra alternatyvus TAA.

Kaip minėta anksčiau, *Eubacterium barkeri* 6-hidroksinikotinas redukuojamas į 1,4,5,6-tetrahidro-6-oksonikotinatą. Šią reakciją katalizuojanti reduktazė savo sudėtyje turi kovalentiškai pririštą flavininį kofaktorių, vieną [2Fe-2S]^{2+/1+} ir du [4Fe-4S]^{2+/1+} centrus (Alhapel ir kt., 2006). Sekančiame nikotinato skaidymo etape dalyvauja enamidazė, katalizuojanti dvi skirtingas reakcijas: pirma – atidaro žiedą, susidarant 2-(enamino)-gliutaratui, ir antra – toliau hidrolizuoja iki *S*-2-formilgliutarato (1.16 pav.). Tai 386 amino rūgščių polipeptidas formuojantis 222-simetrijos tetramerą. Kiekvienas enamidazės monomeras susideda iš β-klosčių domeno ir (α/β)8-TIM-statinės domeno (aktyvaus centro). Šio fermento aktyvus centras talpina savyje abu: cinko ir geležies jonus (KreB ir kt., 2008). Iki tol buvo manoma kad heterociklą suskaldo oksigenazė atakuojanti N1-C2 ryšį.



1.16 pav. Enamidazės iš *Eubacterium barkeri* vaidmuo nikotinato metabolizme. **1** – 1,4,5,6-tetrahidro-6-oksonikotinas; **2** – 2-(enamino)-gliutaratas; **3** – (*S*)-2-(formimino)-gliutaratas; **4** – (*S*)-2-(karbinolamino)-gliutaratas; **5** – (*S*)-2-formilgliutaratas.

Ieškant bakterijų, galinčių hidroksilinti nikotino rūgštį kitoje padėtyje nei 6-oje, buvo parinkta auginimo terpė su 6-metilnikotino rūgštimi. Tokiu būdu buvo surastas *Rastonia (Burkholderia)* DSM 6920 kamienas, hidroksilintis nikotino ir 6-metilnikotino rūgštis 2-oje pozicijoje, tačiau šių metabolitų toliau neskaidė (Tinschert ir kt., 1997). Tiriant detaliau šių bakterijų substratinį specifiškumą paaiškėjo, kad DSM 6920 kamienas visiškai metabolizuoja

piridin-2,5-dikarboksilinę (izocinchomeroninę) rūgštį. Galima manyti, kad izocinchomeroninė rūgštis yra metabolizuojama taip pat kaip ir *Hydrogenophaga* sp. IMA01 kamienas, hidroksilindamas *ortho*-pozicijoje, susidarant 6-hidroksiizocinchomeroninei rūgščiai (Uchida ir kt., 2003). Iš to galima daryti prielaidą, kad DSM 6920 kamieno atveju nikotino rūgšties analogus 2-oje pozicijoje hidroksilina izocinchomeroninės rūgšties dehidrogenazė. Tačiau, kaip paaiškėjo vėlesnių tyrimų metu, DSM 6920 kamieno ląstelės 70-90% efektyvumu galėjo hidroksilinti nikotino, 6-metilnikotino, 6-chloro- ir 5,6-dichloronikotino rūgštis; ir apie 50% efektyvumu – 5-metil- ir 5-chloropirazin-2-karboksilinę rūgštis. Ankstesnę prielaidą paneigia tai, kad intaktinės ląstelės negalėjo hidroksilinti 3-karboksipiridono turinčio hidroksilo ar karboksilo grupes prie C5 ir C6 atomų, taip pat 2-karboksipiridino ir 2-karboksipirazino turinčių hidroksilo ar karboksilo grupes ties C5 atomu (Tinschert ir kt., 2000). Toks platus 6-metilnikotinato-2-oksidoreduktazės substratinis specifiskumas ir tai, kad susidarę metabolitai nėra toliau transformuojami, DSM 6920 kamieną daro labai perspektyviu junginių gamybai. Šio kamieno hidroksilazė, katalizuojanti nikotinato hidroksilinimą prie C2 atomo, nesunkiai galėjo hidroksilinti ir nikotino rūgštį, todėl buvo priskirta nikotinato dehidrogenazių šeimai (NDH). Šis fermentas sudarytas iš trijų 75, 30 ir 16 kDa polipeptidų; natyvaus fermento molekulinė masė yra apie 280 kDa. Holofermentas turi molibdeną, geležį, nestabilią rūgštinę sierą ir FAD santykiu 1,6:7,3:8,0:0,6 moliui natyvaus fermento. Molibdeninis kofaktorius charakterizuotas kaip molibdopterino citozindinukleotidas. Cinkas identifikuotas kaip papildomas metalo jonas, santykiu 1,8 mol/moliui fermento?. Šie duomenys rodo, kad fermentas subvienetų sudėtimi, polipeptidų ilgių ir kofaktorių sudėtimi yra panašus į kitas nikotinato dehidrogenazes, ypač į nikotinato dehidrogenazę iš *Comamonas testosteroni* JA1 kamieno, sudarytą iš 82, 46 ir 21 kDa subvienetų (Yang ir kt., 2009/2010). Tyrimais buvo parodyta, kad grybiniam *Aspergillus oryzae* 112822 kamienui skaidant nikotiną, iš *N*-metilnikotinamido susidaro 2-hidroksi-*N*-metilnikotinamidas. Tačiau nėra jokių duomenų apie eukariotinį

fermentą, atliekantį šią reakciją (Meng ir kt., 2010). Išgrynintos dehidrogenazės iš *Rastonia (Burkholderia)* DSM 6920 kamieno aktyvumas pagal NBT yra 22,6 U/mg, o K_M reikšmė nikotino rūgščiai yra 154 μ M. Piridino-3,5-dikarbosilinė ir chinolino-3-karboksilinė rūgštys katalizuojami, tačiau visiškai skirtinguose pH optimumuose. Keletas dirbtinių elektronų akceptorių buvo redukuojami NDH, tačiau nebuvo jokio aktyvumo su NAD(P)^+ ar O_2 . NDH yra labai jautri cianidui, bet visiškai nejautri arsenitui (Schrader ir kt., 2002).

Dėka to, kad gyvos ląstelės dažnai yra mažiau jautrios aplinkos sąlygoms lyginant su fermentais, be to jų veikimui nėra būtini dažnai labai brangūs elektronų akceptoriai, gyvosios ląstelės gali būti panaudotos junginių biosintezėje ar kaip jutikliai. Vienas tokių pavyzdžių yra imobilizuotos *Pseudomonas fluorescens* TN5 ląstelės, panaudotos nikotino rūgšties detekcijai. Toks „gyvas“ jutiklis dirbo plačiose pH (nuo 4 iki 10) ribose, koncentracijai esant nuo 5 μ M iki 6mM (Takayama ir kt., 1996).

Nikotinato skaidymo metabolitas – 6-hidroksinikotinas yra vertinga medžiaga. Jau nuo praeito šimtmečio 9-o dešimtmečio yra užregistruoti patentai kaip nikotinato dehidrogenazės ir bakterijų pagalba galima gaminti šį junginį. Didelį panaudojimo potencialą turi *Commamonas testosteroni* JA1 kamienas, skaidantis nikotino rūgštį, ją hidroksilindamas 6-oje pozicijoje. Pasirodė, kad šis kamienas beveik 100% išeiga gali hidroksilinti ir 3-cianopiridiną (Yuan ir kt., 2005). *Agrobacterium* DSM 6336, skaidantis 3-cianopiridiną susidarant nikotinatui ir vėliau 6-hidroksinikotinui taip pat pasirodė esąs vertingas biotransformaciniu atžvilgiu. Bakterijos be vargo oksidavo 2-cianopiraziną susidarant pirazinoinei rūgščiai, ir vėliau šį junginį hidroksilino susidarant 5-hidroksipirazinoinei rūgščiai. Šis junginys toliau nėra metabolizuojamas (Wieser ir kt., 1997).

Jei *Rastonia (Burkholderia)* DSM 6920 kamienas galėjo hidroksilinti 6-metilnikotinatą 2-oje pozicijoje, kodėl evoliucijos eigoje negalėjo atsirasti bakterijų galinčių hidroksilinti šią medžiagą 5-oje pozicijoje? Tokio junginio oksidacija yra galima 2-metil-3-hidroksipiridino 5-karboksilinės rūgšties

oksigenaze. *Pseudomonas* MA1 ir *Mesorhizobium loti* skaido vitaminą B6 susidarant 5-hidroksi-6-metilnikotino rūgščiai. Vėliau veikiant flavininei oksigenazei aromatinis piridino žiedas yra atidaromas. Šis fermentas gali katalizuoti ir 5-hidroksinikotinato oksidaciją (Chaiyen, 2010). Todėl galima manyti, kad gamtoje gali būti toks organizmas, kuris skaido nikotinatą, susidarant 5-hidroksinikotinatui. Pastarasis junginys arba toliau oksiduojamas, susidarant dihidroksinikotinatui, arba oksiduojamas, atidarant aromatinį žiedą.

1.5. DIKARBOKSILINTŲ PIRIDINŲ TRANSFORMACIJA

Dažniausiai gamtoje sutinkamos chinolino (nikotino rūgšties pimtakas) ir dipikolino rūgštys. Pastarąją dideliais kiekiais ($\geq 10\%$ nuo sausos masės) kaupia *Bacillus* ir *Clostridium* bakterijų sporos. Dipikolino rūgštis yra sintetinama iš aspartato. Aspartatas yra verčiamas pusiaualdehidu, kuris reaguoja su piruvo rūgštimi. Reakciją katalizuoja dihidrodipikolino rūgšties sintetazė, kurios poveikyje netenkamos 2 molekulės vandens ir susidaro dihidrodipikolino rūgštis (Forman ir kt., 1972). Dar 1961 Doi ir Halvorson išaiškino, kad dihidrodipikolino rūgšties oksidacijos iki dipikolino rūgšties metu, elektronų grandinėje yra reikalingi flavinas ir NAD (Doi ir kt., 1961). Dipikolino rūgštis sintetinama sporuliuojančios motininės ląstelės kompartimente, bet kaupiasi tik besivystančioje priešporėje. Didžioji dipikolino rūgšties dalis yra sporos šerdyje, kur ši suriša divalenčius kationus: daugiausia Ca^{2+} ir Mg^{2+} , šiek tiek Mn^{2+} ir kitus. Pirmosiomis sporos dygimo minutėmis dipikolino rūgštis su surišti divalenčiais kationais yra išskiriama į aplinką (Paidhungat ir kt., 2000).

Bakterinė dipikolinato degradacija gali būti tiek aerobinė, tiek anaerobinė. Anaerobinėje dipikolino rūgšties degradacijoje dalyvauja Gram-neigiamos, nesporuliuojančios bakterijos. Galutiniais skaidymo produktais yra identifikuoti acetatas, propionatas, NH_3 ir CO_2 . Galutinai suskaidyti ir įsisavinti metabolitus padeda kartu augančios kitos Gram-neigiamos bakterijos,

kurios oksiduoja acetatą iki CO₂, furarato, malato ar elementinės sieros. Manoma, kad anaerobinė degradacija yra atvirkštinė sintezei, t.y. pirmoje stadijoje vyksta redukcija iki dihidrodipikolino rūgšties. Tuomet yra prijungiamas vandens molekulė, susidarant 1,2,3,3-tetrahidro-6-hidroksidipikolinatui, kuris skyla į 2-amino-6-okso-heksa-4-enedioinę rūgštį, o vandenyje ši rūgštis hidrolizuojasi į piruvatą ir aspartato pusiauualdehidą (Seyfried ir kt., 1990).

Achromobacter sp. 1-2 kamieno vykdomos aerobinės dipikolinato degradacijos metabolitais buvo identifikuoti fluorescuojantis 3-hidroksidipikolinatas ir α -ketogliutaratas (Kobayashi ir kt., 1962).

Ftalio rūgštį skaidančios bakterijos, išskirtos iš jūros dumblo, pasirodė galinčios metabolizuoti piridindikarboksilines rūgštis. Kaip *Achromobacter* ir įvairios ftalatą skaidančios bakterijos, *Bacillus brevis* galėjo vieninteliu anglies ir energijos šaltiniu panaudoti dipikolino rūgštį. *B. brevis* CC9M kamienas oksiduoja dipikolino rūgštį, susidarant 2,3-dihidroksipikolino rūgščiai. Esant šviesai, 2,3-dihidroksipiridinas labai greitai fotolizuojasi į šešis produktus, kurių tik du nebuvo fotolitiškai ir/ar mikrobiologiškai atakuojami (Amador ir kt., 1990).

Chinolino rūgštis gyvuosiuose organizmuose yra sintetinama skirtingais keliais prokariotuose ir eukariotuose. Prokariotuose aspartaminiu keliu, eukariotuose (augaluose iš chorizmato, gyvūnuose iš triptofano) kinureininiu keliu (Kumatov ir kt., 2003; Katon ir kt., 2004). Iš chinolino rūgšties yra sintetinama nikotino rūgštis (NAD pirmtakas). Chinolino rūgšties kaip anglies ir energijos šaltinio skaidymas tirtas mažai. Žinoma, kad *Alcaligenes* sp. UK21 kamienas, skaido chinolino rūgštį susidarant 6-hidroksichinolino rūgščiai. Pastaroji yra dekarboksilinama, susidarant 6-hidroksipikolino rūgščiai. Šios bakterijos galėjo hidroksilinti ir pirazin-2,3-dikarboksilinę rūgštį ir pirazin-2,3-dikarbonitrilą, bet toliau šių junginių neskaidė. Kai UK21 kamienas buvo auginamas terpėje be molibdeno jonų chinolinato dehidrogenazės kiekis buvo žymiai mažesnis, nei esant molibdeno jonams. Analogiški duomenys yra gauti tiriant nikotinato dehidrogenazės biosintezę. Šie duomenys leidžia manyti, kad

chinolinato dehidrogenazė yra molibdo hidroksilazė. Chinolinato dehidrogenazė yra sudaryta iš 3 subvienetų, kurie SDS-poliakrilamidiniame gelyje migruoja kaip 78,4, 31,1 ir 16,6 kDa dydžio baltymai. Iš 3 subvienetų ir panašios molekulinės masės polipeptidų yra sudaryta nikotinato dehidrogenazė iš *Comanomas testosteroni* JA1 kamieno, kuri priskiriama aldehido oksidazės / ksantino dehidrogenazei (Jang ir kt., 2009). Chinolinato dehidrogenazės elektronų akceptoriais galėjo būti PMS, metileno mėlis, DCPIP, NBT ir neutralusis raudonis. Fermentą visiškai inhibavo 1 mM HgCl₂, AgNO₃, CuSO₄ ir *p*-chlormerkuribenzoato. Kalio cianidas, jodacetatas, merkaptoetanolis ir DDT taip pat inhibavo fermentą. 6-Hidroksichinolinato dehidrogenazė SDS-poliakrilamidiniame gelyje migruoja kaip 35,6 kDa dydžio baltymas. Natyvaus fermento molekulinė masė nustatyta gel-filtraciniu metodu buvo 221 kDa. Fermentas 2% aktyvumu (palyginus su 6-hidroksidichinolinatu) galėjo dekarboksilinti 4-hidroksiftalio rūgštį. Fermentas buvo silpnai inhibuojamas 1mM HgCl₂, AgNO₃, CuSO₄ ir *N*-etilmaleimidu, o chelatuojančios medžiagos išvis neturėjo įtakos fermento aktyvumui. Nustyta 25 amino rūgščių *N*-galinė seka parodė, kad ši dekarboksilazė yra panaši į 4,5-dihidroksiftalato dekarboksilazes (Uchida ir kt., 2003b).

Uchida ir bendraautorai išskyrė *Rhizobium* sp. LA17 ir *Hydrogenophaga* sp. IMA01 kamienus, skaidančius lutidino ir izocinchomeronines rūgštis. Visais (chinolino, lutidino ir izocinchomeroninės rūgščių) atvejais skaidymas prasideda nuo C6 atomo hidroksilinimo (Uchida ir kt., 2003a). Kadangi autoriai koncentravosi į hidropiridininių rūgščių konversijos efektyvumą bioprodukcijai, duomenų apie kitus degradacijos metabolitus nėra.

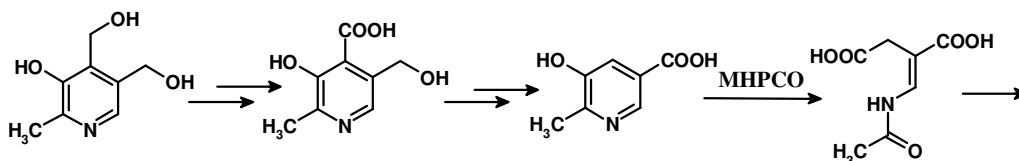
1.6. PIRIDOKSINO TRANSFORMACIJA

Piridoksino metabolizmas yra plačiai paplitęs gamtoje, nes tai yra vitaminas B6. Šis junginys yra įdomus savo struktūra, nes turi dvi grupes – hidroksilo ir metilo, tiesiogiai nedalyvaujančias oksidacijoje, bet atliekančias svarbų vaidmenį aromatinio žiedio įtemptyje, ir hidroksimetilo ir/ar aldehido

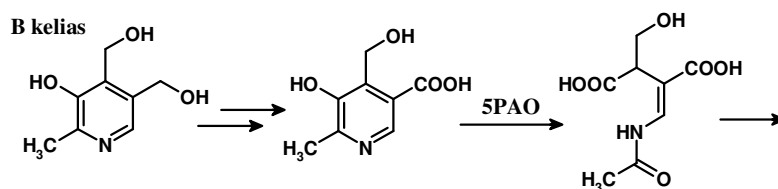
grupės, kurios yra oksiduojamos iki karboksilinės rūgšties liekanos. Tokiu būdu į piridoksino metabolitus galima žvelgti kaip į 6-metil-5-hidroksinikotino rūgštį.

Apžvelgiant piridoksino degradaciją bakterijose, šis junginys gali būti skaidomas skirtingai. Yra duomenų, kad net ir tos pačios genties bakterijos, pav. *Pseudomonas* gali skirtingai oksiduoti piridoksina. Pavyzdžiui, *Pseudomonas* IA kamienas oksiduoja susidarant izopiridoksaliui ir 5-piridokso rūgščiai, kuri oksigenazės poveikyje verčiama pirikonine rūgštimi (α -hidroksimetil-a9-(*N*-acetilaminometil)-gintaro rūgštimi). Tuo tarpu *Pseudomonas* MA-1 kamienas oksiduoja analogiškais reakcijomis, bet susidarant skirtingiems metabolitams: piridoksaliui, 4-piridokso rūgščiai, 2-metil-3-hidroksi-5-formilpiridin-4-karboksilinei rūgščiai, 2-metil-3-hidroksipiridin-4,5-dikarboksilinei rūgščiai, 2-metil-3-hidroksipiridin-5-karboksilinei rūgščiai ir tik tuomet oksigenazės poveikyje atidaromas piridino žiedas, susidarant α -(*N*-acetilaminometilen)-gintaro rūgščiai (1.17 pav.) (Kaiser ir kt., 1996).

A kelias



B kelias



1.17 pav. Piridoksino metabolizmas: *Pseudomonas* MA1 ir *Mesorhizobium loti* (A kelias) ir *Pseudomonas* IA ir *Arthrobacter* Cr-7. (B kelias).

Abu fermentai, 2-metil-3-hidroksipiridin-5-karboksilinės rūgšties oksigenazė (MHPCO) ir 5-piridoksinės rūgšties oksigenazė (5-PAO) katalizuoja piridino žiedo atidarymo reakciją. Šie fermentai yra flavininiai, jų galutiniu elektronų akceptoriumi tarnauja NAD(P)H (Chaiyen, 2010). Nors MHPCO ir 5-PAO katalizuoja tokias pat reakcijas ir jų substratai yra labai

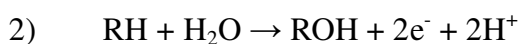
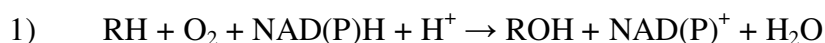
panašūs, bet fermentai tarpusavyje skiriasi. Net ir MHPCO (ar 5-PAO) tarp atskirų organizmų yra labai skiriasi subvienetų sudėtimi ir polipeptidų molekulinio dydžiu, o juo labiau lyginant MHPCO ir 5-PAO tarpusavyje (Nelson ir kt., 1986). Tyrimai su radioaktyviuoju deguonimi parodė, kad abiem atvejais molekulinis deguonis įvedamas į C2 atomą susidarant acilui. Tyrimai su 2-metil-3-hidroksipirdin-5-karboksilinės rūgšties analogais t.y. 5-hidroksinikotino ir *N*-metil-5-hidroksinikotino rūgštimis patvirtino, kad šios medžiagos yra MHPCO iš *Pseudomonas* MA-1 kamieno substratai ir žiedas yra skeliamas ties C2-C3 atomais ir susidaro alifatinės α -(*N*-formil-*N*-metil- ir α -(*N*-formil-aminometilen)-gintaro rūgšties, atitinkamai. Deja, nėra tirta ar ir kitos MHPCO gali katalizuoti 5-hidroksinikotino rūgšties oksidaciją. Tai, kad egzistuoja fermentai galintys oksiduoti 5-hidroksinikotino rūgštį leidžia daryti prielaidą, kad gali egzistuoti organizmai skaidantys 5-hidroksinikotino rūgštį ar net vienu iš metabolitų yra 5-hidroksinikotino rūgštis.

Palyginus MHPCO ir analogiškų fermentų amino rūgščių sekas, buvo surastos amino rūgštys būdingos palyginamiesiems fermentams ir/ar flavininėms hidroksilazėms. Tačiau atlikus MHPCO iš *Pseudomonas* MA-1 kamieno rentgeno struktūrinę analizę buvo išskirtos trys amino rūgštys (Tyr223, Tyr82, ir Arg181) kaip katalitinės (Chaiyen, 2010). Šie duomenys koreliuoja su McCulloch atliktais modeliniais skaičiavimais, analizuojant MHPCO iš *Mesorhizobium loti* MAFF303099 kamieno, kristalų rentgeno struktūrinės analizės duomenis. Jis Tyr223, Tyr54, Arg211 ir dalinai Asp201 priskiria dalyvaujančioms substrato surišime. Aktyviam centrui jis priskiria Tyr54, Tyr82, Tyr223, Phe358, Trp203, Asp 203 ir Arg211, kurios sudaro hidrofobinį kanalą. Taip pat išskirtos amino rūgštys dalyvaujančios FAD surišime. Kaip svarbią amino rūgštį autorius išskiria konservatyvų Pro295, kuris yra virš FAD izoaloksazino žiedo C7 ir C8 atomų (McCulloch ir kt., 2009).

1.7. N-HETEROCIKLINIŲ JUNGINIŲ SKAIDYME DALYVAUJANTYS FERMENTAI

N-Heterociklinių junginių skaidymą galima suskirstyti į du esminius etapus: 1) heterociklinio žiedo hidroksilinimą ir 2) aromatinio žiedo skilimą.

Dauguma žinomų hidroksilinančių fermentų, žinomų kaip mono- ir dioksigenazės, naudoja O₂ molekulę kaip deguonies šaltinį, ir įveda jį į substratą. Šios reakcijos metu yra sunaudojamas redukuojantis NAD(P)H ekvivalentas (1). *N*-heterociklinių junginių hidroksilinimą dažnai katalizuoja molibdeninės hidroksilazės, kurios deguonies šaltiniu naudoja vandens molekulę, ir generuoja redukuojantį ekvivalentą (2).



N-Heterocikliniuose junginiuose esantis heteroatomas inaktyvuoja žiedą. Susidarius teigiamam heteroatomo krūviui, *N*-heterocikliniai junginiai vangiai dalyvauja elektrofilinio pakeitimo reakcijose, pakaitą kreipiant į *meta*- padėtį *N*-heteroatomo atžvilgiu. Tačiau *N*-heterocikliniai junginiai lengvai dalyvauja nukleofilinėse reakcijose, pakaitą kreipiant į *ortho*-ar *para*- padėtį.

Molibdeninis kofaktorius paprastai turi triciklinį piranopterino struktūrą, sudarytą iš pirimidino, pirazino ir pirano žiedų. Alternatyvi pterinui yra biciklinė molibdopterino forma, turinti tik pirimidino ir pirazino žiedus, bet taip pat turinti atidarytą pirano žiedą. Mo ir W yra koordinuojami dviejų ditioleno sieros molekulių, kurios yra prijungtos prie pirano žiedo. Prie žiedo taip pat prijungta fosfometilo grupė, kuri leidžia kofaktoriui būti atpažintam kaip mononukleotidui (Magalon ir kt., 2011).

Pagal molibdeninio kofaktoriaus surišimą, šiuos fermentus galima suskirstyti į tris grupes. Pirmoji – monookso-monosulfido-tipo molibdeninis centras (ksantino oksidazė kaip prototipas). Ksantino dehidrogenazę ir nikotino rūgšties dehidrogenazę iš *Clostridium barkeri* galima išskirti į atskirą monooksi-monoselenido-tipo subgroupę. Antroji, sulfito oksidazės grupė, turi diokso-tipo molibdeninį centrą. Trečioji fermentų grupė turi monookso-tipo

molibdeninį centrą. Ši dimetilsulfoksido reduktazės grupė, turi baltymo ligandą molibdeniniame centre, kur aktyvi amino rūgštis gali būti serinas (pvz., dimetilsulfoksido reduktazės iš *Rhodobacter sphaeroides* atveju), cisteinas ar selenocisteinas (Fetzner ir kt., 1998; 2000).

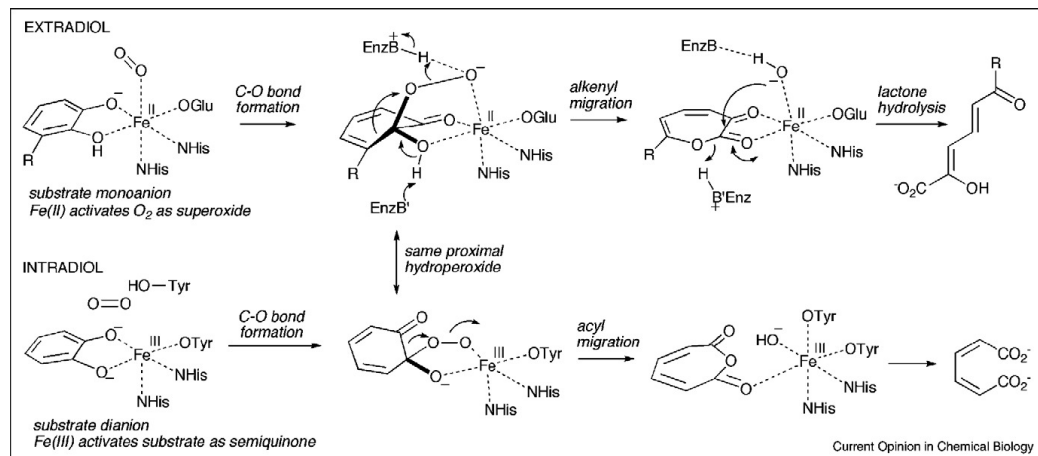
Heterociklinių junginių skaidyme esminė reakcija yra aromatinio žiedo skilimas. Aerobinė benzenoidinių junginių degradacija vyksta įvedant dvi hidroksi grupes *ortho*- ar *para*- padėtyse, viena kitos atžvilgiu. Po ko seka žiedo skilimas, susidarant alifatiniais produktams. Gamtoje egzistuoja tiek „intradiolinės“, tiek „ekstradiolinės“ gentizato 1,2-dioksigenazės, kurios katalizuoja *ortho*- ir *meta*- katecholinių junginių skėlimą, atitinkamai. Yra gerai charakterizuotos neheminės geležies dioksigenazės. Dėja analogiškos heterociklinių junginių dioksigenazės nėra taip gerai išanalizuotos. Heterociklinių junginių skėlime dalyvaujantys fermentai yra skirtingų tipų. Kai kuriose bakterijose 1-triptofano 2,3-dioksigenazė yra hemą turintis fermentas. 2-Metil-3-hidroksipiridino-5-karboksilinės rūgšties oksigenazė yra nuo NAD(P)H-priklausoma, flavininė dioksigenazė. 3,4-Dihidroksipiridino ir 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės yra ekstradiolinės, kurių veikimui yra reikalingi Fe(II) jonai (Fetzner ir kt., 1998). Todėl šiame skyriuje apžvelgsime kaip deguonis gali atakuoti substratą bei intra- ir ekstradiolinių dioksigenazių veikimo mechanizmus.

Nors oksidacijos reakcijos yra egzoterminės, deguonis nėra aktyvus be tinkamo katalizatoriaus. Šiuo katalizatoriumi dažnai būna pereinamųjų metalų jonai, kurie turi nesuporuotus elektronus ir trimis būdais gali aktyvuoti deguonį: 1) persidengiant metalų ir deguonies orbitalėms; 2) metalų jonams priimant tik vieną elektroną, susidarant superoksidui; ir 3) inicijuojant radikalinę reakciją.

Kadangi dioksigenazės katalizuoja dviejų deguonies atomų įvedimą į produktą, pirmiausia susiformuoja vienas C-O ryšys su substratu, susidarant alkil hidroperoksido tarpiniam produktui, iki nutrūkstant O-O ryšiui. Organinis hidroperoksidas yra chemiškai reaktyvus, ir palyginus su silpnu O-O ryšiu, ir

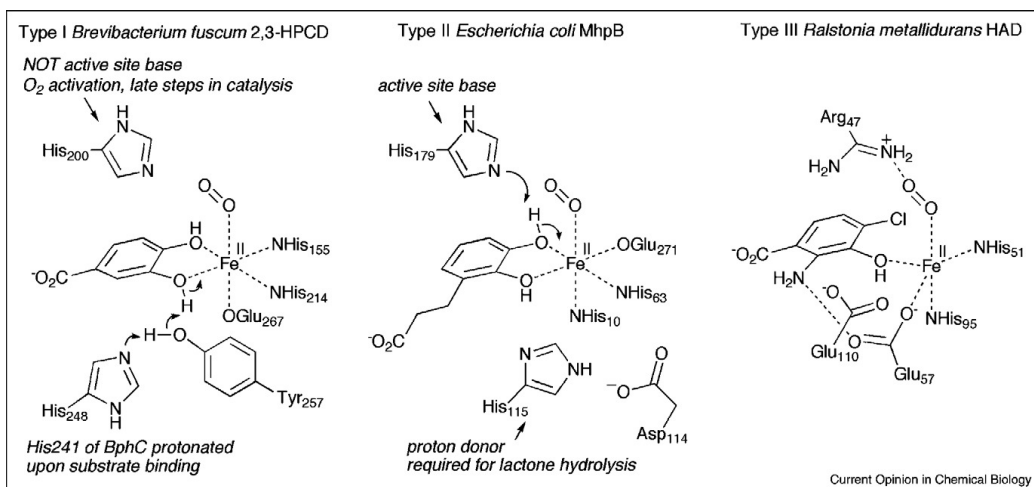
gali reaguoti skirtingai: kaip nukleofilas, kaip elektrofilas, O-O skylant per C-C ryšio migraciją ar O-O skylant per homolitinį skilimą (Bugg, 2003).

