



**VILNIAUS UNIVERSITETAS  
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS  
CHEMIJOS INSTITUTAS**

**Simonas Norvaišis**

Biochemijos studijų programa  
Bakalauro baigiamasis darbas

**7-CIANO-7-DEAZAGUANINĄ SKAIDANČIŲ BAKTERIJŲ  
PAIEŠKA IR TYRIMAS**

Darbo vadovė  
dr. Jonita Stankevičiūtė

Vilnius, 2021

# **7-Ciano-7-deazaguaniną skaidančių bakterijų paieška ir tyrimas**

Bakalauro studijų baigiamasis darbas

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre,  
Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje

Simonas Norvaišis

---

Darbo vadovė:

Dr. Jonita Stankevičiūtė

---

# TURINYS

DARBE NAUDOTOS SANTRUMPOS .....	5
ĮVADAS .....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	8
1.1    7-Deazaguanozinų įtaka tRNR bei kitų nukleorūgščių struktūrai ir funkcionalumui .....	9
1.2    7-Deazaguanozinų įtaka organizmų fiziologinėms funkcijoms .....	13
1.3    7-Deazaguanozinų biosintezė ir biosintezės reguliacija .....	17
1.4    7-Deazapurinų struktūra pasižymintys antriniai metabolitai ir jų ypatybės .....	19
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	21
2.1    Medžiagos, bakterijų kamienai, įranga .....	21
2.1.1    Medžiagos .....	21
2.1.2    Naudoti pradmenys .....	21
2.1.3    Bakterijų kamienai ir plazmidės .....	22
2.1.4    Įranga .....	23
2.2    Genų inžinerijos metodai .....	23
2.2.1    Bakterijų chromosominės DNR skyrimas .....	23
2.2.2    Plazmidinės DNR skyrimas .....	23
2.2.3    DNR gryninimas .....	24
2.2.4    Polimerazės grandininė reakcija (PGR) .....	24
2.2.5    DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis .....	25
2.2.6    DNR elektroforezė agarozės gelyje .....	25
2.2.7    DNR fragmentų gryninimas iš gelio .....	25
2.2.8    DNR klonavimas .....	25
2.2.9    Elektrokompetentinių ląstelių ruošimas ir elektroporacija .....	26
2.3    Biocheminiai metodai .....	26
2.3.1    Mikroorganizmų, biodegraduojančių 7-ciano-7-deazaguaniną (PreQ <sub>0</sub> ), paieška .....	26
2.3.2 <i>E. coli</i> kultivavimas ir eksperimentai su <i>E. coli</i> intaktinėmis ląstelėmis bei lizatais .....	27
2.3.3    Eksperimentai su <i>Microbacterium sp.</i> SINO2 intaktinėmis ląstelėmis .....	27
2.3.4    Biokonversijos eksperimentai su rekombinantine Vcz deminaze .....	28
2.3.5    Rekombinantinių baltymų gryninimas .....	28
2.3.6    Eksperimentai su <i>Microbacterium sp.</i> SINO2 beląstelinio ekstrakto ir <i>Microbacterium sp.</i> SINO2 baltymų gryninimo eksperimentai .....	28
2.3.7    Baltymų natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė (NDS–PAGE) .....	29
2.4    Analiziniai metodai .....	30

2.4.1	Tandeminė skysčių chromatografija ir masių spektrometrija.....	30
2.4.2	Branduolių magnetinio rezonanso eksperimentai.....	30
2.5	Kompiuteriniai metodai ir programinė įranga.....	30
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	32
3.1	7-Ciano-7-deazaguaniną skaidančių bakterijų, esančių dirvožemio mėginiuose, atranka ir išskyrimas.....	33
3.2	SINO2 ląstelių katalizuojamos PreQ <sub>0</sub> biodegradacijos produkto struktūros nustatymas.....	35
3.3	SINO2 bakterijos genties identifikavimas bei giminingiausių atstovų paieška.....	38
3.4	<i>Microbacterium sp.</i> SINO2 fermento, atsakingo už PreQ <sub>0</sub> deamininimą, paieška baltymų chromatografijos būdu.....	38
3.5	<i>Microbacterium sp.</i> SINO2 geno bei fermento, atsakingo už PreQ <sub>0</sub> deamininimą, paieška panaudojant bioinformatinius, genų inžinerijos bei rekombinantinių baltymų technologijos metodus.....	39
3.6	Tikslinių deaminazių erdvių struktūrų modeliavimo ir baltymo-ligando kompleksavimo tyrimai	49
	IŠVADOS.....	60
	SANTRAUKA.....	61
	SUMMARY.....	62
	PADĖKA.....	63
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	64

## DARBE NAUDOTOS SANTRUMPOS

**APS** – amonio persulfatas;

**Asp** – asparto rūgštis;

**Bp** – bazių poros;

**Cys** – cisteinas;

**DMSO** – dimetilsulfoksidas;

**Gln** – gliutaminas;

**Glu** – glutamo rūgštis;

**His** – histidinas;

**HPLC-MS** – aukšto slėgio skysčių chromatografija, kombinuota su masių spektrometrija;

**IPTG** – izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktozidas;

**Km<sup>R</sup>** – atsparumas kanamicinui;

**KSV/ml** – bakterijų kolonijas suformuojantys vienetai viename mililitre bakterijų inokulianto;

**LC-MS/MS** – skysčių chromatografija, kombinuota su tandemine masių spektrometrija;

**LB** – Luria-Bertani terpė;

**NDS** – natrio dodecilsulfatas;

**ppm** – dalių skaičius milijone dalių;

**PreQ<sub>0</sub>** – 7-ciano-7-deazaguaninas;

**rRNR** – ribosominė RNR;

**Ser** – serinas;

**TAE buferinis tirpalas** – buferinis tirpalas, naudojamas nukleorūgščių elektroforezėje, sudarytas iš Tris bazės, acto rūgšties ir EDTA

**TEMED** – N, N, N', N' – tetrametilendiaminas;

**Tris** – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis;

**UV-Vis** – ultravioletinio ir regimojo diapazono bangos ilgių intervalas;

**6xHis-Tag** – 6 histidinių inkaras rekombinantinio baltymo C-gale, skirtas gryninimui afinine kolonėle.

## ĮVADAS

Pastaraisiais dešimtmečiais atradimai biotechnologijų ir genomikos srityse padėjo žmonijai sukurti ir plačiai taikyti našiasias gyvybės mokslų technologijas, tokias kaip *in silico* baltymų modeliavimas, sintetinė biologija bei naujos kartos sekoskaita. Šiuo metu įmanoma ypač efektyviai nuskaityti keturių kanoninių (A, T, G, C) nukleotidų seką bet kurio organizmo genome, sukurta daug efektyvių bioinformatinių priemonių, kurios gali padėti įprasminti šią nuskaitytą seką. Tačiau gamtoje aptinkama žymiai didesnė gausa gyvybės funkcionalumą koduojančių nukleorūgščių monomerų, nei visiems gerai žinomi keturi pagrindiniai nukleotidai (Rios ir Tor, 2013).

Organizmų chromosominėje DNR daugiausiai aptinkami N-metilinti ir C-metilinti kanoniniai nukleotidai, jų funkcionalumui tyrinėti jau sukurta nemažai efektyvių įrankių (pvz., bisulfitinis sekvenavimas, DNR molekulių masių spektrometrija, nanoporų sekvenavimas), o naudojantis šiomis technologijomis išaiškinta nepaprastai svarbi šių modifikuotų nukleotidų funkcija genų raiškos reguliacijoje bei kituose molekulinuose procesuose (Schwartz ir Motorin, 2016; Jones, 2012). Tačiau didžiausia natūralių modifikuotų nukleotidų įvairovė aptinkama ne chromosominės DNR struktūroje, o RNR molekulių struktūrose, ypač transportinėje RNR molekulėje, kuri yra viena pagrindinių genų transliacinio aparato komponentų (Helm, 2006). Skirtingose įvairias aminorūgštis dekoduojančiose tRNR bendrai randama virš 100 skirtingos struktūros modifikuotų nukleotidų, kurie inkorporuojami į tRNR po šios molekulės transkripcijos ir gali sudaryti iki 17% bendros tRNR nukleotidų sekos (Jackman ir Alfonzo, 2013). Tarp šių nukleotidų sutinkamos įvairios chemiškai unikalios struktūros, tokios kaip tiouridinas, 5-formilcitudinas, viozinas ar 7-deazaguanozinai. Manoma, kad šie modifikuoti tRNR nukleozidai lemia teisingą tRNR molekulės tretinės struktūros susiformavimą ir tinkamą sąveiką su ribosoma baltymų sintezės metu, o ekstremofiluose tokie modifikuoti nukleozidai organizmams reikalingi išvengti tRNR denatūracijos aukštoje temperatūroje (Turner ir kt., 2020).

Modifikuoti nukleozidai svarbūs ne tik mikroorganizmams ar fenotipiškai nereikšmingoms molekulinėms funkcijoms, bet ir tiesiogiai žmogaus sveikatai – mitochondrinėje DNR taškinės mutacijos sukelia modifikuotų nukleozidų, tokių kaip 5-taurinometiluridino, stoką mitochondrinėse tRNR molekulėse, dėl ko kyla nepagydomas MELAS (mitochondrinė encefalomiopatija, laktatinė acidozė ir insultą primenantys epizodai) sutrikimas, labai neigiamai paveikiantis žmonių gyvenimo kokybę bei trukmę (Kirino ir kt., 2006). Nors modifikuotų tRNR nukleozidų prasmė ir funkcionalumas žmonių sveikatai bei kitiems organizmams yra aktyviai tyrinėjamas, tokie tyrimai trunka ilgą laiką ir nėra efektyvūs (Motorin ir kt., 2007). Taip yra dėl dar neoptimizuotų tyrimų metodų, plačios modifikuotų nukleotidų pasiskirstymo dinamikos nukleorūgščių molekulėse ir fundamentalių žinių stokos. Pavyzdžiui, per daugelį metų išsiaiškinti beveik visų modifikuotų nukleozidų biosintezės keliai (El Yacoubi ir kt. 2012), tačiau beveik nieko nėra nežinoma apie jų metabolizmą ir apykaitą, ypač trūksta žinių apie minėtų 7-deazaguanozinų degradacijos kelius. Šio darbo objektas – 7-ciano-7-deazaguaninas – yra potranskripciskai modifikuotų nukleozidų archeozino ir kuezino bei kitų 7-deazaguanozino šeimos modifikuotų nukleozidų, įeinančių į archėjų ir bakterijų tRNR bei eukariotų tRNR sudėtį, pirmtakas. Kadangi ši molekulė yra bet kurio 7-deazaguanozino tipo nukleozido pirmtakas, šios šeimos modifikuotų nukleozidų metabolizmo ir degradacijos tyrimus nagrinėti pradėta būtent nuo šios molekulės. Daugelis

bakterijų baltymų pasižymi didele homologija su kitų organizmų baltymais, tyrimai bakterinėse modelinėse sistemose yra pakankamai pigūs ir nesudėtingi, tad degradacijos kelių paiešką verta pradėti būtent nuo šių modelinių organizmų. Identifikuoti ir charakterizuoti degradacijos kelio fermentai padėtų gauti ne tik fundamentalių žinių apie modifikuotų nukleozidų metabolizmą, tačiau galėtų būti panaudoti sintetinėje biologijoje konstruojant sintetinius organizmus, kuriant alternatyvus sintetinius metabolinius kelius bei pasitarnauti provaistų kūrime (Seo ir kt., 2009; Kazlauskas ir kt. 2019).

Remiantis minėtomis modifikuotų nukleozidų degradacijos tyrimų ypatybėmis, iškeltas šio darbo tikslas – iš dirvožemio mėginių išskirti ir identifikuoti bakteriją, atliekančią PreQ<sub>0</sub> transformaciją, bei charakterizuoti vykstantį PreQ<sub>0</sub> transformacijos procesą.

Darbo uždaviniai:

1. Atlikti 7-ciano-7-deazaguaniną skaidančių arba biotransformuojančių bakterijų paiešką ir gryninimą įvairiuose dirvožemio mėginiuose.
2. Genetiškai identifikuoti atrinktus bakterinius kamienus, gebančius skaidyti arba transformuoti 7-ciano-7-deazaguaniną.
3. Charakterizuoti vykstantį PreQ<sub>0</sub> biotransformacijos arba degradacijos procesą(-us).
4. Atlikti PreQ<sub>0</sub> skaidymą katalizuojančių fermento(-ų) ir jį(-uos) koduojančio(-ių) geno(-ų) paiešką ir charakterizavimą.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

Replikacijos ar transkripcijos metu į DNR ar RNR įjungami kanoniniai nukleotidai (A, T, G, C, U) organizme gali būti sintetinami *de novo* būdu arba gaunami iš aplinkos. Visi kiti nukleino rūgščių monomerai ląstelėje negali būti inkorporuoti į RNR ar DNR polimerazių pagalba, šie monomerai gaunami modifikuojant kanoninius nukleotidus nukleorūgščių sekoje po replikacijos arba po transkripcijos, kuomet susintetinta A, T, G, C arba U turinti DNR arba RNR kovalentiškai modifikuojama ląstelėje esančių fermentų pagalba (McCown ir kt., 2020).

Tokios modifikacijos gali būti deamininimai, izomerizacijos reakcijos, glikozilinimai, tiolinimai, transglikozilinimai, metilinimai, sutinkama biochemiškai labai išskirtinių transformacijų – aminorūgštys arba angliavandeniai gali būti prijungiami kovalentiškai prie nukleorūgšties bazės arba/ir prie ribozės (Boccalletto ir kt., 2018). Šios modifikacijos praplečia tokių nukleorūgščių, kaip chromosominės DNR, iRNR, tRNR, rRNR, ribozimų, reguliacine funkcija pasižyminčių RNR bei kitų nukleorūgščių, funkcionalumą, paveikdamos jų stabilumą, tretinės struktūros įgavimo kelią, pernašą, brendimą, sąveiką su nukleorūgštis surišančiais baltymais ir kt. (Chen ir kt. 2016).

Pirmųjų atrastų nukleotidų modifikacijų, tokių kaip pseudouridino (Ψ), inozino (I) bei dihidrouridino (D), funkcija organizmuose bei patologiuose susirgimuose tyrinėjama daugiau nei 60 metų (McCown ir kt., 2020). Dėl sąlyginai didelio šių modifikuotų nukleotidų kiekio organizmuose ir nesudėtingos struktūros, lyginant su kitais modifikuotais nukleotidais, pakankamai išsamiai išnagrinėti šių modifikuotų nukleotidų biosintezės, metabolizmo keliai, identifikuota šių modifikuotų nukleotidų molekulinė ir fiziologinė funkcija, tiesiogiai liečianti žmones, pvz., pseudouridino kiekio RNR mažėjimas Hoyeraal-Hreidarsson sindromo atveju (Penzo ir kt., 2017). Inozino modifikacijos identifikavimas DNR struktūroje pasitarnavo biotechnologijos mokslo šakai ir industrijai, atrasta deaminazių šeima ADAR, gebanti versti adenziną į inoziną RNR sekoje (Song ir kt., 2016). Pakitusi dihidrouridino modifikacijų ir kitų metilintų kanoninių nukleotidų dinamika žmogaus organizme buvo tiesiogiai pritaikyta vėžio diagnostikoje, pagal tai sukurtas šlapimo analizės metodas leido gana tiksliai nustatyti, ar žmogus serga, ar neserga onkologinėmis ligomis, ir leido prognozuoti vėžinių ligų eigą tirtoje pacientų imtyje (Seidel ir kt., 2006).

Dėl sudėtingo tyrimų proceso ir nedidelio kiekio fundamentinių žinių mažai žinoma apie sudėtingesnės struktūros, rečiau organizmuose pasitaikančių modifikuotų nukleotidų reikšmę gyvybei, molekulinėms funkcijoms. Vienu mažiausiai tyrinėtų sudėtingiausios struktūros modifikuotų nukleotidų – 7-deazaguanozinų šeimos atstovų, nagrinėjamų daugiau nei 60 metų, išsamiai charakterizuotas tik biosintezės kelias (Hutinet ir Swarjo, 2016). Nors pavieniai tyrimai leidžia daryti prielaidą apie šios šeimos modifikuotų nukleotidų reikšmę transliacinio aparato mechanizmui, lieka neaišku, dėl ko evoliucijos eigoje organizmai įgavo galimybę inkorporoti būtent šios šeimos modifikuotus nukleotidus į savo nukleorūgštis (Hutinet ir kt., 2019). Šiuo metu dar nėra keliami konkrečių prielaidų, tačiau manoma, kad dėl didelio skaičiaus fermentų ir kitų molekulių, reikalingų susintetinti šiuos modifikuotus nukleotidus, organizmai turėtų apsunkinti savo anabolinę mašineriją ne be reikalo (Vinayak ir Pathak,

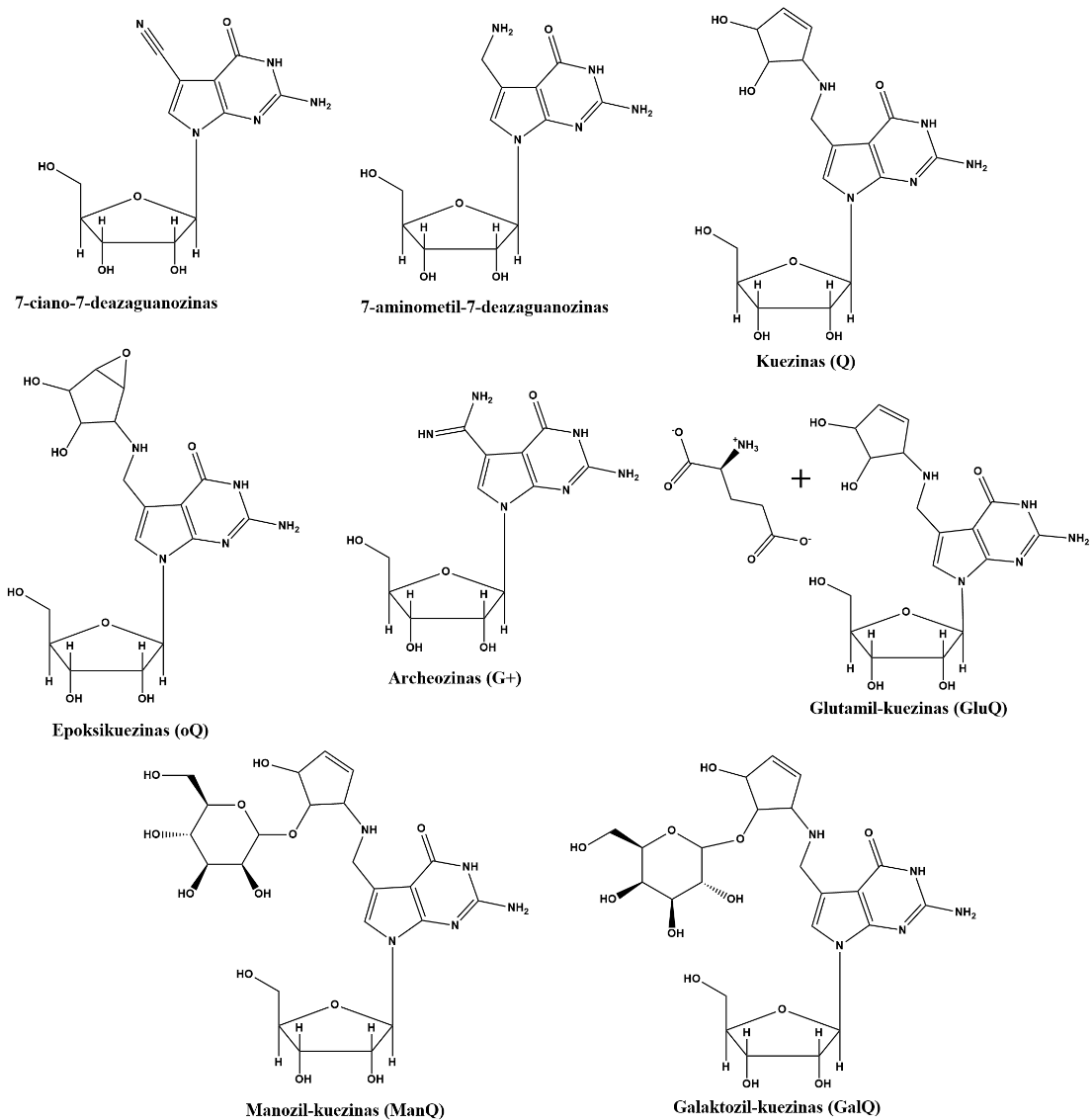


2009). Dėl fundamentalių tyrimų stokos neprieita prie vieningos nuomonės, kokia galėtų būti konkreti 7-deazaguanozinų reikšmė bei panaudojimo galimybės.

### **1.1 7-Deazaguanozinų įtaka tRNR bei kitų nukleorūgščių struktūrai ir funkcionalumui**

Modifikuotų nukleotidų tyrimų sritis gyvuoja daugiau nei 50 metų, per šį laiką tRNR struktūrose rasta daugiau nei 110 post-transkripcinių modifikacijų, naujų modifikacijų struktūrų atrandama ir šiais laikais (Nishimura ir Watanabe, 2006; Boccalletto ir kt., 2018).