Aromatinių junginių skilimą katalizuojančios dioksigenazės yra skirstomos į intradiolines ir ekstradiolines. Pavyzdžiui, egzistuoja tiek intradiolinės, tiek ekstradiolinės katecholio dioksigenazės. Intradiolinė skelia C-C ryšį tarp fenolinių hidroksilo grupių, ekstradiolinė – tarp šalia esančios fenolio hidroksilo grupės (1.18 pav.).



1.18 pav. Intradiolinės ir ekstradiolinės katecholio dioksigenazių veikimo mechanizmai. Pagal Bugg (2003).

Esminis skirtumas tarp intradiolinės ir ekstradiolinės katecholio dioksigenazių yra geležies būvis ir ligandai. Intradiolinėse dioksigenazėse – tai Fe(III) kofaktorius, du tirozinai ir du histidiniai, ekstradiolinėse – tai Fe(II) kofaktorius, du histidiniai ir viena gliutamo rūgštis. Tiek intradiolinės, tiek ekstradiolinės dioksigenazės katalizuojamos reakcijos metu susidaro toks pats hidroperoksido tarpinis produktas, kuris skyla dviem skirtingais Criegee persigrupavimais: 1,2-acilo migracija (intradiolinė), susidarant mukono anhidridui arba 1,2-alkenilo migracija (ekstradiolinė), susidarant laktonui. Ekstradiolinės dioksigenazės papildomai yra skirstomos į tris tipus pagal (aktyvaus centro) amino rūgščių sudėtį (1.19 pav.) (Bugg ir kt., 2008).



1.19 pav. I, II ir III tipų ekstradiolinių dioksigenazių aktyvaus centro amino rūgščių, Fe(II) jono ir substrato išsidėstymai. Pagal Bugg (2003).

Jimenez ir bendraautoriai 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazę išskiria kaip naujo tipo dioksigenazę, evoliucionavusią iš metaloproteazių ir neturinčią ryšio su kitomis dioksigenazėmis (Jimenez ir kt., 2008).

Apibendrinant literatūros apžvalgą galima teigti, kad piridino ir jo junginių biodegradacija vis dar nepakankamai ištirta. Nėra žinomi detalūs biodegradacijos keliai ir metabolitai, neišskirti ar detalieai neaprašyti pagrindiniai fermentai, dalyvaujantys šių junginių katabolizme, ir juos koduojantys genai bei reguliacija metabolizme. Todėl piridino ir jo junginių biodegradacijos tolimesni tyrimai leistų detalčiau pažvelgti į šį procesą ir jame dalyvaujančius fermentus ir genus, bei leistų biokatalizės būdu sintetinti piridininius junginius, kurie turėtų didelę paklausą ir panaudojimo sritis.

Atsižvelgiant į tai, vienas iš šio darbo tikslų buvo surasti mikroorganizmus, hidroksilinančius ir/ar skaidančius hidroksilintas piridino rūgštis. Buvo ieškoma tokių mikroorganizmų, kurie skaidytų netradicines hidroksipiridino rūgštis. Kiti šio darbo tikslai yra detaliau ištirti karboksipiridinių skaidymo procesą – ištirti fermentus ir degradacijoje dalyvaujančius genus.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1. REAGENTAI

3-Hidroksipiridinas, 3-cianopiridinas, pikolino rūgštis, 3-hidroksipikolino rūgštis, 6-hidroksipikolino rūgštis, nikotino rūgštis, 2-hidroksinikotino rūgštis, 6-hidroksinikotino rūgštis, pirazinoinė rūgštis, dipikolino rūgštis, izocinchomeroninė rūgštis, chinolino rūgštis – **Fluka, Vokietija**

3-Hidroksi-2-metilpiridinas, 5-hidroksi-2-metilpiridinas – **Aldrich, JAV**.

5-Hidroksipikolino, pirimidin-3-karboksilinė, piridazin-3-karboksilinė, piridazin-4-karboksilinė rūgštys, 5-hidroksi-2-cianopiridinas, 2-cianopirazinas, 2-cianopirazinas – **Apollo Scientific Ltd., Didžioji Britanija**.

2,5-Dihidroksipiridinas – susintetintas dr. R. Jančienės (VU Biochemijos institutas) pagal Behrman ir Pitt, 1958.

5-Hidroksi-2-hidroksimetilpiridinas – susintetintas dr. A. Klimavičiaus, R. Rozengergo ir J. Meškausko (VU Biochemijos institutas) pagal Iqubal ir kt., 2009.

PMS, DCPIP, NBT, FAD, riboflavinai – **Merck, Vokietija**.

NAD, NADP, NADH, NADPH, – **Reanal, Vengrija**.

Kiti reagentai – **Reachim, Rusija; Serva, Ferak, Vokietija; Lachema, Čekija**.

Mielių ekstraktas, NA (nutrient agar), NB (nutrient broth) – **Oxoid, Didžioji Britanija**.

Jautienos ekstraktas (Beef extract) – **Serva, Vokietija**.

Pradmenys – **METABION, Vokietija**.

ZYMO Plasmid PREP – **Zymo Research Corporation, JAV**.

IPTG, X-gal, Restrikcijos endonukleazės, T4 ligazė, Proteinazė K, DNR išskyrimo iš gelio rinkinys, Gene Ruler DNA ladder Mix – molekulių masių žymenys, Unstrained Protein Molecular Weight Marker – baltymų molekulių

masių žymenys, PCG Master Mix – **Fermentas – Thermo Fisher Scientific, Lietuva.**

Aparatūra:

Äkta purifier 100 – **Amersham Pharmacia – General Electric (Uppsala, Sweden).**

Sorbentai:

HiPrep™16/10 DEAE FF, HiPrep™, HiPrep™16/10 ANX FF, HiPrep™16/10 Q FF, 16/10 Phenyl FF (high sub), Resource™ Q, Resource™ PHE, Superdex™ 200 10/300 GL – **Amersham Pharmacia – General Electric (Uppsala, Sweden).**

ToyoScreen™ AF-Blue-650M, Phenyl-Toyopearl 650 M, SuperQ-Toyopearl 650M, GigaCapQ-Toyopearl 650M – **Tosoh Bioscience GmbH (Vokietija)**
Baltymų molekulinų masių žymenys gel-chromatografijai – **Sigma, JAV**

2.2. BAKTERIJŲ KAMIENAI

Bakteriniai kamienai:

Achromobacter sp. **JS18** laboratorinis kamienas.

Sinorhizobium sp. **L-1** išskirtas šio darbo metu.

Pusillimonas sp. **5HP** buvo išskirtas šio darbo metu.

E. coli **DH5α, BL21 (DE3)**

Plazmidiniai vektoriai pUC19/PstI, pUC19/SalI, pUC19/HindIII, pUC19 ir pTZ57R/T (*Fermentas, Lietuva*); pET19 (*Invitrogen*)

2.3. PRADMENYS

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5'→3'
WOO1	AGA GTT TGA TCM TGG CTC
WOO2	GNT ACC TTG TTA CGA CTT
M13/pUC F	GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A

M13/pUC R	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG
L1F	TCG ATT ATG CCG ACG CCT TCA
L2F	TCG CAY GTC GGC TGG GGC CTG
L3R	TTC CGG CGG TTC GAC GGC GGT
L4R	TKC AGG CCC CAG CCG ACR TGG
P1F	GCC GAC ACG CAC CCG CAA ACN CTG CG
P2F	CTG GTG CCC ACC GAG GCC GAC CG
P3R	CCY TCS SWY TGS CCY TCG TTS GG
P4R	CGT CCA TGC CGA TGT GGG CTT C

2.4. TERPĖS IR AUGINIMO SĄLYGOS

NA terpė: 28 g/l NA (nutrient agar)

NB terpė: 13 g/l NB (nutrient broth)

EFA1 terpė: K_2HPO_4 – 8,8 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ – 1 g/l, NaCl – 2,35 g/l, mielių ekstraktas – 0,5 g/l, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,18 g/l, druskų tirpalas – 10 ml/l.

EFA2 terpė: EFA1 terpė su padidintu organinių medžiagų kiekiu: mielių ekstraktas – 0,9 g/l, peptonas – 1,0 g/l, jautienos ekstraktas – 0,6 g/l, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,18 g/l, druskų tirpalas – 10 ml/l.

Agarizuota terpė: tai terpė į kurią papildomai pridėta 15 g/l agarų.

Druskų tirpalas: $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 2 g/l, $MnSO_4 \times 4H_2O$ – 1 g/l, $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ – 0,7 g/l, $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,7 g/l. Medžiagos buvo tirpinamos 0,1 M HCl.

Visos terpės ir druskų tirpalai buvo autoklavuojami 30 min. 121 °C temperatūroje, esant 1 atm. slėgiui.

Terpės turinčios 5-hidroksipikolinatą ir 2,5-dihidroksipiridiną 30 min. 105 °C temperatūroje, esant 0,5 atm. slėgiui.

Visų terpių pH buvo 7,2.

Visi bakteriniai kamieniai buvo auginami orbitinėse kratyklėse, aeruojant 30 °C temperatūroje, 180 rpm.

Sinorhizobium sp. L-1 kamieno ląstelės buvo auginamos BioEngineering 6 litrų talpos bioreaktoriuje užpildytame 4,2 litro EFA1 terpės. Auginimas vyko aeruojant, įšotinant oru iki 55% deguonies, 24–25 valandas. Reaktoriaus temperatūra buvo palaikoma 30 °C, pH 7,1, o maišymo greitis kito nuo 220 iki 360 rpm.

2.5. TYRIMO METODAI

2.5.1. Chromosominės DNR skyrimas

DNR buvo skiriama pagal Woo metodiką (Woo ir kt., 1992). Bakterijos buvo auginamos 3 ml BHI terpėje per naktį aeruojant termostatuojamoje kratyklėje. Vėliau ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant (6000 g/15 min.). Nusodintos ląstelės buvo praplautos 1 ml TNE buferinio tirpalo (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8,0), o gauta ląstelių suspensija vėl centrifuguojama (10000 g/5 min). Nusodintos ląstelės buvo suspenduojamos 135 µl TNE buferinio tirpalo ir papildomai pridedama dar 135 µl TNE buferinio tirpalo, turinčio 2% Tritono X-100 ir 30 µl (5 mg/ml) lizocimo. Viskas buvo gerai išmaišoma ir inkubuojama 30 min 37 °C vandens vonioje. Po inkubavimo buvo pridedama 15 µl proteinazės K tirpalo (20 mg/ml, Fermentas), gerai sumaišoma 3–5 kartus apverčiant mėgintuvėlį ir inkubuojama 2 val 65°C vandens vonioje. Po centrifugavimo (10000 g/15 min) gautas supernatantas buvo perpilamas į naują mėgintuvėlį ir gryninamas pridedant 300 µl fenolio:chloroformo:izoamilio alkoholio tirpalo santykiu 25:24:1. Tirpalas buvo gerai sumaišomas apverčiant mėgintuvėlį 5–10 kartų ir nucentrifuguojamas (10000 g/5 min). Į atsargiai surinktą viršutinį sluoksnį buvo pridedama 300 µl chloroformo tirpalo, gerai sumaišoma ir vėl nucentrifuguojama. Tuomet į surinktą viršutinį sluoksnį buvo pridedama 30 µl 5 M kalio acetato ir 660 µl 96% etanolio. Geresniam DNR išsėdimui mišinys buvo paliekamas 2 val arba per naktį –20 °C temperatūroje. Nuosėdos buvo surenkamos nucentrifuguojant (10000 g/10 min) ir tirpinamos 150 µl distiliuoto vandens.

2.5.2. Plazmidžių skyrimas šarminės denatūracijos metodu

Plazmidės buvo skiriamos šarminės denatūracijos metodu (Maniatis ir kt., 1982). 10 ml EFA1 terpėje per naktį auginta bakterijų kultūra buvo surenkama centrifuguojant (3200 g/20 min). Nusėdusios ląstelės buvo suspenduojamos 3 ml (1 tūris) 50 mM gliukozės, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, lizocimo (10 mg/ml) tirpalo, o gauta ląstelių suspensija laikoma 15 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos buvo įpilami 6 ml (2 tūriai) šviežiai paruošto 0,2 N NaOH ir 1% SDS tirpalo. Švelniai sumaišius suspensija buvo laikoma apie 15-20 min. kambario temperatūroje, kol ląstelės visiškai lizuoja ir tirpalas praskaidrėja. Tuomet buvo įpilama 4,5 ml (1,5 tūrio) 5 M CH₃COONH₄ tirpalo ir švelniai sumaišius mėgintuvėlis paliekamas ledo vonioje apie 1,5–2 valandas, kol susidaro varškės konsistencijos nuosėdos. Gautas tirpalas centrifuguojamas (3200 g/15 min.) supernatantas perpilamas į švarų mėgintuvėlį ir pridedama 6 ml (2 tūriai) atšaldyto etilo alkoholio. Viskas sumaišoma, apverčiant mėgintuvėlį kelis kartus ir paliekama –20°C temperatūroje 2 ir daugiau valandoms. Iškritusios nuosėdos, surenkamos centrifuguojant (3200 g/20 min.), nuosėdos išdžiovinamos ir ištirpinamos nedideliame kiekyje vandens..

2.5.3. DNR veikimas restrikcijos endonukleazėmis ir produkto analizė

DNR buvo veikama įvairiomis restrikcijos endonukleazėmis ir jų deriniais laikantis UAB „Fermentas“ pateiktų rekomendacijų. Po to DNR buvo frakcionuojama 1% agarozės gelyje elektroforezės pagalba. DNR fragmentų molekulinės masės buvo nustatomos lyginant su Gene Ruler™ DNA ladder Mix žinomų molekulinų masių fragmentais.

2.5.4. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė buvo atliekama 0,8–1% agarozės gelyje TAE buferiniame tirpale (50 – kartinis TAE buferinis tirpalas: Tris-OH – 121 g, Na₂EDTA – 18,6 g, acto rūgštis 99,5% – 28,6 ml, H₂O iki 500 ml). Po

elektroforezės gelis buvo dažomas 5–10 minučių 0,005% etidžio bromido tirpale ir analizuojamas UV šviesoje.

2.5.5. 16S rDNR polimerazės grandininė reakcija

16S rDNR polimerazės grandininė reakcija buvo atliekama naudojant **T personal 20** (Biometra®) PGR aparatą, laikantis gamintojo rekomendacijų. Darbe buvo panaudota UAB „Fermentas“ *Taq* polimerazė bei WOO1 ir WOO2 pradmenys (Godon ir kt., 1997) "*Roth*", Vokietija.

Šiame darbe naudotos PGR programos:

1. 94°C 3 min.
2. 94°C 1 min., 55°C 1 min., 72 °C 4 min. – 29 ciklai.
3. 72°C 10 min.
4. 4°C

2.5.6. DNR polimerazės grandininė reakcija

Fragmentų DNR polimerazės grandininė reakcija buvo atliekama naudojant **T personal 20** (Biometra®) PGR aparatą, laikantis gamintojo rekomendacijų. Darbe buvo panaudota UAB „Fermentas“ *Taq* polimerazė (Maxima PCR mix) bei pradmenys „*Metabion*“ Vokietija.

Šiame darbe naudotos PGR programos:

1. 94°C 5 min.
2. 94°C 1 min., 50-70 °C 1 min., 72 °C 0,75-1 min. – 29 ciklai.
3. 72°C 5 min.
4. 4°C

2.5.7. DNR fragmento skyrimas iš agarozinio gelio

Tiriama plazmidė buvo hidrolizuojama reikiamomis restrikcijos endonukleazėmis ar PGR produktai ir analizuojami elektroforezės pagalba. Reikiamų dydžių fragmentai buvo išpjaunami iš gelio ir išskiriami naudojant DNR ekstrakcijos rinkinį laikantis UAB „Fermentas“ pateiktų rekomendacijų. Išpjautas agarozės gabalėlis, turintis fragmentą buvo dedamas į mėgintuvėlį ir

užpilamas 30-50 µl natrio jodidu. Taip paruoštas pavyzdys buvo inkubuojamas 5 min. termostate 55 °C temperatūroje. Ištirpus agarozei, į mėgintuvėlį buvo įdedama 5 µl silicio miltelių suspensijos, gerai sumaišoma ir vėl inkubuojama 5 min. 55 °C temperatūroje. Adsorbuota prie silicio miltelių DNR buvo nusodinama centrifuguojant (10000 g/1 min.). Tuomet nuosėdos buvo užpilamos 500 µl praplovimo buferiniame tirpale, viskas gerai suspenduojama ir centrifuguojama kaip aprašyta aukščiau. Šis etapas buvo kartojamas 3 kartus. Po paskutinio praplovimo ant nucentrifuguotų nuosėdų buvo užpilama 30 µl dejonizuoto vandens ir mėgintuvėlis paliekamas 5 min. 55 °C temperatūroje. Po centrifugavimo atsargiai surinktas supernatantas buvo perkeliamas į švarų mėgintuvėlį ir analizuojamas agarozės gelyje ar liguojamas su reikiama plazmide.

2.5.8. DNR ligavimas

DNR buvo liguojama naudojant T4 DNR ligazę (UAB „Fermentas“), liguojama su plazmidiniu vektoriumi, hidrolizuotu atitinkama restrikcijos endonukleaze, 4 °C temperatūroje 24 val. arba 1 val. kambario temperatūroje (22 °C). Ligavimo mišinys, norint inaktyvuoti ligazę, kaitinamas 10 min. 65 °C temperatūroje. Po to mišinys atvėsinaamas ir transformuojamas į *E. coli* DH5α ląsteles.

2.5.9. Kompetentinių *E. coli* ląstelių ruošimas ir klonavimas

E. coli DH5α kamienas buvo auginamas 3–4 valandas 25 ml NA terpės aeruojant 30 °C temperatūroje, kol optinis tankis (A_{600}) pasieks 0,3-0,5. Tuomet bakterijų suspensija buvo atšaldoma ledo vonioje 5-10 minučių ir centrifuguojama (3200 g/10 min.). Nupylus auginimo terpę ląstelės buvo tris kartus praplaunamos 10 ml šalto 10% glicerolio tirpalo: suspenduojamos glicerolio tirpale ir centrifuguojamos aukščiau minėtomis sąlygomis. Gauta ląstelių suspensija buvo resuspenduojama 1 ml 10% glicerolio tirpale ir naudojama elektroporacijai.

Prieš elektroporaciją ląstelės buvo 20 min. šaldomos ledo vonioje, o kiuvetės 20 min. šaldomos šaldiklyje $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Į 100 μl elektrokompetentinių ląstelių buvo dedamas 1 μl DNR ir sumaišoma. Tuomet DNR ir ląstelių suspensija buvo perpilama į atšaldytą 1 mm plyšio pločio kiuvetę. Elektroporacija buvo atliekama naudojant 2 kV/cm^2 įtampą. Elektros impulso trukmė buvo 4–5 ms. Po elektroporacijos ląstelės skubiai buvo užpilamos 100 μl NB terpės, suspensija perkeliama į švarų mėgintuvėlį. Ląstelės inkubuojamos 45 min. $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės buvo išsėjamos ant standžios agarizuotos NA terpės su IPTG, X-gal ir ampicilinu (50 $\mu\text{g/ml}$) (Sharma ir Schimke, 1994).

2.5.10. Rekombinantinių baltymų indukcija *E. coli* ląstelėse

Plazmidę turinčios *E. coli* BL21 (DE3) ląstelės buvo auginamos NB terpėje su antibiotiku, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje per naktį. 200 μl tokios naktinės kultūros buvo pernešama į 20 ml NB terpės su antibiotiku ir auginama toliau kol optinis tankis, esant 600 nm bangos ilgiui, bus 0,3–0,5. Tuomet į auginimo terpę buvo įdedama 0,1 mM IPTG ir auginama toliau, dar 6–20 valandų. Ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant, praplaunamos 0,9% NaCl tirpalu ir ruošiamas beląstelinis ekstraktas.

2.5.11. Genų bibliotekos kūrimas ir atranka

Genominė DNR buvo karpoma su atitinkamomis restriktazėmis ir susidarę DNR fragmentai liguojami su atitinkama pUC19 perkirpta plazmide. Kompetentinės DH5 α kamieno ląstelės buvo transformuojamos auksčiau gautais ligavimo mišiniais ir išsėjamos ant standžios NA terpės su ampicilinu, X-gal ir IPTG. Baltos spalvos kolonijos buvo atrenkamos ir tikrinamos PGR metodu.

2.5.12. Nukleotidų sekos nustatymas

Plazmidinės DNR skyrimas nukleotidų sekos nustatymui. Plazmidės buvo skiriamos naudojant ZYMO Plasmid PREP rinkinį.

DNR koncentracijos nustatymas. DNR koncentracija buvo nustatoma agarozės gelyje elektroforezės būdu naudojant Mass RulerTM DNA Ladder (High Range) molekulinės masės ir kiekio žymenis.

Nukleotidų sekos nustatymas. Nukleotidų sekų nustatymui buvo naudojami standartiniai M13/pUC pradmenys. DNR nukleotidų sekos buvo nustatytos MacroGen (Pietų Korėja).

Nukleotidų sekos analizė. Nustatytų sekų chromatogramos buvo analizuojamos naudojant Chromas 2.24 programą (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>), o nukleotidų sekos analizuojamos Vector NTI AdvanceTM 9.0 programa (Gorelenkov ir kt., 2001). Nukleotidų ir aminorūgščių sekų palyginimai buvo atliekami BLAST grupės programomis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

Filogenetinė 16SrRNR geno analizė buvo atliekama naudojant Neighbor-Joining metodą (MEGA 4.0 programa). Panašiausi homologai buvo parenkami The Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>) ir BLAST grupės programomis.

2.6. De novo peptidų sekos nustatymas

Mėginio paruošimas. Baltymo juostelė iš poliakrilamidinio gelio buvo išpjaujama ir susmulkinama į ~1 x 1 x 1 mm kubelius skalperiu, kurie buvo blukinami su 25 mM amonio bikarbonato 50 % acetonitrile, redukuojami DTT, alkilinami iodoacetamidu ir dehidratuojami. Dehidratuotas gelis buvo išmirkomas su 100 ng tripsino 25 mM amonio bikarbonato tirpale. Baltymas proteolizuojamas tripsinu per naktį 37 °C. Kitą dieną peptidai buvo ekstrahuojami su 5% trifluoroacto rūgštimi (TFA), liofilizuojami ir ištirpinami 10 µl 0,1% TFA. Toks tirpalas užnešamas ant ZipTip kolonėlės ir peptidai išplaunami 4 µl 0,1% TFA 50% acetonitrilu, laikantis gamintojo rekomendacijų. Mėginiai paruošiami MALDI analizei užnešant po 0,5 µl mėginio ir virš jo po 0,5 µl matrikso (α -ciano-4-hidroksicinamono rūgštis (CHCA), 4 mg/ml 50% acetonitrile su 0,1 % TFA) ant 384 pozicijų MALDI plokštelės.

MS konfigūracija. Peptidų masių spektrų gavimui buvo naudojamas Applied Biosystems/MDS SCIEX 4800 MALDI TOF/TOF™ masių spektrometras (VU Biochemijos instituto Proteomikos centras), kuris kalibruojamas angiotenzino I, Glu-fibrino ir ACTH (1-17) peptidais *MS reflector* režime ir angiotenzino I fragmentais *MS/MS* režime. Peptidų masių spektrai buvo gaunami „*MS reflector positive*“ režime. Kiekviename spektre dominuojantys pikai buvo fragmentuojami *MS/MS* režime. „*MS reflector positive*“ režimo nustatymai: M/z ribos: 800-4000; Lazerio intensyvumas: 3570; Lazerio šūvių skaičius: 400; Nustatomos masės tikslumas: ±50 ppm. „*MS/MS positive*“ režimo nustatymai: Kolizijos energija: 1 keV; Nenaudota kolizijos-disociacija; Lazerio intensyvumas : 4370; Lazerio šūvių skaičius: 500; Fragmentų masės tikslumas: ±0.1 Da. MS darbus atliko dr. Marija Ger (VU Biochemijos institutas Proteomikos centras).

Gauti masių spektrai buvo naudojami sekų generavimui GPS Explorer™ De Novo Explorer programoje.

2.7. Baltymo erdvinės struktūros modeliavimas ir analizavimas

Baltymo erdvinė struktūra buvo modeliuojama automatinio modeliavimo sąranka, esančia <http://swissmodel.expasy.org/> portale.

DNR molekulės erdvinė struktūra paimta iš <http://www.rcsb.org> portalo.

Erdvinės struktūros buvo analizuojamos RasWin 2.6 programa.

2.8. Bakterijų atranka

5-Hidroksipikolino rūgštį skaidančių bakterijų atrankai 1 g dirvožemio, buvo įdėtas į konusinę 250 ml talpos kolbą ir užpiltas 20 ml mineralinės EFA1 terpės, praturtintos 0,15% 5-hidroksipikolino rūgšties. Kolba buvo auginama aeruojant ir kratant orbitinių kratytuvu 180 aps./min. tris paras 30°C temperatūroje. Tuomet 1 ml terpės buvo perneštas į tokią pačią terpę su 5-hidroksipikolino rūgštimi ir inkubuojamas anksčiau nurodytomis sąlygomis. Po trijų parų auginimo 50 µl kultūros buvo išsėta Petri lėkštutėse ant standžios EFA1 terpės su 5-hidroksipikolino rūgštimi ir inkubuota 30 °C temperatūroje.

Buvo atrenkamos mikroorganizmų kolonijos, gaminančios neląstelinį žalios ar rudos spalvos pigmentus ir kilpele persėjamos ant standžios EFA1 terpės su 5-hidroksipikolino rūgštimi. Lygiagrečiai atskiros kolonijos, pasižymėjusios 5-hidroksipikolino rūgšties skaidymu buvo persėtos ir ant standžio NA terpės. Tokiu būdu buvo išskirtas bakterinis kamienas transformuojantis 5-hidroksipikolino rūgštį.

2.9. Beląstelinio ekstrakto paruošimas

Užauginta bakterijų kultūra (250 ml) buvo centrifuguojama (6000 g/20 min). Ląstelės buvo praplautos 0,9% NaCl tirpalo ir centrifuguojamos (6000 g/20 min). Biomasė buvo suspenduojama 3 ml 20 mM kalio fosfato buferiniame tirpale, pH 7.0–7.5 ir suardoma ultragarsu 22 kHz 3 min., kas 30 s aušinant ledo – vandens vonioje 1 min. Nesuardytos ląstelės, stambios nuolaužos ir kiti stambūs elementai buvo pašalinami centrifuguojant (10000 g/15 min).

2.10. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje

Baltymų gel-elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje buvo atliekama pagal standartines metodikas (Laemmli, 1970), naudojant 4,5% koncentruojantį ir 10-14% skirstomąjį gelius. Baltymai buvo dažomi Coomassie Brilliant Blue G250 dažais. Gelis atplaunamas 10% acto rūgštimi.

2.11. Fermentų aktyvumo nustatymas

2.11.1. 5-Hidroksipikolinato 2-monooksigenazės aktyvumo nustatymas

5-Hidroksipikolino rūgšties dekarboksilinimo-hidroksilinimo fermentinis aktyvumas buvo matuojamas 30 °C temperatūroje, pagal sunaudotą NADH kiekį ($\epsilon_{340} = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reakcijos mišinį sudarė 20 mM kalio fosfato buferinis tirpalas pH 7,0 100 μM 5-hidroksipikolino rūgšties 100 μM NADH 5 μM FAD ir atitinkamas beląstelinio ekstrakto kiekis. Bendras mišinio tūris buvo 1 ml. Vienas 5-hidroksipikolinato 2-monooksigenazės aktyvumo vienetas

buvo toks fermento kiekis, kuris per 1 minutę 30 °C temperatūroje hidroksilina 1 μmol 5-hidroksipikolino rūgšties.

2.11.2. Nikotinato 6-hidroksilazės aktyvumo nustatymas

Nikotino rūgšties hidroksilinimo fermentinis aktyvumas buvo matuojamas 30°C temperatūroje, pagal sunaudotą kalio fericianido kiekį ($\epsilon_{417} = 1040 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reakcijos mišinį sudarė 10 mM kalio fosfato buferinis tirpalas pH 7,0 150 μM nikotino rūgšties 300 μM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ir atitinkamas beląstelinio ekstrakto kiekis. Bendras mišinio tūris buvo 1 ml. Vienas nikotinato 6-hidroksilazės aktyvumo vienetas – tai toks fermento kiekis, kuris per 1 minutę 30 °C temperatūroje hidroksilina 1 μmol nikotino rūgšties (Kitts ir kt., 1989).

2.11.3. 6-Hidroksinikotinato 3-monooksigenazės aktyvumo nustatymas

6-Hidroksinikotino rūgšties dekarboksilinimo-hidroksilinimo fermentinis aktyvumas buvo matuojamas 30 °C temperatūroje, pagal sunaudotą NADH kiekį ($\epsilon_{340} = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reakcijos mišinį sudarė 10 mM kalio fosfato buferinis tirpalas pH 7,2 100 μM 6-hidroksinikotino rūgšties 100 μM NADH 5 μM FAD ir atitinkamas beląstelinio ekstrakto kiekis. Bendras mišinio tūris buvo 1 ml. Vienas 6-hidroksinikotinato 3-monooksigenazės aktyvumo vienetas – tai toks fermento kiekis, kuris per 1 minutę 30 °C temperatūroje hidroksilina 1 μmol 6-hidroksinikotino rūgšties (Nakano ir kt., 1999).

2.11.4. Pikolinato 6-hidroksilazės aktyvumo nustatymas

Pikolino rūgšties hidroksilinimo fermentinis aktyvumas buvo matuojamas 30 °C temperatūroje, pagal sunaudotą DCPIP kiekį ($\epsilon_{340} = 16000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reakcijos mišinį sudarė 10 mM kalio fosfato buferinis tirpalas pH 7,2, 100 μM pikolino rūgšties 100 μM DCPIP 5 μM PMS ir atitinkamas beląstelinio ekstrakto kiekis. Bendras mišinio tūris buvo 1 ml. Vienas 3-hidroksipiridino 6-monooksigenazės aktyvumo vienetas – tai toks fermento kiekis, kuris per 1 minutę 30 °C temperatūroje hidroksilina 1 μmol pikolino rūgšties.

2.11.5. 2,5-Dihidroksipiridino dioksidazės aktyvumo nustatymas

2,5-Dihidroksipiridino oksidavimo fermentinis aktyvumas buvo matuojamas 30 °C temperatūroje, pagal sunaudotą 2,5-dihidroksipiridino kiekį ($\epsilon_{320} = 5200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Gauthier ir kt., 1971). Reakcijos mišinį sudarė 1 mM kalio fosfatinis buferis pH 7,5, 200 μM 2,5-dihidroksipiridino, 1 μM FeSO_4 , ir atitinkamas beląstelinio ekstrakto kiekis. Bendras mišinio tūris buvo 1 ml. Vienas 2,5-dihidroksipiridino dioksidazės aktyvumo vienetas – tai toks fermento kiekis, kuris per 1 minutę 30 °C temperatūroje oksiduoja 1 μmol 2,5-dihidroksipiridino (Gauthier ir kt., 1971; Orpin ir kt., 1972; Cain ir kt., 1974).