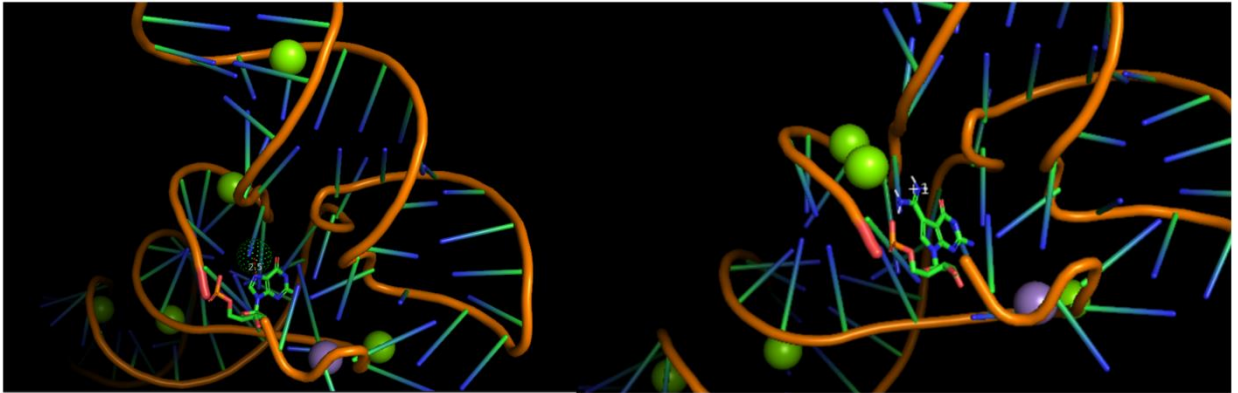
Nors pirmasis 7-deazaguanozinų šeimos nukleozidas kuezinas atrastas prieš daugiau nei 50 metų, šiuo metu organizmų tRNR struktūrose randami ne mažiau nei aštuoni 7-deazaguanino motyvą turintys nukleozidai (1.1 pav.), nulemiantys tRNR, įvairių kitų RNR molekulių struktūras bei funkcijas (Kasai ir kt., 1975; Boccaletto ir kt., 2018; Thiaville ir kt., 2016). Dažniausiai sutinkami ir kartu labiausiai ištirti 7-deazaguanozino šeimos nukleozidai yra kuezinas ir archeozinas (Gregson ir kt., 1993; Kasai ir kt., 1975).



**1.1 pav. Pagrindiniai 7-dezaguanozinų šeimos nukleozidai (Boccaletto ir kt., 2018).** Glutamil-kuezino atveju „+“ ženklas naudojamas pavaizduoti bendrai struktūrai, nes nėra žinoma, prie kurios hidroksigrupės jungiasi glutamo aminorūgštis, sudarydama esterinę jungtį.

Kuezinas ir archeozinas savo struktūrą 7-oje heterociklo pozicijoje turi azoto atomą, pakeistą anglies atomu, jų funkcionalumas ir prigimtis atskiriama dėl skirtingos šių modifikuotų nukleozidų padėties tRNR molekulėje bei pasiskirstymo skirtinguose organizmų duomenuose. Kuezinas randamas eukariotų ir bakterijų tirozino, histidino, asparto ir asparagino aminorūgštis koduojančių tRNR trečioje antikodono (angl. *wobble*) pozicijoje (Katz ir kt., 1982; Kersten, 1988). Palyginimui, archeozinas randamas tik archėjų domene, visas aminorūgštis koduojančių tRNR dihidrouridino kilpoje esančiuose 15-oje arba (rečiau) 13-oje pozicijose (Sprinzl ir kt., 1989). Šiuo aspektu evoliucijos eigoje archėjinės tRNR išsiskyrė – ne archėjinių tRNR 15 pozicijoje modifikacijų neaptinkama, čia įprastai vyrauja guanozinas.

Archeozinas aptiktas acidofilinės archėjos *Thermoplasma acidophilum* transportinės RNR 15-oje bei 13-oje pozicijoje (Kawamura ir kt., 2016). Guanozino pakeitimo į archeoziną tRNR 13-oje pozicijoje prasmė ir įtaka tRNR struktūrai iki šiol nebuvo pasiūlyta ir išaiškinta, tačiau pasitelkiant bioinformatinius modelius, kristalografinius eksperimentinius duomenis buvo pasiūlytos 15 pozicijoje archeoziną turinčios tRNR (G<sup>+</sup>15) struktūrinės ypatybės – skirtingai nuo G15 tRNR<sub>Phe</sub>, galinčios surišti Mg<sup>2+</sup> jonus (1.2 pav.), G<sup>+</sup>15 tRNR<sub>Phe</sub> nebeturi Mg<sup>2+</sup> surišančio saito. Taip įvyksta dėl to, kad fiziologinėse pH sąlygose bazinėmis savybėmis pasižymintį amidino motyvą turintis archeozinas jonizuojasi ir įgauna teigiamą krūvį, taip pat ir dėl sterinių trukdžių nebegali dalyvauti kaip magnio jonų kompleksadarys (Kawamura ir kt., 2016).



**1.2 pav. tRNR<sub>Phe</sub> molekulės, turinčios G15 pozicijoje skirtingas nukleobazes, struktūra ir modelis (Oliva ir kt., 2007).** tRNR<sub>Phe</sub> struktūra (kairėje pusėje) su G15 pozicijoje esančiu guanozinu. G<sup>+</sup>15 tRNR<sub>Phe</sub> modelis (dešinėje pusėje), azoto atomas 7-oje guanozino pozicijoje pakeistas anglies atomu bei amidino grupe.

Nors pastarosios sąlygos pagal teorinį modelį gali būti interpretuojamos kaip tRNR destabilizuojančios, manoma, kad struktūra yra stabilizuojama dėl fiziologiniame pH esančio teigiamai jonizuoto amidino fragmento, kuris dėl savo elektroninių savybių pakeičia Mg<sup>2+</sup> koordinuotą katijoną gali sudaryti intramolekulinius vandenilinius ryšius, be to, struktūra stabilizuojama dėl G<sup>+</sup>15-C48 susidarančios sąveikos (Oliva ir kt., 2007). Tai, kad archeozinas gali reikšmingai stabilizuoti archėjų tRNR ir aukštoje temperatūroje lemti organizmo transliacinio aparato teisingą veikimą, rodo ir kitas tyrimas, atliktas su *Thermococcus kodakarensis* ekstremofiline archėja (Turner ir kt., 2020). Šios archėjos mutantai, turintys defektuotus archeozino inkorporavimo į tRNR genus, labai blogai augo 95°C temperatūroje, kuri normaliomis sąlygomis šiam ekstremofilui yra optimali. Šio organizmo tRNR stabilizuojantis efektas buvo išmatuotas ir *in vitro* sąlygomis – sintetiniai tRNR<sub>Gln</sub> transkriptai su inkorporuotu archeozinu arba PreQ<sub>0</sub> turėjo 4-5°C aukštesnę lydymosi temperatūrą T<sub>m</sub>, lyginat su guanoziną turinčiais transkriptais.

Struktūriškai analizuojant eukariotų ar bakterijų tRNR molekulę, kaip jau minėta, savo struktūroje turinčią kueziną (Q) trečioje antikodono *wobble* pozicijoje (34 tRNR pozicijoje), galima teigti, kad šio modifikuoto nukleozido funkcija turėtų būti dar svarbesnė organizmui ir jo transliaciniam aparatui nei atitinkamai archeozino, kuris nėra aptinkamas šioje svarbiausioje tRNR struktūrinėje dalyje, tiesiogiai susijusioje su genų dekodavimu. *Wobble* pozicijose esantys nukleotidai gali atpažinti ne vieną, o kelis

nukleotidus, taip sumažindami reikalingą tRNR molekulių skaičių ląstelėje ir translacijos proceso jautrumą DNR mutacijoms (Rozov ir kt., 2016). Meier ir kolegos (1985) parodė, kad tokia komplementarumo sąveikos dinamika pasižymi ir *wobble* pozicijoje esantis kuezinas – Q-modifikuotas *Drosophila* tRNA<sub>His</sub> *Xenopus laevis* oocituose kartu su translacinio aparato pagalba efektyviau transliavo NAU nei NAC kodonus (N – bet kuris nukleotidas), nors kuezinas struktūriškai palankiau turėtų sudaryti Watson-Crick porą su citozinu (trys vandeniliniai ryšiai) nei su uracilu (du vandeniliniai ryšiai). Taip pat Q-modifikuota tRNR turi didesnę giminingumą ribosomai eukariotinėse ir bakterinėse sistemose (Noguchi ir kt., 1982). Spėjama, kad tRNR modifikavimas kuezinu suteikia tRNR atsparumo endonukleaziam poveikiui ląstelėse (Muller ir kt., 2015), in vivo *Dictyostelium discoideum* kueziną turinčios tRNR<sub>Asp</sub> ir tRNR<sub>Tyr</sub> tampa atsparesnės fermentinei degradacijai (Ott ir Kersten, 1985). Substratas kuezino modifikacijai yra ne tik citozolinės eukariotinės tRNR, tačiau ir mitochondrinės tRNR – kepenų ląstelių mt-tRNR<sub>Asp</sub> aptinkama kuezino modifikacija, tačiau dėl neaiškių priežasčių vėžinių kepenų ląstelių mt-tRNR<sub>Asp</sub> randama kuezino hipomodifikacija (Randerath ir kt., 1984).

7-Deazaguanozinų šeimos modifikuoti nukleotidai neseniai aptikti ir bakterijų DNR struktūrose. Masių spektrometrijos pagalba tiriant fragmentuotą patogeninės bakterijos *S. enterica* ser. Montevideo ir ekstremofilinės bakterijos *K. radiotolerans* genomine DNR, aptikti nedideli 2'-deoksiPreQ<sub>0</sub> ir reikšmingai didesni 2'-deoksi-7-amido-7-deazaguanozino (dADG) kiekiai (Thiaville ir kt., 2016). Remiantis šiais duomenimis ir atlikus kiekybinę analizę, autoriai teigia, kad *S. enterica* ser. Montevideo genomine DNR gali būti ~1,600 dADG modifikacijų 10<sup>6</sup> bp, o *K. radiotolerans* organizme - ~1,300/10<sup>6</sup> bp, dPreQ<sub>0</sub> – vidutiniškai 10-30 modifikacijų milijone bazių porų. Šiuose organizmuose taip pat aptikti galimi 2'-deoksi 7-deazaguanozinų biosintezės bei jų inkorporavimo į tRNR fermentų homologai, kurie gali būti atsakingi už šių 2'-deoksi-7-deazaguanozinų inkorporavimą į bakterijų DNR struktūrą (Thiaville ir kt., 2016). Neaiški išlieka ne tik šių modifikuotų nukleotidų prasmė bei funkcija genominei bakterijų DNR, tačiau ir pačių modifikuotų nukleotidų numanomi biosintezės ir inkorporavimo į DNR struktūrą fermentų funkcija – jiems būdingas sąlyginai mažas panašumas į kitus žinomos sekos fermentus, taip pat jie pasižymi nežinomos funkcijos domenų (angl. *DUF*) gausa. Manoma, kad *K. radiotolerans* atveju toks didelis modifikacijų dažnis gali būti svarbus šio organizmo gebėjimui išgyventi patyrus didelį radioaktyvios apšvitos kiekį – bakterija išgyvena, paveikta 20000 Gy  $\gamma$ -tipo radiacijos, žmogus per porą savaičių miršta patyręs 5 Gy ar didesnę apšvitą (Bagwell ir kt., 2008).

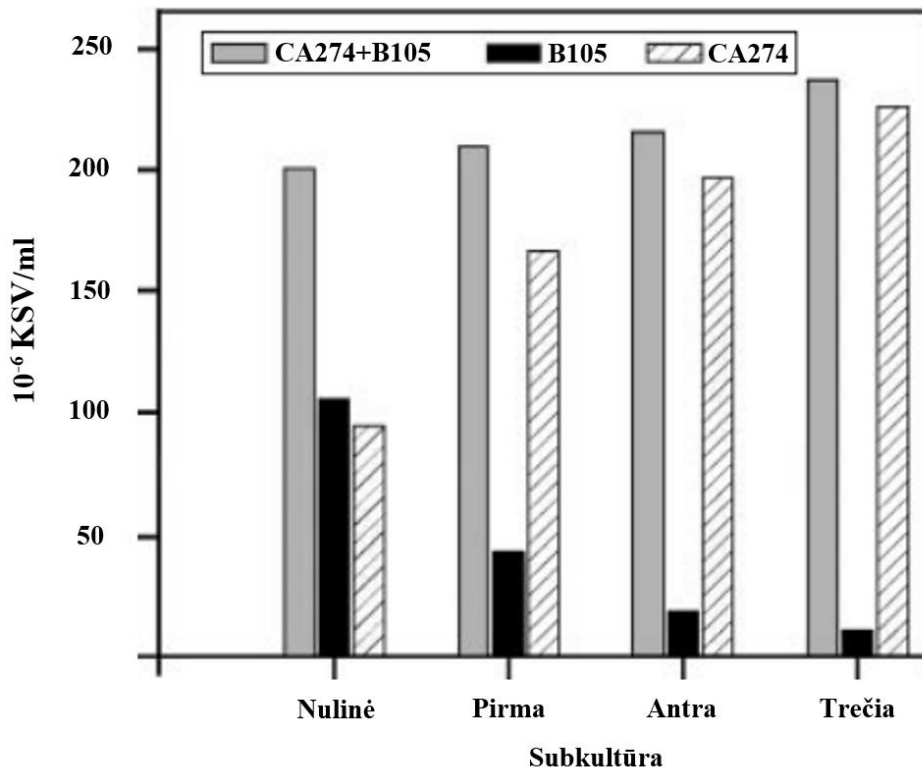
PreQ<sub>0</sub>, archeozino biosintezės ir inkorporavimo į DNR homologai bei pačios 7-deazaguanozino tipo modifikacijos nustatytos ir bakteriofagų, tokių kaip Mycobacteriophage Rosebush, *Streptococcus* Dp-1 ir *E. coli* 9g, genomine DNR (Pedulla ir kt., 2003; Sabri ir kt., 2011; Kulikov ir kt., 2014). Pastarojo bakteriofago fragmentuotoje genomine DNR LC-MS/MS metodu nustatytas ypač didelis archeozino modifikacijų skaičius, čia vidutiniškai 25-27% 2'-deoksiguanozino pakeista 2'-deoksiarcheozinu (Thiaville ir kt., 2016). Šio bakteriofago DNR aptinkama ir dPreQ<sub>0</sub> bei dPreQ<sub>1</sub> modifikacijos (Hutinet ir kt., 2019). Tokios 2'-deoksi-7-deazaguanozino modifikacijų gausos ir dinamikos prasmė bakteriofaguose nėra aiškiai suprasta ar įrodyta, tačiau manoma, kad evoliucijos eigoje bakteriofagai tokiu būdu prisitaikė apsisaugoti nuo bakterijų gynybinių sistemų, *E. coli* 9g fago genomine DNR atspari daugeliui restrikcijos fermentų (Kulikov ir kt., 2014). Taip pat manoma, kad 7-deazaguanozino modifikacijos gali padėti apsisaugoti bakteriofagams prieš CRISPR-Cas sistemas, nes

šios sistemos fermentai, įprastai sąveikaudami su DNR, sąveikauja su 7-oje pozicijoje guanozino molekulėje esančiu azoto atomu, kurio 7-deazaguaninų šeimos modifikuotų nukleotidų atveju nėra (Hutinet ir kt., 2019).

### 1.2 7-Deazaguanozinų įtaka organizmų fiziologinėms funkcijoms

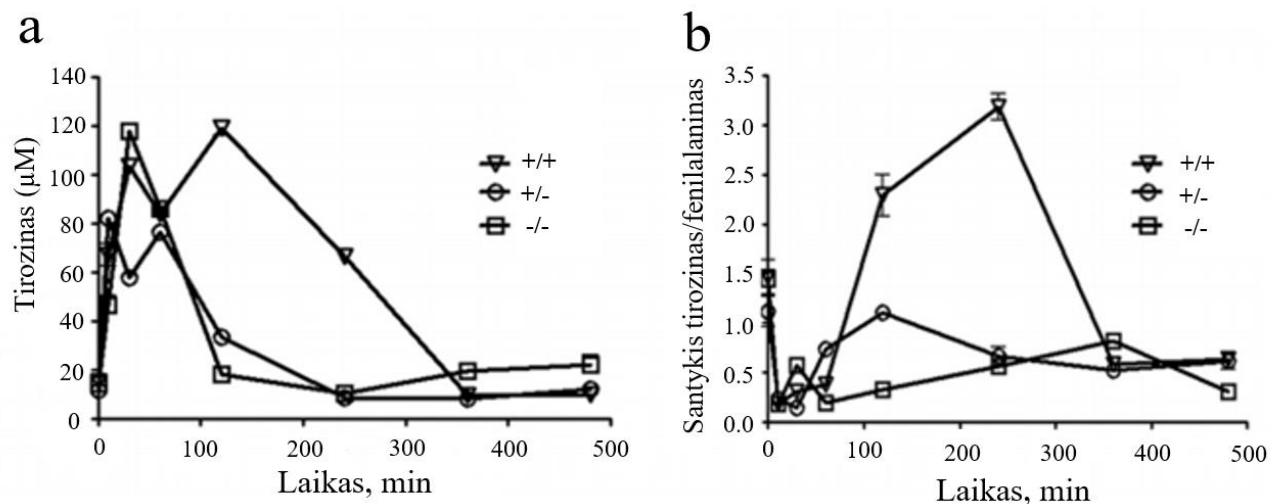
Nors 7-deazaguanozino šeimos modifikuoti nukleotidai organizmų tRNR ir fenotipui suteikia naujų sąvybių ir pranašumų, organizmai gali išgyventi be šių modifikacijų (ypač tai pasireiškia primityvesniuose organizmuose), tačiau tokie organizmai pasidaro jautresni aplikos poveikiui. *T. kodakarensis* archėjos bei *E.coli* bakterijos mutantai, pasižymintys mutantiniais 7-deazaguaninų biosintezės ir inkorporavimo į tRNR genais, gali gyvuoti ir daugintis auginant įprastomis laboratorinėmis sąlygomis, tačiau abiejų organizmų gyvybingumas reikšmingai sumažėja auginant juos nepalankiose sąlygose, pvz., aukštesnėje temperatūroje arba tokiose sąlygose, su kuriomis šie organizmai susiduria natūraliose savo buveinėse (Turner ir kt. 2020; Noguchi ir kt., 1982). Persėjant bakterijų *E. coli* CA274 ir *E. coli* B105 maišytą kultūrą, bėgant laikui, *E. coli* CA274 kamienas, gebantis biosintetinti ir į savo tRNR struktūrą inkorporuoti kueziną, nukonkuravo (1.3 pav.) kitą kartu augantį *E. coli* kamieną B105, kuris pasižymėjo mutantiniu defektyviu PreQ<sub>0</sub> sintezės genu ir negalėjo savo tRNR struktūroje turėti kuezino (Dineshkumar ir kt., 2002).

Kai kurie primityvieji eukariotai, neturintys jų tRNR randamo kuezino ir jo analogų biosintezės genų, kuezino nukleozido nukleobazę kueiną inkorporuoja į tRNR įsisavinę nukleobazę iš maistinių medžiagų arba mikrobiome esančių bakterijų (Fergus ir kt., 2015). Paprasčiausias daugialąstelinis eukariotas *D. discoideum* puikiai auga *E. coli* kultūroje, kurioje gali įsisavinti kueiną, tačiau aseptinėse sąlygose šis organizmas pradeda vegetuoti kaip vienaląstelinis organizmas. Organizmui augant aseptinėmis sąlygomis, ląstelės sintetino dvigubai mažiau tRNR<sub>Asp</sub> ir tRNR<sub>Tyr</sub>, nei kueino gaunantis organizmas (Kersten ir Kersten, 1990).



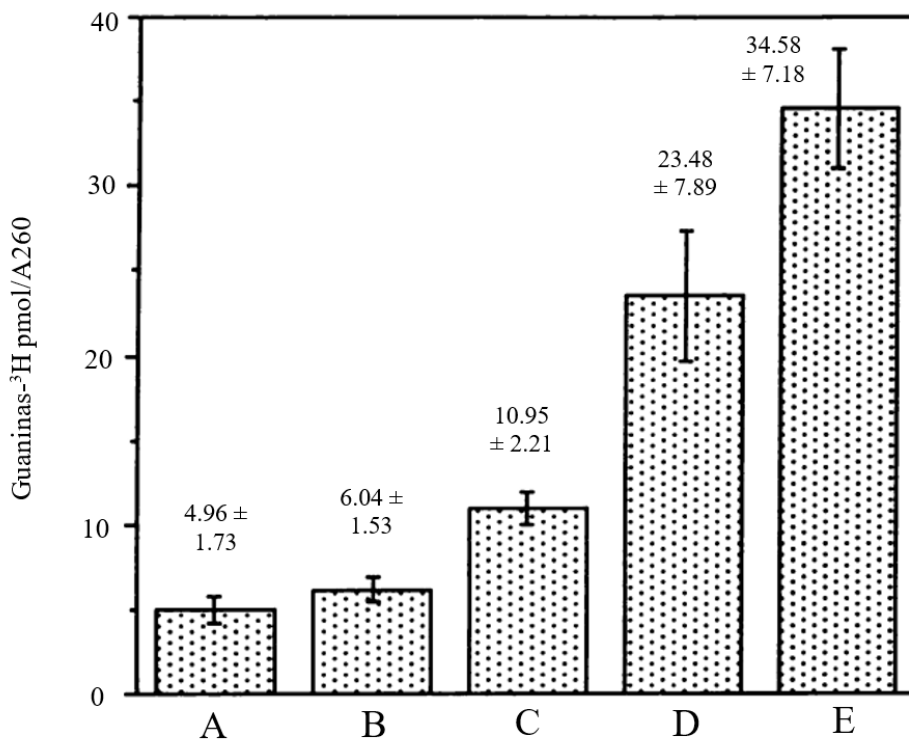
**1.3 pav. *E.coli* CA274 kamienas, persėjant bendrą *E.coli* CA274 ir *E.coli* B105 bakterijų kultūrą, bėgant laikui, nukonkuruoja mutantinį *E. coli* kamieną B105, negalintį sintetinti ir į savo tRNR inkorporuoti kuezino (Dineshkumar ir kt., 2002).**

Kuezinai labai svarbūs žinduolių fiziologinėms funkcijoms – kuezino negavusios ir dėl *Qtrt1* geno mutacijos negalinčios kuezino pasisavinti pelės pasižymėjimo neigiamai paveikta tirozino biosintezės kaskada (1.4 pav.) (Rakovich ir kt. 2011). Kuezino stoka neigiamai paveikė tirozino biosintezę iš fenilalanino, kuomet buvo slopintas fenilalanino hidroksilazės PAH fermento veikimas dėl padidėjusios oksiduotos tetrahydrobiopterino (BH<sub>2</sub>) formos koncentracijos, kuri yra PAH slopiklis (Rakovich ir kt. 2011). Laiku negavusios kuezino ir tirozino, kaip maisto papildų, pelės gali patirti letargiją, konvulsijas bei mirti kelių dešimčių dienų eigoje (Marks ir Farkas, 1997).



**1.4 pav. Pelės su išveiklintu Qtrt1 genu pasižymi kompromituota fenilalanino konversija į tiroziną (Rakovich ir kt. 2011).** Fenilalanino tirpalas injekuotas pelėms (1mg/kg), atitinkamais laiko tarpais registruota tirozino koncentracija (a) arba tirozino/fenilalanino santykis (b) kraujyje. +/+ – laukinio tipo genotipas; +/- – heterozigotinis mutantinis Qtrt1 genotipas; -/- – homozigotinis mutantinis Qtrt1 genotipas.

Sveikame žmogaus organizme kuezino koncentracija svyruoja nuo 1 iki 10 nM (Katze ir kt., 1983). Manoma, kad kuezino modifikacijų skaičius organizme gali būti laikomas svarbiu biomarkeriu vėžio diagnostikoje. tRNR hipomodifikavimas kuezinu pastebėtas plaučių (Huang ir kt., 1992), storosios žarnos (Gündüz ir kt., 1992), smegenų (Aytaç ir kt., 1994), limfomos bei leukemijos vėžinėse ląstelėse (Emmerich ir kt., 1985). Nors šis fenomenas nėra stebimas kai kuriose vėžių rūšyse (Emmerich ir kt., 1985), dažnai tRNR kuezino hipomodifikavimo intensyvumas koreliuoja su pažengusia ligos stadija (1.5 pav.) ir, atitinkamai, blogomis prognozėmis – pastebėta, kad kuo mažesnis paciento Q-tRNR kiekis, tuo mažesnis pacientų išgyvenamumas (Baranowski ir kt., 1994). Šios vėžio ir kuezino kiekio audinyje sąsajos priežastis nėra išaiškinta, tačiau pastebėta, jog sumažėję kuezino kiekiai aptinkami ne tik vėžiniuose, tačiau ir nepiktybiniuose, greitai augančiuose audiniuose, pvz., retikulocituose arba po traumos ar chirurginės operacijos ataugančiame kepenų audinyje (Dubrul ir kt., 1976; Jackson ir kt., 1970), taip pat Q kiekis kinta organizmų tRNR priklausomai nuo vystymosi stadijos ir amžiaus (White ir kt., 1973).



**1.5 pav. Kuezino kiekio tRNR priklausomybė nuo moterų reprodukcinės sistemos audinių vėžinės stadijos (Baranowski ir kt., 1994).** Kuezino trūkumas konkrečioje tRNR pozicijoje buvo išmatuotas naudojant radioaktyvaus guanino inkorporavimo į tRNR metodiką, pasinaudojant tRNR guanino transglikolaze. A – nepiktybinis miometriumas; B – mioma; C – germinogeniniai navikai; D – epiteliniai navikai; E – metastatiniai navikai.

Tyrimai, panaudojant kueiną bei PreQ<sub>0</sub> kaip galimus priešvėžinius vaistus, parodė, kad kueinas sulėtina vėžinių ląstelių augimą hipoksinėse sąlygose, slopina laktato dehidrogenzės, vieno svarbiausių fermentų hipoksinio tipo vėžiuose, raišką, o PreQ<sub>0</sub> *in vitro* sąlygose yra net labiau citotoksiškas vėžinėms ląstelėms nei standartinis chemoterapinis vaistas 5-fluorouracilas (Xu ir kt., 2015; Reisser ir kt., 1994; Pathak ir kt., 2005; Fergus ir kt., 2015). 7-Deazaguanozinai ar kiti modifikuoti nukleotidai ar jų nukleobazės išlieka perspektyvi sritis vėžio gydyme – tokie junginiai gali būti panaudoti kaip tiesioginiai DNR replikacijos inhibitoriai vėžinėse ląstelėse, taip pat gali būti inkorporuoti į priešprasmės (angl. *antisense*) RNR bei iRNR sekas, kurios gali būti priešvėžinių terapijų veikliosios medžiagos, ypač tuomet, kai klinikinę funkciją turinčią priešprasmę RNR arba terapinę baltymą koduojančią iRNR siekiama padaryti atsparesnę organizmo nukleazių poveikiui arba pagerinti tokios terapijos farmakokinetines savybes (Bartosik ir kt., 2020). Tačiau būtent 7-deazaguaninų šeimos modifikuoti nukleotidai reikalauja daugiau fundamentalių mokslinių tyrimų, kadangi šioje tyrimų srityje skirtingų mokslinių grupių rezultatai ir išvados kartais prieštarauja viena kitai, nėra vieningos nuomonės apie šių modifikuotų nukleotidų fiziologinę bei struktūrinę prasmę (Fergus ir kt., 2015).

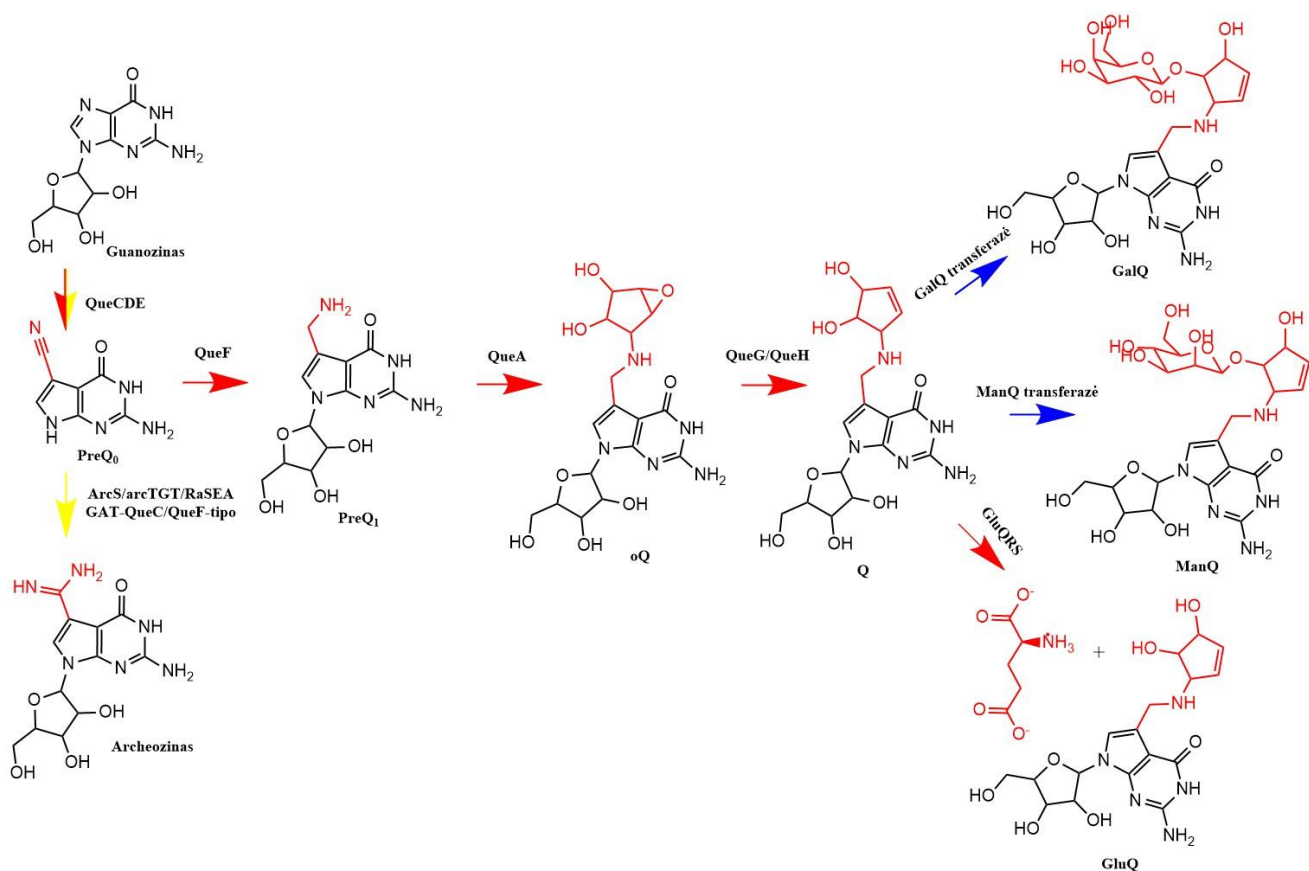


### 1.3 7-Deazaguanozinų biosintezė ir biosintezės reguliacija

Nors kuezino (Q) ir archeozino (G+) biosintezės kelias visuose organizmuose prasideda nuo guanozino vertimo į esminį PreQ<sub>0</sub> intermediatą QueCDE fermentų komplekso pagalba, tolimesnis šių modifikuotų nukleozidų iš PreQ<sub>0</sub> biosintezės kelias skiriasi skirtinguose duomenuose biocheminių reakcijų bei produktų atžvilgiu (1.6 pav.) (Phillips ir kt., 2008). Bakterijose PreQ<sub>0</sub> molekulės nitrilo grupė, retai gamtoje pasitaikančios 4 elektronų redukcijos metu, kurią katalizuoja QueF fermentas, redukuojama iki amino, susidarant PreQ<sub>1</sub> junginiui (Van Lanen ir kt., 2005). PreQ<sub>1</sub> inkorporuojamas į tRNR struktūros 34-ąją poziciją TGT sintetazės fermento pagalba (Iwata-Reuyl, 2008). Ši struktūra verčiama į oQ34, prie terminalinio amino kovalentiškai prijungiant ciklopentano žiedą su dviem hidroksilo grupėmis ir epoksido grupe, reakciją katalizuoja QueA. Tuomet epoksido žiedas pašalinamas QueG arba jam nehomologinio fermento QueH pagalba suformuojant Q34 tRNR (Miles ir kt., 2011; Zallot ir kt., 2017). Bakterijos *E.coli* ir *S. Flexneri* geba modifikuoti Q34 tRNR iki šiuo metu žinomo galutinio 7-deazaguanozinų nukleotidų produkto – GluQ, kuomet prie Q34 kovalentiškai prijungiama glutamo aminorūgštis, tačiau šio aminorūgšties prisijungimo regioselektyvumas dar nėra išaiškintas (1.6 pav.) (Dubois ir kt., 2004; Caballero ir kt., 2012).

Eukariotai, neturintys kuezino *de novo* biosintezės genų, inkorporavę į savo tRNR kueziną iš maisto arba mikrobiomo, jį gali toliau modifikuoti iki GalQ ir ManQ, atitinkamai prie Q prijungiant monosacharidus galaktozę arba manozę (Okada ir Nishimura, 1977). Manoma, kad augalai pasižymi kuezino *de novo* biosintezės genais, laisvo kuezino aptinkama kviečių grūdų gemaluose, kokosuose ir pomidoruose (Katze ir kt., 1982). Šiuo metu nėra tiksliai žinoma, kokių pernašos sistemų pagalba ir kokių mechanizmu 7-deazaguanino šeimos nukleozidai bei jų pirmtakai patenka į eukariotines ląsteles, tačiau žinoma, kad eukariotai 7-deazaguaninų modifikuotų nukleotidų biosintezėi gali pasisavinti ne tik Q, bet ir PreQ<sub>0</sub> ir PreQ<sub>1</sub> (McCown ir kt., 2020).

Archėjų domene sutinkamas tik archeozinas, šiuose organizmuose PreQ<sub>0</sub> inkorporuojamas į tRNR molekulę 15 pozicijoje vietoje guanozino, archeozinas susintetinamas modifikuojant nitrilinę grupę iki amidino fragmento ArcS/arcTGT bei ReSEA fermentų kaskados pagalba (Mohammad ir kt., 2017). *Crenarcheota* tipo archėjos neturi šių fermentų, tačiau geba sintetinti archeoziną GAT-QueC arba QueF-tipo baltymų pagalba (Phillips ir kt., 2012).



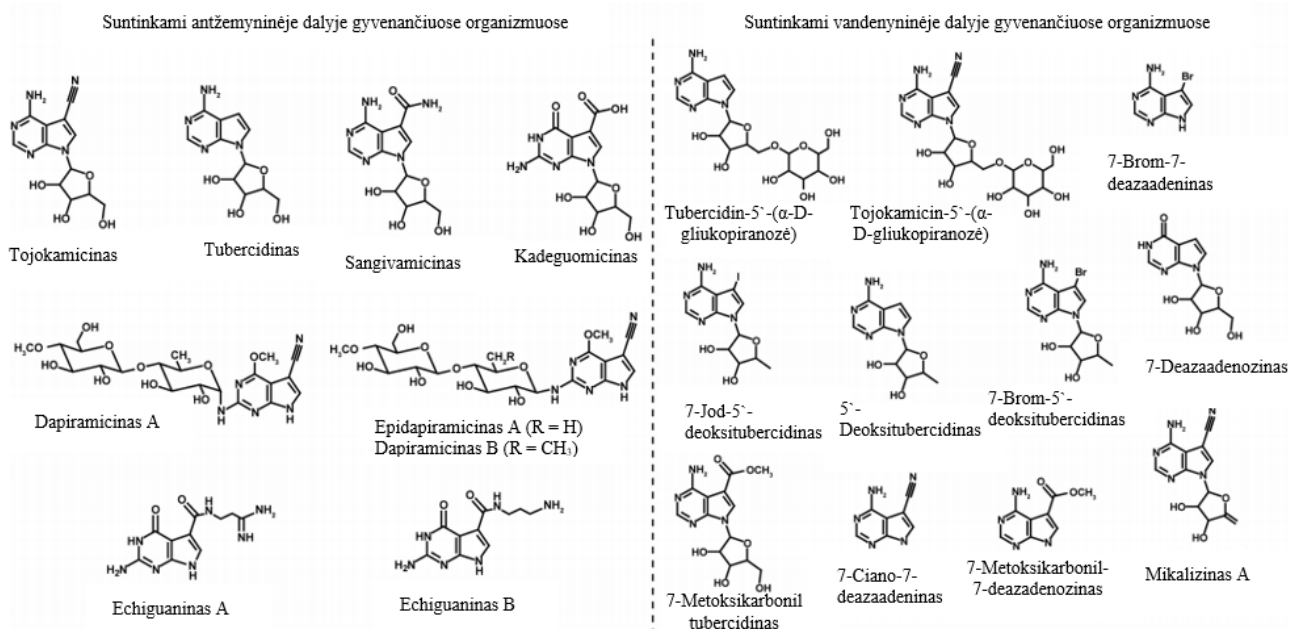
**1.6 pav. 7-Deazaguanozinų šeimos modifikuotų nukleozidų bei jų pirmtakų biosintezės schema (Phillips ir kt., 2008).** Raudona spalva žymimi kiekvienos molekulės motyvai, besiskiriantys nuo guanozino. GluQ atveju sudėties ženklu pažymima, jog nėra žinoma, prie kurios hidroksilo grupės glutamo rūgštis prisijungia prie kuezino, sudarant GluQ. Geltona, raudona ir mėlyna rodyklių spalvos nurodo, kokios 7-deazaguanozinų nukleozidų biosintezės reakcijos vyksta atitinkamai archėjų, bakterijų bei eukariotų domenuose.

Nors 7-deazaguanozinų ir jų pirmtakų biosintezės reguliacijos mechanizmai nėra gerai suprasti, manoma, kad kaip ir dauguma mažamolekulinių heterociklinių junginių biosintezė, taip ir 7-deazaguanozinų biosintezė daugiausia reguliuojama alosteriniu biosintezės fermentų aktyvumo reguliavimo būdu, kuomet biosintetinėje grandinėje vienu fermentų produktai sąveikauja su kitų ar tų pačių fermentų funkciniais motyvais ir daro įtaką šių fermentų katalitinėms funkcijoms (Spitale ir kt., 2009). Tačiau neseniai identifikuoti PreQ<sub>0</sub> bei PreQ<sub>1</sub> ribojungikliai, transkripciniame bei translaciniame lygyje galintys reguliuoti 7-deazaguanozinų biosintezės bei transporto fermentų kiekį, atitinkamai reguliuoja 7-deazaguanozinų nukleozidų bei jų pirmtakų koncentracijos dinamiką/pasiskirstymą audiniuose priklausomai nuo PreQ<sub>0</sub> ir PreQ<sub>1</sub> koncentracijos ir santykio ląstelėje (Eichhorn ir kt., 2014). Šie ribojungikliai unikalūs tuo, jog jų aptamerinė, t.y. substratą (PreQ<sub>0</sub>, PreQ<sub>1</sub>) surišanti sekos dalis yra trumpiausia iš visų žinomų ribojungiklių, taip pat, aptamero giminingumas substratui, lyginant PreQ<sub>0</sub> ir PreQ<sub>1</sub> skiriasi tik 5 kartus (Spitale ir kt., 2009; Eichhorn ir kt., 2014). Biosintezės, reguliacijos, o ypač

7-deazaguanozinų pernašos mechanizmai bei juose dalyvaujantys fermentai yra nepilnai ištyrinėti ir charakterizuoti, tad tolimesni tyrimai reikalingi išiaiškinti 7-deazaguanozinų biosintezės ir transporto reguliacijos mechanizmus, plačiau suprasti PreQ<sub>0</sub>, PreQ<sub>1</sub> ir kitų antrinių 7-deazaguaninų metabolitų funkcijas.

#### 1.4 7-Deazapurinų struktūra pasižymintys antriniai metabolitai ir jų ypatybės

7-Deazapurino struktūros aptinkamos ne tik nukleino rūgštyse, tačiau gamtoje sutinkamos ir mažamolekuliniuose junginiuose, pasižyminčiuose įvairiomis fiziologinėmis funkcijomis. Šiuo metu iš mikroorganizmų, randamų antžemyninėje dalyje ir vandenynuose, aptikta ir išskirta virš 30 7-deazapurinų motyvą turinčių mažamolekulinių antrinių metabolitų (1.7 pav.), pasižyminčių įvairiomis fiziologinėmis ypatybėmis (McCarty ir Bandarian, 2012).



1.7 pav. 7-Deazapurinų motyvą turintys antriniai metabolitai ir jų struktūros (McCarty ir Bandarian, 2012).

Pirmasis fiziologinę reikšmę ir potencialią naudą žmogui 7-deazaguanino struktūra pasižymintis antibiotikas tojokamicinas išskirtas iš *Streptomyces toyocaensis* kultūros 1955 metais. Dėl savo nitrilinės grupės (1.7 pav.) į šio darbo tyrimų objektą PreQ<sub>0</sub> struktūriškai panašus antibiotikas pasižymi gebėjimu slopinti *Mycobacterium tuberculosis* ir *Candida* rūšies patogenų augimą (Nishimura ir kt., 1956; Ohkuma, 1961). Be šios antibiotinės funkcijos tojokamicinas gali būti inkorporuotas į žinduolių 45S rRNR (Tavitian ir kt., 1969).

7-Deazaadenozinas (tubercidas), išskirtas iš *Streptomyces tubercidicus* pasižymi plataus spektro antibakteriniu poveikiu, taip pat pasižymi fungicidinėmis, priešvirusinėmis, priešvėžinėmis savybėmis, nes struktūriškai yra artimas adenzinui, tad sąveikauja su daugybe fermentų adenzino *de novo*

biosintezės keliuose, adenozino fosforilaze ir sudaro nikotinamido-deazaadenino dinukleotido (modifikuotą NADH) kofermentą, taip pat inkorporuotas į DNR, stabdo DNR replikaciją (Bloch ir kt., 1967; Acs ir kt., 1964). Šis modifikuotas nukleozidas ar jo analogai iki šiol laikomi perspektyvia aktyviaja farmacine medžiaga (API) tripanosomozės bei kitų įvairių patogeninių susirgimų atvejų, kurių sukėlėjai negali *de novo* sintetinti adenozino darinių ir turi įsisavinti purinus ar jų nukleozidus iš užsikrėtusiojo įvairių pernašos sistemų pagalba (Hulpia ir kt., 2019). Tubercidinas yra puikus tokių pernašos sistemų inhibitorius, be to, jis nėra metabolizuojamas iki neaktyvių 7-deazainozino darinių ((Acs ir kt., 1964).