2.11.5. Deaminazių aktyvumo nustatymas

Deaminazės fermentinis aktyvumas buvo matuojamas 30 °C temperatūroje, pagal susidariusį NH_4^+ kiekį. Reakcijos mišinį sudarė 50 mM kalio fosfatinis buferis pH 7,2, 250 μl Neslerio reagento, 2,2 ml H_2O ir atitinkamas beląstelinio ekstrakto kiekis. Bendras mišinio tūris 2,5 ml. Vienas deaminazės aktyvumo vienetas – tai toks fermento kiekis, kuris per 1 minutę 30 °C temperatūroje deaminina 1 μmol nikotinamido (Yuodvalkite ir kt., 1982).

2.11.6. Nuo NADH priklausomų reduktazių fermentinio aktyvumo nustatymas po baltymų elektroforezės

Baltymai buvo frakcionuojami 10-15% poliakrilamidiniame gelyje natyviomis sąlygomis. Po baltymų frakcionavimo gelis buvo perkeliamas į indą su 50 mM Tris-HCl buferiu, pH 7,0-7,5, pridedama NADH (galutinė koncentracija 100 μM) ir NBT (galutinė koncentracija 100 μM), jei reikia substrato 200 μM ir PMS 1 μM , ir inkubuojamas kambario temperatūroje 60–120 min (Molnar ir kt., 2004).

2.12. Fermentų gryninimas

2.12.1. Nikotinato dehidrogenazės iš *Sinorhizobium* sp. L-1 išskyrimas ir gryninimas

Sinorhizobium sp. L-1 kamienas buvo auginamas EFA1 terpėje su nikotino rūgštimi, aeruojant 30 °C temperatūroje per naktį. Tokia naktine kultūra buvo inokuliuojami 4 l EFA1 terpės su nikotino rūgštimi ir bakterijos toliau buvo auginamos fermentatoriuje, kaip nurodyta 2.4. metuose. Užauginta bakterijų kultūra buvo surenkama centrifuguojant (4000 g 60 min.), praplaunama 0,9% NaCl tirpalu ir vėl centrifuguojama (10000 g 15 min.). Gauta biomasė buvo suspenduojama 20 mM kalio fosfatiniame buferyje pH 6,9, turinčiame 1 mM MgSO₄ ir ardoma 80 kartų po 30 sekundžių 22 kHz ultragarsu ledo vonioje. Ląstelių nuolaužos buvo pašalinamos centrifuguojant (10000 g 15 min.). Po centrifugavimo beląstelinis ekstraktas pirminėje baltymų gryninimo stadijoje buvo centrifuguojamas ultracentrifuga 35 000 rpm 100 000 g 1,5 val. Nuosėdos surinktos ir ištirpintos 20 mM kalio fosfatiniame buferyje pH 6,9, turinčiame 0,25% Triton X-100. Į tokį tirpalą pridedant amonio sulfato iki 30% sotumo, buvo išsodinama nikotinato hidroksilazė. Išsėdę baltymai iš koloidinio tirpalo buvo išskiriami juos centrifuguojant 10000 g/15 min. Išsėdę baltymai buvo tirpinami 20 mM kalio fosfatiniame buferyje pH 7,0, turinčiame 1 mM MgSO₄ ir 0,25% Triton X-100 ir dializuojami per naktį tokia pačia buferyje, tik be Triton X-100. Kitame gryninimo etape, dializuotas baltyminis tirpalas buvo frakcionuojamas SuperQ-650M sorbentu užpildytoje chromatografinėje kolonėlėje (20 ml), kuri buvo praplauta 20 mM pH 6,9 kalio fosfato buferiniu tirpalu, turinčiame 0,02% Triton X-100. Išplovus iš kolonos visus šiomis sąlygomis nesisorbavusius baltymus ir tolygiai didinant joninę jėgą (0–0,5 M NaCl), baltymai buvo toliau išplaunami. Frakcijos, turėjusios didžiausią hidroksilazinį aktyvumą buvo apjungiamos ir dializuojamos, aukščiau minėtomis sąlygomis. Į dializuotą pavyzdį buvo pridedamas amonio sulfatas iki 0,55 M, tokiu būdu pavyzdys paruoštas hidrofobinei chromatografijai. Resource 15PHE sorbentu užpildyta kolonėlė (8 ml) buvo praplaunama 20 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu pH 6,9, kuriame buvo 0,55

M amonio sulfato. Baltymai, kurie sorbavosi tokiomis sąlygomis kolonėlėje, laipsniškai buvo eliuojami mažėjančia druskos koncentracija. Apjungus aktyvumu pasižymėjusias frakcijas, atplovus nuo druskų ir sukcentravus 20 mM kalio fosfatiniame buferiniame tirpale pH 6,9 fermentinis preparatas buvo paruošiamas kitai kolonėlei. Panaudojant Resource 15Q sorbentu užpildytą kolonėlę (4 ml), sulygsvarintą aukščiau minėtu buferiniu tirpalu, hidroksilazė analogiškomis DEAE chromatografijai sąlygomis buvo gryninama toliau. Frakcijos, pasižymėjusios nikotinato hidroksilaziniu aktyvumu buvo apjungiamos. Į tokį pavyzdį buvo pridedamas acetonitrilas, iki galutinės koncentracijos 3% ir užnešama ant Resource RPC 3ml kolonėlės. Baltymai buvo frakcionuojami didėjančia acetonitrilo koncentracija. Tokiu eliuavęsi baltymai buvo praplaunami 20 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu pH 6,9 ir sukcentruojami.

2.12.2. 2,5-Dihidroksipiridino dioksidazės iš *Sinorhizobium* sp. L-1 išskyrimas ir gryninimas

Nikotinato hidroksilazės gryninimo metu imamas ultracentrifugavimo nuopilas ir iš jo išsodinami baltymai 32-42% amonio sulfato gradientu. Išsėdę baltymai dializuojami 20 mM kalio fosfato buferiniame tirpale pH 7,6. Dializuotas pavyzdys užnešamas ant SuperQ-650M sorbentu užpildytos kolonėlės (20 ml) ir desorbuojami didėjančia jonine jėga (0-1 M NaCl). Frakcijos, turėjusios didžiausią 2,5-dihidroksipiridino oksidazės aktyvumą buvo apjungiamos ir dializuojamos, aukščiau minėtomis sąlygomis. Į dializuotą pavyzdį buvo pridedama amonio sulfato iki galutinės 1,25 M koncentracijos, tokiu būdu paruošiant pavyzdį hidrofobinei chromatografijai. Resource 15PHE užpildyta kolonėlė (8 ml) buvo praplaunama 20 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu, kuriame buvo 1,25 M amonio sulfato. Baltymai, kurie sorbavosi tokiomis sąlygomis kolonėlėje, laipsniškai buvo eliuojami mažėjančia druskos koncentracija. 2,5-Dihidroksipiridino oksidazės aktyvumu pasižymėjusių baltymų frakcijos buvo apjungiamos ir atplovus nuo druskų ir sukcentravus buvo paruošiamos anijoniniai rechromatogramai

Resource 15Q sorbentu užpildytai (4 ml) kolonėlei. Analogiškomis SuperQ chromatografijai sąlygomis buvo gryninama toliau. Frakcijos, pasižymėjusios 2,5-dihidroksipiridino oksigenaziniu aktyvumu buvo apjungiamos.

2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazė iš *Sinorhizobium* sp. L-1 kamienas buvo auginamas EFA terpėje su 3-hidroksipiridinu, aeruojant 30°C temperatūroje per naktį. Tokia naktine kultūra buvo inokuliuojamas 2 l EFA terpės su 3-hidroksipiridinu ir bakterijos toliau buvo auginamos 48 valandas. Užauginta bakterijų kultūra buvo surenkama centrifuguojant (6000 g/30 min.), praplaunama 0,9% NaCl tirpalu ir vėl centrifuguojama (10000 g/15 min.). Gauta biomasė buvo suspenduojama 20 mM kalio fosfato buferiniame tirpale ir ardoma 20 kartų po 30 sekundžių 22 kHz ultragarsu ledo vonioje. Ląstelių nuolaužos buvo pašalinamos centrifuguojant (10000 g/20 min.). Visos gryninimo sąlygos yra analogiškos aukščiau aprašytosioms tik hidrofobinė chromatografija atliekama esant 0,75 M amonio sulfato.

2.12.3. Pikolinato dehidrogenazės iš *Achromobacter* sp. JS18 išskyrimas ir gryninimas

Achromobacter sp. JS18 kamienas buvo auginamas EFA1 terpėje su pikolino rūgštimi, aeruojant 30 °C temperatūroje per naktį. Tokia naktine kultūra buvo inokuliuojamos 1 l kolbos, užpildytos 250 ml EFA1 terpės su pikolino rūgštimi. Užauginta bakterijų kultūra buvo surenkama centrifuguojant (4000 g 60 min.), praplaunama 0,9% NaCl tirpalu ir vėl centrifuguojama (10000 g 15 min.). Gauta biomasė buvo suspenduojama 20 mM kalio fosfato buferiniame tirpale pH 7,5, turinčiame 1 mM DTT ir ardoma 30 kartų po 30 sekundžių 22 kHz ultragarsu ledo vonioje. Ląstelių nuolaužos buvo pašalinamos centrifuguojant (10000 g 15 min.). Po centrifugavimo beląstelinis ekstraktas pirminėje baltymų gryninimo stadijoje buvo centrifuguojamas ultracentrifuga 35000 rpm 100 000 g 1,5 val. Baltymai iš nuopilo išsodinami 15-40% amonio sulfato gradientu. Išsėdę baltymai buvo tirpinami 20 mM kalio fosfato buferiniame tirpale pH 7,5, turinčiame 1 mM DTT ir 1 mM EDTA ir dializuojami per naktį tokia pačia buferiniame tirpale. Kitame gryninimo

etape, dializuotas baltyminis tirpalas buvo frakcionuojamas GigaCapQ-650M sorbentu užpildytoje chromatografinėje kolonėlėje (36 ml), kuri buvo sulygsvarinta 20 mM pH 7,5 kalio fosfatinu buferiniu tirpalu, turinčiame 1 mM DTT. Išplovus iš kolonos visus šiomis sąlygomis nesisorbavusius baltymus ir tolygiai didinant joninę jėgą (0–0,5 M NaCl) baltymai buvo desorbuojami. Frakcijos, turėjusios didžiausią hidroksilazinių aktyvumą buvo apjungiamos ir dializuojamos, aukščiau minėtomis sąlygomis. Į dializuotą pavyzdį buvo pridodamas natrio sulfatas iki 0,55 M, tokiu būdu pavyzdys paruošiamas hidrofobinei chromatografijai. Resource 15PHE sorbentu užpildyta kolonėlė (8 ml) buvo praplaunama 20 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu pH 7,5, turinčiame 1 mM DTT, kuriame taip pat buvo 0,55 M natrio sulfato. Baltymai, kurie sorbavosi tokiomis sąlygomis kolonėlėje, laipsniškai buvo eliuojami mažėjančia druskos koncentracija. Apjungus aktyvumu pasižymėjusias frakcijas, atplovus nuo druskų ir sukonzentravus 20 mM kalio fosfato buferiniame tirpale pH 7,5 fermentinis preparatas buvo paruošiamas kitai kolonėlei. Panaudojant Resource 15Q sorbentu užpildytą kolonėlę (4 ml), sulygsvarintą tokiu pačiu buferiniu tirpalu, hidroksilazė analogiškomis GigaCapQ chromatografijai sąlygomis buvo gryninama toliau. Frakcijos, pasižymėjusios pikolinato hidroksilaziniu aktyvumu buvo apjungiamos ir sukonzentruojamos. Pavyzdys toliau buvo gryninamas – analizuojamas gel-filtracijos metodu SuperDex G200 10/30 kolonėle.

2.12.4. Nikotino dehidrogenazės iš *Achromobacter* sp. JS18 kamieno išskyrimas ir gryninimas

Achromobacter sp. JS18 kamienas buvo auginamas EFA1 terpėje su nikotino rūgštimi, aeruojant 30 °C temperatūroje per naktį. Tokia naktine kultūra buvo inokuliuojamos 1 l kolbos, užpildytos 250 ml EFA1 terpės. Užauginta bakterijų kultūra buvo surenkama centrifuguojant (4000 g 60 min.), praplaunama 0,9% NaCl tirpalu ir vėl centrifuguojama (10000 g 15 min.). Gauta biomasė buvo suspenduojama 20 mM kalio citrato buferiniame tirpale pH 5,8, turinčiame 1 mM DTT ir 1mM EDTA ir ardoma 20 kartų po 30

sekundžių 22 kHz ultragarsu ledo vonioje. Ląstelių nuolaužos buvo pašalinamos centrifuguojant (10000 g 15 min.). Po centrifugavimo beląstelinis ekstraktas pirminėje baltymų gryninimo stadijoje buvo centrifuguojamas ultracentrifuga 35000 rpm 100 000 g 1 val. Baltymai iš nuopilo išsodinami 27-38% amonio sulfatu. Išsėdę baltymai buvo tirpinami 10 mM kalio citrato buferiniame tirpale pH 5,8 turinčiame 1 mM DTT ir 1 mM EDTA dializuojami per naktį tokia pačia buferiniame tirpale. Kitame gryninimo etape, į dializuotą baltyminių tirpalą buvo pridedamas 100 mM kalio fosfato buferinis tirpalas pH 7,2 iki galutinės 10 mM fosfato koncentracijos ir titruojama iki pH 7,2. Taip paruoštas pavyzdys buvo užnešamas ant GigaCapQ-650M sorbentu užpildytoje chromatografinėje kolonėlėje (36 ml), kuri buvo sulygsvarinta 20 mM pH 7,2 kalio fosfato buferiniu tirpalu, turinčiame 1 mM DTT. Išplovus iš kolonos visus šiomis sąlygomis nesisorbavusius baltymus ir tolygiai keičiant buferinio tirpalo prigimtį ir pH į 20 mM kalio citratinį pH 5,7 buvo desorbuojami baltymai. Frakcijos, turėjusios didžiausią hidroksilazinį aktyvumą buvo apjungiamos ir dializuojamos, aukščiau minėtomis sąlygomis. Į dializuotą pavyzdį buvo pridedamas amonio sulfatas iki 0,55 M, tokiu būdu pavyzdys paruošiamas hidrofobinei chromatografijai. Resource 15PHE sorbentu užpildyta kolonėlė (8 ml) buvo praplaunama 20 mM kalio citrato buferiniu tirpalu pH 5,8 kuriame buvo 1 mM DTT ir 0,55 M amonio sulfato. Baltymai, kurie sorbavosi tokiais sąlygomis kolonėlėje, laipsniškai buvo eliuojami mažėjančia druskos koncentracija. Apjungus aktyvumu pasižymėjusias frakcijas, atplovus nuo druskų ir sukonzentravus 10 mM kalio citrato buferiniame tirpale pH 5,8, turinčiame 1 mM DTT. Pridedant kalio fosfato buferinį tirpalą ir keičiant preparato pH iki 7,2 (aukščiau minėtomis sąlygomis) preparatas buvo paruošiamas kitai kolonėlei. Panaudojant Resource 15Q sorbentu užpildytą kolonėlę (4 ml), sulygsvarintą tokiu pačiu buferiniu tirpalu, hidroksilazė buvo eliuojama tolygiai didėjančia NaCl (0–0,5 M) koncentracija. Frakcijos, pasižymėjusios nikotinato hidroksilaziniu aktyvumu buvo apjungiamos.

2.12.5. 2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės iš *Achromobacter* sp. JS18 išskyrimas ir gryninimas

Achromobacter sp. JS18 kamienas buvo auginamas EFA1 terpėje su nikotino rūgštimi, aeruojant 30 °C temperatūroje per naktį. Tokia naktinė kultūra buvo inokuliuojama 1 l kolbos, užpildytos 250 ml EFA1 terpės. Užauginta bakterijų kultūra buvo surenkama centrifuguojant (4000 g 60 min.), praplaunama 0,9% NaCl tirpalu ir vėl centrifuguojama (10000 g 15 min.). Gauta biomasė buvo suspenduojama 20 mM kalio fosfato buferiniame tirpale pH 7,6 ir ardoma 20 kartų po 30 sekundžių 22 kHz ultragarsu ledo vonioje. Ląstelių nuolaužos buvo pašalinamos centrifuguojant (10000 g 15 min.). Baltymai iš nuopilo išsodinami 30-42% amonio sulfato gradientu. Išsėdę baltymai dializuojami 20 mM kalio fosfato buferiniame tirpale pH 7,6. Dializuotas pavyzdys užnešamas ant SuperQ-650M sorbentu užpildytos kolonėlės (20 ml) ir desorbuojami didėjančia jonine jėga (0-1 M NaCl). Frakcijos, turėjusios didžiausią 2,5-dihidroksipiridino oksigenazės aktyvumą buvo apjungiamos ir dializuojamos, aukščiau minėtomis sąlygomis. Į dializuotą pavyzdį buvo pridedama amonio sulfato iki galutinės 0,75 M koncentracijos, tokiu būdu paruošiant pavyzdį hidrofobinei chromatografijai. Resource 15PHE užpildyta kolonėlė (8 ml) buvo praplaunama 20 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu, kuriame buvo 0,75 M amonio sulfato. Baltymai, kurie sorbavosi tokiomis sąlygomis kolonėlėje, laipsniškai buvo eliuojami mažėjančia druskos koncentracija. 2,5-Dihidroksipiridino oksigenazės aktyvumu pasižymėjusių baltymų frakcijos buvo apjungiamos ir atplovus nuo druskų ir sukonzentravus buvo paruošiamos anijoniniai rechromatogramai Resource 15Q sorbentu užpildytai (4 ml) kolonėlei. Analogiškomis SuperQ chromatografijai sąlygomis buvo gryninama toliau. Frakcijos, pasižymėjusios 2,5-dihidroksipiridino oksigenaziniu aktyvumu buvo apjungiamos.

2.12.6. 5-Hidroksipikolinato 2-monooksigenazės iš *Pusillimonas* sp. 5HP išskyrimas ir gryninimas

Pusillimonas sp. 5HP kamienas buvo auginamas 50 ml talpos centrifuginiuose mėgintuvėliuose, užpildytuose 5 ml EFA2 terpės su 5-hidroksipikolino rūgštimi, aeruojant 30 °C temperatūroje apie 80 val. Užauginta bakterijų kultūra buvo surenkama centrifuguojant (3200 g 10 min.), praplaunama 0,9% NaCl tirpalu ir vėl centrifuguojama (10000 g 10 min.). Gauta biomasė buvo suspenduojama 20 mM kalio fosfato buferiniame tirpale pH 7,5, ir ardoma 22 kHz ultragarsu ledo vonioje. Ląstelių nuolaužos buvo pašalinamos centrifuguojant (10000 g 15 min.). Po centrifugavimo beląstelinis ekstraktas pirminėje baltymų gryninimo stadijoje buvo užnešamas ant afininės AF-Blue-650M 5ml sorbentu užpildytos ToyoScreen kolonėlės, sulygsvarintos 20 mM pH 7,5 kalio fosfato buferiniu tirpalu. Išplovus iš kolonos visus šiomis sąlygomis nesisorbavusius baltymus, eliuavimas buvo vykdomas dviem etapais: 1) atplaunant 2-3 kolonos tūriais 20% sacharozės turinčiu buferiniu tirpalu, 2) užnešimo buferiniu tirpalu. Monooksigenazė eliuavosi kartu su užnešimo buferiniu tirpalu. Frakcijos, turėjusios monooksigenazinį aktyvumą buvo apjungiamos, dializuojamos. Toks dializuotas pavyzdys buvo toliau gryninamas ir koncentruojamas Resource 15Q sorbentu užpildytą kolonėlę, sulygsvarintą 20 mM pH 7,5 kalio fosfato buferiniu tirpalu. Tokiomis sąlygomis sorbavęsi baltymai buvo eliuojami tolygiai didėjančia jonine jėga (0-0,5 M NaCl). Apjungtos aktyvumu pasižyminčios frakcijos buvo toliau gryninamos – analizuojamos gel-filtraciniu metodu Superdex 200 HR 10/30 kolonėle.

2.13. Baltymų molekulinės masės nustatymas gel-filtraciniu metodu

Baltymų pavyzdžiai buvo analizuojami Superdex 200 HR 10/30 kolonėle. Analizei buvo naudojamas 20 mM kalio fosfato buferinis tirpalas pH 7,2, turintis 0,15 M NaCl. Pavyzdžio tūris kito nuo 100 iki 500 µL.

2.14. Įvairių substratų skaidymas intaktinėse ląstelėse

2.14.1 *Achromobacter* sp. JS18 intaktinėse ląstelėse

JS18 bakterijos buvo auginamos per naktį EFA1 terpėje su 0,2% pikolino, nikotino ar dipikolino rūgšties, 30 °C temperatūroje. 1 ml naktinės kultūros buvo persėjama į 1 l talpos kolbas su 250 ml EFA1 terpės, praturtintos 0,2% to paties piridininio junginio ir auginamos 1-1,5 paros, 30°C temperatūroje aeruojant. Ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant (30 min./6000 g), praplaunamos 0,9% NaCl tirpalu ir vėl centrifuguojamos (30 min./6000 g). Tuomet surinkta biomasė buvo suspenduojama 50 mM kalio fosfato buferiniame tirpale, pH 7,2. Reakcijos mišinį sudarė 50 mM kalio fosfato buferinis tirpalas, pH 7,2, 100–200 μM tiriamo substrato ir ląstelių suspensija. Bendras reakcijos mišinio tūris buvo 1 ml.

2.14.2 *Pusillimonas* sp. 5HP intaktinėse ląstelėse

5HP bakterijos buvo auginamos 50 ml centrifuginiame mėgintuvėlyje su 5 ml EFA2 terpės su 0,15% 3-hidroksipiridinu, pikolino, nikotino ar benzoine rūgštimi, 30 °C temperatūroje 3-4 paros aeruojant. Ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant (10 min./6000 g), praplaunamos 0,9% NaCl tirpalu ir vėl centrifuguojamos (10 min./6000 g). Tuomet surinkta biomasė buvo suspenduojama 50 mM kalio fosfato buferiniame tirpale, pH 7,2. Reakcijos mišinį sudarė 50 mM kalio fosfato buferiniame tirpale, pH 7,2, 100–200 μM tiriamo substrato ir ląstelių suspensija. Bendras reakcijos mišinio tūris buvo 1 ml.

2.15. Kiti metodai

Absorbcijos spektrai buvo užrašomi naudojantis Helios γ spektrofotometru. Eksperimentuose buvo panaudotos 1 cm kvarcinės ir 1 cm plastikinės kiuvetės.

Ultracentrifugavimas buvo atliekamas Beckman Coulter Optima L-100 XP ultracentrifuga. Naudojamas Type 70 Ti Fixed Angel 8 x 39 ml rotorius. Centrifuguojama buvo 90 min., esant 35000 rpm, generuojant 100 000 g.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Netradicinėse piridino žiedo hidroksilinančių ir hidroksilintų pikolino ir nikotino rūgščių skaidyme dalyvaujančių mikroorganizmų atranka buvo pasirinkta dėl unikalumo. Yra žinoma antibiotikų grupė turinti 3-hidroksi- ir 5-hidroksipiridin-2-karboksirūgštis, tačiau apie šių medžiagų skaidymą nieko nėra žinoma. Iki 1997 metų buvo žinoma, kad piridin-3-karboksirūgštis (nikotino rūgštis) yra hidroksilinama tik 6-oje pozicijoje, bet Tinschert ir kolegos atliko bakterijų paiešką ir aptiko *Rastonia (Burkholderia)* DSM 6920 bakterinį kamieną, hidroksilinantį nikotino rūgštį 2-oje pozicijoje (Tinschert ir kt., 1997). Jų sėkmės įkvėpti, vienu iš darbo tikslų išskėlėme mikroorganizmų galinčius hidroksilinti ir/ar skaidančius hidroksilintas neįprastose vietose piridino monokarboksirūgštis paiešką ir identifikavimą. Šiam tikslui pasiekti yra galimos 3-ys skirtingos atrankos sistemos, vieninteliu anglies šaltiniu esant:

1. Piridino rūgščiai
2. Piridino rūgščiai su užblokuota hidroksilinimo padėtimi
3. Tarpiniam metabolitui (hidroksilintam dariniui)

Kiekviena iš šių atrankos sistemų turi savo trūkumų. 1-osios sistemos atveju būtų atrinkta daug (galbūt) įvairių bakterijų, tačiau didžioji bakterijų dalis piridino rūgštis metabolizuotų klasikiniu skaidymo keliu. 2-osios – blokavimui naudojami pakaitai gali būti toksiški, trukdyti hidroksilinimui (dėl fermento didelio specifškumo) ar būti metabolizuojami patys. 3-osios sistemos trūkumas – gali būti atrinktos bakterijos negalinčios hidroksilinti, bet galinčios metabolizuoti hidroksilintas piridino rūgštis. Tyrimams buvo pasirinkta 3-ioji atrankos sistema naudojant: 3-hidroksi- ir 5-hidroksipiridin-2-karboksirūgštis ir 2-hidropiridin-3-karboksirūgštis.

3.1. *Achromobacter* sp. JS18 tyrimas

3.1.1. Piridinkarboksirūgščių biokonversija intaktinėmis *Achromobacter* sp. JS18 ląstelėmis

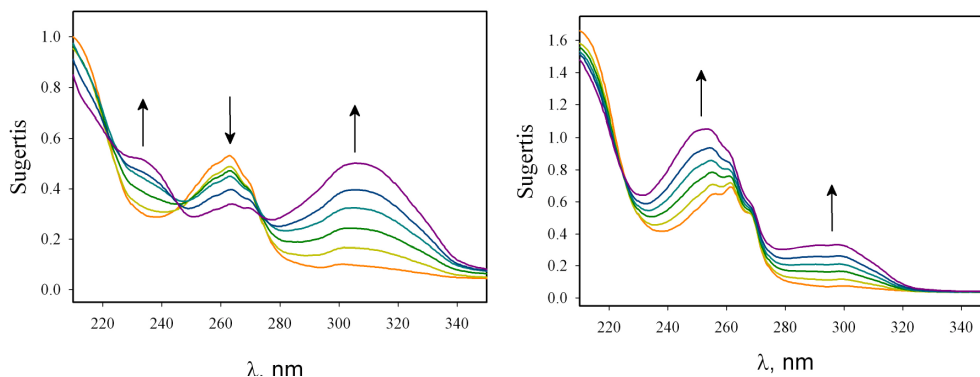
Achromobacter sp. JS18 bakterijos buvo išgrynintos ir identifikuotos ankstesnių darbų metu. Nustatyta, kad šios bakterijos gali įsisavinti nikotino, pikolino ir dipikolino rūgštis (Kutanovas, 2006).

Šio darbo metu buvo ieškoma bakterijų galinčių metabolizuoti 3-hidroksipiridin-2-karboksirūgštį (3-hidroksipikolinatą). Buvo ieškoma ne tik naujų bakterijų, bet ir tikrinami laboratoriniai kamienai. Tuo tikslu buvo tikrinamas laboratorinių kamienų gebėjimas skaidyti 3-hidroksipiridin-2-karboksirūgštį ant standžios EFA1 terpės. Teigiamas rezultatas – spalvos atsiradimas. Tokiu būdu buvo pakartotinai atrinktas JS18 kamienas ir tiriamas šio darbo metu. Tyrimų eigoje buvo nustatyta, kad bakterijų gebėjimas transformuoti 3-hidroksipiridin-2-karboksirūgštį yra prarandamas. Jau pirmojo bakterijų persėjimo ant standžios terpės su 3-hidroksipiridin-2-karboksirūgštimi, ir nesant induktoriui, o 3-hidroksipiridin-2-karboksirūgštis nėra induktorius, bakterijos negalėjo augti.

Todėl buvo tiriama piridin-2-karboksirūgštis (pikolinato), piridin-3-karboksirūgštis (nikotinato) ir piridin-2,6-dikarboksirūgštis (dipikolinato) skaidymas intaktinėse ląstelėse. Darbo metu buvo siekiant nustatyti, ne tik skaidymo eigą, bet ir kuri iš šių medžiagų gali indukuoti 3-hidroksipiridin-2-karboksirūgštis skaidymą. Buvo nustatyta, kad skaidymas intaktinių ląstelių suspensijoje vyksta be papildomų kofaktorių, kosubstratų ar metalo jonų. Pagal reakcijos metu sunaudoto substrato kiekį ir sugerties spektro pasikeitimus buvo sprendžiama apie kultūros aktyvumą. *Achromobacter* sp. JS18 bakterinio kamieno ląstelės, augintos skystoje EFA1 terpėje su dipikolino, pikolino ir nikotino rūgštimis, kaip vieninteliu anglies bei azoto šaltiniu, ir atplautos nuo kultūrinės terpės komponentų, efektyviai vartojo aukščiau minėtas rūgštis.

Achromobacter sp. JS18 bakterijos augintos su dipikolino rūgštimi galėjo transformuoti pastarąją rūgštį. Deja, transformacijos metu neatsirado

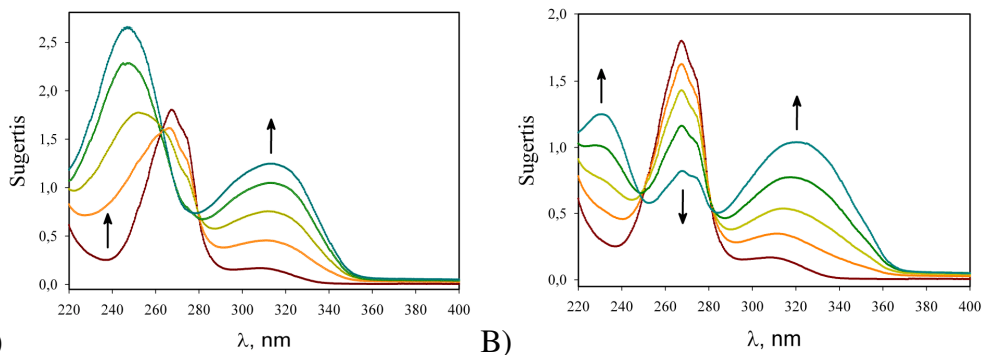
papildomų spektro smailių, kaip nurodo Kobayashi ir bendraautoriai (Kobayashi ir kt., 1962), todėl neįmanoma pasakyti kokie yra galimi tarpiniai metabolitai. Be to, *Achromobacter* sp. JS18 bakterijos negalėjo įsisavinti kitų dikarboksirūgščių: piridin-2,3-, piridin-2,4- ir piridin-2,5-dikarboksirūgščių bei nitrilų: piridin-2,6-dikarbonitrilo, 6-metilpiridin-2-karbonitrilo ir piridin-3-karbonitrilo. Ląstelės užaugintos indukuotai piridin-2,6-dikarboksirūgštimi, po neilgo apie 30 min. lag periodo, jau efektyviai mažino piridin-2-karboksirūgšties ir piridin-3-karboksirūgšties koncentracijas reakcijos mišinyje. Analogiški produktų spektrai susidaro stebint piridin-2-karboksirūgšties transformaciją, šiuo junginiu indukuotose ląstelėse, ir stebint piridin-3-karboksirūgšties transformaciją, šiuo junginiu indukuotose ląstelėse. Šių transformacijų metu aiškiai buvo matyti spektro pasikeitimai, susidarant 6-hidroksipiridin-2-karboksirūgščiai ir 6-hidroksipiridin-3-karboksirūgščiai (3.1 pav.). Tai buvo patvirtinta sulyginus su esamomis hidroksipiridinkarboksirūgščių sugerties spektrais. Abiem piridino monokarboksirūgščių transformacijos metu vyksta hidroksilinimas į 6-ąją padėtį.