7-Deazapurinų analogas sangivamicinas pasižymi stipriu priešvėžiniu poveikiu pelių leukemijai ir HeLa ląstelių linijai (Rao, 1968) veikdamas šių vėžinių ląstelių baltymų kinazę C (Loomis ir kt., 1988), pirmoje klinikinėje fazėje patvirtintas šio priešvėžinio vaisto kandidato (Cavins ir kt., 1967) tinkamumas žmonėms. Sutinkama sudėtingesnės struktūros 7-deazapurinų motyvą turinčių antrinių metabolitų, glikozilintų disacharidais (pvz. dapiramicinas A) arba savo struktūroje turinčių halogeno atomų (pav. 1.7), tačiau jų funkcija, poveikis fiziologinis poveikis modeliniams organizmams bei žmogui yra menkai ištyrinėtas (McCarty ir Bandarian, 2012).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Medžiagos, bakterijų kamienai, įranga

#### 2.1.1 Medžiagos

**Reagentai:** Restrikcijos endonukleazės NcoI, HindIII, T4 DNR ligazė, molekulinų masių standartai GeneRuler™ DNA Ladder Mix, GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, GeneRuler™ loading dye, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, fermentų buferiniai tirpalai: FastDigest Green Buffer (10X), Phusion™ High-Fidelity PCR Master Mix (2x), DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2x), T4 DNR ligazės buferinis tirpalas; GeneJet Gel Extraction Kit DNR gryninimo reagentai; Izopropil-β-D-galaktopiranozidas (IPTG) (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Lietuva). Kanamicinas (*AppliChem*, Vokietija). Etanolis (*Vilniaus degtinė*, Lietuva). ZymoPURE™ Plasmid Miniprep Kit plazmidžių skyrimo rinkinys, Zymo Quick-DNA Miniprep Kit chromosominės DNR skyrimo rinkinys (*Zymo Research Corporation*, JAV). Pradmenys (*Metabion*, Vokietija). pET28a-Vcz (Aučynaitė ir kt., 2018). 7-Ciano-7-deazaguanozinas (PreQ<sub>0</sub>) (*Advanced ChemBlock Inc.*, JAV). NaCl, MgSO<sub>4</sub>, HCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> (*Reachim*, Rusija). Acto rūgštis, ortofosforo rūgštis (*Chempur*, Lenkija). Etidžio bromidas, EDTA (*Serva*, JAV). Imidazolas, gliukozė, NaOH, β-merkptoetanolis (*Fluka*, Vokietija). Acetonitrilas, metanolis, dimetilsulfoksidai, d6-dimetilsulfoksidai, agaras, natrio dodecilsulfatas (NDS), izocitozinas. (*Sigma*, JAV). Tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris) (*AppliChem*, Vokietija). Mielių ekstraktas, triptonas (*Oxoid*, Anglija).

#### **Terpės:**

Kozero mineralinė terpė: 5 g/L NaCl; 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 g/L NH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g/L MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O; 10 mL /L druskų tirpalo, terpės pH 7,2.

LB terpė: 10 g/L triptono, 5 g/L mielių ekstrakto, 10g/L NaCl, terpės pH 7,2.

Druskų tirpalo sudėtis: 1 g/L MnSO<sub>4</sub> × 4H<sub>2</sub>O, 0,5 g/L FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 2 g/L CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O. Druskų tirpalas, MgSO<sub>4</sub> tirpalas, gliukozė ir PreQ<sub>0</sub> į sterilią Kozero mineralinę terpę ar LB terpę įdedami po autoklavavimo.

#### **Tirpalai:**

Tirpalai skirti terpių ruošimui (medžiagos ištirpintos vandenyje, išskyrus PreQ<sub>0</sub>): 40 mg/mL kanamicinas, galutinė konc. 40 μg/mL; 1 M IPTG, galutinė konc. terpėje 0,2 mM; PreQ<sub>0</sub> 40 mg/mL, ištirpinta DMSO, galutinė konc. terpėje 0,5 mg/mL.

#### 2.1.2 Naudoti pradmenys

Genų fragmentų padauginimui nuo genomines DNR naudoti pradmenys:

CMP tiesioginis 5' – GAA TCC ATG GCG CTC GCC ACC GGC TAC AC

CMP atvirkštinis STOP 5' – CTG TTA AGC TTT CAC GAG GTC ACG GCC CCG C

CMP atvirkštinis HIS 5' – CTG TTA AGC TTC GAG GTC ACG GCC CCG CGT G

CYDE1 tiesioginis 5' – GAA TCC ATG GCG CTC CTC GTC ACG CAT GC

CYDE1 atvirkštinis STOP 5' – CTG TTA AGC TTT CAG TGC GGA TGC CCG CGC

CYDE1 atvirkštinis HIS 5' – CTG TTA AGC TTG TGC GGA TGC CCG CGC AG

CYDE2 tiesioginis 5' – GAA TCC ATG GGC CGC GCT CGC CTG CTG

CYDE2t tiesioginis 5' – CAA TCC ATG GAC GAT GAC AAC AGC GTT C

CYDE2 ir CYDE2t atvirkštinis STOP 5' – CTG TTA AGC TTT CAT GCC GGG AAC AGA CCC G

CYDE2 ir CYDE2t atvirkštinis HIS 5' – CTG TTA AGC TTT GCC GGG AAC AGA CCC GCA G

Kolonijų PGR atveju transformantams atrinkti naudoti pradmenys:

T7 ter 5' – GCT AGT TAT TGC TCA GCG G

T7 pro 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

16s rRNR geno padauginimui naudoti pradmenys:

Woo1 5' – AGA GTT TGA TCA TGG CTC

Woo2 5' – GGT ACC TTG TTA CGA CTT

### 2.1.3 Bakterijų kamienai ir plazmidės

**Bakterijų kamienai:** *Escherichia coli* BL21 (genotipas: (DE3) [F<sup>-</sup> ompT gal hsdS<sub>b</sub> (r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-) dcm lon (DE3)] (Avidis, Prancūzija); *Escherichia coli* DH5α (genotipas: [φ80dlacZΔM15 Δ(lacZY-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r<sub>K</sub> m<sub>K</sub>)sup E44 thi-1 gyrA96 relA1] (*Pharmacia*, Prancūzija).

**Klonavimui naudotos plazmidės:** pET21(b) (Km<sup>R</sup>, 5368 bp) (*Novagen*, Didžioji Britanija)

**Šio darbo metu sukonstruotos plazmidės:** pCMPSTOP (CMP deaminazė su STOP kodonu, Km<sup>R</sup>, 5842 bp); pCMPHIS (CMP deaminazė su 6xHis-tag žymeniu, Km<sup>R</sup>, 5839 bp); pCYDE1STOP (CYDE1 su STOP kodonu, Km<sup>R</sup>, 6616 bp); pCYDE1HIS (CYDE1 su 6xHis-tag žymeniu, Km<sup>R</sup>, 6613 bp); pCYDE2STOP (CYDE2 ilgesnis geno variantas su STOP kodonu, Km<sup>R</sup>, 6622 bp); pCYDE2HIS (CYDE2 ilgesnis geno variantas su 6xHis-tag žymeniu, Km<sup>R</sup>, 6619 bp); pCYDE2tSTOP (CYDE2 trumpesnis geno variantas su STOP kodonu, Kan<sup>R</sup>, 6580 bp); pCYDE2tHIS (CYDE2 trumpesnis geno variantas su 6xHis-tag žymeniu, Km<sup>R</sup>, 6579 bp).

## 2.1.4 Įranga

**Baltymų gryninime naudota aparatūra:** Äkta Purifier 100 FPLC baltymų gryninimo chromatografas; HiTrap™ DEAE FF, HiTrap™ Phenyl HP, HiTrap™ chelating IMAC HP chromatografijos kolonėlės (*GE Healthcare*, Švedija).

**Aparatūra:** plokštelių skaitytuvas BIOTEK PowerWave XS (*BioTek Instruments Inc.*, JAV), spektrofotometras Eppendorf BioPhotometer (OD 600) (*Eppendorf AG*, Vokietija), ultragarsinis dezintegratorius VC750 (*Sonics ir Materials Inc.*, JAV), didelės talpos šaldanti centrifuga Eppendorf 5804R (*Marshall Scientific*, JK), stalinė centrifuga Eppendorf (*Thermo Fisher Scientific*, JAV), vertikali baltymų elektroforezės sistema Bio-Rad, (JAV), elektros šaltinis elektroforezei Pharmacia EPS 400/500, autoklavas Raypa AES – 75 (*Raypa*, Ispanija), pH matuoklis Orion 320 PerpHect LogR (*Thermo Fisher*, JAV), termostatas Binder FD 23 (*Binder*, Vokietija), didelės talpos termostatuojamos, rotacinės purtyklės Innova 44 (*Biocompare*, JAV), termocikleris SensoQuest Labcycler Basic (SensoQuest GmbH, Vokietija) ir Mastercycler egradient S (Eppendorf AG, Vokietija), elektroporatorius Eppendorf electroporator 2510 (*Eppendorf AG*, Vokietija), rotacinis garintuvas IKA (IKA Works Inc., JAV).

## 2.2 Genų inžinerijos metodai

### 2.2.1 Bakterijų chromosominės DNR skyrimas

*Microbacterium sp.* SINO2 genomine DNR buvo skiriama „Zymo Research *Quick-DNA Miniprep Kit*“ pagal gamintojų pateikiamą instrukciją. DNR gryninta pagal 2.2.3 metodiką.

### 2.2.2 Plazmidinės DNR skyrimas

Plazmidinė DNR buvo skiriama naudojant „ZymoPURE™ Plasmid Miniprep Kit“ pagal gamintojų rekomendacijas arba pagal Molekulinės Mikrobiologijos ir Biotechnologijos skyriuje taikomą šarminės lizės metodą (Birnboim ir Doly, 1979). Bakterijų kultūra auginama LB terpėje 30°C temperatūroje termostatuojamoje purtyklėje. Suspensija centrifuguojama (10 min × 4000 aps/min), nupilamas terpės perteklius, ląstelės suspenduojamos vorteksuojant viename tūryje I-o tirpalo (50 mM gliukozė, 25 mM Tris- HCl pH 8,0, 10 mM EDTA). Suspensija užpilama dvejais tūriais II-o tirpalo (1% NDS, 0,2 N NaOH) ir mėginys atsargiai išmaišomas ir paliekamas kambario temperatūroje, iki kol tirpalas nuskaidrės. Tuomet įpilama 1,5 tūrio 7,5 M amonio acetato (pH 6,0) tirpalo ir laikoma lede iki kol iškrenta nuosėdos. Mėginys centrifuguojamas (5 min × 16200 aps/min), gautas supernatantas surenkamas į kitą mėgintuvėlį. Tuomet į mėgintuvėlį su supernatantu pridedami 2 tūriai etilo alkoholio ir tirpalas atšaldomas -20°C temperatūroje 10 min. Nežymimioms nuosėdoms susidarius tirpalas centrifuguojamas 5 min × 16200 aps/min. Supernatantas atsargiai nupilamas, ant mėgintuvėlio sienelių susidariusios nuosėdos buvo džiovinamos ir ištirpinamos nedideliame kiekyje vandens. Plazmidinės DNR

koncentracija po skyrimo nustatoma DNR elektroforezės pagalba naudojant GeneRuler™ 1kb DNA Ladder masės žymenį.

### 2.2.3 DNR gryninimas

PGR reakcijos metu gauta arba iš agarozės gelio išpjauta plazmidinė DNR gryninta GeneJet Gel Extraction Kit DNR gryninimo rinkiniu (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Lietuva). Iš agarozinio gelio išpjauto fragmento atveju gryninama pagal gamintojo rekomendaciją. Gryninant PGR reakcijos mišinį, praleidžiamas trečias protokolo punktas (PGR reakcijos ir „Binding Buffer“ komponento mišinys neinkubuojamas aukštoje temperatūroje), gryninant 10-20 µL PGR reakcijos mišinio, dedama 500 µL „Binding Buffer“ komponento.

### 2.2.4 Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Atliekant DNR fragmentų padauginimo PGR reakcijas naudoti SensoQuest Labcycler Basic (*SensoQuest GmbH*, Vokietija) ir Mastercycler egradient S (*Eppendorf AG*, Vokietija) PGR aparatai, 2x Phusion™ High-Fidelity PCR Master Mix ir 2x DreamTaq™ Green PCR Master Mix (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Lietuva) PGR buferiniai tirpalai su polimerazėmis ir 2.1.3 skyriuje aprašyti pradmenys. Polimerazės grandininė reakcija buvo atliekama vadovaujantis polimerazių gamintojo rekomendacijomis. Tiksliniams genams padauginti gradientinės PGR reakcijos, panaudojant abi polimerazes, atliktos šiose temperatūrose: 57.6°C, 61.6°C, 65.9°C, 69.4°C, 71°C, pradmenų koncentracija – 0.2 µM.

DreamTaq™ polimerazės atveju PGR programa - 95°C 2 min, [95°C 30 s; gradiento temperatūra 30 s; 72°C 1 min] × 30 ciklą, 10 min 72°C.

Phusion™ polimerazės atveju PGR programa - 98°C 30 s, [98°C 10 s; gradiento temperatūra 30 s; 72°C 45 s] × 30 ciklą, 5 min 72°C.

Atliekant genų padauginimo eksperimentus su Phusion™ polimeraze, kuomet reakcijos mišinys praturtintas 3% (w/v) DMSO, matricos sulydymo temperatūros (angl. *annealing temperature*) naudotos tokios pat, kaip prieš tai vykdytose gradientinės PGR reakcijose, naudota 40 arba 400 kartų skiesta chromosominė DNR (skiedimas atliktas skiedžiant pradinį iš *Microbacterium sp.* SINO2 ląstelių išskirtos genominės DNR mėginį). Pradmenų koncentracija naudota ta pati, kaip prieš tai vykusių gradientinės PGR reakcijose, reakcijos mišinys praturtintas 3% DMSO, reakcijos vykdytos pagal gamintojo rekomendacijas.

Kolonijų tikrinimo PGR reakcijos buvo atliktos DreamTaq™ polimerazės pagalba, naudoti T7 ter ir T7 pro pradmenys. PGR programa - 95°C 2 min, [95°C 30 s; 50°C 30 s; 72°C 1 min] × 30 ciklą, 10 min 72°C.



### 2.2.5 DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis

DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis buvo vykdoma naudojant Thermo Fisher Fast Digest restrikcijos endonukleazes NcoI ir HindIII ir Fast Digest Green 10x buferinį tirpalą laikantis gamintojo nurodytų rekomendacijų. Hidrolizė buvo vykdoma 60 min esant 37°C temperatūrai. Po hidrolizės reakcijos mišinys kaitinamas 80°C 10min siekiant inaktyvuoti restrikcijos endonukleazes prieš ligavimo reakciją arba valomas GeneJet Gel Extraction Kit DNR gryninimo rinkiniu.

### 2.2.6 DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė buvo atliekama 1x TAE buferiniame tirpale 120V įtampoje 1% agarozės gelyje (Russell ir Sambrook, 2001). Gelis buvo dažomas 10-15 min 0,005% etidžio bromido tirpale ir analizuojamas apšvietus UV spinduliais. DNR fragmentų molekulinės masės buvo nustatomos naudojantis GeneRuler™ 1kb DNA Ladder arba GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Jei prieš DNR elektroforezė nebuvo naudojami „Green“ serijos reagentai ar buferiniai tirpalai, DNR mėginiai dažyti naudojant GeneRuler™ Loading Dye.

### 2.2.7 DNR fragmentų gryninimas iš gelio

PGR reakcijos metu padauginți DNR fragmentai buvo frakcionuojami DNR elektroforezės pagalba. Gelis buvo dažomas etidžio bromido tirpalu 10-15 min ir analizuojamas apšvietus UV spinduliais. Tiksliniai fragmentai, nustatyti pagal dydį, išpjauti iš gelio pipetės antgalio pagalba ir gryninti GeneJet Gel Extraction Kit rinkiniu, laikantis gamintojo nurodyto protokolo.

### 2.2.8 DNR klonavimas

Restrikcijos endonukleazėmis hidrolizuoti DNR fragmentai klonuojami į pET28(b) vektorių, hidrolizuotą NcoI ir HindIII restrikcijos endonukleazėmis pagal 2.2.5 metodiką, naudojant T4 DNR ligazę. Reakcija vykdyta 4°C temperatūroje 12-16 valandų. Po ligavimo reakcijos, ligavimo mišinys valomas išsodinant DNR etanolio ir natrio acetato pagalba (Green ir Sambrook, 2016). 10-20 uL ligavimo mišinio užpilama 500 uL -20°C etilo alkoholio ir 50ul 5M natrio acetato, mišinys 2-16h laikomas -20°C temperatūroje. Centrifuguojama 4°C temperatūroje (15min × 16200 aps/min), atsargiai nupilamas etanolis. Mėgintuvėlis džiovinamas, kol nebelieka etanolio. Mėgintuvėlyje esantis ligavimo mišinys užpilamas 10 µL sterilaus vandens. Šiuo mišiniu transformuojamos paruoštos bakterijų ląstelės.

## 2.2.9 Elektrokompentinių ląstelių ruošimas ir elektroporacija

*E. coli* DH5 $\alpha$  arba *E. coli* BL21(DE3) bakterijos užsėjamos į 5 mL LB terpės ir auginamos per naktį. 200  $\mu$ L naktinės kultūros užsėjamos į 20 mL LB terpės ir auginama, iki kol ląstelių kultūra pasiekia OD<sub>600</sub> 0,5-0,8 optinį tankį. Tuomet ląstelės atvėsinaamos iki 4°C ir centrifuguojamos (15 min  $\times$  4000 aps/min) 4°C temperatūroje. Nupylus supernatantą, ląstelės buvo du kartus plaunamos 20 mL 4°C temperatūros 10% glicerolio tirpalu. Nucentrifugavus ląsteles (15 min  $\times$  4000 aps/min) 4°C temperatūroje, jos resuspenduojamos 2 mL 4°C 10% glicerolio tirpale ir išpilstomos 90  $\mu$ l porcijomis į 1,5 ml mėgintuvėlius. Ląstelės laikomos -80°C temperatūroje.

Elektroporacijai naudojamos ląstelės atšildomos lede, o kiuvetės atšaldomos -20°C. Į 90  $\mu$ l elektrokompentinių ląstelių įdedama 1  $\mu$ l plazmidinės DNR ir mišinys kelias minutes inkubuojamas lede. Ląstelių suspensija su DNR perkeliama į atšaldytą kiuvetę. Elektroporavimas vykdomas aparate *Eppendorf electroporator 2510* (Eppendorf AG, Vokietija) 2 kV/cm įtampoje, elektros impulso trukmė, priklausomai nuo ląstelių suspensijos paruošimo, 3,0-5,5 ms. Po elektros impulso, nedelsiant, ant ląstelių užpilama 100  $\mu$ L LB terpės ir ląstelių suspensija perkeliama į mėgintuvėlį su 0.7 mL LB terpės. Ląstelės gaivinamos inkubuojant 37°C termostate 30 min, centrifuguojamos 3 min  $\times$  16200 aps/min, sumažinamas terpės tūris iki 50  $\mu$ L ir ląstelės užsėjamos ant LB terpės su kanamicinu. Cirkuliarizuotos plazmidės suteikia bakterijoms antibiotiko atsparumo savybę, tad tokios bakterijos užauga ant agarizuotos terpės su kanamicinu. Tikslinių konstruktyvų paieškai atliekama užaugusių bakterijų kolonijų PGR reakcija pagal 2.2.4 metodiką.

## 2.3 Biocheminiai metodai

### 2.3.1 Mikroorganizmų, biodegraduojančių 7-ciano-7-deazaguaniną (PreQ<sub>0</sub>), paieška

Šio darbo metu mikroorganizmų atranka 7-ciano-7-deazaguanino biodegradacijos tyrimui buvo vykdoma naudojant dirvožemio mėginius, kurie buvo surinkti įvairiose Vilniaus ir Utenos rajonų vietose, 15-20 cm gylyje. 130 dirvožemio mėginių surinkta į 1,5 mL plastikinius mėgintuvėlius. Laboratorijoje žemės mėginiai vorteksuojant suspenduoti 1 mL 0,9% NaCl tirpalo. 100  $\mu$ L šios suspensijos užsėjama į 900  $\mu$ L Kozero mineralinę terpę, kuri prieš tai praturtinta 0,05% (w/v) PreQ<sub>0</sub> iš 40 mg/mL pradinio PreQ<sub>0</sub> tirpalo DMSO tirpiklyje. Neigiama šio eksperimento kontrolė buvo Kozero mineralinė terpė, praturtinta PreQ<sub>0</sub>, sumaišyta su 100  $\mu$ L 0,9% NaCl tirpalo be bakterijų. Mėginiai inkubuojami 30°C. Kas 3-7 paras atliekami reakcijos mišinių supernatantų UV-Vis sugerties spektro matavimai – mėginiai centrifuguojami 5 min  $\times$  16200 aps/min, 100  $\mu$ L supernatanto perkeliama į 96 šulinėlių mikroplokštelę (Greiner, JAV). Atliekami mėginių supernatantų UV-Vis sugerties spektro, nuo 200 nm iki 400 nm diapazone, matavimai. Esant neaiškiems arba išsiskiriantiems spektrams, mėginio supernatantas du kartus praskiedžiamas acetonitrilu, nucentrifuguojamas ir gautas mėginys analizuojamas HPLC-MS metodu. Mėginiai, kuriuose užfiksuojamas UV-Vis sugerties spektro pokytis, lyginant su neigiamos kontrolės mėginiu, persėjami ant agarizuotos LB terpės, agarizuotos Kozero terpės, praturtintos 0,05%

PreQ<sub>0</sub> arba agarizuotos Kozero terpės, praturtintos 1% gliukozės ir 0,05% PreQ<sub>0</sub>. Užaugusių mikroorganizmų kolonijos persėjamos atskirai į Kozero mineralinę terpę, praturtintą 0,05% PreQ<sub>0</sub> substratu. Po 3-7 dienų šie mėginiai vėl paruošiami matavimams pagal viršuje aprašytą metodą, matavimai atliekami plokštelių skaitytuvo pagalba arba HPLC-MS metodika.

### 2.3.2 *E. coli* kultivavimas ir eksperimentai su *E. coli* intaktinėmis ląstelėmis bei lizatais

pET28a-Vcz arba tikslinius CMP deaminazės, CYDE1 ir CYDE2 genų fragmentus turinčios plazmidės transformuotos *E. coli* BL21(DE3) bakterijos nuo standžios LB terpės užsėjamos į 5 mL LB terpės su atitinkama kanamicino koncentracija ir auginamos 30°C temperatūroje per naktį. Iš užaugusios naktinės kultūros 200 µL bakterijų suspensijos panaudojama inokuliuoti 20 mL LB terpės su kanamicinu, 30°C auginama iki kol ląstelių kultūra pasiekia 0,5-0,8 optinį tankį (OD<sub>600</sub>). Tuomet rekombinantinių baltymų biosintezė buvo indukuojama 30°C (pET28a-Vcz atveju indukcijos temperatūra 20°C) 0,2 mM IPTG ir inkubavimas tęsiamas per naktį 16-18 valandų. Užaugintos ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant šaltoje centrifugoje (15 min × 4000 aps/min), 3 kartus praplaunamos 20 mL 0,9% NaCl tirpale ir resuspenduojamos 5 mL pH 7,2 50 mM kalio fosfatiniame buferiniame tirpale.

Atliekant CMP deaminazės baltymo raiškos optimizavimo eksperimentus, ląstelių auginimo ir indukcijos eksperimentas atliekamas taip pat, tik pakeičiama indukcijos temperatūra (16°C, 30°C arba 37°C) ir IPTG koncentracija (0,1 mM, 0,2 mM arba 0,4 mM).

Vykdamas PreQ<sub>0</sub> konversijos reakcijas su intaktinėmis *E. coli* ląstelėmis, reakcijos mišinys sudarytas iš 20 µL pradinės ląstelių suspensijos, 0,05% (w/v) PreQ<sub>0</sub> (iš 40mg/ml PreQ<sub>0</sub> tirpalo DMSO) ir 0,2% gliukozės, galutinis reakcijos tūris 500 µL. Ši ląstelių suspensija buvo inkubuojama 30°C temperatūroje. Tam tikrais laiko intervalais paėmus suspensijos mėginį ir jį nucentrifugavus 3 min × 16200 aps/min, 100 µL supernatanto buvo perkeliamas į plokštelę ir matuojamas UV-Vis sugerties spektras 200-400 nm diapazone.

Atliekant eksperimentus su rekombinantinių baltymų *E. coli* lizatais, ląstelių suspensija 5 mL pH 7,2 50 mM kalio fosfatiniame buferiniame tirpale 4°C temperatūroje ardamos ultragarsiniu dezintegratoriumi 5s ardant ir 10 sekundžių darant pauzę 5 min bendro ardymo laiko. Centrifuguojama 15 min × 4000 aps/min.

### 2.3.3 Eksperimentai su *Microbacterium sp.* SINO2 intaktinėmis ląstelėmis

*Microbacterium sp.* SINO2 bakterijos nuo agarizuotos LB terpės užsėjamos į skystą 5 mL LB terpę ir auginamos 30°C temperatūroje parą laiko. Iš gautos naktinės kultūros užsėjama 20 mL LB terpės, bakterijos auginamos 30°C temperatūroje parą laiko. Atliekant indukcijos eksperimentą su PreQ<sub>0</sub> indukuotomis intaktinėmis ląstelėmis bei jų lizatu, ląstelės augintos LB terpėje arba LB terpėje su 0.05% PreQ<sub>0</sub> substratu. Užaugusios ląstelės centrifuguojamos (15 min × 4000 aps/min), tris kartus plaunamos

0.9% NaCl tirpalu, suspenduojamos 5 mL 50mM pH 7,2 kalio fosfatiniame buferiniame tirpale. Biokonversijos eksperimentas vykdomas su 500  $\mu$ L buferiniame tirpale suspenduotų *Microbacterium sp.* SINO2 ląstelių ir 3mM substrato (PreQ<sub>0</sub> arba izocitozino). Reakcijos mišinys inkubuojamas 30°C temperatūroje. Tam tikrais laiko intervalais nucentrifugavus dalį ląstelių suspensijos, 100  $\mu$ L supernatanto analizuojama HPLC-MS metodika arba matuojamas UV-Vis sugerties spektras 200-400 nm intervale.

#### 2.3.4 Biokonversijos eksperimentai su rekombinantine Vcz deaminaze

Siekiant pagaminti didesnę kiekį deamininto PreQ<sub>0</sub> produkto, atliekama PreQ<sub>0</sub> deaminavimo reakcija su gryninta Vcz rekombinantine deaminaze. Reakcijos pavyzdys: į 50 ml pH 7,2 kalio fosfatinio buferinio tirpalo buvo įdėta 5 mg PreQ<sub>0</sub> (iš 40 mg/mL PreQ<sub>0</sub> tirpalo DMSO) ir įpilta 500  $\mu$ L Vcz gryno rekombinantinio fermento. Monitorizuojant reakcijos eigą plokštelių skaitytuvu registruojant UV absorbcijos spektrą, po 4h reakcijos mišinys praturtintas 5 mg PreQ<sub>0</sub>. Po 24h, 32h bei 40h nuo reakcijos pradžios reakcijos mišinys praturtintas dar po 5 mg PreQ<sub>0</sub>. Po 50h nuo reakcijos pradžios įnešta 5mg PreQ<sub>0</sub> ir įpilta 250  $\mu$ L baltymo. Po 54h nuo reakcijos pradžios reakcijos turinys nugarintas rotaciniu garintuvu, praplautas 3  $\times$  5 mL šalto distiliuoto vandens, centrifuguotas 20 min  $\times$  4000 aps/min, gauti smėlio spalvos vienalyčiai milteliai, jų masė 19,82 mg (65,7% išeiga).

#### 2.3.5 Rekombinantinių baltymų gryninimas

Vcz deaminazė bei CMP deaminazė su 6xHis-tag inkaru gryninta iš centrifuguoto lizato 1 mL arba 5 mL Ni<sup>2+</sup> HiTrap IMAC HP kolonėle ((*GE Healthcare*, Švedija) giminingumo chromatografijos būdu Äkta Purifier baltymų chromatografijos aparatūros pagalba. Kolonėlė buvo iš anksto paruošiama ją užpildant 50 mM pH 7,2 kalio fosfatiniu buferiniu tirpalu su 0,5M NaCl (A buferinis tirpalas). Ant kolonėlės užnešus baltymų ekstraktą, visi kolonėlei giminingumo neturintys baltymai išplauti A buferiniu tirpalu, o frakcijos su tiksliniu baltymu, turinčiu histidinių inkarą surenkamos taikant gradientinę eliuciją buferiniu tirpalu B (0,5M imidazolu praturtintas A buferinis tirpalas). Frakcijos su tiksliniu baltymu buvo surinktos pagal išmatuotą absorbciją ties 280 nm. Imidazolas pašalinamas atliekant tikslinio baltymo mėginio dializę buferiniame tirpale A (tūris 50 kartų didesnis, nei mėginio) per naktį 4°C. Eliucijos frakcijos analizuojamos NDS–PAGE metodu, tikrinamas frakcijų fermentinis aktyvumas.

#### 2.3.6 Eksperimentai su *Microbacterium sp.* SINO2 beląsteliniu ekstraktu ir *Microbacterium sp.* SINO2 baltymų gryninimo eksperimentai

Užaugintų *Microbacterium sp.* SINO2 ląstelių suspensija ardyta ultragarsiniu dezintegratoriumi 4°C temperatūroje 5 min aktyvaus ardymo laiko (15 min bendro ardymo laiko) 5 s ardant ir 10 s darant

pauzę. Gautas beląstelinis ekstraktas centrifuguotas (15 min  $\times$  4000 aps/min). Eksperimentai su PreQ<sub>0</sub> bei izocitozino substratais atliekami panaudojant 50  $\mu$ L beląstelinio ląstelių ekstrakto, 3mM substrato, galutinis reakcijos tūris 500  $\mu$ L. Tam tikrais laiko intervalais nucentrifugavus dalį reakcijos mišinio, 100  $\mu$ L supernatanto analizuojama HPLC-MS metodika arba matuojamas UV-Vis sugerties spektras 200-400 nm intervale.

*Microbacterium sp.* SINO2 beląsteliniame ekstrakte esančių baltymų gryninimas atliktas HiTrap DEAE FF bei HiTrap Phenyl HP (*GE Healthcare*, Švedija) kolonėlių pagalba atitinkamai jonų mainų chromatografijos arba hidrofobinės sąveikos chromatografijos būdu. Prieš gryninimo eksperimentą, ląstelės augintos LB terpėje be papildomų priedų. Gryninant baltymų ekstraktą HiTrap DEAE FF kolonėle, kolonėlė buvo paruošiama ją užpildant 50 mM pH 7,2 kalio fosfatinu buferiniu tirpalu (A buferinis tirpalas). Ant kolonėlės užnešus baltymų ekstraktą, visi kolonėlei giminingumo neturintys baltymai išplauti A buferiniu tirpalu, o frakcijos su baltymais, pasižyminčiais giminingumu kolonėlių sorbentui surenkamos taikant gradientinę eliuciją buferiniu tirpalu B (1M NaCl praturtintas A buferinis tirpalas). HiTrap Phenyl HP kolonėlės atveju A buferinis tirpalas buvo 50 mM pH 7,2 kalio fosfatinis buferinis tirpalas praturtintas 1M NaCl, o B buferinis tirpalas – be NaCl. Frakcijos su baltymais buvo surinktos pagal išmatuotą absorbciją ties 280 nm. Eliucijos frakcijos analizuojamos NDS–PAGE metodu, tikrinamas frakcijų fermentinis aktyvumas.

### 2.3.7 Baltymų natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė (NDS–PAGE)

Baltymų elektroforezė natrio dodecilsulfato denatūruojančiomis sąlygomis poliakrilamidiniame gelyje buvo atliekama pagal standartines metodikas naudojant 5% koncentruojamąjį ir 12% skirstomąjį gelius.

<b>Skirstomasis 12% gelis:</b>	<b>Koncentruojantis 4,5 % gelis:</b>
3,10 ml H <sub>2</sub> O	3,10 ml H <sub>2</sub> O
2,8 ml 40 % Akrilamido	562 $\mu$ l 40 % Akrilamido
2,0 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8
80 $\mu$ l 10 % NDS	50 $\mu$ l 10 % NDS
80 $\mu$ l 10 % APS	50 $\mu$ l 10 % APS
8 $\mu$ l TEMED	5 $\mu$ l TEMED

Prieš elektroforezę, baltymai buvo dažomi su Coomassie Brilliant Blue R-250 dažais su 4 % NDS ir 6 %  $\beta$ -metkaptuoetanolio. Mėginiai 2–4 min inkubuojami verdančio vandens vonelėje. Į elektroforezės

aparato šulinėlius po 5–15  $\mu$ l įnešami pavyzdžiai ir PageRuler™ Prestained Protein Ladder baltymų molekulinės masės žymuo. Elektroferezė vykdoma esant 70 mA stiprumo srovei 1 val. 20 min. Gelis po dažymo blukinamas su 7% acto rūgšties vandeniniu tirpalu ir skalaujamas vandeniu (Leammi, 1970).

## 2.4 Analiziniai metodai

### 2.4.1 Tandeminė skysčių chromatografija ir masių spektrometrija

Tandeminė skysčių chromatografija ir masių spektrometrija (HPLC-MS) buvo atlikta naudojant modulinę sistemą, sudarytą iš CBM-20A valdymo bloko, SIL-30AC automatinio bandinių ėmiklio, dviejų LC-2020AD pompų ir CTO-20AC termostato, naudojant SPD-M20A PDA detektorių ir LCMS-2020 masių spektrometrą su ESI šaltiniu (*Shimadzu*, Kioto, Japonija).

Chromatografinis fracionavimas atliktas naudojant YMC Pack Pro C18, 150  $\times$  3 mm chromatografinę kolonėlę (*YMC*, Kioto, Japonija), esant 40°C temperatūrai. Mobilioji fazė sudaryta iš 0,1% vandeninio skruzdžių rūgšties tirpalo (tirpalas A) ir acetonitrilo (tirpalas B) gradientu nuo 5% iki 60%.

Masių spektrai buvo registruoti  $m/z$  50 iki  $m/z$  700 intervale, esant 350°C temperatūrai, 250°C DL temperatūrai ir  $\pm$ 4500 V įtampai (neutrali DL/Qarray įtampa), naudojant N<sub>2</sub> kaip džiovinamąsias ir purškiamąsias dujas. Masių spektrometrijos analizė buvo atlikta taikant teigiamos ir neigiamos jonizacijos režimus. Duomenys analizuoti naudojant LabSolutions LC/MS programinę įrangą.

### 2.4.2 Branduolių magnetinio rezonanso eksperimentai

BMR spektrai gauti atlikus matavimus su 7-ciano-7-deazaguaninu bei 2,4-diokso-2,3,4,7-tetrahidro-1*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidino-5-karbonitrilu, ištirpintuose DMSO-*d*<sub>6</sub> (*Sigma*, JAV). Naudota Bruker Ascend 400 įranga (Bruker, Billerica, MA, JAV), <sup>1</sup>H BMR spektras užregistruotas 400 MHz dažnyje, <sup>13</sup>C BMR spektras – 101 MHz dažnyje. Cheminiai poslinkiai ( $\delta$ ) nurodomi ppm skalėje lyginant su tetrametilsilano standartu. Pikų multiplietišcumai: s = singletas.

**7-Ciano-7-deazaguaninas** nupirktas kaip rudi, vienalyčiai milteliai. <sup>1</sup>H BMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 11.99 (s, 1H), 10.72 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 6.39 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 158.05, 154.21, 152.15, 128.26, 116.36, 99.21, 86.02.

**2,4-Diokso-2,3,4,7-tetrahidro-1*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidino-5-karbonitrilas** gautas kaip smėlio spalvos, vienalyčiai milteliai. <sup>13</sup>C BMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 159.65, 153.11, 145.82, 132.47, 117.47, 98.24, 85.47.

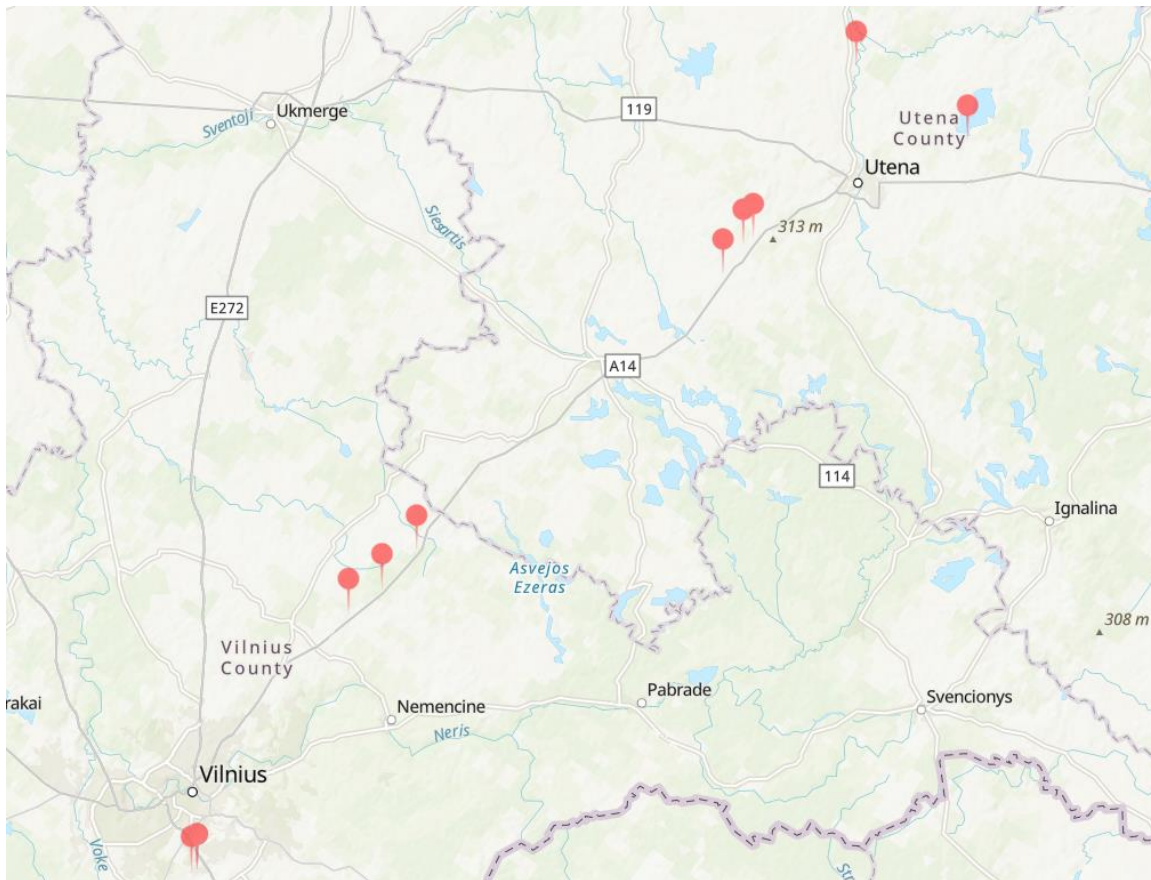
## 2.5 Kompiuteriniai metodai ir programinė įranga

**Duomenų apdorojimo programos:** Paveikslai sumodeliuoti BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com), 2021) ir ChemDraw v19.0 (PerkinElmer Informatics, JAV). Duomenys analizuoti ir grafikai sudaryti Microsoft Excel 2016 programa. Plokštelių skaitytuvo pagalba išmatuoti duomenys apdoroti BioTEK Gen5 programine įranga. Baltymų filogenetinė analizė buvo atlikta naudojantis MEGA X programine įranga (Kumar ir kt., 2018). Homologų paieška atlikta NCBI BLAST programine įranga. *Microbacterium sp.* SINO2 bakterijos surinktas genomai analizuotas Unipro UGENE v36.0 programa (Okonechnikov ir kt., 2012).

**Bioinformatinių baltymų tretinių struktūrų modeliavimo bei fermento-substrato kompleksavimo (angl. *docking*) eksperimentai:** Baltymų sekų homologų paieška vykdyta NCBI BLAST duomenų bazėje (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Daugybiniis palyginys sukurtas naudojant ClustalOmega algoritmą (Sievers ir kt., 2011), palyginio apipavidalinimas atliktas naudojantis ESPript serveriu (Robert ir Gouet, 2014). Struktūrinių homologų (šablonų) paieška vykdyta PDB duomenų bazėje. Tikslinių baltymų struktūrų modeliai sugeneruoti HHPred (Gabler ir kt., 2020) bei Swiss-Model algoritmų pagalba (Waterhouse ir kt., 2018). Gautų modelių struktūros tikslintos Galaxy Refine algoritmo pagalba (Heo ir kt., 2013). Gautų modelių kokybė buvo įvertinta ProSA serveryje (Wiederstein ir Sippl, 2007), palyginta su šablonų įverčiais, taip pat ir netikslintų modelių įverčiais. Fermento-substrato kompleksacijos *in silico* eksperimentai vykdyti naudojant AutoDock Vina (Trott ir Olson, 2010) bei SwissDock algoritmus (Grosdidier ir kt., 2011). Baltymų ir ligandų tretinės struktūros paruoštos fermento-substrato kompleksacijos eksperimentams UCSF Chimera programos pagalba (Pettersen ir kt., 2004), pagal standartinę siūlomą parametrų rinkinį, į baltymo modelio struktūrą įkomponuoti vandenilio atomai, paskirstytas teorinis krūvis. Prieš fermento-substrato kompleksacijos eksperimentą dėl kompiuterinės galios resursų stokos nebuvo atliktos aktyviojo centro molekulinės dinamikos optimizacijos. Struktūrinių modelių analizei ir palyginimui su žinomomis struktūromis naudota PyMOL programa (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC).

### 3. REZULATATAI IR JŲ APTARIMAS

Vykdamt mikroorganizmų, biodegraduojančių 7-ciano-7-deazaguaniną (PreQ<sub>0</sub>), paiešką, buvo atsižvelgta į tai, kad didelė tikimybė organinius junginius biodegraduojančias bakterijas rasti dirvožemio mėginiuose, gautuose iš paviršinių dirvožemio sluoksnių. Paviršiniai dirvožemio sluoksniai pasižymi didele bakterijų dinamika, dėl tiesioginio ryšio su atmosfera, biosfera bei dėl žmogaus veiklos paviršiniuose dirvožemio sluoksniuose aptinkama didelė organinių cheminių junginių gausa, kuriuos bakterijos evoliucijos eigoje yra prisitaikiusios biodegraduoti (Singh, 2008). Nesusijusių eksperimentų metu Molekulinės Mikrobiologijos ir Biotechnologijos skyriuje iš paviršinio dirvožemio žemės mėginių buvo išskirti *Arthrobacter* bei *Burkholderia* genčių atstovai, gebantys skaidyti bei transformuoti gamtoje natūraliai nesutinkamus hidroksipiridinus bei piridinių darinius (Gasparavičiūtė ir kt., 2006; Stankevičiūtė ir kt., 2016). Šio darbo metu 7-ciano-7-deazaguanino biodegradacijos tyrimui naudoti dirvožemio mėginiai buvo surinkti įvairiose Vilniaus ir Utenos rajonų vietose, 15-20 cm gylyje (3.1 pav.).



**3.1 pav. Vilniaus ir Utenos rajonų vietos, kuriose buvo surinkti žemės mėginiai.**

Surinkta 130 dirvožemio mėginių 10-tyje skirtingų vietų, su pastaraisiais mėginiais nedelsiant pradėti bakterijų atrankos eksperimentai.