3.1 pav. Piridin-2-karboksirūgšties ir piridin-3-karboksirūgšties transformacijos JS18 ląstelėmis, susidarant 6-hidroksipiridin-2-karboksirūgščiai ir 6-hidroksipiridin-3-karboksirūgščiai, atitinkamai. Biomasė (auginta 2 paras 40 ml EFA1 terpės su 0,2% piridinkarboksirūgštimi) buvo suspenduota 10 ml 50 mM kalio fosfato buferinis tirpalas, pH 7,2. Bendrą reakcijos mišinį (1 ml) sudarė 50 mM kalio fosfato buferinis tirpalas, pH 7,2, 0,15 mM piridinkarboksirūgšties ir bakterijų suspensija. Sugerties spektrai užrašyti po 0, 10, 20, 30, 45 ir 60 min. inkubacijos.

Nustačius, kad piridin-2- ir piridin-3-karboksirūgštys yra skaidomos, susidarant monohidroksilintiems dariniams, buvo nuspręsta ištirti monohidroksipiridino karboksilinių rūgščių transformaciją. Tiriant 6-hidroksipiridin-3-karboksirūgšties įsisavinimą, piridin-3-karboksirūgštimi indukuotose ląstelėse, pastebėtas spektro pasikeitimas būdingas 2,5-dihidroksipiridinui. 2-Hidroksipiridin-3-karboksirūgšties transformacija piridin-3-karboksiline rūgštimi indukuotose ląstelėse vyksta žymiai lėčiau, susidarant (kaip spėjama) 2,6-dihidroksipiridin-3-karboksirūgščiai, UV spektre papildomai atsirandant smailei 316 nm bangos ilgyje. Be to karboksilo grupei būdinga smailė išlieka toje pačioje spektro vietoje. Deja 2-hidroksipiridin-3-karboksirūgšties transformacija yra labai lėta, o susidariusio dihidroksi autooksidacija ore, susidarant mėlynos spalvos junginiui, labai greita. Susidarantis mėlynos spalvos produktas, spėtinai yra chinoninis dimeras, pagal analogiją su trihidroksipiridinų autooksidacijos mėlynos spalvos produktais (Gupta ir kt., 1975; Shukla ir kt., 1986; Holmes ir kt., 1972).

Literatūroje yra duomenų, kad bakterijos skaidančios nikotino rūgštį (piridin-3-karboksirūgštį) gali transformuoti ir pirazin-2-karboksirūgštį (Wiesser ir kt., 1997; Yang ir kt., 2009), todėl buvo nuspręsta ištirti kaip ir ar išvis JS18 kamienas gali transformuoti šią rūgštį. Tyrimų eigoje buvo nustatyta, kad JS18 kamieno ląstelės užaugintos indukuotai piridin-3-karboksirūgštimi, gali transformuoti pirazin-2-karboksirūgštį (3.2 A pav.) ir piridazin-3-karboksirūgštį, pagal analogiją su piridin-3-karboksirūgštimi, hidroksilinant į *para* padėtį, pakaito atžvilgiu. Susidaręs hidroksilintas junginys toliau nėra metabolizuojamas. Deja, kitų junginių pirimidin-3-karboksirūgšties, piridin-3-karbonitrilo ir pirazin-2-karbonitrilo JS18 ląstelės indukuotos piridin-3-karboksirūgštimi transformuoti negalėjo.

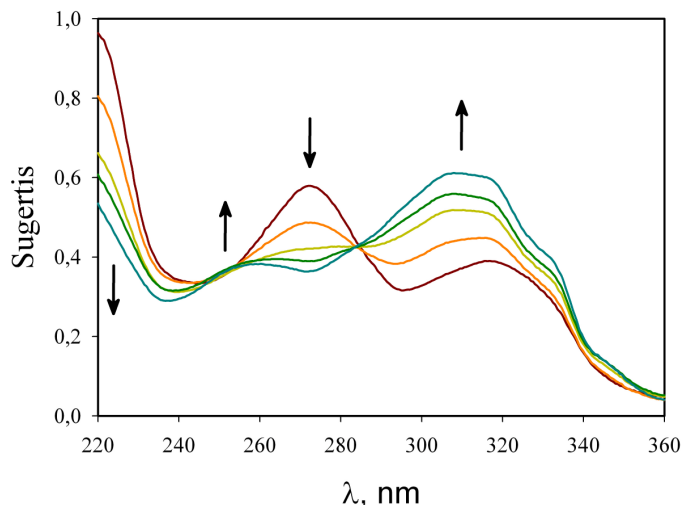


3.2 pav. Pirazin-2-karboksirūgšties biokonversija intaktinėmis *Achromobacter* sp. JS18 ląstelėmis užaugintomis indukuotai A) piridin-3-karboksirūgštimi ir B) piridin-2-karboksirūgštimi. Pirazin-2-karboksirūgšties koncentracija 0,15 mM. Sugerties spektrai užrašyti po 0, 7, 18, 30 ir 45 min. inkubacijos. Biomės paruošta kaip aprašyta 3.1 pav.

Tiriant monohidroksilintų piridin-2-karboksirūgščių skaidymą JS18 ląstelių indukuotų piridin-2-karboksirūgštimi suspencijoje gauta, kad ląstelės tokiu pačiu greičiu gali įsisavinti tiek 6-hidroksipiridin-2-karboksirūgštį, tiek 2,5-dihidroksipiridiną, t.y. labai lėtai palyginus su piridin-2-karboksirūgšties ir 3-hidroksipiridin-2-karboksirūgšties įsisavinimu. Galbūt taip yra todėl, kad ląstelėse nėra 6-hidroksipiridin-2-karboksirūgšties ir 2,5-dihidroksipiridino transporto sistemos. Įdomu tai, kad ląstelės galėjo ypač greitai suvartoti 6-hidroksipiridin-2-karboksirūgštį, susidarant 2,5-dihidroksipiridinui (nustatyta palyginus su 2,5-dihidroksipiridino spektru). Tokiu būdu 3-hidroksipiridin-2-karboksirūgšties skaidymas vyksta lygiai taip pat kaip ir piridin-2-karboksirūgštinės rūgšties, t.y. susidarant kaip manoma 3,6-dihidroksipiridin-2-karboksirūgščiai, kuri vėliau yra dekarboksilinama susidarant 2,5-dihidroksipiridinui. Piridin-2-karboksirūgšties ir 3-hidroksipiridin-2-karboksirūgšties hidroksilinimą į 6-ąją padėtį katalizuoja tas pats fermentas – pikolinato dehidrogenazė, tai buvo patvirtinta fermentiškai (žiūrėti 3.3 skyrių).

Achromobacter sp. JS18 ląstelės indukuotos piridin-2-karboksirūgštimi galėjo transformuoti pirazin-2-karboksirūgštį (3.2 B pav.) ir 5-hidroksipiridin-2-karboksirūgštį (3.3 pav.), kaip spėjama abiem atvejais hidroksilinant į *meta* padėtį pakaito atžvilgiu. Susidarę junginiai toliau nebuvo metabolizuojami. Deja kitų junginių – piridazin-3-karboksirūgšties, piridazin-4-karboksirūgšties,

pirimidin-2-karboksirūgšties, piridin-3-karbonitrilo ir pirazin-2-karbonitrilo – *Achromobacter* sp. JS18 ląstelės, indukuotos piridin-3-karboksirūgštimi, netransformavo.

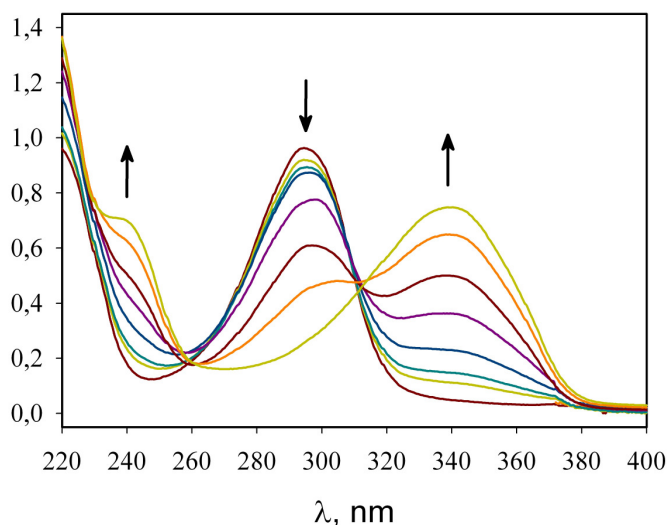


3.3 pav. 5-Hidroksipiridin-2-karboksirūgšties biokonversija intaktinėmis *Achromobacter* sp. JS18 ląstelėmis. 5-hidroksipiridin-2-karboksirūgšties koncentracija 0,15 mM. Sugerties spektrai užrašyti po 0, 20, 55, 115, 200 min. inkubacijos. Biomasės paruošta kaip aprašyta 3.1 pav.

Biokonversijos būdu pagaminus 5- ir 6-hidroksipirazin-2-karboksirūgštis, buvo tiriama ar šios rūgštys gali būti toliau skaidomos JS18 ląstelėmis. Šiam tikslui pasiekti, JS18 ląstelės indukuotos piridin-2-karboksirūgštimi buvo perkeltos į 5-hidroksipirazin-2-karboksirūgšties tirpalą ir JS18 ląstelės indukuotos piridin-3-karboksirūgštimi perkeltos į 6-hidroksipirazin-2-karboksirūgšties tirpalą. Deja, abiem atvejais transformacija nevyko.

Literatūroje yra nurodomas spėjamas piridin-2,6-dikarboksirūgšties skaidymas, susidarant 3-hidroksipiridin-2,6-dikarboksirūgščiai, pasižyminčiais fluorescentinėmis savybėmis ir susidarant tarpiniam 2,3-dihidroksipiridino metabolitui (Kobayashi ir kt., 1962). Todėl buvo patikrinta, ar piridin-2,6-dikarboksirūgštimi indukuotos ląstelės gali įsisavinti spėjamą metabolitą – 5,6-dihidroksipiridin-2-karboksirūgštį, kaip spėjama, kuri buvo gauta JS18 ląstelių biokonversijos būdu (žiūrėti aukščiau). Tačiau JS18 ląstelės, indukuotos dikarboksirūgštimi negalėjo įsisavinti ne tik 5,6-dihidroksipiridin-2-karboksirūgšties, bet ir 2,3-dihidroksipiridino. Užtat galėjo skaidyti 2,5-

dihidroksipiridiną. Šie tyrimai leido daryti prielaidą, kad piridin-2,6-dikarboksirūgštis yra skaidoma nauju keliu. JS18 ląstelės indukuotos piridin-2,3-dikarboksiline rūgštimi, tokiu pačiu 2,5-dihidroksipiridino įsisavinimo greičiui, galėjo vartoti ir 6-hidroksipiridin-2-karboksirūgštį. Įdomu tai, kad piridin-2,6-dikarboksirūgštimi indukuotos JS18 ląstelės visiškai negalėjo transformuoti 5-hidroksipiridin-2-karboksirūgšties, o 3-hidroksipiridin-2-karboksirūgšties skaidymo metu susidaro nenustatytas produktas, kurio sugerties maksimumas yra ties 340 nm (3.4 pav.). Junginys nebuvo nustatytas, nes transformacija yra santykinai lėta, o ilgesnės transformacijos metu susidaro 2,5-dihidroksipiridininas, kuris ore lėvai autooksiduojasi.



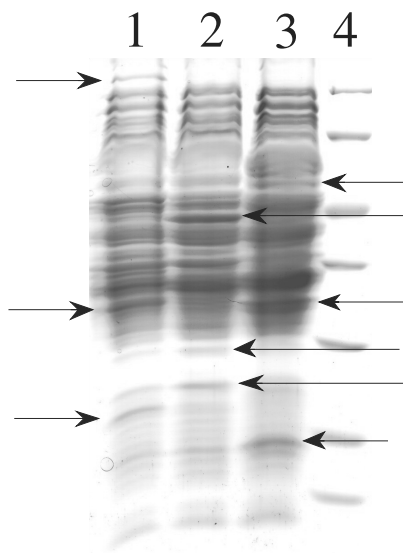
3.4 pav. 3-Hidroksipiridin-2-karboksirūgšties biokonversija intaktinėmis *Achromobacter* sp. JS18 ląstelėmis. 3-hidroksipiridin-2-karboksirūgšties koncentracija 0,15 mM. Sugerties spektrai užrašyti po 0, 15, 25, 35, 45, 70, 100, 140 ir 200 min. inkubacijos. Biomasa paruošta kaip aprašyta 3.1 pav.

Jei skirtingomis medžiagomis indukuotos JS18 ląstelės hidroksilino pirazin-2-karboksirūgštį į skirtingas pozicijas, tai buvo įdomu kaip ši rūgštis bus hidroksilinama ląstelėmis indukuotomis piridin-2,6-dikarboksirūgštimi. Transformacijos metu gauto produkto spektras buvo panašus į pirazin-2-karboksirūgšties transformacijos spektrus indukuotomis piridin-2-karboksirūgštimi ir piridin-3-karboksirūgštimi, skirtingos buvo tik sugertys, esant 240 ir 320 nm bangos ilgiuose. Kadangi pirazin-2-karboksirūgšties

koncentracija transformacijos, piridin-2-karboksirūgštimi ir piridin-3-karboksirūgštimi indukuotomis ląstelėmis, buvo vienoda, o susidarantis produktas nėra skaidomas, tai abiem atvejais gautų hidroksipirazin-2-karboksirūgščių spektrai buvo padauginti iš daugiklio. Kai daugiklių skaitinės vertės buvo artimos viena kitai, gautas matematinis sugerties spektras buvo beveik identiškas JS18 ląstelėms indukuotomis piridin-2,6-dikarboksirūgštimi, transformuojant pirazin-2-karboksirūgštį. Todėl šiuo atveju pirazin-2-karboksirūgštis yra hidroksilinama nespecifiškai, susidarant 5- ir 6-hidroksipirazin-2-karboksirūgščių mišiniui, santykiu artimu 1:1.

Reikėtų paminėti, kad JS18 ląstelės užaugintos neindukuotai, t.y. su vieninteliu anglies šaltiniu acetatu, nė vieno iš aukščiau tirtų piridino junginių neskaidė.

Nustačius, kad piridinkarboksirūgščių skaidymas JS18 ląstelėse yra indukuojamas procesas, buvo nuspręsta ištirti produkuojamus baltymus poliakrilamidiniame gelyje, denatūruojančiomis sąlygomis, elektorforetiniu metodu (3.5 pav.).



3.5 pav. *Achromobacter* sp. JS18 kamieno baltymų biosintezės ypatybės, kultivuojant bakterijas terpėje su skirtingais anglies šaltiniais. 1 – su piridin-2-karboksirūgštimi, 2 – su piridin-3-karboksirūgštimi, 3 – piridin-2,6-dikarboksirūgštimi, 4 – molekulinų masių žymenys: 116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4 ir 14,4 kDa.

Gelyje akivaizdžiai matomi skirtumai tarp baltymų profilių, priklausomai nuo auginimo terpėje buvusio induktoriaus. Skirtumus sudaro ne tik vienokios ar kitokios molekulinės masės baltymo buvimas ar nebuvimas, bet ir produkuojamo baltymo kiekis.

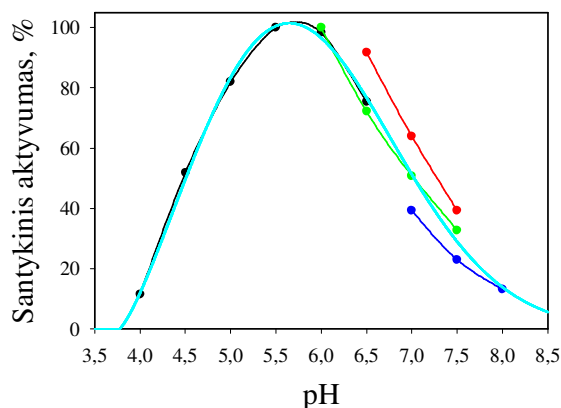
Nikotino rūgštis gyvuosiuose organizmuose yra sintetinama iš chinolino rūgšties, ją dekarboksilinant. Bet kaip yra skaidoma chinolino rūgštis žinoma labai mažai. Tėra žinoma, kad pirmajame etape ši rūgštis yra hidroksilinama 6-oje pozicijoje (Uchida ir kt., 2003a). Kaip parodyta šiame darbe, *Achromobacter* sp. JS18 bakterijos gali įsisavinti pikolino ir dipikolino rūgštis. Nors šie skaidymo keliai vyksta panašiai ir susidarant bendriems metabolitams, visgi šie skaidymo keliai yra indukuojami skirtingai. Buvo įdomu ar egzistuoja tokie mikroorganizmai gebantys chinolino rūgštį paversti pikolino rūgštimi ar koku kitu pikolino rūgšties hidroksilintu dariniu. Todėl atliekant paiešką, kurios metu buvo atrinktos *Achromobacter* sp. JS18, buvo atrinktos ir *Arthrobacter* sp. 68b. Tyrimai parodė, kad šios bakterijos indukuotos ftalio rūgštimi gali transformuoti chinolino rūgštį, susidarant junginiui turinčiam plačią sugerties sritį 300–350 nm bangos ilgyje. Todėl, tiriant *Arthrobacter* sp. 68b ląstelių vykdomą chinolino rūgšties transformaciją ir *Achromobacter* sp. JS18 ląstelių vykdomą 3-hidroksipikolino rūgšties skaidymą buvo tiriama ar ftalio ir dipikolino rūgščių skaidymai gali būti susieti.

3.1.2. Nikotinato dehidrogenazės iš *Achromobacter* sp. JS18 gryninimas ir tyrimas

Nustačius piridin-3-karboksirūgšties (nikotinato) skaidymo metabolitus, intaktinių JS18 ląstelių pagalba, buvo bandoma aptikti fermentus katalizuojančius metabolitų oksidaciją. Iš literatūros yra žinoma, kad pirmajame skaidymo etape dalyvaujanti dehidrogenazė yra dviejų tipų: 1) nuo NAD(P)H priklausoma arba 2) veikianti tik su dirbtiniais elektronų akceptoriais. Tiriant beląstelinį JS18 ekstraktą, buvo aptiktas nikotinato (piridin-3-karboksirūgšties) dehidrogenazės aktyvumas, matuojant su

firicianidinu. Tiriant šią dehidrogenazę, nustatyta, kad elektronų akceptoriais gali būti ne tik fericianidas, bet PMS, DCPIP, NBT ir cytochromu *c*.

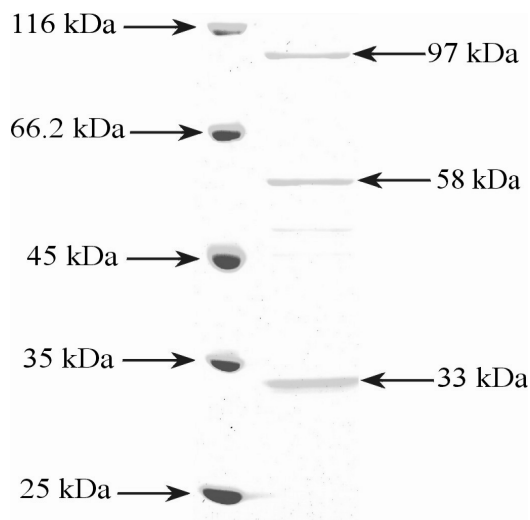
Tiriant fermentinio aktyvumo priklausomybę nuo pH nustatyta, kad optimalus veikimo pH – 5,5–6,0 (3.6 pav.). Šie duomenys visiškai skiriasi nuo žinomų nikotinato dehidrogenazių optimalaus veikimo pH – 7,0–8,5.



3.6 pav. Nikotinato dehidrogenazės iš *Achromobacter* sp JS18 kamieno aktyvumo priklausomybė nuo buferinio tirpalo prigimties ir pH. Aktyvumai buvo matuoti 100 mM buferiniuose tirpaluose, kuriuose buvo 0,2 mM kalio fericianido, 0,15 mM piridino-3-karboksirūgšties ir dalinai išgryninta nikotianto dehidrogenazė. — kalio citratinis buferis, — kalio MOPS buferis — kalio fosfatinis buferis — Tris-HCl buferis — matematinis modelis.

Prieš pradėdant fermentą gryninti buvo tiriamos fermento stabilumo savybės. Nustatyta, kad fermentą stabilizuojančiai veikia Mg^{2+} jonai (Ca^{2+} jonai įtakos neturi), redukuojančios medžiagos – DTT, Triton X-100, EDTA. Kaip manoma, EDTA stabilizuoja, dėl gebėjimo inhibuoti proteazes. Literatūroje yra nurodoma, kad nikotinato dehidrogenazė yra membraninis ar su membranomis asocijuotas fermentinis kompleksas. Todėl nustatyti ar ši nikotinato dehidrogenazė yra membraninė ar citozolinė buvo atlikta ultracentrifugavimo analizė. Centrifugavus JS18 beląstelinį ekstraktą 90 minučių generuojant 100 000 g jėgą, membraninėje frakcijoje buvo gauta, tik apie 17% nikotinato dehidrogenazės aktyvumo. Tai rodo, kad šis fermentas yra citozolinis. Gryninant fermentą buvo atsisakyta ultracentrifugavimo stadijos. Nikotinato dehidrogenazė iš *Achromobacter* sp. JS18 kamieno buvo išgryninta metodinėje dalyje nurodytomis sąlygomis, o gryninimo eiga pateikta 1-oje

lentelėje. Ši dehidrogenazė poliakrilamidiniame gelyje migruoja kaip 95, 56 ir 33 kDa dydžio baltymai (3.7 pav).



3.7 pav. Nikotinato dehidrogenazės iš *Achromobacter* sp. JS18 baltymų elektroforezė, denatūruojančiomis sąlygomis. 1 – Molekulinių masių žymenys: 116, 66,2, 45, 35 ir 25 kDa. 2 – nikotinato dehidrogenazė.

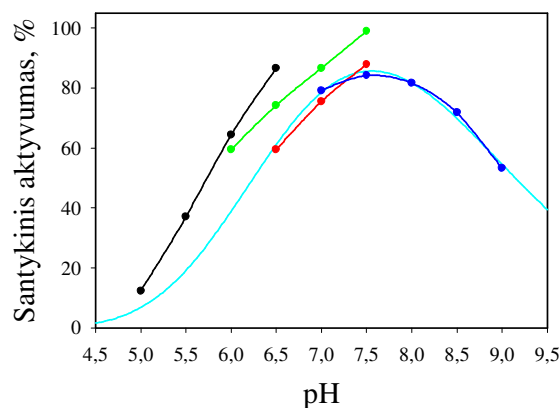
1 lentelė. Nikotinato dehidrogenazės iš *Achromobacter* sp. JS18 kamieno gryninimo eiga. Gryninimui naudota biomasė iš 1,5 litro terpės.

Gryninimo stadija	Aktyvumas, U	Baltymo kiekis, mg	Specifinis aktyvumas U/mg	Išgryninimas, kartais	Išeiga, %
Ekstraktas	280	725	0,39	1	100
24-38% amonio sulfatas	260	415	0,63	1,62	93
GigaCapQ	110	100	1,1	2,85	39,3
Resource 15PHE	27	44	0,61	1,6	9,65
Resource 15Q	15	19	0,79	2,05	5,36

Tiriant nikotinato dehidrogenazės savybes buvo nustatytas ir substratinis specifiškumas. Dehidrogenazė galėjo hidroksilinti pirazin-2-karboksi- ir piridazin-3-karboksi- rūgštis atitinkamai apie 20% ir 5% efektyvumu. Jokio aktyvumo nebuvo pastebėta su piridazin-4-karboksirūgštimi, pirimidin-2-karboksirūgštimi, piridino-3-karbonitrilu bei pirazino-2-karbonitrilu.

3.1.3. Pikolinato dehidrogenazės iš *Achromobacter* sp. JS18 gryninimas ir tyrimas

Literatūroje yra duomenų, kad tiek nikotinato, tiek pikolinato dehidrogenazių išgaunamo fermentinio aktyvumo kiekiai labai priklauso nuo molibdeno jonų kiekio auginimo terpėje. T.y. abiejų rūšių fermentai yra nuo molibdeno priklausomi ir priklauso ksantino dehidrogenazių šeimai. Todėl analogiškomis nikotinato dehidrogenazės aptikimo sąlygomis, JS18 ląstelėse indukuotose piridino-2-karboksirūgštimi (pikolinato), buvo ieškoma fermentinio aktyvumo, susijusio su piridino-2-karboksirūgšties hidroksiliniu. Jokio fermentinio aktyvumo nebuvo aptikta matuojant fericianidinėje sistemoje, kol nebuvo papildomai įdėta PMS. Esant PMS galutiniu elektronų akceptoriumi galėjo būti fericianidas, DCPIP, NBT. Įdomu tai, fermentas galėjo veikti ir vien tik esant NBT. Tiriant fermentinio aktyvumo priklausomybę nuo pH buvo nustatyta, kad jis yra optimalus pH esant apie 7,5 (3.8 pav.).



3.8 pav. Pikolinato dehidrogenazės iš *Achromobacter* sp JS18 kamieno aktyvumo priklausomybė nuo buferinio tirpalo prigimties ir pH. Aktyvumai buvo matuoti 100 mM buferiniuose tirpaluose, kuriuose buvo 0,2 mM kalio fericianido, 0,15 mM piridino-2-karboksirūgšties ir dalinai išgryninta pikolinato dehidrogenazė. — kalio citratinis buferis, — kalio MOPS buferis — kalio fosfatinis buferis — Tris-HCl buferis — matematinis modelis.

Tiriant pikolinato dehidrogenazės savybes buvo nustatyta, kad fermentas nėra specifiškas substratams. Dehidrogenazė galėjo hidroksilinti 3-hidroksipiridino-2-karboksi-, 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštis ir pirazino-

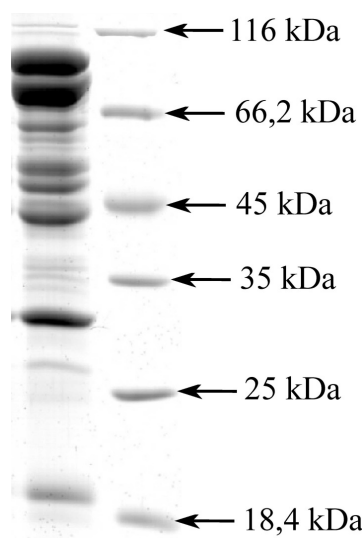
2-karboksirūgštis atitinkamai apie 85%, 7% ir 20% efektyvumu. Jokio aktyvumo nebuvo pastebėta su piridino-2,3-dikarboksirūgštimi, piridazino-3- ir piridazino-4-karboksirūgštimi, pirimidino-2-karboksirūgštimi, piridino-3-karbonitrilu bei pirazino-2-karbonitrilu.

Prieš pradėdant gryninti pikolinato dehidrogenazę, buvo atlikti analogiški nikotinato dehidrogenazei (žiūrėti ankstesnį skyrių) stabilumo tyrimai. Šios analizės parodė, kad beląsteliniame ekstrakte esančią dehidrogenazę stabilizuojančiai veikia EDTA, DDT, Triton X-100 ir Mg^{2+} jonai. Kadangi pH įtaka stabilumui buvo didesnė nei Mg^{2+} jonų įtaka esant pH iki 7 (perkopus pH 7 magnio jonai iškrenta į nuosėdas), buvo dirbama esant pH 7,5 ir be Mg^{2+} jonų. Nors ultracentrifugavimo tyrimas parodė, kad fermentas praktiškai visas išlieka tirpioje frakcijoje. Pagal metodinėje dalyje nurodytas sąlygas buvo dalinai išgryninta pikolinato dehidrogenazė. Gryninimo eiga pateikta 2-oje lentelėje.

2 lentelė. Pikolinato dehidrogenazės iš *Achromobacter* sp. JS18 gryninimo eiga. Gryninimui imtos ląstelės iš 8,5 litrų terpės.

Gryninimo stadija	Aktyvumas, U	Baltymo kiekis, mg	Specifinis aktyvumas mU/mg	Išgryninimas, kartais	Išeiga, %
Ekstraktas	36,0	5250	6,85	1	100
Ultracentrifugavimas	60,0	3860	15,55	2,27	166
20–40% amonio sulfatas	60,0	1580	40,0	5,84	166
GigaCapQ	32,0	220	145,5	21,25	88,9
Resource 15PHE	15,0	38,5	390,0	57	41,7
Resource 15Q	6,7	7,5	895	130	14,9
SuperDex G200	2,5	5	500	73	7

Natyvus fermentas gel-filtracinėje kolonėlėje migravo kaip 295 kDa dydžio baltymas. Baltymo spektrinė analizė parodė, kad baltymas absorbuoja ultravioletinę šviesą 320 nm bangos ilgyje, būdingoje Fe-S centrums, ir regimąją – 435 nm bangos ilgyje, kas leidžia įtarti esant flavininio tipo kofaktoriui. Fermento išgryninti iki homogeniškumo nepavyko, tačiau galima įtarti, kad natyvus fermentas yra sudarytas iš trijų subvienetų: 85, 43 ir 30 kDa dydžio (pav. 3.9).



3.9 pav. Pikolinato dehidrogenazės iš *Achromobacter* sp. JS18 baltymų elektroforezė, denatūruojančiomis sąlygomis. 1 – Pikolinato dehidrogenazė. 2 – Molekulinių masių žymenys: 116, 66,2, 45, 35, 25 ir 18,4 kDa.

3.1.4. 2,5-Dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazės iš *Achromobacter* sp. JS18 gryninimas ir tyrimas

Tiriant piridino-2- ir piridino-3-karboksirūgšties skaidymo ypatybes JS18 ląstelėse buvo nustatyta, kad ląsteles indukavus piridino-3-karboksirūgštimi, nepriklausomai nuo kultivavimo laiko, yra išgaunamas didesnis 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės kiekis. Todėl metodinėje dalyje nurodytomis sąlygomis, buvo gryninama 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazė iš piridino-3-karboksirūgštimi indukuotų *Achromobacter* sp. JS18 ląstelių. Gryninimo eiga pateikta 3 lentelėje.

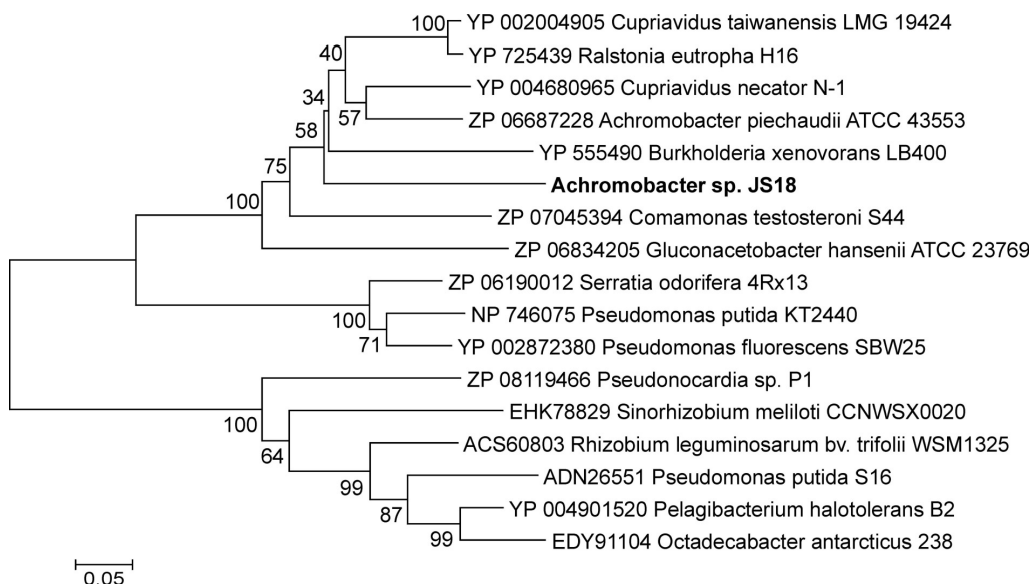
3 lentelė. 2,5-Dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazės iš *Achromobacter* sp. JS18 ląstelių gryninimo eiga.