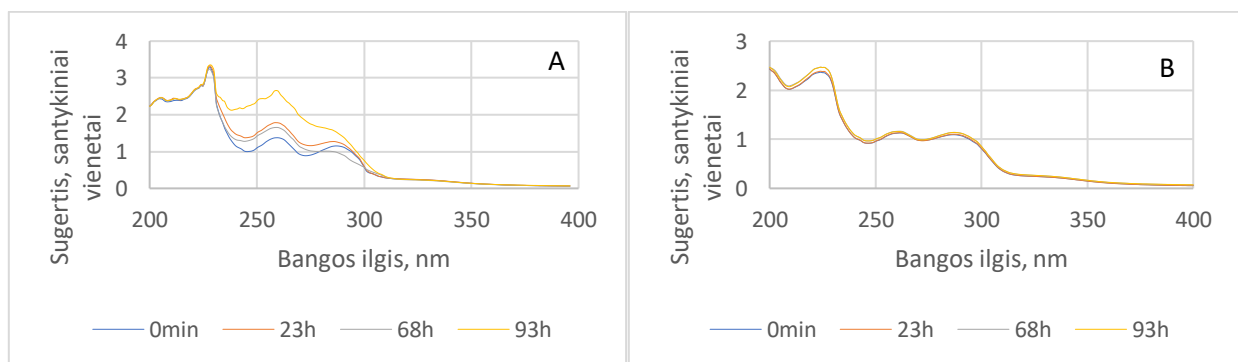


### 3.1 7-Ciano-7-deazaguaniną skaidančių bakterijų, esančių dirvožemio mėginiuose, atranka ir išskyrimas

Pirminis darbo uždavinys buvo sužinoti, ar surinktuose dirvožemio mėginiuose yra bakterijų, gebančių vartoti 7-ciano-7-deazaguaniną kaip vienintelį anglies šaltinį arba galinčių metabolizuoti PreQ<sub>0</sub> intaktinių ląstelių pagalba į kitus organinius junginius. Pagal darbe aprašytą metodiką (2.3.1), surinkti dirvožemio mėginiai buvo suspenduoti 0,9% NaCl tirpale, šiais mėginiais užsėta neagarizuota Kozero mineralinė terpė, praturtinta 0,05% galutinės koncentracijos (w/v) PreQ<sub>0</sub>. Mėginiai inkubuoti 30°C. Ši atranka paremta PreQ<sub>0</sub> kaip vieninteliu anglies šaltiniu. Pokyčiai PreQ<sub>0</sub> praturtintoje terpėje tikrinti kas 3-7 paras centrifuguojant mėginius ir matuojant supernatanto UV-Vis sugerties spektrą 200-400 nm diapazone plokštelių skaitytuvu.

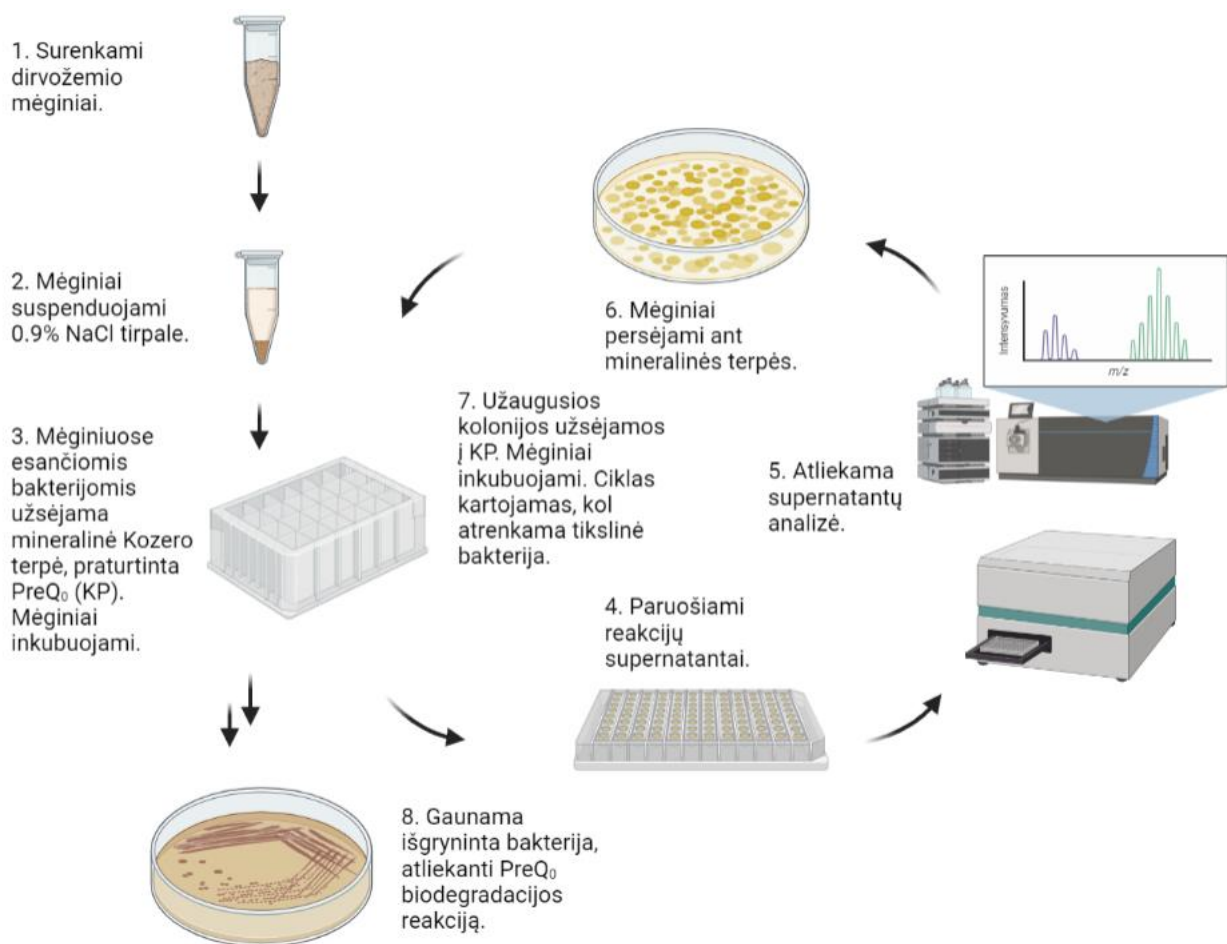
Bakterijų atrankos pradžioje, po 7 dienų, UV-Vis sugerties spektro pokyčiai buvo užfiksuoti 6 mėginiuose iš 130 (~4,6%), kai daugeliu pirmųjų ir kitų matavimų metu užfiksuoti neaiškūs bei PreQ<sub>0</sub> degradacijos neatspindintys supernatanto UV-Vis sugerties spektro pokyčiai (3.1.1 pav.). Kai kurių spektrų sugertis didėja 260 nm ir 280 nm srityje, nes bakterijos lizuoja ir išskiria į suspensiją nukleorūgštis bei baltymus (3.1.1 pav. A). Dažnai bakterijos laikui bėgant nedaro įtakos PreQ<sub>0</sub> būdingam UV-Vis sugerties spektrui, suspensijoje nevyksta jokie biocheminiai procesai, kuriuos būtų galima užfiksuoti plokštelių skaitytuvu (3.1.1 pav. B).

Siekiant praturtinti mėginius bakterijomis, kurios galėtų biodegraduoti PreQ<sub>0</sub>, iki tol, kol su PreQ<sub>0</sub> vykstančią konversiją būtų galima užregistruoti HPLC-MS metodais arba pagal pakitusį UV-Vis sugerties spektrą plokštelių skaitytuvu pagalba, dirvožemio mėginiais užsėta mineralinė terpė buvo persėta ant agarizuotos LB terpės, agarizuotos Kozero terpės, praturtintos 0,05% (w/v) PreQ<sub>0</sub> arba agarizuotos Kozero terpės, praturtintos 1% gliukozės ir 0,05% PreQ<sub>0</sub>. Užaugus kolonijoms, jos buvo atskirai persėtos į neagarizuotą mineralinę Kozero terpę su 0,05% PreQ<sub>0</sub> ir šio supernatanto UV-Vis spektro arba/ir molekulių masių pokyčiai vėl registruojami kas 3-7 paras.



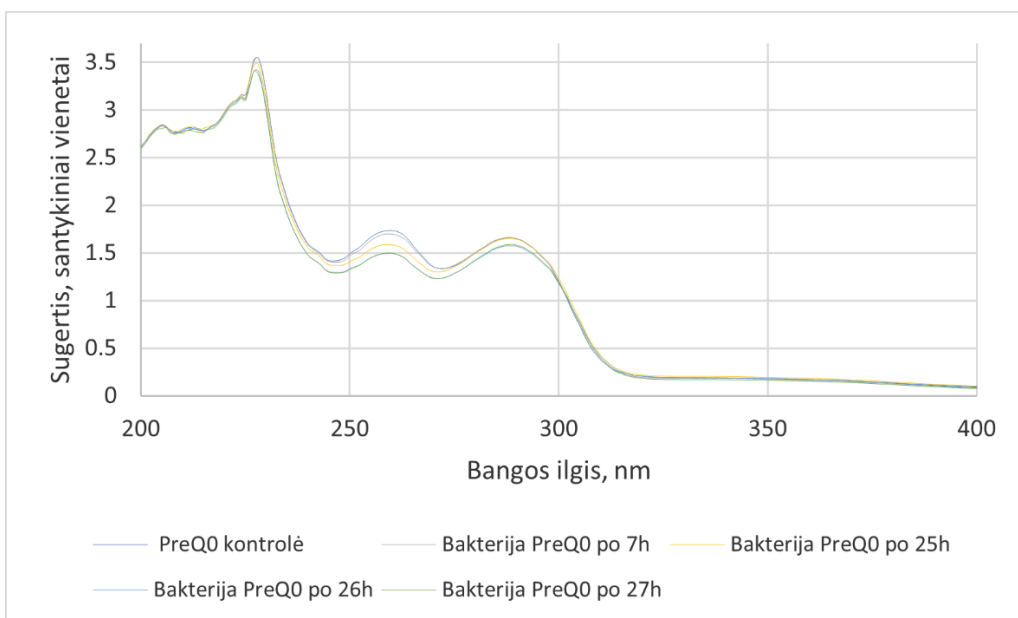
3.1.1 pav. Bakterijų, inkubuotų su PreQ<sub>0</sub>, supernatantų UV-Vis sugerties spektrai.

Užfiksavus spektro pokytį, bakterijų suspensija vėl persėjama ant agarizuotų terpių, tęsiant bakterijų atranką. Ši gryninimo strategija (3.1.2 pav.) reikalinga taip pat tam, kad išgryninti tik vieną bakteriją, be to, įsitikinti, kad bakteriją galima kultivuoti laboratorinėmis sąlygomis ant agarozinės terpės.



### 3.1.2 pav. Bakterijų, gebančių biodegraduoti PreQ<sub>0</sub> substratą, atrankos schema.

Naudojant skystą Kozero mineralinę terpę ir agarizuotas terpes, tikrinant skystos terpės supernatanto pokytį dviem įvardintais metodais pavyko gauti gryną bakterijų kultūrą SINO2, kuri keičia PreQ<sub>0</sub> UV-Vis sugerties spektrą (3.1.3 pav.).

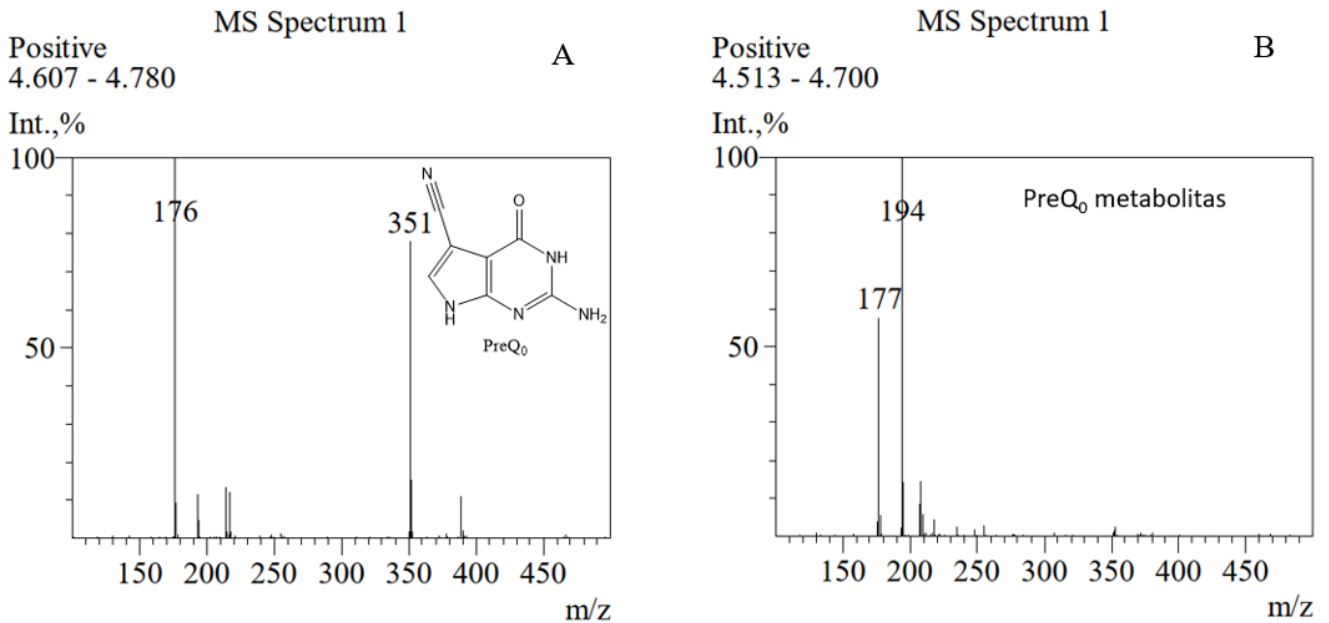


**3.1.3 pav. PreQ<sub>0</sub> UV-Vis sugerties spektro pokytis inkubuojant PreQ<sub>0</sub> su iš dirvožemio mėginių išgryninta bakterija.** Eksperimentai atlikti pagal 2.3.6 metodiką.

3.1.3 paveiksle galima matyti, kad pagal UV-Vis sugerties spektrą su intaktinėmis ląstelėmis inkubuojamas PreQ<sub>0</sub> substratas bėgant laikui keičia PreQ<sub>0</sub> būdingą sugerties spektrą, inkubavimo metu vieno piko sugertis mažėja 255-265 nm srityje, kito piko sugertis išlieka beveik nepakitusi 285-290 nm srityje. Laikui bėgant sugerties intensyvumas stipriai nesumažėja, ~27h nuo inkubavimo pradžios pakitęs spektras nebesikeičia. Iškelta prielaida, kad PreQ<sub>0</sub> nėra biodegraduojamas iki galo, o transformuojamas iki tam tikro produkto. Tolimesni PreQ<sub>0</sub> transformacijos tyrimai atlikti su šia bakterija.

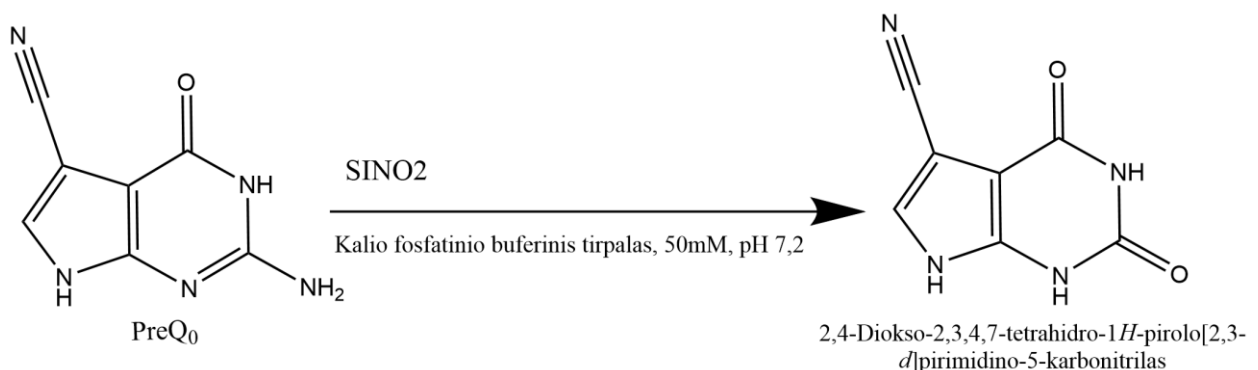
### 3.2 SINO2 ląstelių katalizuojamos PreQ<sub>0</sub> biodegradacijos produkto struktūros nustatymas

Atlikus SINO2 ląstelių suspensijos Kozero terpėje, inkubuotos su PreQ<sub>0</sub>, supernatanto analizę HPLC-MS metodika, pastebėta, jog iš tiesų PreQ<sub>0</sub> yra transformuojamas į kitą produktą, o ne biodegraduojamas iki galo. 7-ciano-7-deazaguanui būdingas chromatogramos smailė sunyko, chromatogramoje atsirado kito junginio smailė, kurio užlaikymo laikas labai panašus į PreQ<sub>0</sub> išėjimo laiką, tačiau išanalizavus jo masių spektrogramą, atitinka 176 Da molekulinę masę (3.2.1 pav).



**3.2.1 pav. PreQ<sub>0</sub> (A) bei SINO2 intaktinių ląstelių pagalba gauto metabolito (B) masių spektrogramos.** Spektrai registruoti teigiamos jonizacijos režime, dėl to PreQ<sub>0</sub> (175 Da) masės smailė atitinka 176 m/z, o PreQ<sub>0</sub> metabolito (176 Da) atitinka 177 m/z. PreQ<sub>0</sub> masių spektrogramoje 351 masės bei krūvio santykis greičiausiai atitinka PreQ<sub>0</sub> dimerą. PreQ<sub>0</sub> metabolito masių spektrogramoje 194 masės bei krūvio santykį atvaizduojantis smailė nėra susijęs su vykusios reakcijos produktais, toks pats smailė registruotas ir kitose, su PreQ<sub>0</sub> reakcija nesusijusiose masių spektrogramose.

Pagal turimus duomenis iškelta hipotezė, kad SINO2 bakterijų pagalba vykstanti PreQ<sub>0</sub> biotransformacija yra deamininimo reakcija, nes PreQ<sub>0</sub> deaminintas produktas pasižymi 176 Da molekuline mase, t.y. 1 Da mažesnis, nei PreQ<sub>0</sub> (3.2.2 pav.)

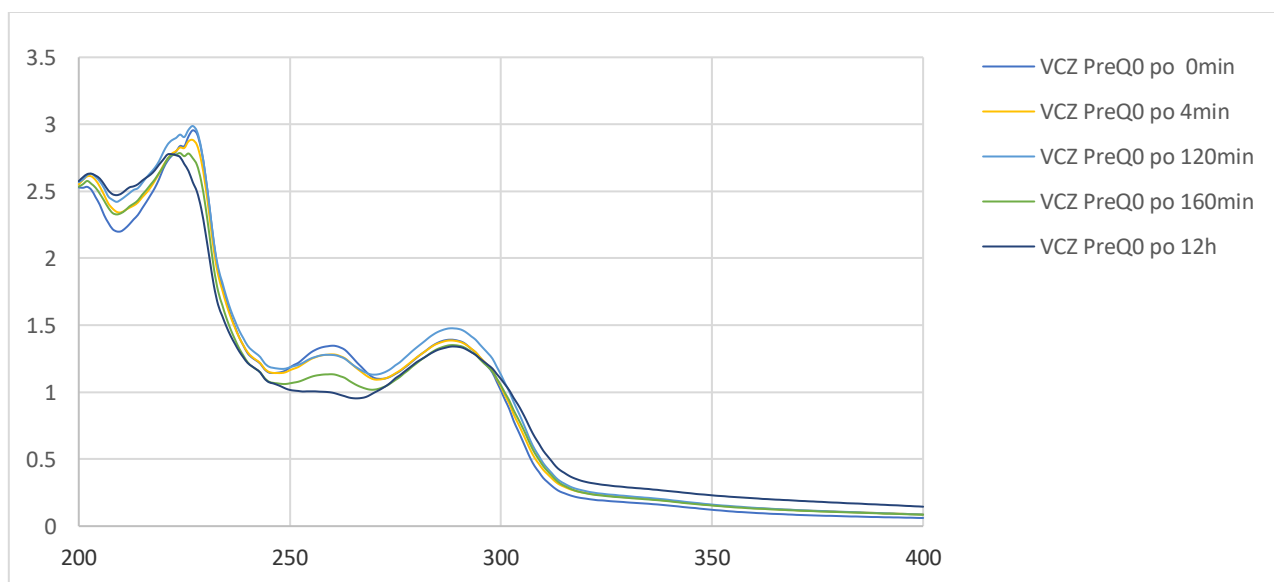


**3.2.2 pav. Reakcijos schema, atvaizduojanti galimai vykstančią PreQ<sub>0</sub> substrato transformaciją.**

Remiantis iškelta PreQ<sub>0</sub> transformacijos į deaminintą produktą hipoteze, pabandyta atlikti PreQ<sub>0</sub> deamininimo reakciją su deaminazėmis iš laboratorijos kolekcijos. Pastebėta, kad viena iš rekombinantinių izocitozino deaminazių Vcz (Aučynaitė ir kt., 2018) verčia PreQ<sub>0</sub> į tokį patį junginį

(patvirtinta HPLC-MS metodu, nepateikta), kaip ir iš dirvožemio mėginių izoliuota SINO2 bakterija. Tiek eksperimentų metu su intaktinėmis SINO2 ląstelėmis, tiek su SINO2 beląsteliniu ekstraktu nebuvo užfiksuotas reikšmingas izocitozino skaidymas ar reakcija su izocitoziniu.

Siekiant identifikuoti ir patvirtinti naujo produkto struktūrą ir, atitinkamai, hipotezę apie PreQ<sub>0</sub> deamininimą, atlikti struktūros nustatymo eksperimentus branduolių magnetinio rezonanso spektroskopijos pagalba, didesniai kiekiui tikslinio produkto gauti pasitelkta Vcz izocitozino deaminazė. Kadangi inkubuojant PreQ<sub>0</sub> su SINO2 intaktinėmis ląstelėmis bei atliekant deamininimo reakciją su Vcz gaunamas tas pats produktas, o Vcz deaminazės pagalba šį produktą galima gauti efektyviau bei greičiau (pav. 2.3.3) nei su SINO2 bakterijomis, PreQ<sub>0</sub> transformacijos reakcija atlikta pasitelkiant Vcz izocitozino deaminazę, gautas produktas panaudotas BMR spektroskopijos eksperimentams.



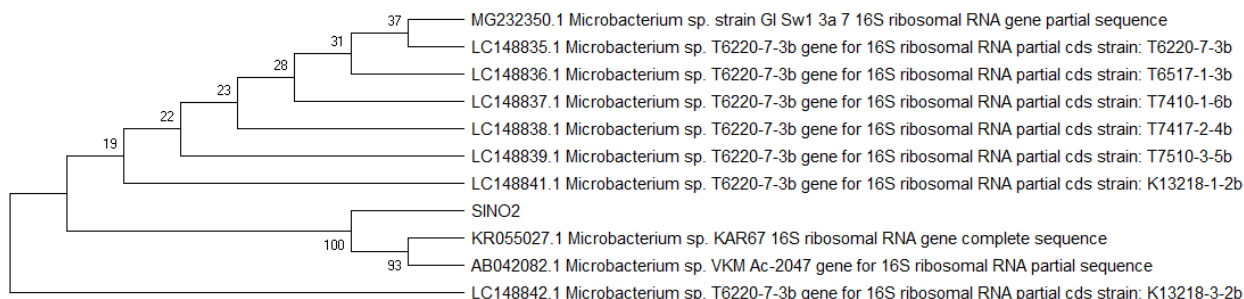
**3.2.3 pav. Vcz rekombinantinės deaminazės katalizuojamos PreQ<sub>0</sub> konversijos reakcijos supernatanto UV-Vis spektro pokytis bėgant laikui.** Pildant reakcijos mišinį PreQ<sub>0</sub> substrato porcijomis ir rekombinantiniu Vcz fermentu sėkmingai atliktos PreQ<sub>0</sub> konversijos 50 mg mastu. Dėl efektyvios ir greitai vykstančios konversijos buvo galima sėkmingai atlikti produkto struktūros nustatymą branduolių magnetinio rezonanso spektroskopijos pagalba.

Atlikus BMR eksperimentus (2.4.2 metodika) ir išsprendus gautus PreQ<sub>0</sub> ir rekombinantinės Vcz deaminazės katalizuotos PreQ<sub>0</sub> biokonversijos produkto <sup>13</sup>C BMR spektrus, patvirtinta, jog tiek rekombinantinis fermentas Vcz, tiek intaktinės SINO2 ląstelės katalizuoja PreQ<sub>0</sub> deamininimo reakciją susidarant 2,4-diokso-2,3,4,7-tetrahidro-1*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidino-5-karbonitrilui. Mūsų žiniomis, pastarasis junginys literatūroje nėra aprašytas ar charakterizuotas, tad šių eksperimentų metu identifikuotas naujas PreQ<sub>0</sub> degradacijos produktas.

Kaip minėta, tolimesniai deamininto produkto bioviršmai, inkubuojant jį su SINO2 intaktinėmis ląstelėmis, nebuvo užfiksuoti. Nors tikėtasi iš bakterijų mišinių išskirti bakteriją, gebančią degraduoti 7-ciano-7-deazaguaniną kelių reakcijų pagalbą iki pirminių metabolitų, atrasta bakterija SINO2 atlieka tik vieną biocheminę PreQ<sub>0</sub> konversijos reakciją. Yra žinoma, kad bakterijos būna prisitaikiusios iš aplinkoje cirkuliuojančių junginių įsisavinti ne tik anglies atomus, tačiau ir pasisavinti azotą amoniako pavidalu (Stal ir kt., 2008). Pasisavinti molekulinį azotą mikroorganizmams yra sudėtinga, tad tokiu būdu jie prisitaiko paprasčiau įsisavinti vieną pagrindinių elementų, reikalingų organizmo gyvavimui ir dauginimuisi (Stal ir kt., 2008). Be to, yra žinoma, kad visišką organinių junginių degradavimą vykdo ne tik pavienės bakterijos, tačiau ir bakterijų konsorciumai (Patowary ir kt., 2016), tad šios atrankos metu pavyko išskirti tik dalį junginio metabolinio kelio turintį organizmą.

### 3.3 SINO2 bakterijos genties identifikavimas bei giminingiausių atstovų paieška

Nustačius, kokią biodegradacinę transformaciją atlieka SINO2 bakterijų intaktinės ląstelės su PreQ<sub>0</sub> substratu, nuspręsta išsiaiškinti, kokios bakterijų genčiai priklauso ši bakterija. PGR būdu padauginus ir nusekvenavus SINO2 bakterijos 16S rRNR geną, atlikus sekos filogenetinę analizę su panašiausiomis sekomis išsiaiškinta, kad SINO2 bakterija pagal šio geno seką artimiausia *Microbacterium* genties bakterijoms, konkrečiai *Microbacterium* genties KAR67 atstovui (3.3.1 pav.)



**3.3.1 pav. Filogenetinis medis, reprezentuojantis artimiausias žinomas SINO2 bakterijai 16S rRNR geno sekas.** Visos sekos, artimiausios SINO2 bakterijos tikslinio geno sekai, priklauso *Microbacterium* genčiai. Prieš sekos pavadinimą pateiktas NCBI duomenų bazėje esantis originalus nukleotidų sekos numeris.

### 3.4 *Microbacterium* sp. SINO2 fermento, atsakingo už PreQ<sub>0</sub> deaminimą, paieška baltymų chromatografijos būdu

Siekiant išsiaiškinti, kuris *Microbacterium* sp. SINO2 bakterijos baltymas bei jį koduojantis genas atsakingas už 7-ciano-7-deazaguanino deaminimą, bandyta gryninti tikslinį baltymą chromatografijos būdu. Prieš tai nuspręsta patikrinti, ar *Microbacterium* sp. SINO2 bakterijos fermento, katalizuojančio

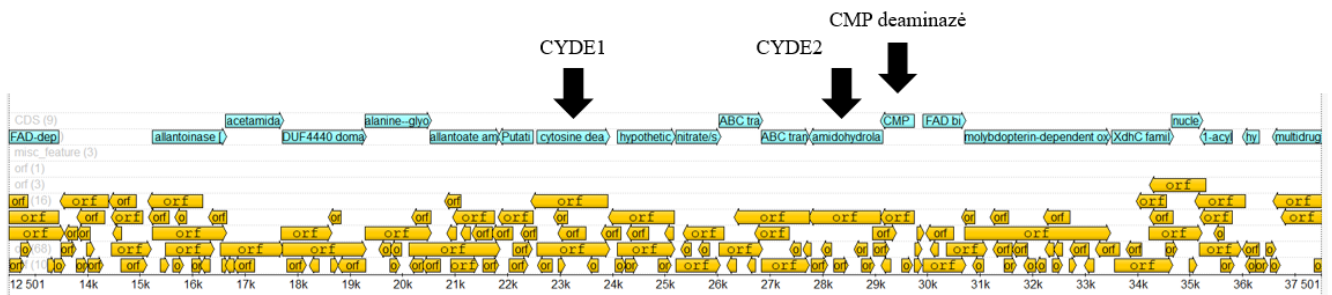
PreQ<sub>0</sub> deamininimą, raiška yra indukuojama, ar nuolatinė. Bakterijos užaugintos LB terpėje, praturtintoje arba nepraturtintoje 0,05% PreQ<sub>0</sub>, nucentrifuguotos, praplautos 0,9% NaCl tirpalu ir ląstelės ardytos ultragarso aparatu. Atliktos PreQ<sub>0</sub> konversijos reakcijos su šiomis sąlygomis augintų ląstelių lizatais bei intaktinėmis ląstelėmis. Po 26-27h nuo reakcijos pradžios plokštelių skaitytuvu registruota PreQ<sub>0</sub> deamininimo reakcija, katalizuota LB terpėje augintų ląstelių, LB terpėje, praturtintoje PreQ<sub>0</sub> augintų ląstelių, LB terpėje, praturtintoje PreQ<sub>0</sub> augintų ląstelių lizato bei LB terpėje augintų ląstelių lizato katalizuota reakcija. Visų keturių reakcijų metu PreQ<sub>0</sub> deamininimas registruotas panašiu laiku. Tai davė pagrindo manyti, jog fermento, katalizuojančio PreQ<sub>0</sub> deamininimo reakciją, raiška yra nuolatinė.

Iškelta hipotezė, jog tikslinį fermentą būtų galima išgryninti jonų mainų chromatografijos arba hidrofobinės sąveikos chromatografijos būdu iš *Microbacterium sp.* SINO2 ląstelių lizato. Lyginant trapusavyje PreQ<sub>0</sub> deaminaziniu aktyvumu pasižyminčių bei nepasižyminčių frakcijų baltymų sąstatus akrilamidinio gelio pagalba nustatyti fermentą(-us), kuris(-ie) galėtų būti atsakingas(-i) už PreQ<sub>0</sub> deamininimą. Išpjovus iš akrilamidinio gelio potencialaus(-ių) fermento(-ų) fragmentus bei juos nusekvenavus būtų galima sužinoti mus dominančio fermento seką bei susintetinus šį baltymą, patikrinti jo fermentinį aktyvumą. Jonų mainų bei hidrofobinės sąveikos chromatografijos metu naudojant atitinkamai HiTrap DEAE FF bei HiTrap Phenyl HP kolonėles buvo gautos PreQ<sub>0</sub> deamininimo aktyvumu pasižyminčios frakcijos, tačiau šios frakcijos turimų baltymų sąstatu neišsiskyrė iš frakcijų, nepasižyminčių fermentiniu aktyvumu. Aktyvių frakcijų gavimas suardžius 7-ciano-7-deazaguaninu neindukuotas ląsteles patvirtina, kad fermento, atliekančio PreQ<sub>0</sub> deamininimą raiška ląstelėje yra nuolatinė. Tolimesnę fermento, katalizuojančio PreQ<sub>0</sub> deamininimą, paiešką nuspręsta atlikti pasitelkus genų inžinerijos ir rekombinantinių baltymų technologijos metodus.

### **3.5 *Microbacterium sp.* SINO2 geno bei fermento, atsakingo už PreQ<sub>0</sub> deamininimą, paieška panaudojant bioinformatinius, genų inžinerijos bei rekombinantinių baltymų technologijos metodus**

Ankstesnis eksperimentas parodė, kad tikslinės *Microbacterium sp.* SINO2 deaminazės gryninimas iš ląstelių lizato komplikuoatas, ir, galimai, sunkiai įgyvendinamas, todėl tikslinio geno ir baltymo identifikavimui nuspręsta pasitelkti genomo sekoskaitą. Išanalizavus bakterijos genomą ir klonavimo bei rekombinantinių baltymų technologijos būdu susintetinus pasirinktų deaminazių genų produktus, bus bandomas šių rekombinantinių fermentų aktyvumas su PreQ<sub>0</sub> substratu.

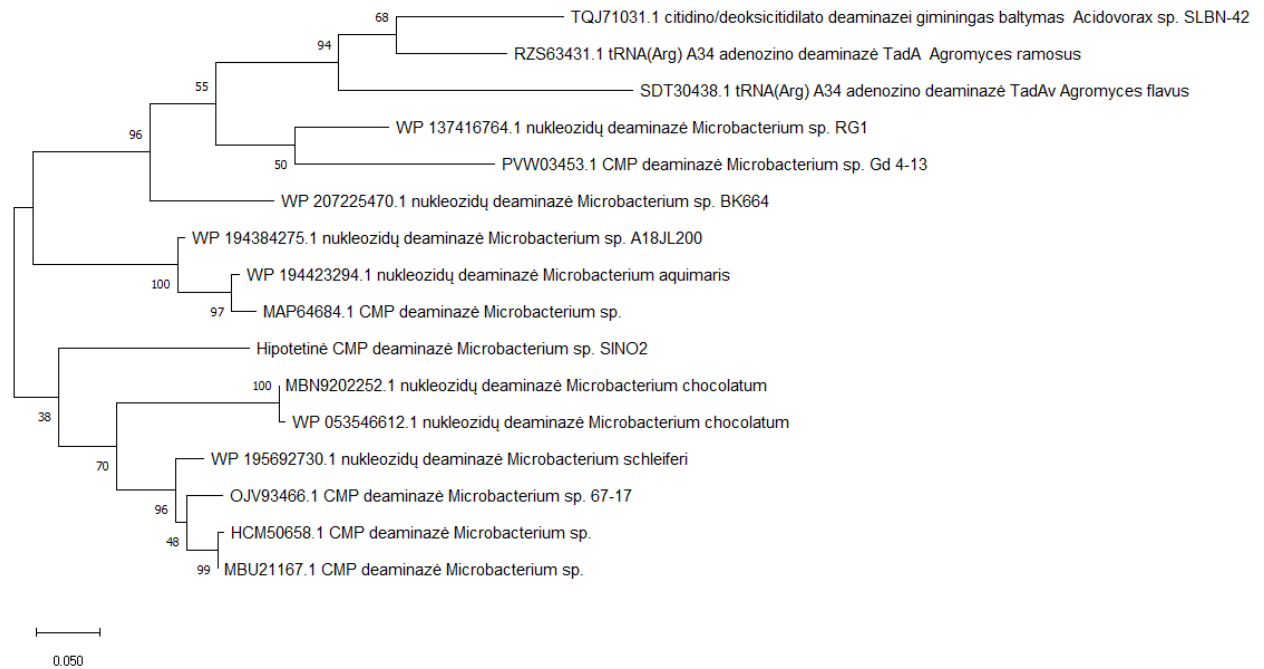
Užauginus *Microbacterium sp.* SINO2 bakterijos biomasės, išskyrus genomine bakterijos DNR, ši DNR buvo sekvenuota. Atlikus genomo anotavimą, pasirinkti trys galimi genai, atsakingi už PreQ<sub>0</sub> substrato deamininimą – CMP deaminazė, CYDE1 ir CYDE2 (3.5.1 pav.). Šie genai randasi operone, kuriame koduojami ir kiti guaninų ir į juos panašių molekulių skaidymo kelyje galintys dalyvauti fermentai – HpxO urato oksidazė, alantoinazė ir alantoato amidohidrolazė, ksantino dehidrogenazės domeną turintis baltymas XdhC, be to, keletas ATP surišančių kasečių (angl. ABC) transporterių superšeimos baltymų, kurie teoriškai gali būti atsakingi už PreQ<sub>0</sub> substrato patekimą į bakterijos citozolį (Vogels ir Van der Drift, 1976; Xi ir kt., 2000).



**3.5.1 pav. Anotuota *Microbacterium sp. SINO2* bakterijos surinkto genomo (angl. *contig*) ištrauka.** Schemoje pavaizduotos trijų pasirinktų genų padėtys vienas kito atžvilgiu.

Atliktos visų trijų genų *in-silico* nutransliuotų baltymų homologų paieškos bei filogenetinės analizės.

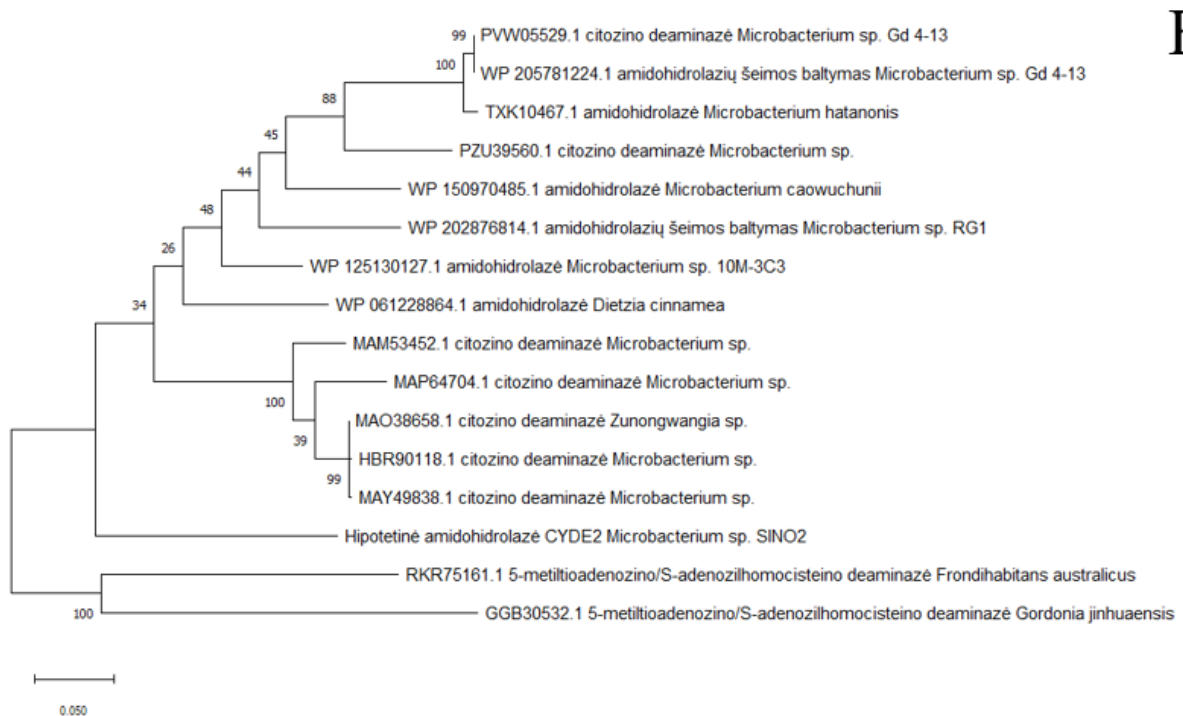
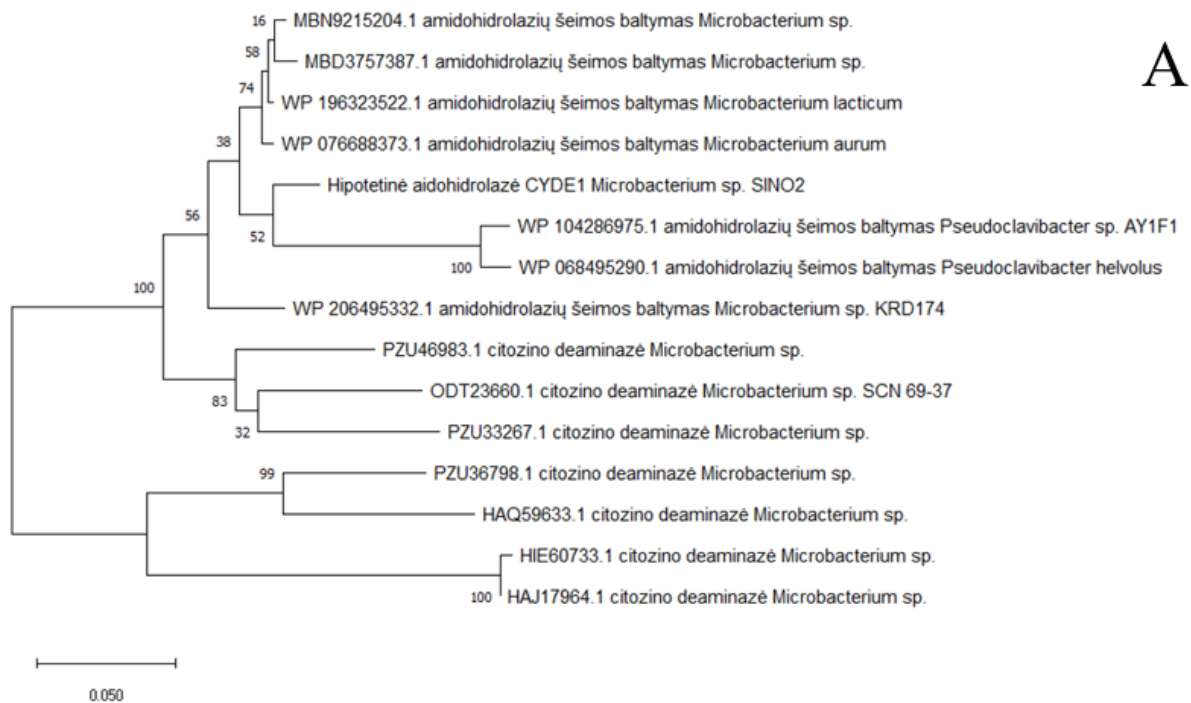
Atlikta CMP deaminazės homologų paieška ir filogenetinė analizė parodė (3.5.2 pav.), jog šis baltymas yra artimas citidino monofosfato (CMP) deaminazėms, nukleozidų deaminazėms, kurios katalizuoja tokių nukleozidų, kaip citidino, guanozino heterociklinės dalies deamininimą bei pasižymi panašumu tRNR adenzino deaminazėms. Artimiausi homologai priklauso *Microbacterium* genties bakterijoms. Remiantis filogenetiniu medžiu galima teigti, kad tikėtina, jog šis pasirinktas genas gali būti atsakingas už PreQ<sub>0</sub> deamininimą.



**3.5.2 pav. CMP deaminazės iš *Microbacterium sp. SINO2* filogenetinis medis.** Filogenetinė analizė atlikta panaudojant artimiausias rastas sekas NCBI duomenų bazėje pritaikius didžiausio tikėtinumo metodą. Analizė atlikta MEGAX programa. Prieš baltymo pavadinimą pateiktas jo sekos numeris genų banke. Skaičiai prie šakų rodo grupių išskyrimo patikimumą procentais.



Atlikta *Microbacterium sp.* SINO2 bakterijos CYDE1 baltymo homologų paieška parodė, kad CYDE1 yra panaši į kitas *Pseudoclavibacter* ir *Microbacterium* šeimos bakterijų amidohidrolazes, taip pat pasižymi mažesniu panašumu į įvairias bakterines citozino deaminazes. Panaudojus filogenetinės ir molekulinės evoliucijos analizės programą MEGAX, buvo sudarytas šių baltymų filogenetinis medis (3.5.3 pav. A). Filogenetinė analizė parodė, kad CYDE1 teoriškai galėtų būti *Microbacterium sp.* SINO2 bakterijos baltymas, gebantis katalizuoti PreQ<sub>0</sub> deamininimą. Atlikus *Microbacterium sp.* SINO2 bakterijos CYDE2 fermento, pasirinkto patikrinti fermentinį deaminazės aktyvumą su PreQ<sub>0</sub>, homologų paiešką ir filogenetinę analizę (3.5.3 pav. B), galima teigti, kad šis baltymas labiausiai giminingas *Microbacterium* ir *Dietzia* genčių bakterijų amidohidrolazėms, taip pat citozino deaminazėms. Ši hipotetinė deaminazė mažiau artima 5-metiltioadenozino/S-adenozilhomocisteino deaminazei. Remiantis šiais duomenimis, galima teigti, jog visi homologai pagal seką pasižymi deaminaziniu fermentiniu aktyvumu, artimiausias CYDE2 fermento homologas pasižymi 80% sekos panašumu, tad CYDE2 teoriškai gali katalizuoti PreQ<sub>0</sub> deamininimą.