Gryninimo stadija	Aktyvumas, U	Baltymo kiekis, mg	Specifinis aktyvumas U/mg	Išgryninimas, kartais	Išeiga, %
Ekstraktas	93	740	0,126	1	100
30–40% amonio sulfatas	44	310	0,142	1,13	47,3
GigaCapQ	26	87	0,3	2,38	28
Resource 15PHE	7,2	22	0,33	2,62	7,7
Resource 15Q	3,9	13	0,3	2,38	4,2

Dioksigenazės molekulinė masė nustatyta SDS-PAGE metodu yra 38,7 kDa. Natyvaus fermento molekulinė masė nustatyta gel-filtraciniu metodu yra apie 227±3 kDa. Kartu buvo gauta ir apie 87 kDa dydžio baltymo smailė. Kuri taip pat pasižymėjo dioksigenaziniu aktyvumu. Kadangi natyvus fermentas yra sudarytas iš šešių monomerų, galima manyti, kad 87 kDa dydžio gautas baltymas yra 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės dimeras.

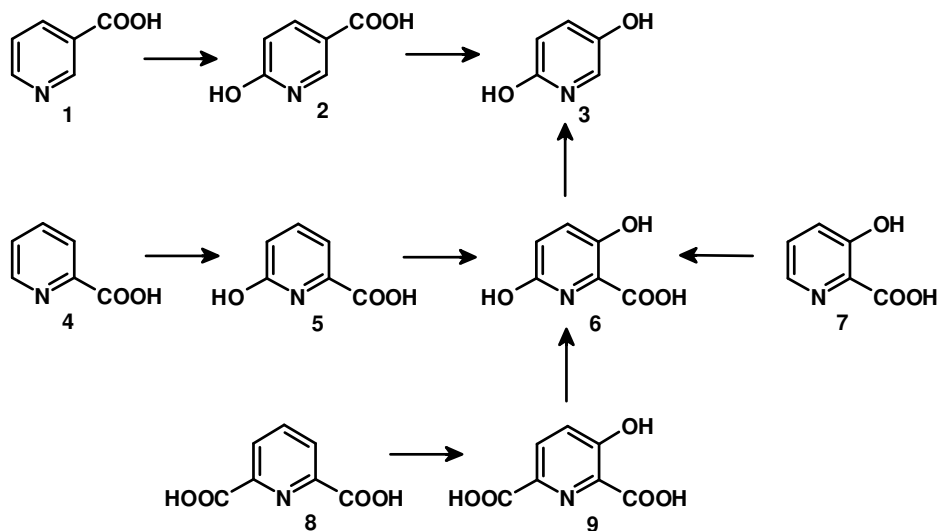
Išgryninus 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazę iki homogeniškumo ir atlikus baltymo peptidų MALDI analizę buvo identifikuoti keturi peptidai. BLASTA analizė parodė šių peptidų TGADTHPQTLR (E=3e-07), LVPSEADR (E=0,002), VLTEGPNEGKSEGR (E=0,009), EAHIGMDAR (E=6e-06) panašumą į *Achromobacter piechaudii* ATCC 43553 (ZP_06684487.1) hipotetinį baltymą EFF78588.1. Pagal šiuos peptidus, taip pat atsižvelgiant į baltymą koduojančią DNR seką, buvo sukurti keturi pradmenys P1F, P2F, P3R ir P4R. Panaudojus PGR metodą ir *Achromobacter* sp. JS18 bakterijų chromosominę DNR, buvo padauginti du apie 534 bp ir 786 bp kitimosi ilgio fragmentai. Šie fragmentai buvo klonuoti į pTZ59R/T plazmidę. Po transformacijos į *E. coli*, atrinktos dvi plazmidės (p12-32E ir p12-42Y) su 530 ir 780 bp ilgio fragmentais. Nustačius klonuotų DNR fragmentų nukleotidų sekas ir palyginus jas su genų banko duomenų baze bei atlikus filogenetinę analizę, galima teigti, kad buvo klonuota dalis 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės geno, kuris buvo labai artimas

Achromobacter piechaudii ATCC 43553 hipotetinio baltymo EFF78588.1 genui. 531 bp ir 786 bp fragmento patikimumo vertės $E=8e-114$ ir $E=2e-179$.



3.10 pav. 2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės fragmento iš *Achromobacter* sp. JS18 kamieno filogenetinis medis.

Apibendrinant biokonversijos intaktinėmis *Achromobacter* sp. JS18 ląstelėmis rezultatus buvo sudaryti spėjami piridino-2-karboksi-, piridino-3-karboksi- ir piridino-2,3-dikarboksi rūgščių skaidymo keliai (3.11 pav.).



3.11 pav. Spėjama piridino karboksirūgščių transformacija *Achromobacter* sp. JS18 ląstelėse. **1** – piridino-3-karboksirūgštis, **2** – 6-hidroksipiridino-3-karboksirūgštis, **3** – 2,5-dihidroksipiridinas, **4** – piridino-2-karboksirūgštis, **5** – 6-hidroksipiridino-2-karboksirūgštis, **6** – 3,6-dihidroksipiridino-2-karboksirūgštis, **7** – 3-hidroksipiridino-2-karboksirūgštis, **8** – piridino-2,6-dikarboksirūgštis, **9** – 3-hidroksipiridino-2,6-dikarboksirūgštis.

Nustatyta, kad piridino karboksirūgščių skaidymas *Achromobacter* sp. JS18 ląstelėse yra indukuojamas procesas. Nustatyta 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės iš *Achromobacter* sp. JS18, dalyvaujančios piridino karboksirūgščių skaidyme, koduojančios sekos dalis.

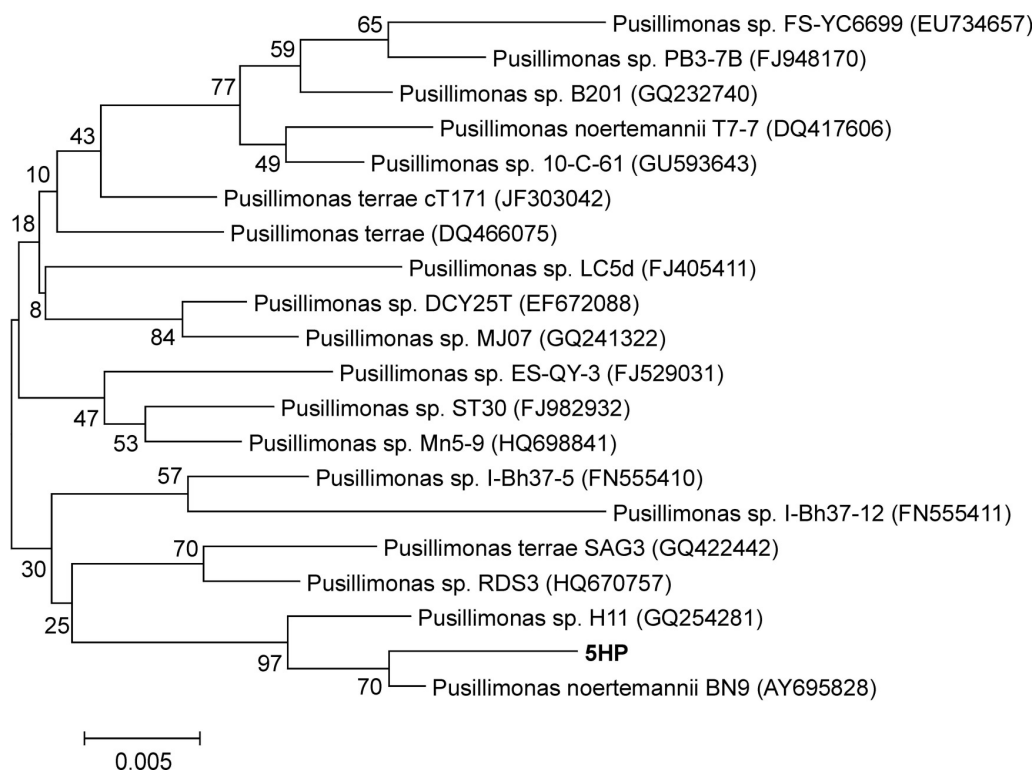
3.2. *Pusillimonas* sp. 5HP tyrimas

3.2.1. 5-Hidroksipikolino rūgštį skaidančių bakterijų atranka

Atrankoje buvo panaudotos metodinėje dalyje aprašytos selektyvios maitinamosios terpės bei praturtinimo metodai, minėtų grupių bakterijoms išskirti. Įvairūs dirvožemio pavyzdžiai buvo suspenduoti skystoje EFA1 terpėje su 0,15% 5-hidroksipikolino rūgštimi ir inkubuojami 30 °C temperatūroje 4 paras aeruojant. Jau po 2-3 parų maitinamoji terpė ėmė keisti spalvą į žalią, o po 3-4 – į rudą. Užaugusios kultūros buvo išsėtos ant standžios EFA1 terpės su 5-hidroksipikolino rūgštimi ir atrenkamos tos kolonijos, kurios sintetino neląstelinį, žalios spalvos pigmentą, kuris laikui bėgant tapdavo rudu. Literatūroje yra aprašyta, kad auginant neidentifikuotas Gram-neigiamas (Khana ir Shukla, 1977) ir *Achromobacter* sp. 2L (Cain ir kt., 1974) genties bakterijas terpėje su 3-hidroksipiridinu, taip pat buvo stebimas panašaus pigmento susidarymas. Išskirtų kolonijų gryninimas bei morfologinis tyrimas buvo atliekamas ant standžios NA terpės. Tokiu būdu iš įvairiomis cheminėmis medžiagomis užteršto dirvožemio buvo išskirtas naujas aerobinis bakterinis kamienas 5HP, galintis panaudoti 5-hidroksipikolino rūgštį kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį. Literatūroje yra aprašytas tik vienintelis atvejis, kai iš jūros makrofitų nuosėdų buvo išskirtos *Nocardia* sp., kurių augimo metu kaip metabolitas buvo identifikuota 5-hidroksipikolino rūgštis (Makareva ir kt., 1989). Todėl aptikus bakterinį kamieną, skaidantį 5-hidroksipikolino rūgštį, buvo nuspręsta atlikti šio mikroorganizmo genetinę identifikaciją. Buvo klonuoti mikroorganizmo 16S RNR koduojantys genai, atlikta 16S rDNR

restrikcijos fragmentų dydžio palyginamoji analizė bei nustatyta 16S rRNR seka koduojanti DNR seka.

16S RNR koduojantys genai buvo padauginti PGR metodu, naudojantis bakterijoms specifiniais WOO1 ir WOO2 pradmenimis (Godon ir kt., 1997). Amplifikuotas 1,5 kb dydžio DNR fragmentas buvo liguojamas su pUC57/T vektoriumi kaip nurodyta metodinėje dalyje. Nustačius klonuoto 1,5 kb dydžio DNR fragmento seką, buvo nustatyta naujai išskirto 5HP mikroorganizmo prigimtis. Pagal nustatytos 16S rDNR seką, buvo nustatytas sekos giminingumas naudojant grupių apjungimo metodą (The Ribosomal Database Project (RDPII), <http://rdp.cme.msu.edu/html/>). Ši analizė parodė, kad tai beta proteobakterija, *Pusillimonas* genties atstovas. Todėl vėliau 16S rDNR seka buvo analizuojama BLAST grupės programa, parenkant giminingiausias sekas. MEGA 4.0 programa buvo sudarytas giminingumo medis (3.12 pav.). Naujasis mikroorganizmas yra giminingiausias *Pusillimonas noertemannii* BN9 kamienui.



3.12 pav. 5HP 16S rRNR geno giminingumo medis. Po paveikslu pateiktas mastelis atitinka 5 bp pakitimus 1000 bp.

3.2.2. *Pusillimonas* sp. 5HP substratinis specifiškumas ir katabolizmo tyrimas intaktinėse ląstelėse

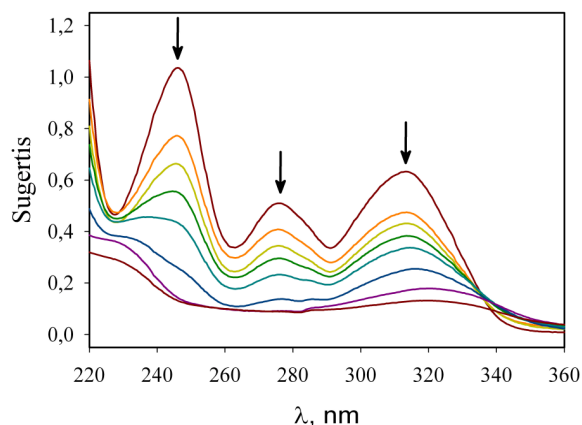
Iš literatūros yra žinoma, kad bakterijos naudojančios *N*-heterociklinius junginius kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį, taip pat gali įsisavinti ir jo homologus, todėl buvo nuspręsta ištirti 5HP bakterinio kamieno gebėjimą įsisavinti ir kitus aromatinus junginius. Tyrimams šis bakterinis kamienas buvo auginamas ant standžios EFA2 terpės su 0,15% 3-hidroksipiridino, piridino-3-karbonitrilo, 5-hidroksipiridino-2-karbonitrilo, 3-hidroksi-2-metilpiridino ir 5-hidroksi-2-metilpiridino, piridino-2-karboksi-, 3-hidroksipiridino-2-karboksi-, 6-hidroksipiridino-2-karboksi-, piridino-3-karboksi-, 2-hidroksipiridino-3-karboksi-, 6-hidroksipiridino-3-karboksi-, pirazino-2-karboksi-, 5-hidroksipirazino-2-karboksi-, 6-hidroksipirazino-2-karboksi-, piridino-2,5-karboksi-, piridino-2,6-karboksi-, benzoine, 2-hidroksibenzoine, 4-hidroksibenzoine ir indolo-3-karboksi- rūgštimis.

5HP bakterinis kamienas iš tirtų aromatinių junginių vieninteliais anglies šaltiniais naudojo tik 3-hidroksipiridiną, piridino-3-karbonitrilą, 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštį, piridino-3-karboksirūgštį, benzoinę ir 4-hidroksibenzoinę rūgštis. Žalios spalvos pigmento susidarymas ir jo autooksidacija iki rudos spalvos, buvo stebima ląstelės auginant su 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštimi ir esant didesnei nei 0,2% 3-hidroksipiridino koncentracijai. Šio pigmento susidarymas rodo, kad pastarųjų junginių katabolizmas vyksta per tarpinius dihidroksilintus piridino junginius (Ensign ir kt., 1963; Khana ir kt., 1976). Auginant 5HP ląsteles su nikotino rūgštimi, žalios spalvos pigmentas galėjo nesusidaryti dėl žymiai didesnio 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės kiekio. Piridino-3-karboksirūgštis (nikotinas) indukuoja žymiai stipresnį promotorių, nei kiti metabolitai (Jimenez ir kt., 2011). Priešingai nei tikėtasi, 5HP bakterijos negalėjo augti ant agarizuotos terpės su cinchomerono, dipikolino ir pikolino rūgštimis, 5-hidroksi-2-hidroksimetilpiridinu ir 5-hidroksipiridino-2-karbonitrilu. Nežiūrint to, kad 5HP kamieno ląstelės negalėjo augti ant agarizuotos terpės su šiais

junginiais, visgi bakterijų gebėjimas įsisavinti šiuos substratus buvo patikrintas su intaktinėmis ląstelėmis užaugintomis su pastaraisiais junginiais. Tačiau tokiomis sąlygomis užaugintos ląstelės nepasižymėjo aktyvumu ir nesiskyrė nuo intaktinių ląstelių užaugintų neindukuojančiomis sąlygomis. Šie tyrimai patvirtino, kad 5-hidroksi-2-hidroksimetilpiridinas, 5-hidroksipiridino-2-karbonitrilas, piridino-2-karboksi-, piridino-2,6-dikarboksi- ir piridino-2,5-dikarboksi- rūgštys nėra 5HP kamieno metabolitai ir neindukuoja jokių genų.

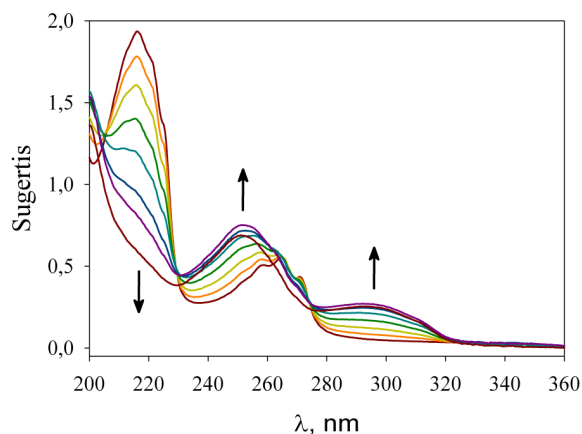
Tiriant 3-hidroksipiridino, piridino-3-karbonitrilo, 5-hidroksipiridino-2-karboksi-, piridino-3-karboksi-, benzoinės ir 4-hidroksibenzoinės rūgščių katabolizmą *Pusillimonas* sp. 5HP kamieno bakterijose, buvo bandoma spektrofotometriškai užfiksuoti šių junginių ir spėjamų metabolitų suvartojimą tiesiog pačiose intaktinėse ląstelėse. Buvo nustatyta, kad skaidymas intaktinių ląstelių suspensijoje vyksta be papildomų kofaktorių, kosubstratų ar metalo jonų. Pagal reakcijos metu sunaudoto substrato kiekį ir sugerties spektro pasikeitimus buvo sprendžiama apie kultūros aktyvumą ir metabolitus.

5HP bakterinio kamieno ląstelės, augintos skystoje EFA terpėje su 3-hidroksipiridinu ir atplautos nuo kultūrinės terpės komponentų, efektyviai mažina 3-hidroksipiridino koncentraciją reakcijos mišinyje (3.13). Susidarančio metabolito spektras sutapo su 2,5-dihidroksipiridino spektru.

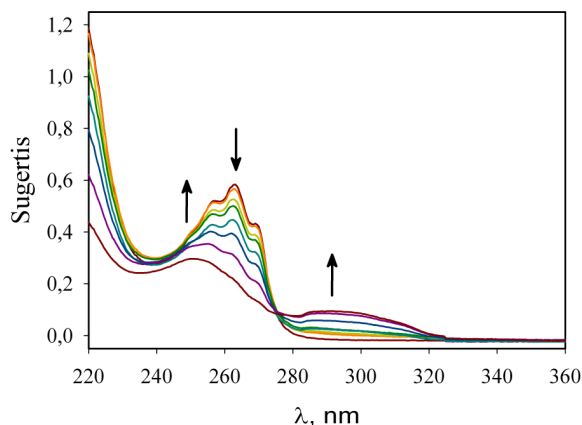


3.13 pav. 3-Hidroksipiridino suvartojimas intaktinėmis *Pusillimonas* sp. 5HP ląstelėmis. Biomasė (auginta 4 paras 2 x 5 ml EFA1 terpės su 0,15% 3-hidroksipiridino) buvo suspenduota 5 ml 50 mM kalio fosfato buferiniame tirpale, pH 7,2. 3-hidroksipiridino koncentracija 0,15 mM. Sugerties spektrai buvo užrašyti po 0, 12, 20, 30, 45, 60, 75 ir 90 min. inkubacijos.

Ląstelės užaugintos indukuotai piridino-3-karbonitrilo galėjo įsisavinti piridino-3-karbonitrilą, piridino-3-karboksamidą, piridino-3-karboksi-, ir 6-hidroksipiridino-3-karboksi- rūgštis, taip pat ir pirazino-2-karboksirūgštį. Taigi piridino-3-karbonitrilo skaidymas pereina į nikotinato skaidymo kelią. Be to šios ląstelės galėjo transformuoti ir kitus nitrilus: 5-hidroksipiridino-2-karbonitrilą (3.14 pav.), pirazino-2-karbonitrilą, 3- ir 6-metil-piridino-2-karbonitrilus, ir piridino-2,6-dikarbonitrilą į atitinkamus amidus/rūgštis (dėja spektrofotometriškai labai sunku atskirti amidus nuo rūgščių). Transformacijos metu susidariusi 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštis buvo pradedama skaidyti tik po ilgo 1 paros lag periodo. Ląstelės užaugintos su piridin-3-karboksirūgštimi galėjo įsisavinti piridino-3-karboksamidą, piridino-3-karboksi- (3.15 pav.) ir 6-hidroksipiridino-3-karboksi- rūgštis. *Pusillimonas* sp. 5HP ląstelės užaugintos indukuotai piridino-3-karboksirūgštimi ir/ar piridino-3-karbonitrilu, transformavo pirazino-2-karboksirūgštį, susidarant tam pačiam (sulyginus sugerties spektrus) junginiui kaip ir *Achromobacter* sp. JS18 ląstelėms užaugintoms indukuotai su piridino-3-karboksirūgštimi.

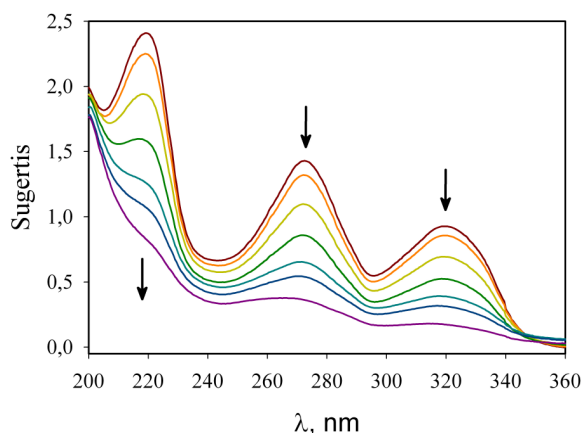


3.14 pav. Piridino-3-karbonitrilo suvartojimas intaktinėmis *Pusillimonas* sp. 5HP ląstelėmis. Piridino-3-karbonitrilo koncentracija 0,15 mM. Sugerties spektrai buvo užrašyti po 0, 15, 35, 60, 90, 120, 150 ir 180 min. inkubacijos. Biomės paruošta kaip aprašyta 3.13 pav.

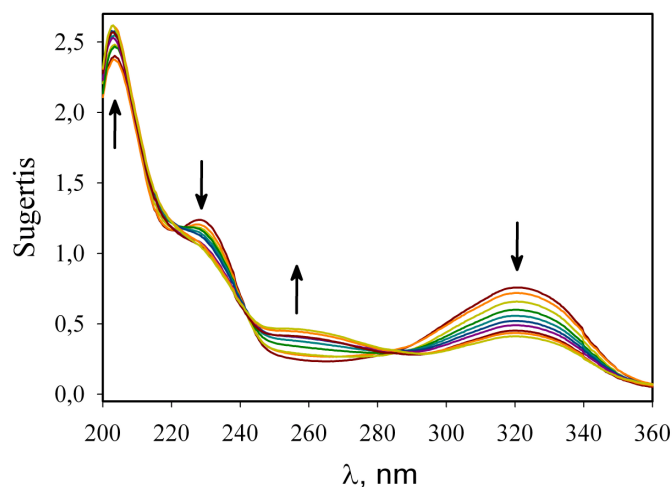


3.15 pav. Nikotinato suvartojimas intaktinėmis *Pusillimonas* sp. 5HP ląstelėmis. Nikotinato koncentracija 0,15 mM. Sugerties spektrai buvo užrašyti po 0, 30, 60, 90, 120 ir 150 min. inkubacijos. Biomasės paruošta kaip aprašyta 3.13 pav.

5HP ląstelės užaugintos indukuotai su 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštimi galėjo įsisavinti tik 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštį (3.16 pav). Priešingai nei 3.1 skyriuje tirtos JS18 ląstelės, jos negalėjo iškart pradėti vartoti piridino-3-karboksirūgšties. Jos taip pat negalėjo transformuoti hidroksipirazino-2-karboksi rūgščių (susintetintų 3.1.1 skyriuje). Visais keturiais (3-hidroksipiridinu, 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštimi, piridino-3-karbonitrilu ir piridino-3-karboksirūgštimi) induktoriais indukuotos (atskirai) ląstelės vartojo bendrą junginį – 2,5-dihidroksipiridiną (3.17 pav.).

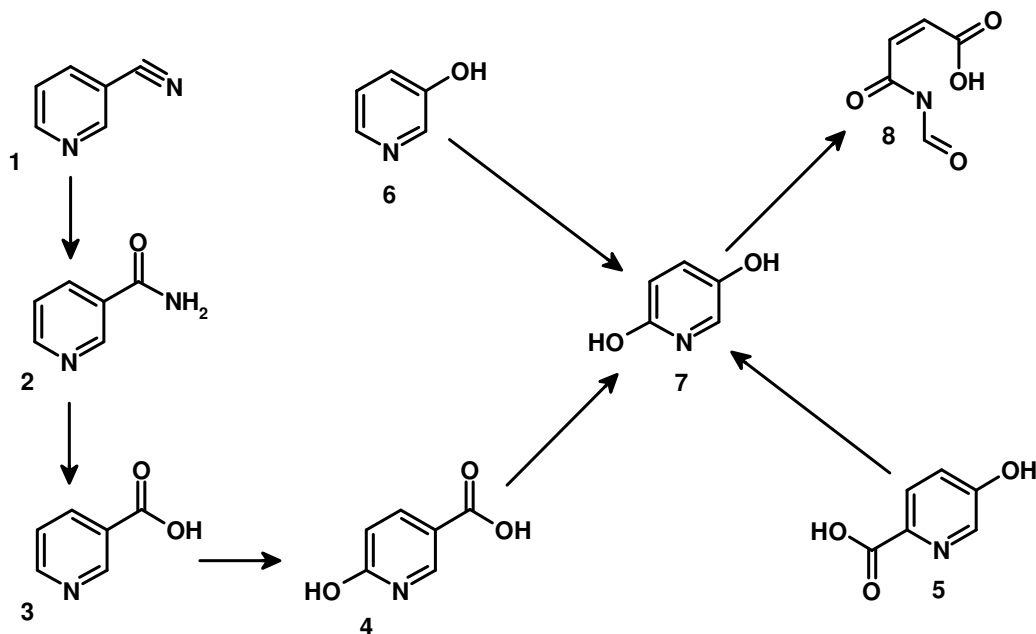


3.16 pav. 5-Hidroksipiridino-2-karboksirūgšties suvartojimas intaktinėmis *Pusillimonas* sp. 5HP ląstelėmis. 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgšties koncentracija 0,15 mM. Sugerties spektrai buvo užrašyti po 0, 30, 60, 90, 120, 150 ir 180 min. inkubacijos. Biomasės paruošta kaip aprašyta 3.13 pav.



3.17 pav. 2,5-Dihidroksipiridino suvartojimas intaktinėmis *Pusillimonas* sp. 5HP ląstelėmis. 2,5-dihidroksipiridino koncentracija 0,15 mM. Sugerties spektrai buvo užrašyti po 0, 15, 45, 75, 105, 135, 165, 195, 240 ir 315 min. inkubacijos. Biomasės paruošta kaip aprašyta 3.13 pav.

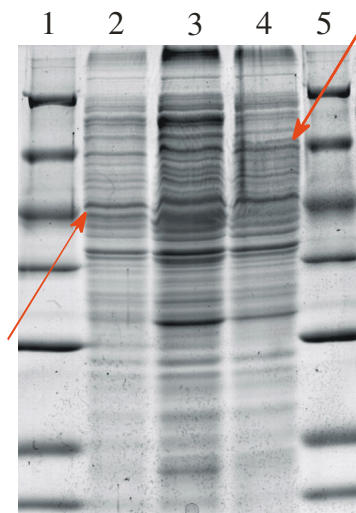
Taigi 5HP ląstelėse yra indukuojami trys skirtingi metaboliniai keliai turintys bendrą metabolitą – 2,5-dihidroksipiridiną (3.7 pav.). 5HP intaktinių ląstelių tyrimai leido identifikuoti visus skaidymo kelių tarpinius junginius.



3.18 pav. Galimi piridino junginių skaidymo keliai *Pusillimonas* sp. 5HP kamiene. 1 – piridino-3-karbonitrilas; 2 – piridino-3-karboksamidas; 3 – piridino-3-karboksirūgštis; 4 – 6-hidroksipiridino-3-karboksirūgštis; 5 – 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštis; 6 – 3-hidroksipiridinas; 7 – 2,5-dihidroksipiridinas, 8 – *N*-formilmaleamo rūgštis.

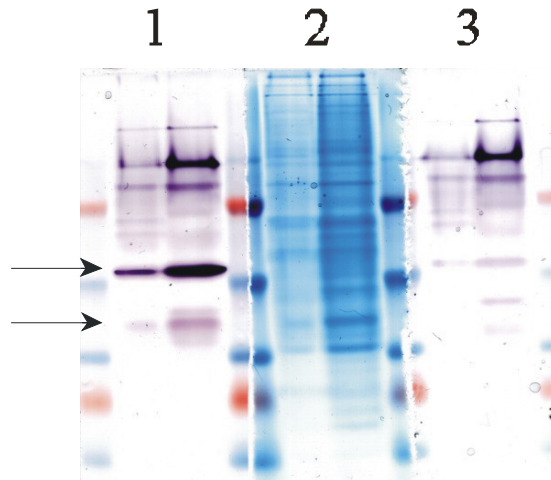
3.2.3. *Pusillimonas* sp. 5HP ląstelėse indukuojamų baltymų tyrimas

Pastebėjus, kad 3-hidroksipiridino pikolino ir nikotino rūgščių katabolizme dalyvaujantys fermentai yra indukuojami baltymai, buvo nuspręsta tirti beląstelių ekstraktų skirtumus baltymų elektroforezės metodu. Tuo tikslu, *Pusillimonas* sp. 5HP ląstelės buvo užaugintos su 3-hidroksipiridinu, 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštimi ar piridino-3-karboksirūgštimi. Suardžius ląsteles ir pašalinus jų nuolaužas, beląsteliniai ekstraktai buvo tiriami naudojant baltymų elektroforezę denatūruojančiomis sąlygomis (3.19 pav.)



3.19 pav. *Pusillimonas* sp. 5HP kamieno baltymų analizė SDS-PAGE metodu. 1 ir 5 – molekulių masių žymenys: 116; 66,2; 45; 35; 25; 18,4 ir 12,4 kDa. 2 – ląstelės užaugintos su 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštimi, 3 – ląstelės užaugintos su piridino-3-karboksirūgštimi, 4 – ląstelės užaugintos su 3-hidroksipiridinu. Rodyklėmis pažymėti indukuojami baltymai.

Rodyklėmis pažymėti šie indukuojami baltymai: apie 70 kDa dydžio ląsteles indukavus 3-hidroksipiridinu, ir 45 kDa dydžio – indukavus 5-hidroksipikolinatu. Pastarojo tipo beląstelinis ekstraktas buvo analizuotas natyvios baltymų elektroforezės metodu ir gelius dažant su NBT (3.20 pav.).



3.20 pav. *Pusillimonas* sp. 5HP kamieno, užauginto su 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštimi, beląstelinio ekstrakto analizė natyvos baltymų elektroforezės metodu. 1 – dažyta su NBT, 2 – dažyta su Coomassie Blue, 3 – dažyta su NBT ir esant 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgščiai.

Toks dažymas rodo esant apie 45 ir 60 kDa dydžio baltymams, kurių aktyvumui pasireikšti yra reikalinga 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštis.

3.2.4. 5-Hidroksipikolinato 2-monooksigenazės iš *Pusillimonas* sp. 5HP gryninimas ir tyrimas

Naujo tipo fermentas, katalizuojantis 5-hidroksipikolino rūgšties (5-hidroksipiridino-2-karboksirūgšties) oksidacinį dekarboksilinimą, buvo dalinai išgrynintas afininės chromatografijos būdu. Fermentas, nors mažu imlumu, bet specifiskai sąveikavo su Cibacron Blue F3GA dažu. Sąveikaujantys pasižymėjo 450 nm bangos ilgio (būdingo flavinams) sugertimi. Pagal katalizuojamą reakciją, kosubstratą, kofaktorių (FAD molekulės fermentą veikė stimuliuojančiai), pH optimumą bei molekulinę masę fermentas yra panašus į 6-hidroksinikotinato 3-monooksigenazę (Nakano ir kt., 1999), todėl buvo pavadintas analogiškai – 5-hidroksipikolinato-2-monooksigenaze. Tai, kad fermento katalizuojamos reakcijos metu tikrai susidaro 2,5-dihidroksipiridinas, buvo patvirtinta eksperimentiškai, 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės iš *Sinorhizobium* sp. L1 kamieno pagalba. Buvo vykdoma 5-hidroksipikolinato-2-monooksigenazės reakcija, ir įdedamas nedidelis kiekis

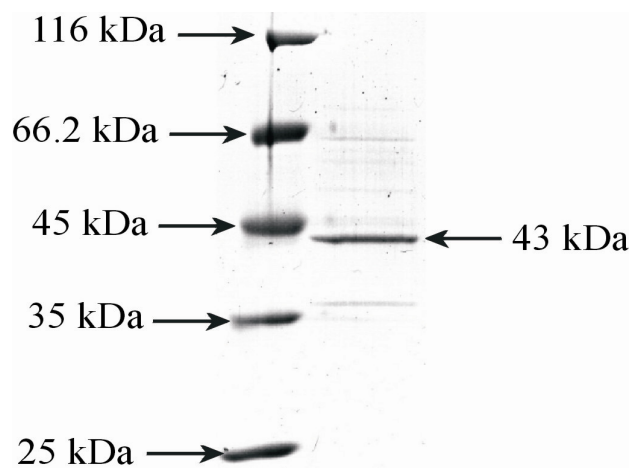
2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės. Įdėjus dioksigenazę yra stebimas sugerties sumažėjimas 320 nm bangos ilgiu.

Metodinėje dalyje nurodytomis sąlygomis, buvo dalinai išgryninta 5-hidroksipikolinato 2-monooksigenazė. Gryninimo eiga pateikta 7 lentelėje.

7 lentelė. 5-Hidroksipikolinato 2-monooksigenazės iš *Pusillimonas* sp. 5HP gryninimo eiga.

Gryninimo stadija	Aktyvumas, U	Baltymo kiekis, mg	Specifinis aktyvumas U/mg	Išgryninimas, kartais	Išeiga, %
Ekstraktas	290	2700	0,1	1	100
AF-Blue-650M	18	35	0,5	5	6
Resource 15Q	0	16	0	0	0

Dalinai išgryninus fermentą, SDS-PAGE metodu buvo nustatyta jo molekulinė masė, kuri yra apie 43-44 kDa (3.24 pav.). Šis dydis taip pat yra artimas 6-hidroksinikotinato 3-monooksigenazės masei, apie 42 kDa (Nakano ir kt., 1999) ar salicilato-1-monooksigenazei apie 44 kDa.



3.24 pav. Dalinai išgrynintos 5-hidroksipikolinato 2-monooksigenazės iš *Pusillimonas* sp. 5HP analizė SDS-PAGE metodu. 1 – molekulių masių žymenys; 2 – dalinai išgryninta 5-hidroksipikolinato 2-monooksigenazė.

Tiriant fermento savybes, nustatyta, kad fermentą stimuliuojančiai veikia FAD molekulės. FMN ir riboflavinai įtakos neturėjo. Be to fermentas pasirodė

esąs specifiskas NADH, bet nebuvo pastebėta aktyvumo su fosforilintu analogu. Monooksigenazė efektyviai veikė pH 7,0–8,0 ribose.

Iš *Pusillimonas* sp. 5HP kamieno užauginto su 5-hidroksipikolinatu ir išgryninus fermentą bei atlikus baltymo peptidų MALDI analizę buvo identifikuotas VGFPEALVGR peptidas. Kadangi baltymo hidolizei buvo naudojamas tripsinas, kuris hidrolizuoja ties bazinėmis amino rūgštimis, tai šį peptidą galima prailginti N-gale pridedant liziną ar argininą. Be to masių spektrometrijos metodu negalima atskirti leucino nuo izoleucino ir lizino nuo gliutamino, nes šių amino rūgščių molekulinės masės yra identiškos. Gautu peptido analizė BLAST programa parodė panašumą į *Burkholderia xenovorans* LB400 kamieno salicilato 1-monooksigenazės (YP_555487) amino rūgščių seką (KVAFLPQAIIVGR, E=0,004).

Abibendrinant šią darbo dalį galima teigti, kad *Pusillimonas* sp 5HP ląstelėse yra indukuojami trys skirtingi: 3-hidroksipiridino, 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgšties ir piridino-3-karboksirūgšties skaidymo keliai, turintys bendrą metabolitą – 2,5-dihidroksipiridiną. Aptiktas ir dalinai išgrynintas naujas fermentas, katalizuojantis 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgšties oksidacinį dekarboksilinimą.

3.3. *Sinorhizobium* sp. L1 tyrimas

3.3.1. *Sinorhizobium* sp. L1 substratinis specifškumas

Šioje darbo dalyje buvo tiriamas *Sinorhizobium* sp. L1 bakterinio kamieno gebėjimas įsisavinti 3-ioje padėtyje pakeistus piridino junginius. Šie tyrimai parodė, kad tiriamas kamienas gali vieninteliais anglies ir energijos šaltiniais naudoti 3-hidroksipiridiną, 3-hidroksimetilpiridiną, piridino-3-karboksamidą, piridino-3-karboksi- ir 6-hidroksipiridino-3-karboksi- rūgštis. Gebėjimas įsisavinti β-pakeistus piridino junginius mažėja tokia eilės tvarka: piridino-3-karboksirūgštis > 6-hidroksipiridino-3-karboksirūgštis > piridino-3-karboksamidą ≥ 3-hidroksipiridinas > 3-hidroksimetilpiridinas.

3.3.2. β -pakeistų piridino junginių katabolizmo tyrimas ir katabolizme dalyvaujantys fermentai

Nustačius, kad *Sinorhizobium* sp. L1 bakterijos gali įsisavinti kai kuriuos 3-ioje padėtyje pakeistus piridino junginius, buvo tiriamas piridino-3-karboksirūgštimi, 6-hidroksipiridino-3-karboksirūgštimi, piridino-3-karboksamidu, 3-hidroksimetil-, 3-hidroksi- ir 2,5-dihidroksipiridino skaidymas intaktinėse ląstelėse. Tuo tikslu *Sinorhizobium* sp. L1 ląstelėse buvo užaugintos EFA1 terpėje su aukščiau išvardintais substratais ir gintaro rūgštimi. Surinkus biomasę ir atplovus nuo terpės komponentų, buvo bandoma spektrofotometriškai užfiksuoti aukščiau minėtų piridino junginių suvartojimą intaktinėse ląstelėse, priklausomai nuo kultūros auginimo sąlygų (8 lentelė).

8 lentelė. Piridino-3-karboksi-, 6-hidroksipiridino-3-karboksi- rūgščių, piridino-3-karboksamido, 3-hidroksimetilpiridino, 3-hidroksipiridino ir 2,5-dihidroksipiridino suvartojimas *Sinorhizobium* sp. L-1 intaktinėse ląstelėse, užauginus ląsteles EFA1 terpėje su įvairiais anglies šaltiniais. Bendrą reakcijos mišinį (1 ml) sudarė 50 mM kalio fosfato buferinis tirpalas, pH 7,5, 200 mM tiriamo substrato ir atitinkamas kiekis biomasės.

Tiriamas substratas	Substratas (0,2%) auginimo terpėje					
	Gintaro rūgštis	Piridino-3-karboksirūgštis	6-Hidroksipiridino-3-karboksirūgštis	Piridino-3-karboksamidas	3-Hidroksi-piridinas	3-Hidroksi-metilpiridinas
Piridino-3-karboksirūgštis	-	+	+	+	-	-
6-Hidroksipiridino-3-karboksirūgštis	-	+	+	+	-	-
Piridino-3-karboksamidas	-	+	+	+	-	-
3-Hidroksipiridinas	-	-	-	-	+	-
3-Hidroksimetilpiridinas	-	-	-	-	-	-
2,5-Dihidroksipiridinas	-	+	+	+	+	-

(„+“ – ląstelės substratą vartoja, „-“ – ląstelės substrato nevartoja)

Iš lentelės duomenų matyti, kad bakterijos, užaugintos neindukuojančiomis sąlygomis, t.y. su gintaro rūgštimi, nevartojo nei vieno iš tirtų substratų. Panašus rezultatas gautas su ląstelėmis užaugintomis su 3-hidroksimetilpiridinu, tačiau to priežastis galėjo būti junginio transporto sistemos į ląstelę nebuvimas. Palyginimui galima pasakyti, kad ląstelėms pasiekti maksimalų kiekį (matuojant sugerti) auginant su piridino-3-karboksirūgštimi pakanka kiek daugiau nei paros, su 3-hidroksipiridinu – dvejų parų, su 3-hidroksimetilpiridinu – savaitės. Tai, kad ląstelės užaugintos indukuojant 3-hidroksipiridinu galėjo įsisavinti tik 3-hidroksipiridiną, o užaugintos su kitais β-pakeistais piridiniais – pastarosios grupės junginius (išskyrus 3-hidroksipiridiną), leido padaryti prielaidą, kad piridino junginių biodegradacija šiose ląstelėse vyksta skirtingais keliais. Ši prielaida buvo patvirtinta, fermentiniais tyrimais (9 lentelė).

9 lentelė. Fermentai, indukuojami *Sinorhizobium* sp. L-1 ląstelėse, užaugintose EFA1 terpėje su skirtingais anglies šaltiniais. Fermentiniai aktyvumai buvo matuojami standartinėmis sąlygomis.

Fermentinis aktyvumas	Substratas (0,2%) auginimo terpėje					
	Gintaro rūgštis	Piridino-3-karboksirūgštis	6-Hidroksipiridino-3-karboksirūgštis	Piridino-3-karboksamidas	3-Hidroksipiridinas	3-Hidroksimetilpiridinas
Nikotinamido deaminazė	-	-	-	+	-	-
Nikotino rūgšties dehidrogenazė	-	+	+	+	-	+
6-Hidroksinikotinato 3-monooksigenazė	-	+	+	+	-	+/-
2,5-Dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazė	+	+	+	+	+	+
Maleamo rūgšties deaminazė	+	+	+	+	+	+

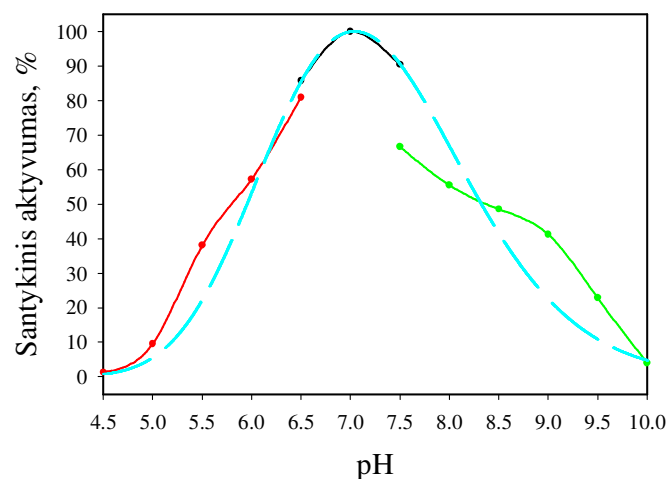
(„+“ – fermentinis aktyvumas yra, „-“ – fermentinio aktyvumo nėra)

Šiais tyrimais parodyta, kad ląstelėse užaugintose su 3-hidroksipiridinu nėra fermentinių aktyvumą aptinkamų L1 ląsteles užauginus indukuotai su kitais tirtais β -pakeistais piridiniais. O 3-hidroksimetilpiridinas yra oksiduojamas į piridin-3-karboksirūgštį, ir skaidomas nikotino keliu.

Tiriant biosintetinamus fermentus, indukuotose ląstelėse, buvo nustatyta, kad 2,5-dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazės kiekis aptinkamas biomasėje iš 1 litro terpės, auginant su 3-hidroksipiridinu yra apie 800 U, su piridino-3-karboksirūgštimi – apie 4000 U. Maleamo rūgties deaminazės kiekiai gaunami iš ląstelių augintų su 3-hidroksipiridinu ir piridino-3-karboksirūgštimi yra panašūs – apie 20 U.

3.3.3. Nikotinato dehidrogenazės iš *Sinorhizobium* sp. L1 išskyrimas, gryninimas ir tyrimas

Tiriant beląstelinį L1 ekstraktą, buvo aptiktas nikotinato (piridino-3-karboksirūgšties) dehidrogenazės aktyvumas. Ši dehidrogenazė, elektronų akceptoriais gali naudoti fericianidą, PMS, DCPIP, NBT ir cyt *c*. Tiriant fermentinio aktyvumo priklausomybę nuo reakcijos mišinio pH nustatyta, kad optimalus veikimo pH yra apie 7,0 (3.25 pav.). Prieš pradėdant fermentą gryninti buvo tiriamos fermento stabilumo savybės. Nustatyta, kad fermentą stabilizuojančiai veikia Mg^{2+} jonai (Ca^{2+} jonai įtakos neturi), redukuojančios medžiagos – DTT, tirpumą didintys detergentai – Triton X-100. Literatūroje yra nurodoma, kad nikotinato dehidrogenazė yra membraninis ar su membranomis asocijuotas fermentinis kompleksas. Todėl buvo atlikta fermento analizė centrifuguojant ultracentrifuga. Centrifugavus L1 beląstelinį ekstraktą 90 minučių generuojant 100 000 g jėgą, membraninėje frakcijoje buvo surasta didžioji dalis nikotinato dehidrogenazės aktyvumo. Tai rodo, kad fermentas tikrai yra membraninis.



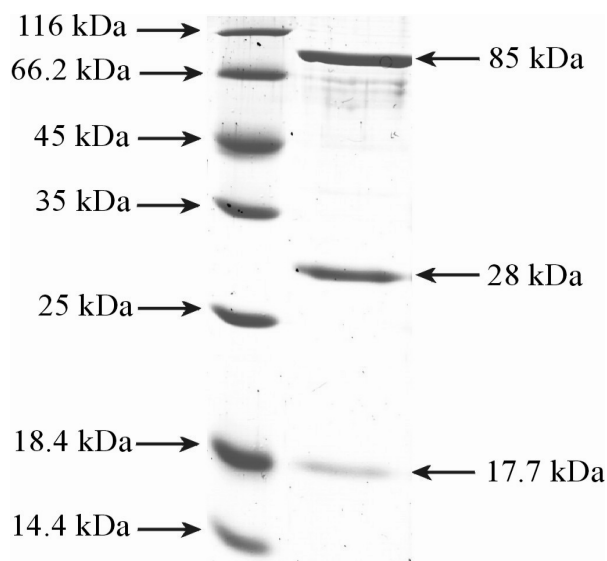
3.25 pav. Nikotinato dehidrogenazės iš *Sinorhizobium* sp. L1 aktyvumo priklausomybė nuo reakcijos mišinio pH. Aktyvumai buvo matuoti 30 °C temperatūroje 50 mM kalio acetato, citrato ir fosfato ir Tris-HCl buferiniuose tirpaluose, esant 400 μM fericianido ir 200 μM nikotino rūgšties. — kalio citrato buferinis tirpalas, — kalio fosfato buferinis tirpalas — Tris-HCl buferinis tirpalas.

Metodinėje dalyje nurodytomis sąlygomis, buvo išgryninta nikotinato dehidrogenazė. Gryninimo eiga pateikta 10 lentelėje.

10 lentelė. Nikotinato dehidrogenazės iš *Sinorhizobium* sp. L1 gryninimo eiga.

Gryninimo stadija	Aktyvumas, U	Baltymo kiekis, mg	Specifinis aktyvumas U/mg	Išgryninimas, kartais	Išeiga, %
Ekstraktas	1080	2600	0,415	1,0	100
Ultracentrifugavimas	780	890	0,876	2,11	72,2
30% amonio sulfatas	756	142	5,32	12,82	70,0
GigaCapQ	490	55,7	8,8	21,2	45,4
Resource 15PHE	75	1,28	58,6	141,2	6,95
Resource 15Q	27	0,248	108,9	262,4	2,5
SuperDex G200	19,5	0,063	309,5	745,8	1,8
Resource RPC	11,5	0,058	198,3	477,8	1,07

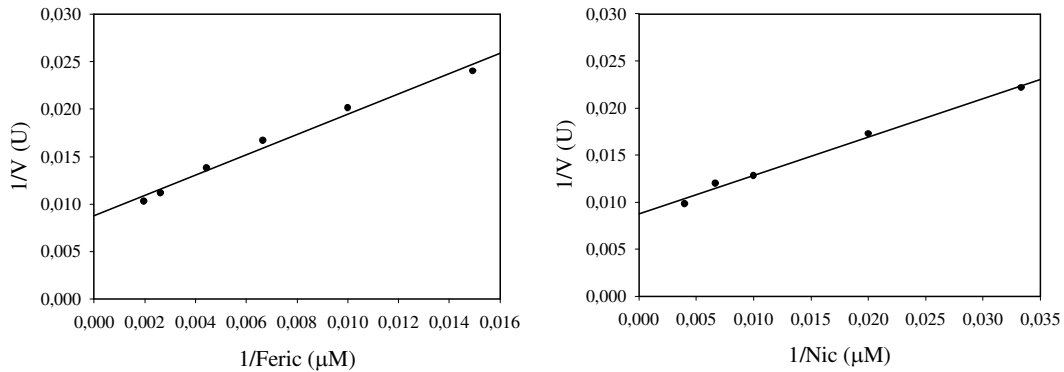
Atlikus išgryninto fermento analizę baltymų elektroforezės, denatūruojančiomis sąlygomis metodu buvo nustatyta, kad fermentas yra sudarytas iš trijų subvienetų: 85, 28 ir 17,7 kDa (3.26 pav.). Išskirtas fermentas savo apibūdinimu panašus į iš *Comamonas testosteroni* S44 kamieno išskirtą nikotinato dehidrogenazę (pagal subvienetų kiekį ir molekulinės mases 82, 46 ir 21 kDa (Yang ir kt.; 2009/2010).



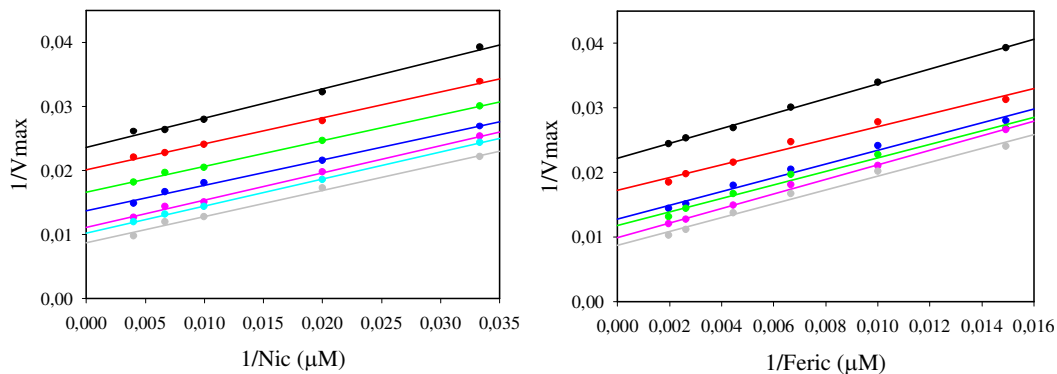
3.26 pav. Nikotinato dehidrogenazės iš *Sinorhizobium* sp. L1 analizė SDS-PAGE metodu. 1 – nikotinato dehidrogenazė, 2 – molekulių masių žymenys.

Atlikus baltymų peptidų MALDI analizę buvo identifikuoti trys peptidai: vidutinio subvieneto – VVKIDFKR ir didžiojo subvieneto – ENEWAHDPR (E=44), VHPGHVDIGTGIR (E=6,3). Pastarieji peptidai yra panašūs į kitų aldehydų dehidrogenazių didžiojo subvieneto amino rūgščių ESEWARDPR ir AFNGHVLDLGTGIR sekas. Mažojo subvieneto analizė nepavyko.

Tiriant fermento savybes buvo nustatyta, kad fermentas veikia su skirtingo potencialo dirbtiniais elektronų akceptoriais: fericianidu, PMS, DCPIP, NBT ir cyt *c*. Ekstrapoliuojant atvirkštinėse koordinatėse nustatytos, K_M vertės, kurios yra 122,7 μM nikotinatui ir 46,85 μM fericianidui (3.27 ir 3.28 pav.).



3.27 pav. Nikotinato dehidrogenazės iš *Sinorhizobium* sp. L1 kamieno K_M reikšmių nustatymas dvigubų atvirkštinių dydžių koordinatėse.

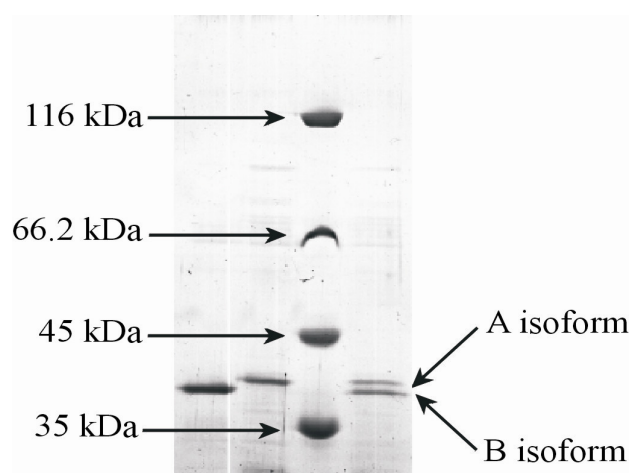


3.28 pav. Nikotinato dehidrogenazės iš *Sinorhizobium* sp. L1 kamieno reakcijos greičių ekstrapoliacijos atvirkštinėse koordinatėse. Pilka spalva pažymėtas teorinis greitis, ekstrapoliuojant į begalybę.

Kadangi kai kurios nikotinato dehidrogenazės turi cytochrominį subvienetą ar domeną, buvo nuspręsta nustatyti K_M vertes tokiai sistemai. Tokioje sistemoje gautos vertės yra 117,9 mM nikotinatui ir 225 mM cit c. Analogiški ekstrapoliaciniai skaičiavimai, esant nikotinatui ir citochromui c, leidžia daryti prielaidą, kad reakcijos mechanizmas vyksta susidarant trinariam kompleksui. Taip pat pastebėta, kad ferrocianidinės sistemos aktyvacija naftazarinu buvo menka, tuo tarpu citochrominės – labai didelė. Įdomu tai, kad nikotinato dehidrogenazė iš *Achromobacter* sp. JS18 kamieno nors ir pasižymėjo panašiomis savybėmis (aktyvumu su ferrocianidu ir cit c), bet naftazarinas įtakos aktyvumui neturėjo.

3.3.4. 2,5-Dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazės iš *Sinorhizobium* sp. L1 išskyrimas, gryninimas ir tyrimas

Užauginus L-1 kamieno ląsteles su skirtingais anglies šaltiniais, skiriasi 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės kiekis gaunamas iš 1 L terpės: indukuojant piridino-3-karboksirūgštimi – apie 4000 U, o 3-hidroksipiridinu – apie 800 U. Gryninant fermentą ir tiriant jo savybes buvo pastebėta, kad skirtingomis medžiagomis indukuota 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazė pasižymi skirtingomis savybėmis ir yra skirtingos molekulinės masės. Dioksigenazė, iš ląstelių užaugintų su 3-hidroksipiridinu, buvo pavadinta A izoforma, nes buvo atrasta pirma, o iš ląstelių užaugintų su piridino-3-karboksirūgštimi – B izoforma (3.29 pav.)



3.29 pav. *Sinorhizobium* sp. L1 ląstelėse indukuojamų 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazių analizė SDS-PAGE metodu. 1 – iš piridin-3-karboksirūgštimi indukuotų ląstelių, 2 – iš 3-hidroksipiridinu indukuotų ląstelių, 3 – molekulių masių žymenys, 4 – 1 ir 2 pavyzdžiai kartu.

Metodinėje dalyje nurodytomis sąlygomis, buvo išgrynintos 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės iš 3-hidroksipiridinu ir piridino-3-karboksirūgštimi indukuotų ląstelių. Gryninimo eiga pateikta 11 ir 12 lentelėse.

11 lentelė. 2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės A izoformos iš *Sinorhizobium* sp. L1 ląstelių indukuotų 3-hidroksipiridinu gryninimo eiga.

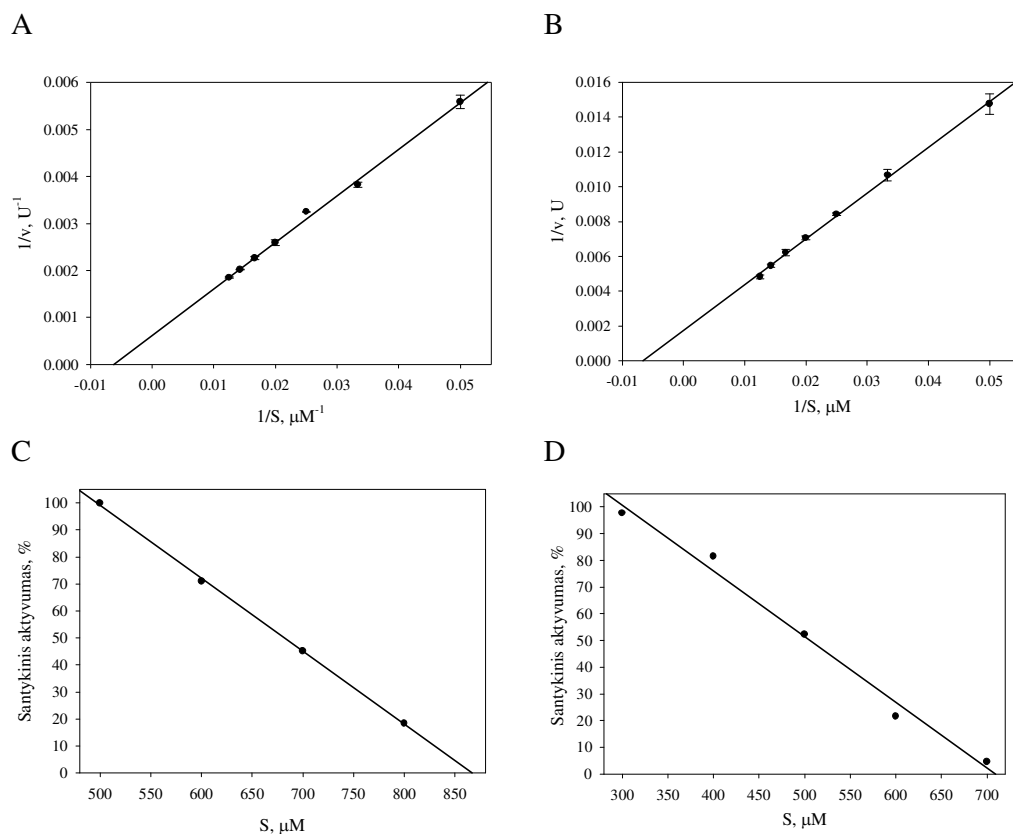
Gryninimo stadija	Aktyvumas, U	Baltymo kiekis, mg	Specifinis aktyvumas U/mg	Išgryninimas, kartais	Išeiga, %
Ekstraktas	385	192,5	2	1	100
30–40% amonio sulfatas	210	97	2,2	1,1	54,5
GigaCapQ	180	23	7,8	3,9	46,7
Resource 15PHE	27	1,1	24,5	12,25	7
Resource 15Q	19	0,32	59,4	29,7	4,9

12 lentelė. 2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės B izoformos iš *Sinorhizobium* sp. L1 ląstelių indukuotų piridino-3-karboksirūgštimi gryninimo eiga.

Gryninimo stadija	Aktyvumas, U	Baltymo kiekis, mg	Specifinis aktyvumas U/mg	Išgryninimas, kartais	Išeiga, %
Ekstraktas	5400	500	11	1	100
Ultracentrifugavimas	3950	340	11,6	1,05	73,1
30–40% amonio sulfatas	2280	115	19,8	1,8	44,2
GigaCapQ	1760	19	92,6	8,4	32,6
Resource 15PHE	430	1,4	307	27,9	8
Resource 15Q	320	0,64	500	45,5	5,9

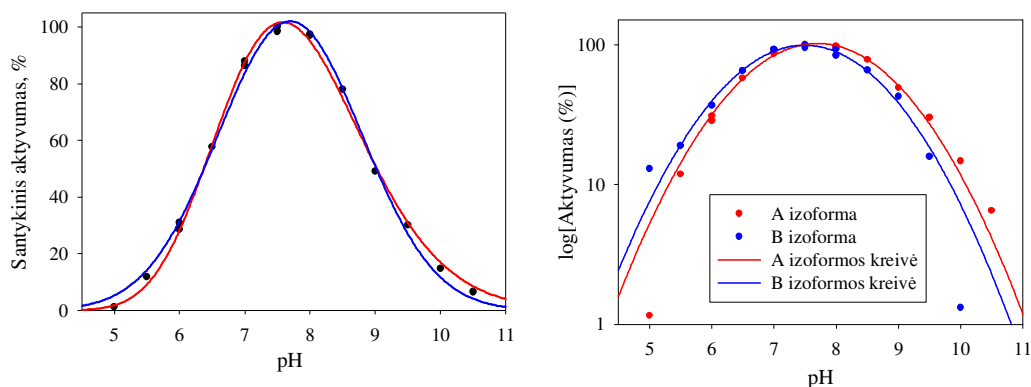
Išgrynintos 2,5-dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazės A ir B izoformos iš *Sinorhizobium* sp. L1 kamieno, poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis, migruoja kaip 39,8 kDa ir 38,3 kDa dydžio baltymai, atitinkamai (3.29 pav.). Molekulinės masės nustatytos gel-filtraciniu metodu yra: 230 ± 2 kDa ir 214 ± 2 kDa, atitinkamai. Šie duomenys yra artimi 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazėms išskirtoms iš *Pseudomonas putida* N-9, KT2440 ir S16 kamienų.

Tiriant fermento izoformų katalizines savybes buvo nustatyta, kad K_M reikšmės 10 mM kalio fosfato buferiniame tirpale, pH 7,5 2,5-dihidroksipiridinui yra labai panašios: 175 μM – B izoformai ir 150 μM – A izoformai (3.30 pav. A ir B). Taip pat nustatyta, kad fermentai nustoja veikti, kai substrato kiekis yra apie 4,85 karto didesnis už K_M vertę: 865 μM B izoformai ir 710 μM A izoformai (3.30 pav. C ir D), t.y. stebima inhibicija substratu. Tai galbūt galima paaiškinti tuo, kad katalizuojama reakcija yra bisubstratinė. Be to, kai substrato koncentracija viršija deguonies tirpumo 30 °C temperatūros vandenyje koncentraciją (200 μM), yra stebimas reakcijos greičio tiesės lūžis. Tiriant K_M priklausomybę nuo pH (tyrimai atlikti tik su A izoforma) pastebėta, kad rūgštėjant terpei K_M mažėja.



3.30 pav. 2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės A ir B izoformų reakcijos greičio nuo 2,5-dihidroksipiridino koncentracijos priklausomybė. Aktyvumai buvo matuoti 30 °C temperatūroje 5 mM kalio fosfato buferiniame tirpale, pH 7,5, esant 20–80 μM 2,5-DHP ir 1 μM FeSO_4 . Bendras reakcijos mišinio tūris sudarė 1 ml.

Abi 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės izoformos pasirodė esančios mažai specifinės buferinio tirpalo prigimčiai. Jos buvo jautrios tik citrato buferiniam tirpalui, matomai, dėl jo chelatinųjų savybių. Nors fosfato buferinis tirpalas pasižymi silpnomis chelatinėmis savybėmis, vis dėlto didžiausias aktyvumas pasiekiamas jame. Fermento izoformų aktyvumo priklausomybė nuo buferinio tirpalo pH yra pateikta 3.32 paveiksle. pH optimumai yra panašūs: A izoformos – 7,5–7,75, B izoformos – 7,25–7,5.



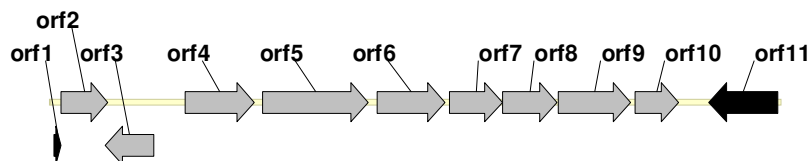
3.32 pav. 2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės A ir B izoformų aktyvumo priklausomybė nuo reakcijos mišinio pH. Aktyvumai buvo matuoti standartinėmis sąlygomis. • – A izoforma, • – B izoforma.

Skirtumai tarp pH optimumo ir veikimo ribų aiškiau pastebimi logaritminėse skalėse (3.32 pav.). A izoformos pH veikimo spektras yra kiek labiau pasislinkęs į šarminę pusę, o B izoformos – į rūgštinę pusę. A izoforma veikia pH 5,5–10,5 intervale, o 7,2–8,3 intervale, pasižymi didesniu nei 90% aktyvumu. B izoforma veikia pH 5–10,0 intervale, didesniu nei 90% aktyvumu pasižymi 7,0–8,0 intervale. Toks grafikas duoda du lūžio taškus: A izoformai ties 6,8–7,0 ir 8,5 ir B izoformai ties 6,8–7,0 ir 8,4–8,6. Fermento optimalaus veikimo ir saugojimo buferiniai tirpalai bei jų pH sutampa – tai kalio fosfato buferinis tirpalas, pH 7,2–7,8.

3.3.5. 2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės geno iš *Sinorhizobium* sp. L1 klonavimas ir analizė

Iš *Sinorhizobium* sp. L1 kamieno užauginto su nikotino rūgštimi ir išgryninus iki homogeniškumo 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazę bei atlikus baltymo peptidų MALDI analizę buvo identifikuoti keturi peptidai: IDYADAFIAAGKR (E=1,1), VITAVEPAPLIGR (E=0,16), WDHGEPAAF (E=12), VVVISKGDER (pastarasis artimesnis *Achromobacter piechaudii*), labai panašūs į *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325 hipotetinį baltymą (YP_002978554.1). Iš *Sinorhizobium* sp. L1 kamieno užauginto su 3-hidroksipiridinu ir analogiškai atlikus baltymo peptidų MALDI analizę buvo identifikuoti tokie peptidai: IITAVEPPEIAR (E=0,044), MMPYPELR, PYPELR. Pagal šiuos peptidus, atsižvelgiant į (*R. leguminosarum*) baltymą koduojančios DNR seką, buvo sukurti gauto peptido pradmenys. Atlikus L1 kamieno chromosominės DNR PGR su sukurtais pradmenimis buvo gauti keli tikimosi dydžio fragmentai. Šie fragmentai buvo klonuoti į pTZ59R plazmidės ir padaugintas. Tokiu būdu buvo gauta plazmidė (pF1R4A) su 685 bp ilgio fragmentu. Atlikus padaugintų fragmentų sekvenavimą buvo gauta dalis 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės geno, kuri buvo labai artima pradmenų kūrimui naudoto *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325 hipotetinio baltymo amino rūgščių sekai.

Remiantis nustatyta nukleotidų seka buvo susintetinti pradmenys LF1, LF2, LR3 ir LR4. Šie pradmenys buvo panaudoti, tikrinant *Sinorhizobium* sp. L1 genų biblioteką, kuri gauta kaip aprašyta Metodų skyriuje (2.5.11). Tokiu būdu buvo sėkmingai atrinkta bakterinė kolonija, turinti rekombinantinę pL1Pst25 plazmidę. Restrikcinė analizė parodė, kad ši plazmidė turi 10,4 kb ilgio DNR fragmentą, kurio nukleotidų seka buvo sekvenuota. Šiame fragmente nustatyti 11-a atviro sakymo rėmelių (3.34 pav), kurie koduoja du transkripcijos faktorius (vienas hipotetinis), tris transporto sistemos baltymus ir keturis su degradacija susijusius baltymus (13 lentelė).



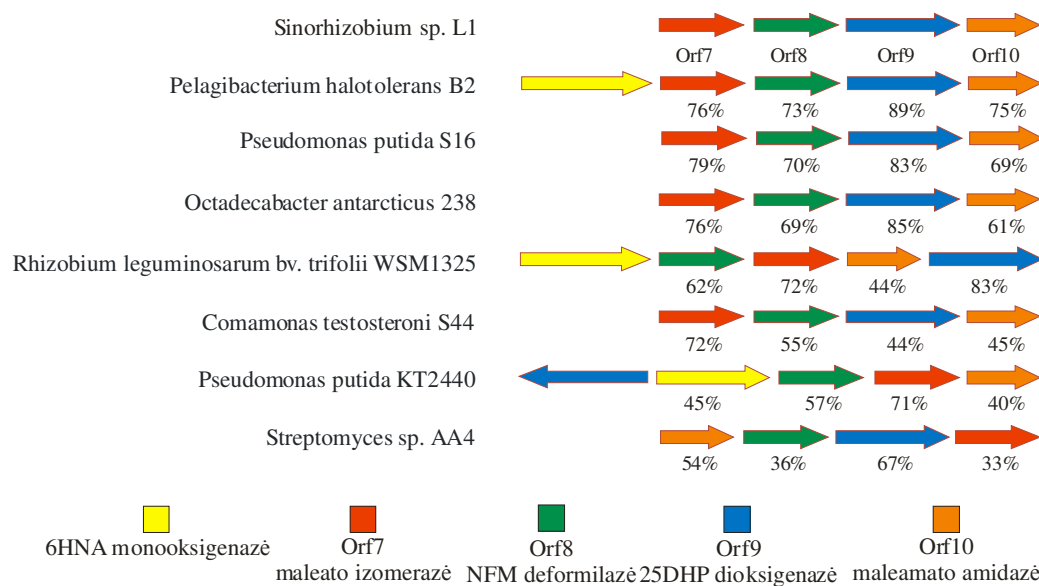
3.34 pav. Schematinis pL1Pst25 klonuoto DNR fragmento genolapis.

13 lentelė. L1Pst25 genų sandaupoje indentifikuotų ORF palyginimas.

ORF	Ilgis (a. r.)	CDS pozicija	Artimiausias homologas	Genų banko priegios Nr.	Identifikumas (%)	E vertė
Orf1	35	16-140	anglies monoksido dehidrogenazė, <i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2	ABD07809	13/28 (46%)	6E-06
Orf2	224	137-811	hipotetinis baltymas CTS44_14338 <i>Comamonas testosteroni</i> S44	EFI60974	119/215 (55%)	9E-81
Orf3	233	767-1468	GntR tipo transkripcijos faktorius <i>Comamonas testosteroni</i> S44	EFI60973	84/194 (43%)	6E-32
Orf4	329	1912-2904	hipotetinis periplazminis baltymas TorT <i>Marinomonas</i> sp. MED121	EAQ65112	142/329 (43%)	3E-86
Orf5	503	3023-4534	cukrų ABC transporterinis ATP-surišantis baltymas <i>Marinomonas</i> sp. MED121	EAQ65113	242/492 (49%)	3E-172
Orf6	290	4666-5630	heksozių ABC-tipo transporto sistemos permeazė <i>Marinomonas</i> sp. MED121	EAQ65114	143/294 (49%)	6E-90
Orf7	249	5702-6451	maleato cis-trans izomerazė <i>Pseudomonas putida</i> S16	ADN26549	197/249 (79%)	2E-148
Orf8	257	6461-7234	hidrolazė, alfa/beta klosčių šeima <i>Octadecabacter antarcticus</i> 238	EDY88475	179/258 (69%)	7E-137
Orf9	343	7258-8289	leucil aminopeptidazė (aminopeptidazė T) <i>Pelagibacterium halotolerans</i> B2	AEQ53770	304/342 (89%)	0,0
Orf10	208	8350-8976	N-karbamoilsarkozino amidazė <i>Pelagibacterium halotolerans</i> B2	AEQ53771	153/203 (75%)	7E-110
Orf11	327	9411-10394	spėjama, nuo gliutationo nepriklausoma, formaldehidro dehidrogenazė <i>Dermaococcus</i> sp. Ellin185	EFP57883	166/271 (61%)	2E-104

Nustatyto genomino L1Pst25 fragmento iš *Sinorhizobium* sp. L1 kamieno genų organizacija skiriasi nuo Jimenez ir bendraautorių sudarytos *nic* genų sandaupos organizacijos bakterijose (3.35 pav.). Jimenez palyginimui imtos genų sandaupos turi *nicC* (ar analogišką monooksigenazę). Be to su degradacija susiję genai tik kai kuriais atvejais yra apsupti transporto baltymų

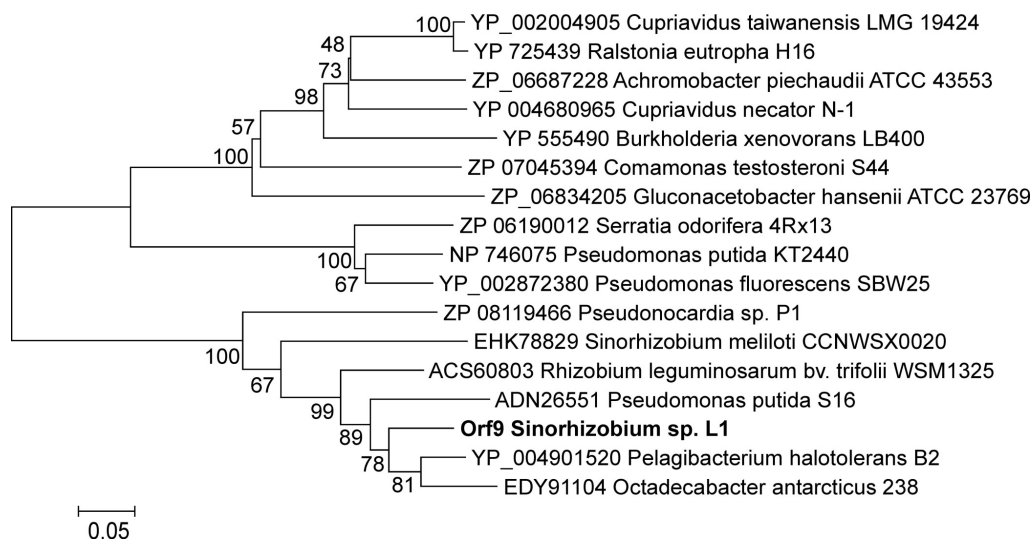
genais. *Sinorhizobium* sp. L1 atveju transporto baltymams priklauso porinas, ATPazė ir receptorinis TMAO-TorT tipo baltymas. Deja ne visi organizmai (pvz. *P. putida* KT2440) tokio tipo receptorių turi. Nors Jimenez palygintuose genų sandauposose transkripcijos reguliatorius dažnai yra NicR ar TetR tipo, visgi kaip ir *Sinorhizobium* sp. L1 atveju yra ir GntR tipo reguliatorius. Be to Jimenez palygintais su degradacija susijusio genų ketverto baltymai (dioksigenazė, deformilazė, aminazė ir izomerazė) yra apsupti *nicA* ir/arba *nicB* genų, o ne transporto sistemos ir formaldehidro dehidrogenazės genų, kaip kad yra *Sinorhizobium* sp. L1 atveju. Didelis skirtumas tarp *Sinorhizobium* sp. L1 ir kitų pvz., *P. putida* KT2440 tai, kad formiato dehidrogenazė *P. putida* KT2440 kamieno atveju, yra nutolusi nuo *nic* genų sandaupos per 4 Mb. Palyginus L1Pst25 fragmento genų organizaciją su panašiomis genų sandaupomis, esančiomis kitose bakterijose (1.14 pav. Literatūros apžvalgoje) paaiškėjo, kad šalia genų ketverto 6-hidroksinikotinato 3-monooksigenazės genas arba būna, arba ne. Todėl palyginimui buvo sudarytas kitas genų sandaupos palyginimas (3.35 pav.).



3.35 pav. L1Pst25 genomino fragmento iš *Sinorhizobium* sp. L1 kamieno genetinė organizacija kaip palyginimas su kitais panašiomis genų sandaupomis, esančiomis kitose bakterijose. ■ – 6-Hidroksinikotinato 3-monooksigenazė; ■ – maleato izomerazė; ■ – *N*-formilmaleamo rūgšties deformilazė; ■ – 2,5-dihidroksipirido dioksigenazė; ■ – maleamo rūgšties deaminazė. Procentinė reikšmė rodo amino rūgščių identiškumą panašioms baltymams.

Analizuojant L1Pst25 fragmento seką buvo pastebėta, kad prieš *N*-formilmaleamo rūgšties deformilazės ir 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės genus yra Shine-Dalgarno sekos: GAGAGGGCGAGATG ir GAGAGGAAATAGCGCGATG atitinkamai. Analogiškos Shine-Dalgarno sekos yra aptiktos *P. putida* S16 kamiene, šios sekos išsidėsčiusios prieš 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės ir maleamo rūgšties deaminazės genus (Tang ir kt., 2012).

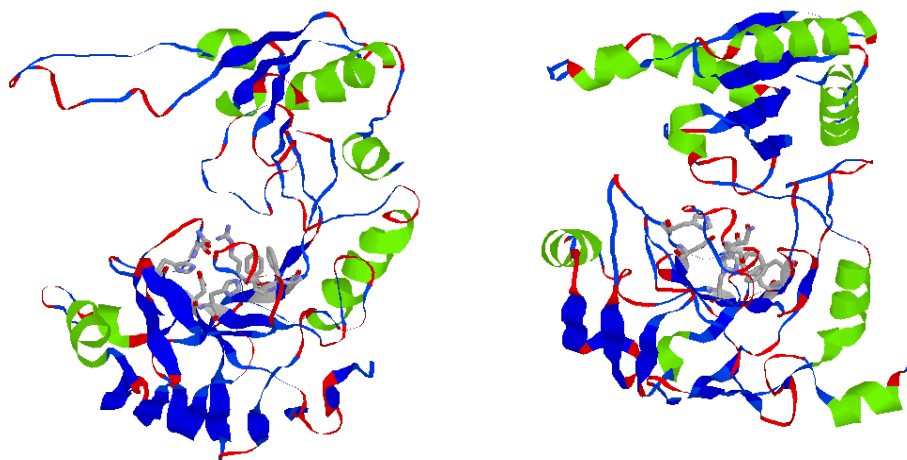
2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės palyginimui grupių apjungimo metodu buvo sudarytas filogenetinis medis (3.36 pav.)



3.36 pav. 2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės iš *Sinorhizobium* sp. L1 filogenetinis medis.

2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazių amino rūgščių sekų palyginimui ClustalW programa leido išskirti konservatyvias amino rūgštis. Pagal Jimenez ir bendraautorių pateiktus, sumodeliuotos 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės struktūros duomenis, katalitiniai triadai buvo priskirti: H265, H318 ir D320. Tačiau katalizei trijų amino rūgščių nepakanka. Be to autoriai kelia hipotezę, kad 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazė evoliucionavo iš metaloproteazių. Ir iš tiesų, 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazių amino rūgščių palyginimui Blast programa baltymą priskiria leucilamino peptidazių grupei. Dažnai metalo proteazių aktyviame centre būna histidiniai, gliutaminai, asparto rūgštis,

leucinas ir argininas. Todėl buvo nuspręsta sumodeliuoti 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės iš *Sinorhizobium* sp. L1. Visos modelinės struktūros yra panašios tuo, kad formuojama struktūra yra „G“ formos, kurios centre yra aktyvaus centro niša. Iš visų struktūrų 3.37 paveikslėlyje yra pateiktos tik dvi, kaip labiausiai tikėtinos.

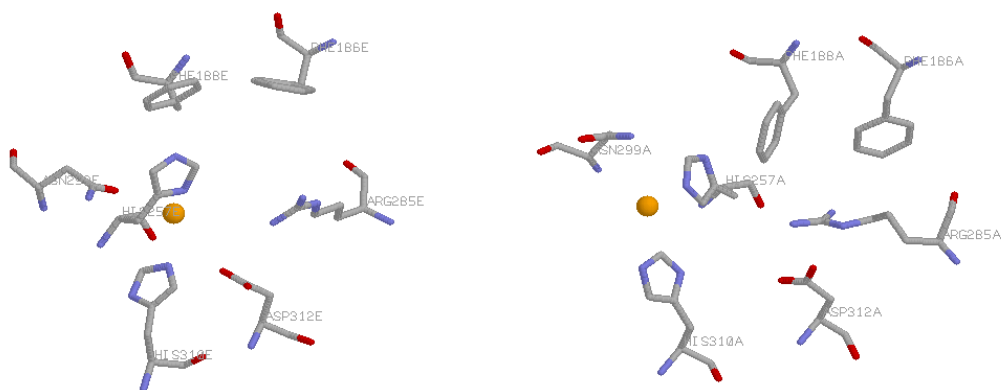


A)

B)

3.37 pav. Modelinės 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės iš *Sinorhizobium* sp. L1 struktūros

Kitos struktūros yra mažai tikėtinos, nes: 1) išanalizavus katalizinius histidinus (H312 ir H257) supančias amino rūgštis buvo išskirtos katalizėje dalyvaujančios amino rūgštys: D310, N299 ir R285; 2) buvo sumodeliuota geležies jono padėtis; 3) atmestos modelinės struktūros nes, kuriose D310, N299 buvo išsidėstę per toli (sąveikai) ar R285 per arti nuo geležies jono. Šalia aktyvaus centro buvo aptiktos konservatyvios hidrofobinės amino rūgštys: F186 ir F188, kurie sukuria aktyvaus centro hidrofobinę aplinką (3.38 pav.). Be to galima įtarti, kad šie fenilalaninai sąveikauja su 2,5-dihidroksipiridino žiedo hidrofobine dalimi, taip jį koordinuodami.

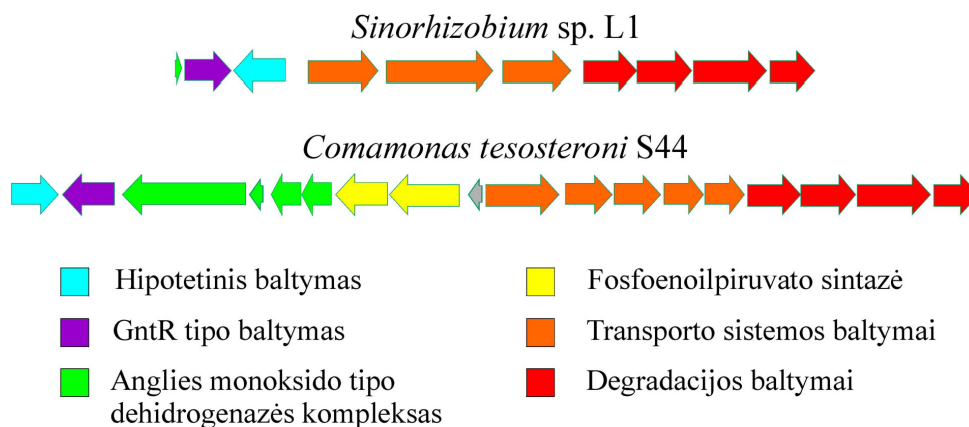


3.38 pav. 2,5-Dihidropiridino dioksigenazės iš *Sinorhizobium* sp. L1 modeliųjų struktūrų A) ir B) aktyvaus centro apsuptys.

Įdomu tai, kad abiem atvejais geležis yra pentakoordinuotas amino rūgščių heteroatomais. Šeštasis ryšys yra tarp aktyvuotos deguonies formos, kuri taip pat sąveikuoja ir su R285 radikalinės uodegos azotais. Pirmuoju atveju penkis ryšius su geležies jonu sudaro: H310, D312, N299 ir du ryšius sudaro H257. Antruoju atveju: H310 ir N299 sudaro po du ryšius ir H257 tik vieną. Galima manyti, kad abiem atvejais D312 radikalo karboksilinė grupė gali sąveikauti ir koordinuoti 2,5-dihidropiridina aktyviame centre. Pagal analogiją su trečiojo tipo ekstradiolinėmis dioksigenazėmis R285 sąveikauja su aktyvuota deguonies forma, kurią perneša 2,5-dihidropiridino molekulei. Taigi 2,5-dihidropiridino dioksigenazė pagal amino rūgščių seką yra panaši į metalo protezes, o pagal modeliųjų struktūrų aktyviame centre esančias amino rūgštis panaši į III-io tipo ekstradiolines dioksigenazes.

Pagal darbo metu gautus duomenis (žiūrėti 3.29 pav.) *Sinorhizobium* sp. L1 kamiene yra dvi skirtingos 2,5-dioksigenazės izoformos, besiskiriančios molekuline mase. Tai, kad 2,5-dihidropiridino dioksigenazės genai yra keli skirtingi, tose pačiose bakterijose yra retas atvejis, bet ne išimtis. *Pseudomonas struzi* kamienas AN10 turi NahW ir NahG genus, koduojančius skirtingas amino rūgščių sąstatu salicilato hidroksilazes (Bosch ir kt., 1999). *Comamonas testosteroni* S44 (ZP_07044829 ir ZP_07045394) ir *Achromobacter piechaudii* ATCC 43553 (ZP_06684487 ir ZP_06687228) turi po du (2,5-

dihidroksipiridino dioksigenazės) baltymus labai panašius vienas į kitą. Šie bakteriniai kamienai turi dvigubus ir *N*-formilmaleamo rūgšties hidrolazes ir deaminazes. *C. testosteroni* S44 – ir maleino izomerazę. 2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės genas koduoja 343 amino rūgščių peptidą. Tokio peptido molekulinė masė nustatyta SDS-PAGE metodu buvo 38,3 kDa (skyrelis Nr. 3.3.4.), kas labai panašu į teoriškai apskaičiuotą 37,715 kDa. Šio peptido teorinis pI 4,88. Deja kitos dioksigenazės izoformos amino rūgščių seka yra nežinoma. Nustatyta molekulinė masė SDS-PAGE metodu yra 39,8 kDa. Analogiška dioksigenazė yra rasta *Achromobacter* sp. JS18 kamienne. Dioksigenazės iš *Achromobacter* sp. JS18 bakterijų molekulinė masė nustatyta SDS-PAGE metodu yra 38,7 kDa. Teorinė masė *Achromobacter piechaudii* ATCC 43553 baltymo – 38,327 kDa. Dioksigenazės iš *Pseudomonas putida* KT2440 kamieno teorinė masė yra 39,017 kDa.

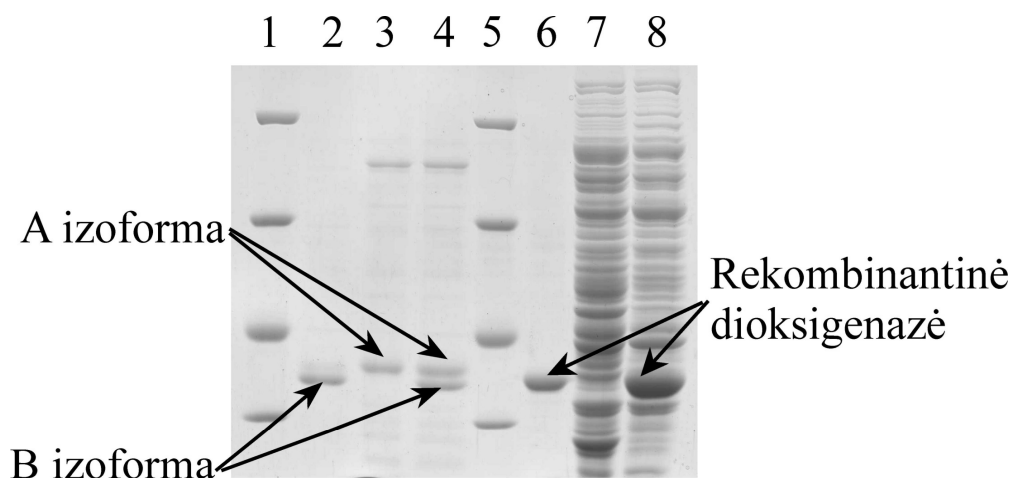


3.39 pav. *Sinorhizobium* sp. L1 ir *Comamonas testosteroni* S44 genų sandarų palyginimas.

Didelis panašumas tarp genų sandarų randamas lyginant *Sinorhizobium* sp. L1 10,5 kb ir *Comamonas testosteroni* S44 ~20 kb dydžio genomų fragmentus (3.39 pav). Abu fragmentai turi GntR tipo transkripcijos reguliatorių (Tropel ir kt., 2004), kurių identiškumas yra 43%. Abiem atvejais aukščiau GntR tipo reguliatoriaus priešinga kryptimi yra orientuotas hipotetinis baltymas (ZP_07045379), kurių identiškumas 55%. Be aukščiau „genų ketverto“ baltymus yra išsidėstę transporto baltymai.

3.3.6. Rekombinantinės 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės iš *Sinorhizobium* sp. L1 raiška *E. coli* ląstelėse

Pagal metodinėje dalyje nurodytas sąlygas buvo klonuotas 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės genas į pET19 plazmidę ir indukuota šio baltymo sintezė *E. coli* BL21(DE3) kamiene (3.40 pav.). Šiomis sąlygomis didžioji dalis produkuojamo baltymo buvo netirpi. Bet ekstrakte likusi tirpi baltymo dalis turėjo fermentinį aktyvumą. Tokiomis sąlygomis produkuojamo aktyvaus baltymo išeiga yra apie 2 U/L terpės.



3.40 pav. 2,5-Dihidroksipiridino dioksigenazės geno indukcijos analizė SDS-PAGE metodu. 1 ir 5 – molekulių masių žymenys (116; 66,2; 45 ir 35 kDa); 2 – dioksigenazė iš nikotinu indukuotų ląstelių; 3 – dioksigenazė iš 3-hidroksipiridinu indukuotų ląstelių; 4 – abiejų dioksigenazių mišinys; 6 – rekombinantinė dioksigenazė BL21 kamiene; 7 – kontrolinių BL21 bakterijų beląstelinis ekstraktas; 8 – indukuotų BL21 bakterijų beląstelinis ekstraktas.

Kadangi rekombinantinė dioksigenazė poliakrilamidiniame gelyje migruoja kaip dioksigenazė iš piridino-3-karboksirūgštimi indukuotų ląstelių, tai nustatytasis genų sandara priklauso nikotinato metabolizmui.

REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

Šio darbo metu buvo ieškoma bakterijų galinčių skaidyti piridino monokarboksirūgštis. Netradicinėse vietose hidroksilinančių ir/ar hidroksilintų piridino karboksirūgščių skaidyme dalyvaujančių mikroorganizmų atranka leido pakartotinai atrinkti laboratorinį *Achromobacter* sp. JS18 kamieną, galintį skaidyti 3-hidroksipiridino-2-karboksirūgštį bei iš dirvožemio išskirti naują 5HP kamieną galintį vieninteliu anglies ir energijos šaltiniu panaudoti 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštį. 16S rRNR geno analizės duomenimis 5HP kamienas priklauso *Pusillimonas* genčiai. Tai pirmas žinomas mikroorganizmas galintis skaidyti 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštį.

Tiriant *Pusillimonas* sp. 5HP ląsteles buvo nustatyta, kad šios ląstelės gali įsisavinti ne tik 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgštį, bet ir 3-hidroksipiridiną, piridino-3-karbonitrilą ir/ar piridino-3-karboksirūgštį (nikotino rūgštį). Piridino-3-karbonitrilo skaidymas vyksta nikotino rūgšties keliu. Visi šie junginiai *Pusillimonas* sp. 5HP bakterijose indukuoja tris skirtingus katabolinius kelius, susidarant bendram metabolitui – 2,5-dihidroksipiridinui. Tiriant beląstelinį *Pusillimonas* sp. 5HP ekstraktą buvo pirmą kartą nustatyta ir dalinai išgryninta 5-hidroksipikolinato 2-monooksigenazė, katalizuojanti 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgšties oksidacinį dekarboksilinimą, susidarant 2,5-dihidroksipiridinui. Tokiu būdu buvo parodytas dar neaprašytas degradacijos kelias, susidarant 2,5-dihidroksipiridinui iš 5-hidroksipiridino-2-karboksirūgšties.

Tiriant *Achromobacter* sp. JS18 ląstelių substratinį specifiškumą buvo nustatyta, kad bakterijose yra indukuojami trys skirtingi: piridino-2-karboksirūgšties, piridino-3-karboksirūgšties ir piridino-2,6-dikarboksirūgšties skaidymo keliai. Remiantis gautais tyrimų rezultatais, buvo pasiūlytas galimas minėtų piridino karboksirūgščių, įskaitant ir 3-hidroksipiridino-2-karboksirūgšties, skaidymo kelias. Visi skaidymo keliai veda į bendro metabolito – 2,5-dihidroksipiridino – susidarymą.

Tiriant *Sinorhizobium* sp. L1 ląstelės, buvo nustatyta, kad 3-hidroksipiridino ir piridino-3-karboksirūgšties skaidymai yra indukuojami procesai ir vyksta skirtingais keliais. 3-Hidroksimetilpiridinas *Sinorhizobium* sp. L1 ląstelėse yra oksiduojamas iki piridino-3-karboksirūgšties (nikotino rūgšties). Tiek 3-hidroksipiridino, tiek ir piridino-3-karboksirūgšties skaidymas vyksta susidarant bendram metabolitui – 2,5-dihidroksipiridinui. Tyrimų eigoje buvo pastebėta, kad *Sinorhizobium* sp. L1 ląstelėse 3-hidroksipiridinas ir piridino-3-karboksirūgštis indukuoja skirtingas 2,5-dihidroksipiridino dioksidogenazės izoformas. Analizuojant *Sinorhizobium* sp. L1 genų biblioteką, buvo atrinktas DNR fragmentas, koduojantis dalį nikotino rūgšties katabolizme dalyvaujančių baltymų.

Šio darbo metu buvo išgrynintos trys 2,5-dihidroksipiridino 5,6-dioksidogenazės, dvi nikotinato ir viena pikolinato dehidrogenazės, kurios yra palygintos su žinomais analogiškais baltymais 14-oje lentelėje.

14 lentelė. 2,5-Dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazės, nikotinato dehidrogenazės, pikolinato dehidrogenazės palyginimas su žinomais analogiškais baltymais.

Šaltinis	K _M , mM	Specifinis aktyvumas, U/mg	pH optimumas	Subvienetų molekulinė masė, kDa	Natyvaus fermento molekulinė masė, kDa	Literatūros šaltinis
2,5-Dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazės						
<i>Sinorhizobium</i> sp. L1 (A)	0,15	60	7,5-7,6	39,8	230	Šis darbas
<i>Sinorhizobium</i> sp. L1 (B)	0,175	500	7,4-7,5	38,3	214	Šis darbas
<i>Achromobacter</i> sp. JS18	–	0,3	7,5	38,7	227	Šis darbas
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	0,07	2,3	8,0	39	243-244	Jimenez ir kt., 2008
<i>Pseudomonas putida</i> N9	–	38,3	8,0	38,5	242	Gauthier ir kt., 1971
<i>Pseudomonas putida</i> S16	0,168	7,0	6,5	40	–	Tang ir kt., 2012
<i>Achromobacter</i> sp. 2L	–	15,3	–	–	340	Cain ir kt., 1974
Nikotinato dehidrogenazės						
<i>Sinorhizobium</i> sp. L1	0,12	198	7,0	85; 28; 17.7	–	Šis darbas
<i>Achromobacter</i> sp. JS18	–	0,79	5,6	97, 58, 33	295	Šis darbas
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	–	1,18		128; 23.8	130	Jimenez ir kt., 2008
<i>Comamonas testosteroni</i> JA1	–	–	7,0	82,4; 46; 21	–	Jang ir kt., 2010
<i>Pseudomonas fluorescens</i> TN5	0,11	672	8,3	80; X	100	Hurh ir kt., 1994
<i>Clostridium</i> sp.	0,11	28,8	7,5-8,5	–	300	Holcenberg ir kt., 1969
<i>Eubacterium barkeri</i>	–	18	7,5-8,0	50; 37; 33; 23	160	Gladyshev ir kt., 1996
<i>Bacillus niacini</i>	1,0	0,54	7,5	85; 34; 20	300	Nagel ir kt., 1990
<i>Bacillus</i> sp.	0,07	0,83	7,4	–	400	Hirschenber ir kt., 1971
Pikolinato dehidrogenazės						
<i>Achromobacter</i> sp. JS18	–	0,9	7,5	85; 43; 30	295	Šis darbas
<i>Arthrobacter picolinophilus</i>	–	0,636	7,5	–	230	Tate ir kt., 1974

Apibendrinant išgrynintų fermentų palyginimą galima teigti, kad išgrynintos ir iširtos 2,5-dihidroksipiridino dioksidogenazės yra panašios į žinomas, tačiau šio fermento A izoforma iš *Sinorhizobium* sp. L1 ląstelių išsiskiria specifiniu aktyvumu, kuris daugiau nei dešimt kartų didesnis už kitų analogiškų fermentų. Nikotinato dehidrogenazė iš *Achromobacter* sp. JS18 ląstelių skiriasi nuo žinomų subvienetų molekuline mase, optimalaus veikimo pH ir savo lokalizacija ląstelėje. Nikotinato dehidrogenazė iš *Sinorhizobium* sp. L1 ląstelių priešingai – yra panaši į žinomas, tačiau nuo kitų analogiškų fermentų skiriasi labai siauru specifiškumu substratams – galėjo oksiduoti tik nikotino rūgštį. Šiuo darbu buvo papildytos žinios ir apie pikolinato dehidrogenazes. Identifikuotas ir dalinai charakterizuotas fermentas skyrėsi nuo žinomo savo substratiniu specifiškumu bei lokalizacija ląstelėje.

IŠVADOS

1. Pikolino, nikotino ir dipikolino rūgštys *Achromobacter* sp. JS18 bakterijose indukuoja tris skirtingus katabolinius kelius.
2. Pirmą kartą išskirta bakterija galinti įsisavinti 5-hidroksipikolino rūgštį kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį. 5HP izoliatas priklauso *Pusillimonas* genčiai.
3. 3-Hidroksipiridinas, nikotino ir 5-hidroksipikolino rūgštys *Pusillimonas* sp. 5HP bakterijose indukuoja tris skirtingus katabolinius kelius, susidarant tam pačiam metabolitui – 2,5-dihidroksipiridinui.
4. Pirmą kartą atrasta ir dalinai išgryninta 5-hidroksipikolinato 2-monooksigenazė, katalizuojanti 5-hidroksipikolinato oksidacinį dekarboksilinimą.
5. 3-Hidroksipiridinas ir nikotino rūgštis *Sinorhizobium* sp. L1 ląstelėse indukuoja skirtingų 2,5-dihidroksipiridino dioksigenazės izoformų biosintezę.
6. Iš *Sinorhizobium* sp. L1 bakterijų klonuotas DNR fragmentas koduoja dalį nikotinato katabolizme dalyvaujančių baltymų.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

1. Karvelis, L., Meškys R. New *Rhizobium* strain degrading 3-hydroxypyridine. *Biologija* **2004** (2): 98–101.
2. Stanislauskienė R., Rudenkov M., Karvelis L., Gasparavičiūtė R., Meškienė R., Časaitė V., Meškys R. Analysis of phthalate degradation operon from *Arthrobacter* sp. 68b. *Biologija* **2011** 57: 45–54.
3. Karvelis L. Gasparavičiūtė R., Meškys R. Charakterization of 2,5-dihydroxypyridine dioxygenase from *Sinorhizobium* sp. L1. *Biologija* **2012** (Pateikta)
4. Karvelis L., Klimavičius A., Gasparavičiūtė R., Jančienė R., Meškys R. New *Pusillimonas* sp. strain degrading 5-hydroxypicolinic acid. (Pateikta)

KONFERENCIJOS

1. Razumienė, J., L. Karvelis, V. Gurevičienė, M. Rozgaitė, R. Meškys. Fermentinis nikotino rūgšties nustatymo metodas. *Chemija ir cheminė technologija: tarptautinė studentų mokslinė konferencija*. Vilnius, balandžio 27, 2007.
2. Razumiene J., L. Karvelis, V. Gureviciene, R. Meskys. Application of nicotinic acid 6-hydroxylase from *Sinorhizobium* sp. L-1 for amperometric determination of nicotinic acid and nicotinamide. *The 59th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry. Electrochemistry Down to the Molecular Level: Interfacial Science for Life and Technology*. September 7 to 12, 2008 Seville, Spain.
3. Kutanovas S., L. Karvelis, K. Michailova, V. Časaitė, J. Stankevičiūtė, R. Meškys. Biodegradation of carboxypyridines and carboxypyrazines. *COST Action CM00701 “Cascade Chemoenzymatic Processes – New Synergies Between Chemistry and Biochemistry” Joint Meeting-Conference*, Vilnius, Lithuania, 8-11 September, 2010.

PADĖKA

Esu labai dėkingas savo darbo vadovui dr. Rolandui Meškiui už galimybę atlikti šį darbą, nuoširdžius patarimus, atliekant eksperimentus ir rašant darbą.

Nuoširdžiai dėkoju visiems Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus darbuotojams, ypač V. Dzekevičienei ir A. Krutkiui ir visiems kitiems skyriaus darbuotojams vienaip ar kitaip prisidėjusiems prie šio darbo eksperimentų ir rezultatų, taip pat už bendradarbiavimą ir patarimus.

Taip pat reiškiu padėką dr. R. Jančienei, dr. A. Klimavičiui, R. Rozenbergui ir J. Meškauskui atlikusiems junginių sintezes.

Norėčiau padėkoti dr. Marijai Ger už baltymų peptidų analizę.

Širdingai dėkoju dr. Laurai Kalinienei ir recenzentams dr. R. Vidžiūnaitei ir dr. J. Urbonavičiui už patarimus ir komentarus.

Esu labai dėkingas savo šeimai ir draugams už supratingumą ir palaikymą.

LITERATŪROS SARAŠAS

1. Alhapel A., Darley D.J., Wagener N., Eckel E., Esner N., Pierik A.J. (2006) Molecular and functional analysis of nicotinate catabolism in *Eubacterium barkeri*. *PNAS* 103: 12341–13346.
2. Amador J.A., Taylor B.F. (1990) Coupled metabolic and photolytic pathways for degradation of pyridine dicarboxylic acids, especially dipicolinic acid. *Appl. Env. Microbiol.* 56: 1352–1356.
3. Awaja J.D., Fox P.M., Borthakur D. (2005) *pyd* genes of *Rhizobium* sp. strain TAL1145 are required for degradation of 3-hydroxy-4-pyridone, an aromatic intermediate in mimosine metabolism. *J. Microbiol.* 187: 4480–4487.
4. Behrman E.J., Stanier R.Y. (1957) The bacterial oxidation of nicotinic acid. *J. Biol. Chem.* 923–945
5. Berhman E.J, Pitt B.M. (1958) The Elbs peroxydisulphate oxidation in the pyridine series: a new synthesis of 2,5-dihydroxypyridine. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 3717–3718.
6. Boivin C., Barran L.R., Malpica C.A., Rosenberg C. (1991) Genetic analysis of a region of the *Rhizobium meliloti* pSym plasmid specifying catabolism of trigonelline, a secondary metabolite present in legumes. *J. Bacteriol.* 173: 2809–2817
7. Boivin. C., Camut S., Malpica C.A., Truchet G., Rosenberg C. (1990) *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. *Plant Cell* 2: 1157–1170.
8. Bondareva A., Marcinkevičienė L., Bachmatova I., Semėnaitė R., Meškienė R., Meškys R. (2000) Plasmid-mediated degradation of 2-hydroxypyridine by a gram-positive bacterium. *Biologija* 1: 22–24.
9. Borthakur D., Soedarjo M., Fox P.M., Webb D.T. (2003) The *mid* genes of *Rhizobium* sp. strain TAL1145 are required for degradation of mimosine into 3-hydroxy-4-pyridone and inducible by mimosine. *Microbiology* 149: 537–546.

10. Bosch R., Moore E.R.B., Pieper E.G.-V., Pieper D.H. (1999) NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *J. Bacteriol.* 181: 2315–2322.
11. Brandsch R., Decker K. (1984) Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Arthrobacter oxidans*. *Arch. Microbiol.* 138: 15–17.
12. Brandsch R. (2006) Microbiology and biochemistry of nicotine degradation; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 493–498.
13. Bugg T.D.H. (2003) Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models; *Tetrahedron* 59: 7075–7101.
14. Bugg T.D.H., Ramaswamy S. (2008) Non-heme iron-dependent dioxygenases: unravelling catalytic mechanisms for complex enzymatic oxidations. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12: 134–140.
15. Cain R.B., Houghton C., Wright K.A. (1974) Microbial metabolism of pyridine ring. Metabolism of 2- and 3-hydroxypyridines by the maleamate pathway in *Achromobacter* sp. *Biochem. J.* 140: 293–300.
16. Chaiyen P. (2010) Flavoenzymes catalyzing oxidative aromatic ring-cleavage reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 493: 62–70.
17. Decker K, Bleeg H. (1965) Induction and purification of stereospecific nicotine oxidizing enzymes from *Arthrobacter oxidans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 105: 313–324.
18. Doi R.H., Halvorson H. (1961) Mechanism of dipicolinic acid stimulation of the soluble reduced diphosphopyridine nucleotide oxidase of spores. *J. Bacteriol.* 81: 642–648.
19. Ensign J.C., Rittenberg S.C. (1963) A crystalline pigment produced from 2-hydroxypyridine by *Arthrobacter crystallopoietes*. *Arch. Microbiol.* 47: 137–153.
20. Ensign J.C., Rittenberg S.C. (1964) The pathway of nicotinic acid oxidation by a *Bacillus* species. *J. Biol. Chem.* 239(7): 2285–91.
21. Fernandez-Martin R., Cultrone A., Scazzocchio C. (1999) The nicotinic acid utilisation cluster of *Aspergillus nidulans*. XONet European Project

- HPRN-CT-1999-00084. IGM Universite Paris-sud Bat. 409. 91405 Orsay France.
22. Fetzner S. (2000) Enzymes involved in the aerobic bacterial degradation of *N*-heteroaromatic compounds: molybdenum hydroxylases and ring-opening 2,4-dioxygenases. *Naturwissenschaften* 87: 59–69.
 23. Fetzner S., Tshisuaka B., Lingens F., Kappl R., Huttermann J. (1998) Bacterial degradation of quinoline and derivatives – pathways and their biocatalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 576–597
 24. Fetzner. S. (1998) Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 237–250.
 25. Forman M., Aronson A. (1972) Regulation of dipicolinic acid biosynthesis in sporulating *Bacillus cereus*. *Biochem J.* 126: 503–513
 26. Ganas P., Brandsch R. (2009) Uptake of *L*-nicotine and 6-hydroxy-*L*-nicotine by *Arthrobacter nicotinovorans* and by *Escherichia coli* is mediated by facilitated diffusion and not by passive diffusion or active transport; *Microbiology* 155: 1866–1877.
 27. Ganas P., Sachelaru P., Mihasan M., Iglai G. L., Brandsch R. (2008) Two closely related pathways of nicotine catabolism in *Arthrobacter nicotinovorans* and *Nocardioides* sp. strain JS614; *Arch. Microbiol.* 189: 511–517.
 28. Gauthier J.J., Rittenberg S.C. (1971) The metabolism of nicotinic acid. I. Purification and properties of 2,5-dihydroxypyridine oxygenase from *Pseudomonas putida* N-9. *J. Biol. Chem.* 246(11): 3737–3742.
 29. Gladyshev V.N., Khagulov S.V., Stadtman T.C. (1994) Nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barkeri*: Electron paramagnetic resonance studies show that selenium is coordinated with molybdenum in the catalytically active selenium-dependent enzyme. *Biochemistry* 91: 232–236.

30. Gladyshev V.N., Khangulov S.V., Stadtman T.C. (1996) Properties of the selenium- and molybdenum-containing nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barkeri*. *Biochemistry* 35: 212–223.
31. Grether-Beck S., Igloi G.L., Pust S., Schilz E., Decker K., Brandsch R. (1994) Structural analysis and molybdenum-dependent expression of the pAO1-encoded nicotine dehydrogenase genes of *Arthrobacter nicotinovorans*. *Mol. Microbiol.* 13: 929–936.
32. Gupta R.C., Shukla O.P. (1975) Microbial metabolism of 2-hydroxypyridine. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 12: 296–298.
33. Halo L.M., Marshall J.W., Yakasai A.A., Song Z., Butts C.P., Crump M.P., Heneghan M., Bailey A.M., Simpson T.J., Lazarus C.M., Cox R.J. (2008) Authentic heterologous expression of the tenellin iterative polyketide synthase nonribosomal peptide synthetase requires coexpression with an enoyl reductase. *Chem. Biol.* 9: 585–594.
34. Hirschberg R., Ensign J.C. (1971a) Oxidation of nicotinic acid by a *Bacillus* species: purification and properties of nicotinic acid and 6-hydroxynicotinic acid hydroxylases. *J. Bacteriol.* 108: 751–756.
35. Hirschberg R., Ensign J.C. (1971b) Oxidation of nicotinic acid by a *Bacillus* species: source of oxygen atoms for the hydroxylation of nicotinic acid and 6-hydroxynicotinic acid. *J. Bacteriol.* 108: 757–759.
36. Hirschberg R., Ensign J.C. (1972) Oxidation of nicotinic acid by a *Bacillus* species: regulation of nicotinic acid and 6-hydroxynicotinic acid hydroxylases. *J. Bacteriol.* 112: 392–397.
37. Holcenberg J.S., Stadtman E.R. (1969) Nicotinic acid metabolism. III. Purification and properties of a nicotinic acid hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 244: 1194–1203.
38. Holcenberg J.S., Tsai L. (1969) Nicotinic acid metabolism. IV. Ferredoxin-dependent reduction of 6-hydroxynicotinic acid to 6-oxo-1,4,5,6-tetrahydronicotinic acid. *J. Biol. Chem.* 244: 1204–1211.

39. Holmes P.E., Rittenberg S.C. (1972) The bacterial oxidation of nicotine. VII. Partial purification and properties of 2,6-dihydroxypyridine oxidase. *J. Biol. Chem.* 247: 7622–7.
40. Houghton C., Cain R.B. (1972) Microbial metabolism of pyridine ring. Formation of pyridinediols (dihydroxypyridines) as intermediates in the degradation of pyridine compounds by micro-organisms. *Biochem. J.* 130: 879–93.
41. Hughes D.E. (1955) 6-Hydroxynicotinic acid as an intermediate in the oxidation of nicotinic acid by *Pseudomonas fluorescens*. *Biochem. J.* 60: 303–310.
42. Hunt A.L. (1959) Purification of the nicotinic acid hydroxylase system of *Pseudomonas fluorescens* KB1. *Biochem. J.* 72:1–7.
43. Hurh B., Yamane T., Nagasawa T. (1994) Purification and Characterization of Nicotinic Acid Dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* TN5; *J. Ferment. Bioeng.* 78: 19–26.
44. Igloi G.L., Brandsch R. (2003) Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system. *J. Bacteriol.* 185: 1976–1986.
45. Yang Y., Chen T., Ma P., Shang G., Dai Y., Yuan S. (2010) Cloning, expression and functional analysis of nicotinate dehydrogenase gene cluster from *Comamonas testosteroni* JA1 that can hydroxylate 3-cyanopyridine. *Biodegradation* 21: 593–602.
46. Yang Y., Yuan S., Chen T., Ma P., Shang G., Dai Y. (2009) Cloning, heterologous expression, and functional characterization of nicotinayte dehydrogenase gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *Biodegradation* 20: 541–549.
47. Yuan S., Yang Y., Sun J., Liang M.X., Dai Y.J., Zhang X.N., Xu S.C.(2005) A combined process of hydroxylation of nicotinic acid by growing culture and hydroxylation of 3-cyanopyridine by resting cells of *Comamonas testosteroni* JA1. *Eng. Life Sci.* 5: 369–374.

48. Jimenez J.I., Canales A., Barbero J.J., Gilanski K., Rychlewski L., Garcia J.L., Diaz E. (2008) Deciphering the genetic determinants for aerobic nicotinic acid degradation: the *nic* cluster from *Pseudomonas putida* KT2440. *PNAS* 105: 11329–11334.
49. Jimenez J.I., Juarez J.F., Garcia J.L., Diaz E. (2011) A finely tuned regulatory circuit of the nicotinic acid degradation pathway in *Pseudomonas putida*. *Env. Microbiol.* 13: 1718–1732.
50. Jones M.V., Hughes D.E. (1972) The oxidation of nicotinic acid by *Pseudomonas ovalis* chester. The terminal oxidase. *J. Biochem.* 129: 755–761.
51. Jones M.V. (1973) Cytochrome c linked nicotinic acid hydroxylase in *Pseudomonas ovalis* chester. *FEBS Lett.* 32: 321–324.
52. Kaiser J.P., Feng Y., Bollag J.M. (1996) Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiol. Rev.* 60: 483–498.
53. Kessmann H., Staub T., Hofmann C., Maetzke T., Herzog J. (1994) Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:439–459.
54. Khanna M., Shukla O.P. (1977) Microbial metabolism of 3-hydroxypyridine. *Indian J. Biochem. Biophys.* 14: 301–302.
55. Kim Ch.G., Lamichhane J., Song K.I., Nguyen V.D., Kim D.H., Jeong T.S., Kang S.H., Kim K.W., Maharjan J., Hong Y.S., Kang J.S., Yoo J.Ch., Lee J.J., Oh T.J., Liou K. (2008) Sohng J.K. Biosynthesis of rubradirin as an ansamycin antibiotic from *Streptomyces achromogenes* var. *rubradiris* NRRL3061. *Arch. Microbiol.* 189: 463–473.
56. Kitts C.L., Lapointe J.P., Lam V.P., Ludwig R.A. (1992) Elucidation of complete *Azorhizobium* nicotinate catabolism pathway. *J. Bacteriol.* 174: 7791–7797.
57. Kitts C.L., Schaechter L.E., Rabin R.S., Ludwig R.A. (1989) Identification of cyclic intermediates in *Azorhizobium caulinodans*. Nicotinate catabolism. *J. Bacteriol.* 171: 3406–3411.

58. Kobayashi, Y., and K. Arima. (1962) Bacterial oxidation of dipicolinic acid. II. Identification of a-ketoglutaric acid and 3-hydroxydipicolinic acid and some properties of cell-free extracts. *J. Bacteriol.* 84:765–771.
59. Korosteleva L.A., Kost A.N., Vorobyova L.N., Modyanova L.V., Terentyev P.B., Kulikov N.S. (1981) Microbiological degradation of pyridine and 3-methylpyridine. *Appl. Biochem. Microbiol.* 17: 276–283.
60. Kost A.N. ir Modyanova L.V. (1978) Microbiol transformation of pyridine derivatives (Review). *Chemistry of Heterocyclic Compounds* 14: 1049–1062.
61. Kress D., Alhapel A., Pierik A.J., Essen L.O (2008) The Crystal Structure of Enamidase: A Bifunctional Enzyme of the Nicotinate Catabolism. *J. Mol. Biol.* 384: 837–847.
62. Kretzer A., Frunzke K., Andreesen J.R. (1993) Catabolism of isonicotinate by *Mycobacterium* sp. INA1: extended description of the pathway and purification of the molybdoenzyme isonicotinate dehydrogenase. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2763–2772.
63. Kutanovas S. (2006) Piridino dikarboksirūgštis skaidančių bakterijų tyrimas. Bakalaurinis darbas. Vilniaus universitetas, Vilnius.
64. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
65. Lee J.J., Yoon J.H., Yang S.Y., Lee S.T. (2006) Aerobic biodegradation of 4-metilpyridine and 4-etilpyridine by newly isolated *Pseudonocardia* sp. strain M43. *FEMS Microbiol. Lett.* 254: 95–100.
66. Lee J.J., Rhee S.K., Lee S.T. (2001) Degradation of 3-methylpyridine and 3-ethylpyridine by *Gordonia nitida* LE31. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4342–4345.
67. Li H., Li X., Duan Y., Zhang K.Q., Yang J. (2010) Biotransformation of nicotine by microorganism: the case of *Pseudomonas* spp.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 11–17.

68. Magalon A., Fedor J.G., Walburger A., Weinr J.H. (2011) Molybdenum enzymes in bacteria and their maturation. *Coord. Chem. Rev.* 255: 1159–1178.
69. Meng X.J., Li L.L., Gu G.F., Xiao M. (2010) A novel pathway for nicotine degradation by *Aspergillus oryzae* 112822 isolated from tobacco leaves. *Res. Microbiol.* 161: 626–633.
70. Mihasan M., Chiribau C.B., Friedrich T., Artenie V., Brandsch R. (2007) An NAD(P)H-nicotine blue oxidoreductase is a part of the nicotine regulon and may protect *Arthrobacter nicotinovorans* from oxidative stress during nicotine catabolism; *Appl. Env. Microbiol.* 73: 2479–2485.
71. Molnar A.M., Alves A.A., Pereira-da-Silva L., Macedo D.V. (2004) Dabbeni-Sala F. Evaluation by blue native polyacrylamide electrophoresis colorimetric staining of the effects of mitochondrial complexes in rat muscle. *Braz. J. Med. Bio. Res.* 37: 939–947.
72. Moon M. ir Van Lanen S.G. (2010) Characterization of a Dual Specificity Aryl Acid Adenylation Enzyme enzyme with dual function in nikkomycin biosynthesis. *Biopolymers* 93: 791–801.
73. Nagel M., Koenig K., Andreesen J.R. (1989) Bactopterin as component of eubacterial dehydrogenases involved in hydroxylation reactions initiating the degradation of nicotine, nicotinate, and 2-furancarboxylate. *Microbiol. Lett.* 60: 323–326
74. Nagel M., Andreesen J.R. (1990) Purification and characterization of the molybdoenzymes nicotinate dehydrogenase and 6-hydroxynicotinate dehydrogenase from *Bacillus niacini*. *Arch. Microbiol.* 154: 605–613.
75. Orpin C.G., Knight M., Evans W.C. (1972) The bacterial oxidation of picolinamide, a photolytic product od diquat. *Biochem. J.* 127: 819–831.
76. Paidhungat M., Setlow B., Driks A., Setlow P. (2000) Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *J. Bacteriol.* 182: 5505–5512.

77. Parshikov I.A., Terent'ev P.B., Modyanova L.V. (1994) Microbial transformation in series of nitrogen-containing heterocycles (Review). *Chemistry of Heterocyclic Compounds* 30: 11–12.
78. Rincon M.T., Allison M.J., Michelangeli F., De Sanetis Y., Dominguez-Bello M.G. (1998) Anaerobic degradation of mimosine-derived hydroxypyridines by cell free extracts of the rumen bacterium *Synergistes jonesii*. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 27: 4127–133.
79. Schenk S., Decker K. (1999) Horizontal gene transfer involved in the convergent evolution of the plasmid-encoded enantioselective 6-hydroxynicotine oxidases. *J. Mol. Evol.* 48: 178–186.
80. Schrader T., Thiemer B., Andreesen J.R. (2002) A molybdenum-containing dehydrogenase catalyzing an unusual 2-hydroxylation of nicotinic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 612–7.
81. Seyfried B., Schinck B. (1990) Fermentative degradation of dipicolinic acid (pyridine-2,6-dicarboxylic acid) by a defined coculture of strictly anaerobic bacteria. *Biodegradation* 1: 1–7.
82. Semėnaitė R. (2003) Piridino ir 2-hidroksipiridino biodegradacijos bakterijose tyrimas. Daktaro disertacija, Biochemijos institutas ir Vilniaus universitetas, Vilnius.
83. Sethi P., Kulkarni P.R. (1995) *Leucaena leucocephala* a nutrition profile. Food and Nutrition Bulletin. 16(3). The United Nations Press.
84. Sharma M.L., Kaul S.M., Shukla O.P. (1984) Metabolism of 2-hydroxypyridine by *Bacillus brevis*. *Biol. Mem.* 9: 43–52.
85. Sharma R.C. ir Schimke R.T. (1994) The propensity for gene amplification: a comparison of protocols, cell lines and selection agents. *Mutat. Res.*; 304: 243–260.
86. Shukla O.P., Kaul S.M. (1986) Microbial transformation of pyridine-*N*-oxide and pyridine by *Nocardia* sp. *Can. J. Microbiol.* 32: 330–341.
87. Tang H., Yao Y., Wang L., Yu H., Ren Y., Wu G., Xu P. (2012) Genomic analysis of *Pseudomonas putida*: genes in a genome island are crucial for nicotine degradation. *Scientific Report* 2: 377.

88. Tang H., Wang S., Ma L., Meng X., Deng Z., Zhang D., Ma C., Xu P. (2008) A Novel Gene, Encoding 6-Hydroxy-3-Succinoylpyridine Hydroxylase, Involved in Nicotine Degradation by *Pseudomonas putida* Strain S16. *Appl. Env. Microbiol.*, 74: 1567–1574.
89. Tate, R.L.; Ensign, J.C. (1974) Picolinic acid hydroxylase of *Arthrobacter picolinophilus*. *Can. J. Microbiol.* 20: 695–702.
90. Thacker R., Gunsalus I.C. (1979) Dissociation of the NIC plasmid aggregate in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 137: 697–699.
91. Thacker R., Rorvig O., Kahlon P. (1978) Gunsalus I.C. NIC, a conjugative nicotine-nicotinate degradative plasmid in *Pseudomonas convexa*. *J. Bacteriol.* 135: 289–90.
92. Tinschert A., Kiener A., Heinzmann K, Tschech A. (1997) Isolation of new 6-methylnicotinic-acid-degrading bacteria, one of which catalyses the regioselective hydroxylation of nicotinic acid at position C2. *Arch. Microbiol.* 168: 355–361
93. Tinschert A., Tschech A., Heinzmann K, Kiener A. (2000) Novel regioselective hydroxylations of pyridine carboxylic acids at position C2 and pyrazine carboxylic acids at position C3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 185–195.
94. Tropel D., van der Meer J.R. (2004) Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 68: 474–500.
95. Tsai L., Pastan., Stadtman E.R. (1966) Nicotinic acid metabolism. II. The isolation and characterisation of intermediates in the fermentation of nicotinic acid. *J. Biolog. Chem.* 241: 1807–13.
96. Uchida A., Ogawa M., Yoshida T., Nagasawa T. (2003a) Regioselective hydroxylation of quinolinic acid, lutidinic acid and isocinchomeric acid by resting cells of pyridine dicarboxylic acid-degrading microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 337–341.
97. Uchida A., Ogawa M., Yoshida T., Nagasawa T. (2003b) Quinolate dehydrogenase and 6-hydroxyquinolate decarboxylase involved in the

- conversion quinolinic acid to 6-hydroxyquinolinic acid by *Alcaligenes* sp. strain UK21. *Arch. Microbiol.* 180: 81–87.
98. Wagener N., Pierik A.J., Ibdah A., Hille R., Dobbek H. (2009) The Mose active site of nicotinate dehydrogenase. *PNAS* 106: 11055–11060.
 99. Watson G.K., Houghton C., Cain R.B. (1974a) Microbial metabolism of the pyridine ring. The hydroxylation of 4-hydroxypyridine to pyridine-3,4-diol (3,4-dihydroxypyridine) by 4-hydroxypyridine-3-hydroxylase. *J. Biochem.* 140: 265–276.
 100. Watson G.K., Houghton, C., Cain R.B. (1974b) Microbial metabolism of the pyridine ring. The metabolism of pyridine-3,4-diol (3,4-dihydroxypyridine) by *Agrobacterium* sp. *J. Biochem.* 140: 277–90.
 101. Weinberger M., Kolenbrander P.E. (1979) Plasmid-determined 2-hydroxypyridine utilisation by *Arthrobacter crystallopoietes*. *Can. J. Microbiol.* 25: 329–334.
 102. Wieser M., Heinzmann K., Kiener A. (1997) Bioconversion of 2-cyanopyrazine to 5-hydroxypyrazine-2-carboxylic acid with *Agrobacterium* sp. DSM 6336;. *Appl. Microbiot. Biotechnol.* 48: 174–176.
 103. Zefirov N.S., Agapova S.R., Terentiev P.B., Bulakhova I.M., Vasyukova N.I., Modyanova L.V. (1994) Degradation of pyridine by *Arthrobacter crystallopoietes* and *Rhodococcus opacus* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 118: 71–74.