**3.5.3 pav. *Microbacterium* sp. SINO2 bakterijos CYDE1 (A) ir CYDE2 (B) baltymų filogenetiniai medžiai** Filogenetinė analizė atlikta panaudojant artimiausias rastas sekas NCBI duomenų bazėje pritaikius didžiausio tikėtimumo metodą. Analizė atlikta MEGAX programa. Prieš baltymo pavadinimą pateiktas jo sekos numeris genų banke. Skaičiai prie šakų rodo grupių išskyrimo patikimumą procentais.

Siekiant patikrinti trijų pasirinktų genų produktų fermentinį deaminazės aktyvumą su PreQ<sub>0</sub> substratu, sukonstruotos plazmidės, turinčios klonuotą tikslinio geno atvirą skaitymo rėmelį. Kiekvieno geno klonavimo darbams PGR būdu buvo pagausinta po du fragmentus – vienų pradmenų pagalba geno atviras skaitymo rėmelis padauginamas su natyviu STOP kodonu, kitų – STOP kodonas pakeičiamas kodonu, koduojančiu aminorūgštį, kurios pagalba baltymo seka bus pratęsta ir pasižymės 6xHis-tag žymeniu C gale, vėliau naudojamu rekombinatinio baltymo gryninimui. CYDE2 geno atveju sukonstruotos dvi tiesioginių (angl. *forward*) pradmenų sekos, kiekviena pradmenų pora padaugina skirtingo ilgio geno atvirą skaitymo rėmelį dėl dviejų skirtingų iniciacijos kodonų pradžios, kadangi nėra žinoma, ar CYDE 2 geno seka gali prasidėti nuo tolimesnio, ar artimesnio iniciacijos kodono.

Genų pagausinimas atliktas naudojant ThermoFisher Phusion™ arba ThermoFisher DreamTaq™ polimerazę, taikant gradientinės PGR metodiką tam, kad gauti didžiausią kiekį švariausio tikslinio geno produkto. Padaugintų genų 5' ir 3' galai paruošti klonavimui NcoI ir HindIII restrikcijos endonukleazėmis. Klonavimui naudotas vektorius pET28b, jis taip pat paruoštas ligavimui NcoI ir HindIII restrikcijos endonukleazėmis. Baigus klonavimo darbus, gautos 8 plazmidės (1 lentelė).

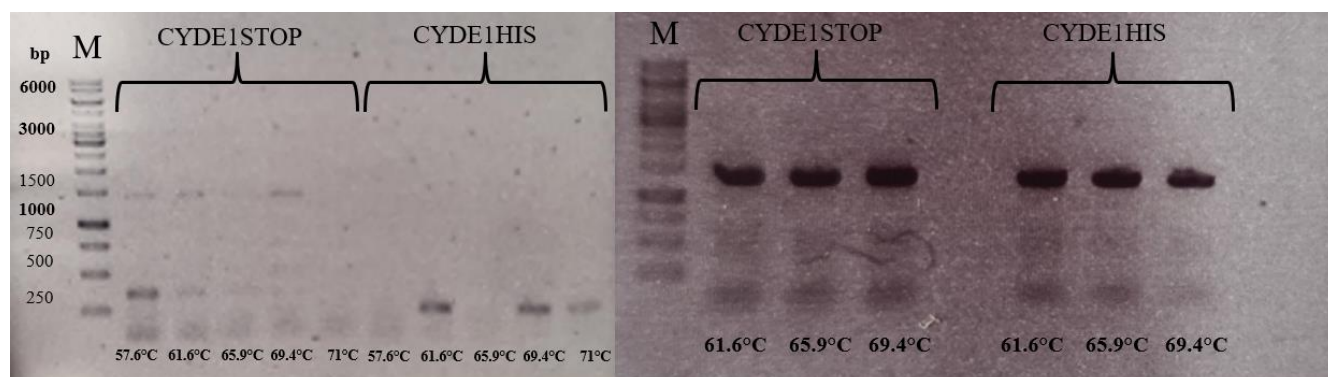
**1 lentelė.** Sukonstruotų plazmidžių pavadinimai, klonuotų ganų skaitymo rėmeliai bei jų ilgiai.

<b>Plazmidės pavadinimas</b>	<b>Tikslinis genas</b>	<b>Tikslinio geno fragmento ilgis, bp</b>
<b>pCMPSTOP</b>	CMP deaminazė su STOP kodonu	594
<b>pCMPHIS</b>	CMP deaminazė su 6xHis-tag žymeniu	630
<b>pCYDE1STOP</b>	CYDE1 su STOP kodonu	1368
<b>pCYDE1HIS</b>	CYDE 1 su 6xHis-tag žymeniu	1404
<b>pCYDE2STOP</b>	CYDE2 ilgesnis geno variantas su STOP kodonu	1374
<b>pCYDE2HIS</b>	CYDE2 ilgesnis geno variantas su 6xHis-tag žymeniu	1410
<b>pCYDE2tSTOP</b>	CYDE2 trumpesnis geno variantas su STOP kodonu	1332
<b>pCYDE2tHIS</b>	CYDE2 trumpesnis geno variantas su 6xHis-tag žymeniu	1368

pCMPSTOP ir pCMPHIS klonai gauti su CMP deaminazės geno fragmentu, padaugintu ypač tikslia ThermoFisher Phusion™ polimeraze. Ši polimerazė sėkmingai padaugino CMP deaminazės geno fragmentą, kuris yra trumpesnis, lyginant su CYDE1 ir CYDE2 genų fragmentais (1 lentelė), nors vienoje gradientinės PGR temperatūroje, kaip matricą naudojant genomine DNR, nesusidarė papildomų nespecifinių PGR produktų. Nuskevenavus ir išanalizavus šių plazmidžių sekas įsitikinta, kad klonuotose genų fragmentuose nėra klaidų.

Gradientinio PGR būdu kilo problemų ThermoFisher Phusion™ polimerazės pagalba padauginti nuo genomines DNR likusius CYDE1 bei CYDE2 genų fragmentus, turinčius tiek STOP kodoną, tiek 6xHis-tag žymenį.

Šiuos genus pavyko sėkmingai padauginti ThermoFisher DreamTaq™ polimerazės pagalba gradientinio PGR metu, gauti klonai pCYDE1STOP-pCYDE2tHIS (imtinai). Paveiksle pavaizduotas gradientinių PGR reakcijų produktų palyginimas CYDE1 geno atveju, kuomet naudota polimerazė ThermoFisher Phusion™ arba ThermoFisher DreamTaq™ (3.5.4 pav). Atlikus fragmentų klonavimą į pET28b vektorių ir nusekvenavus gautas plazmides, daugelis jų vidutiniškai pasižymėjo 2-3 neteisingai į seką inkorporuotais nukleotidais, keli jų pasižymėjo išankstinio STOP kodono (angl. *nonsense*) mutacija.



**3.5.4 pav. ThermoFisher Phusion™ ir DreamTaq™ polimerazių pagalba gradientinės PGR reakcijos metu padaugintas CYDE1 genas.** Phusion™ polimerazės pagalba gradientinės PGR reakcijos metu buvo gauta mažai tikslinio fragmento, susidarė šalutinių PGR fragmentų, kurie gali trukdyti gauti reikalingas plazmides klonavimo metu. DreamTaq™ polimerazė padaugino tikslinį geną efektyviau, PGR produktai buvo gryninti bei panaudoti klonavimui. Į šulinėlius užneštas vienodas tūris PGR reakcijos mišinio – po 3 µl. CYDE1STOP – CYDE1 fragmentas su STOP kodonu, CYDE1HIS – CYDE1 fragmentas su 6xHis-tag žymeniu. M – ThermoFisher GeneRuler™ 1kb DNA Ladder masių standartas. Paveikslo apačioje sužymėtos temperatūros nurodo pradmenų ir matricos sulydymo temperatūrą (angl. *annealing temperature*) PGR metu.

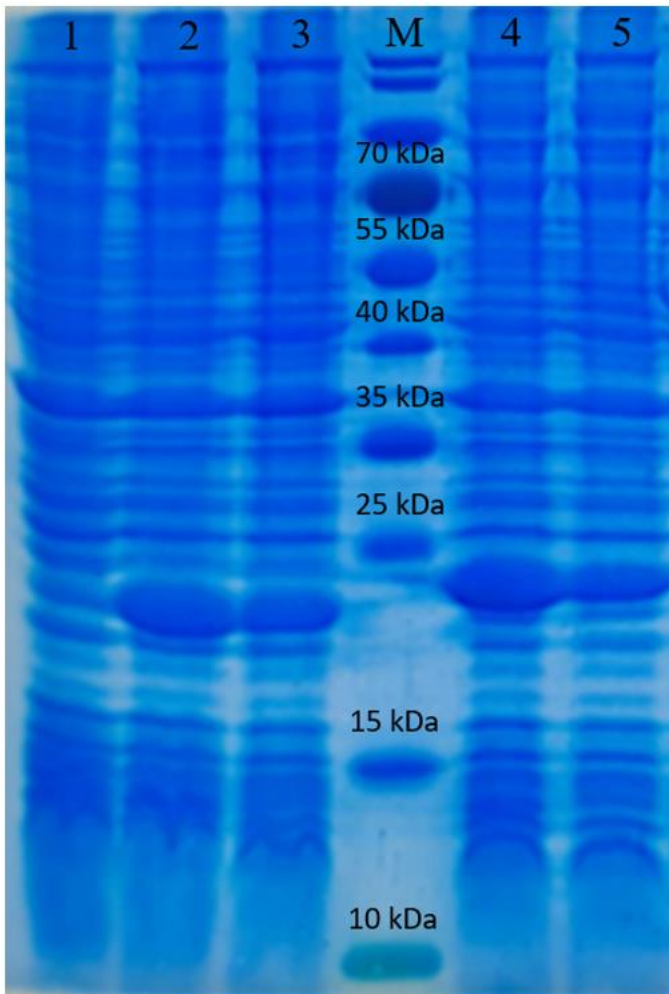
Išanalizavus plazmidžių sekoskaitos duomenis, gilintasi, kodėl galėjo įvykti šios mutacijos tiksliniuose genuose atliekant jų PGR padauginimo reakcijas su komercine ThermoFisher DreamTaq™ polimeraze. Pastebėta, kad visi trys tiksliniai genai pasižymi neįprastai didele GC nukleotidų procentine sudėtimi. CMP deaminazė, CYDE1 bei CYDE2 genai pasižymi vidutiniškai ~68% GC sudėtimi. Palyginimui, pET28b klonavimo vektorių pasižymi 52,79% GC sudėtimi, *E.coli* chromosominė DNR -

~50% GC sąstatu (Muto ir Osawa, 1987). Tikėtina, kad dėl šios priežasties atleikant genų CYDE1 bei CYDE2 padauginimo reakcijas panaudojant ThermoFisher DreamTaq™ polimerazę, įvyko genų mutacijos. Nagrinėjant ThermoFisher DreamTaq™ gamintojo pateiktą informaciją nurodoma, kad šios polimerazės charakteristikos nėra geros esant dideliame GC santykiui (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1081#/K1081>, Thermo Fisher, JAV, 2021).

Žinoma, kad GC turtingų sekų padauginimo PGR būdu efektyvumą bei specifiškumą gali pagerinti PGR reakcija, kurioje naudojama maža genomines DNR koncentracija bei 1-5% DMSO koncentracija ([https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012393\\_Phusion\\_HighFidelity\\_DNAPolymerase\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012393_Phusion_HighFidelity_DNAPolymerase_UG.pdf), Thermo Fisher, JAV, 2021). Įsitikinus, kad mūsų pasirinktų genų atveju ThermoFisher DreamTaq™ įveda į genų skaitymo rėmelius nepageidaujamų mutacijų, dėl kurių negalima atlikti tolimesnių eksperimentų, o CMP deaminazės geno fragmentuose, padaugintuose ThermoFisher Phusion™ polimerazės pagalba, nebuvo klaidų, bandyta CYDE1 ir CYDE2 genų fragmentus padauginti panaudojant ThermoFisher Phusion™ polimerazę, atliekant PGR gradientinę reakciją, praturtintą 3% DMSO.

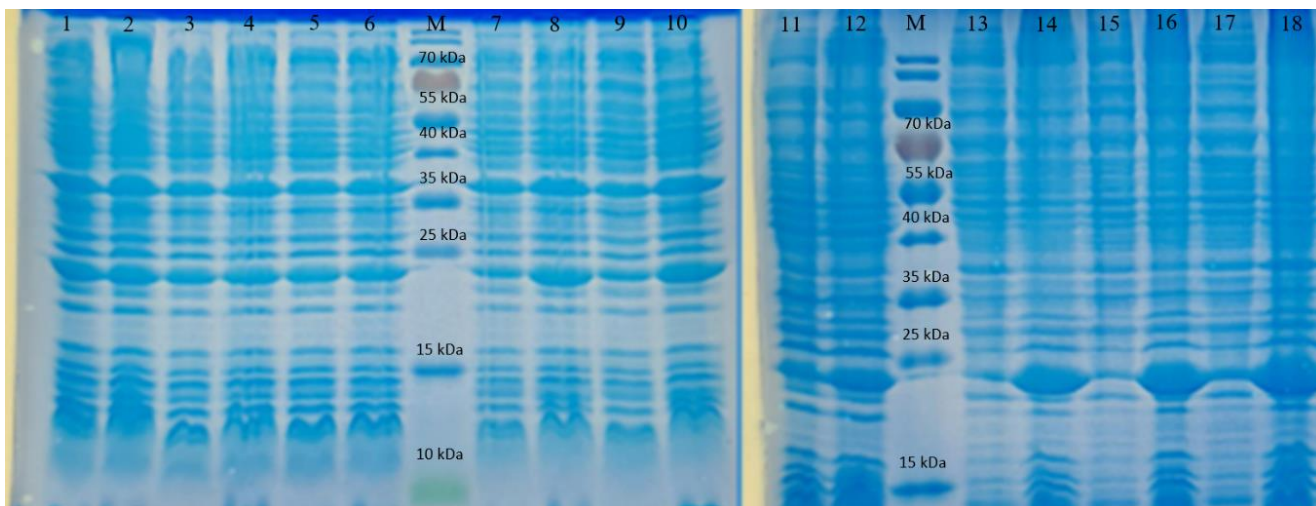
Atlikus eksperimentus ir išanalizavus rezultatus DNR agaroziniame gelyje pastebėta, kad DMSO bei chromosominės DNR skiedimas nepadidina PGR reakcijos specifiškumo, tikslinio PGR produkto kiekio. Negavus švarių tikslinių PGR produktų klonavimo darbams ateityje nuspręsta susidariusius fragmentus gryninti iš gelio ir panaudoti klonavimui tikslinėms plazmidėms gauti, tikintis, kad šių PGR reakcijų metu padaugintuose genų skaitymo rėmeliuose nebus mutacijų.

Transformavus pCMPSTOP ir pCMPHIS plazmides į kompetentines BL21(DE3) ląsteles elektroporacijos būdu, atrinktus klonus skystoje LB terpėje užauginus ir indukavus 30°C temperatūroje su 0,2 mM IPTG, baltymų analizė denatūruojančiomis sąlygomis parodė, kad abiem atvejais yra tiek tirpaus, tiek netirpaus tikslinio baltymo (3.5.5 pav.).



**3.5.5 pav. CMP deaminazės *E. coli* BL21(DE3) kamiene tyrimas.** 1 – plazmidėmis netransformuotų *E. coli* BL21(DE3) ląstelių lizatas; 2 - *E. coli* BL21(DE3), transformuotų pCMPSTOP, ląstelių lizatas, 3 - *E. coli* BL21(DE3), transformuotų pCMPSTOP, ląstelių lizato centrifugatas; 4 – *E. coli* BL21(DE3), transformuotų pCMPHIS, ląstelių lizatas, 5 - *E. coli* BL21(DE3), transformuotų pCMPHIS, ląstelių lizato centrifugatas; M – molekulinis žymuo.

Nors pCMPSTOP ir pCMPHIS baltymai šiomis raiškos sąlygomis gauti iš dalies tirpūs, buvo ieškomos sąlygos optimaliai pCMPHIS plazmidės koduojamos CMP deaminazės su 6xHis-tag žyme raiškai, nes su šiuo grynu fermentu ateityje bus atliekami substratų specifiškumo tyrimai. Fermento raiškos sąlygos tirtos pritaikant skirtingas indukcijos temperatūras bei IPTG koncentracijas (3.5.6 pav.). Atlikus eksperimentą galima matyti, IPTG induktoriaus koncentracija baltymo raiškai ir tirpumui neturi didelės įtakos, didinant temperatūrą indukcijos metu gaunama vis mažiau baltymo. Optimaliausias sąlygos – 16°C temperatūra indukcijos metu bei 0,1mM IPTG koncentracija.



**3.5.6 pav. CMP deaminazės, turinčios 6xHis-tag žymenį, baltymų raiškos *E. coli* BL21(DE3) kamiene tyrimas skirtingomis sąlygomis.** Šulinėlių numeriai atitinka: 1-6 – 16°C indukcijos temperatūra; 7-12 – 30°C indukcijos temperatūra; 13-18 – 37°C indukcijos temperatūra; 1, 2, 7, 8, 13, 14 – 0.1 mM IPTG; 3, 4, 9, 10, 15, 16 – 0.2 mM IPTG; 5, 6, 11, 12, 17, 18 – 0.4 mM IPTG; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 – ląstelių lizato centrifugato frakcijos; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 – ląstelių lizato frakcijos. M – baltymų molekulinis žymuo.

Siekiant išsiaiškinti, kuris iš turimų baltymų pasižymi savybe katalizuoti PreQ<sub>0</sub> substrato deaminimą, visų turimų indukuotų *E. coli* BL21(DE3) ląstelių, transformuotų pCMPSTOP, pCMPHIS bei mutantinėmis pCYDE1HIS, pCYDE2tSTOP, pCYDE2tHIS plazmidėmis bei indukuotų IPTG lizatai bei intaktinės ląstelės inkubuotos su PreQ<sub>0</sub> substratu 30°C 24h. Po 24 valandų, monitorizuojant reakcijas plokštelių skaitytuvu PreQ<sub>0</sub> substrato UV-Vis sugerties spektro pokytis nebuvo registruotas nei vienoje reakcijoje.

Atliktas pCMPHIS indukuotų ląstelių lizato gryninimas Ni<sup>2+</sup> afinine kolonėle buvo nesėkmingas, išgryninti CMP deaminazės su 6xHis-tag žyma nepavyko (3.5.7 pav). Nesėkmingo gryninimo priežastis galėjo būti techninė arba įvykti dėl to, kad 6xHis-tag žyma, reikalinga gryninimui ir turinti afiniškumą Ni<sup>2+</sup> jonams galėjo sąveikauti su baltymo vidine globuline struktūra ir nebūti prieinama Ni<sup>2+</sup> katijonams (Janknecht ir kt., 1991).



**3.5.7 pav. Rekombinantinės CMP deaminazės su 6 histidinių inkaru gryninimo elektroforezės rezultatas.** 1 – E.coli BL21(DE3) ląstelių, transformuotų pCMPHIS plazmide bei indukuotų IPTG, tirpi frakcija; 2 – CMP deaminazė po  $\text{Ni}^{2+}$  chelatinės kolonėlės gryninimo, 1 frakcija; 3 – CMP deaminazė po  $\text{Ni}^{2+}$  chelatinės kolonėlės gryninimo, 2 frakcija. M – baltymų molekulinis žymuo.

Nepavykus susintetinti visų 8 plazmidžių koduojamų rekombinacinių fermentų bei charakterizuoti jų fermentinio aktyvumo  $\text{PreQ}_0$  atžvilgiu, pereita prie bioinformatinių baltymų tretinių struktūrų modeliavimo bei fermento-substrato kompleksavimo (angl. *docking*) eksperimentų, siekiant patyrinti, kuri iš trijų pasirinktų deaminazių teoriškai labiausiai tikėtina galėtų būti atsakinga už  $\text{PreQ}_0$  deaminimą.



### 3.6 Tikslinių deaminazių erdviųjų struktūrų modeliavimo ir baltymo-ligando kompleksavimo tyrimai

Bioinformatinių eksperimentų pagalba patyrinėti pasirinkti CMP deaminazės, CYDE1 bei CYDE2 fermentai.

Išsikelti du bioinformatinių eksperimentų darbo uždaviniai:

1. Nustatyti, kuris iš trijų pasirinktų *Microbacterium sp.* SINO2 bakterijos fermentų – CMP deaminazė, CYDE1 ar CYDE2 labiausiai tikėtina galėtų katalizuoti PreQ<sub>0</sub> deaminavimo reakciją.
2. Teoriškai išsiaiškinti, kodėl Vcz fermentas atlieka tiek PreQ<sub>0</sub>, tiek izocitozino deaminavimo reakciją, o nežinomas *Microbacterium sp.* SINO2 bakterijos fermentas geba deaminuoti tik PreQ<sub>0</sub>.

Atliekant šį bioinformatinį eksperimentą, kuomet pagrindinis tikslas siejasi su biokatalitine baltymo funkcija ir substrato specifiškumui, svarbiausia tiriamųjų baltymų struktūrinė dalis yra aktyvusis centras, kuriame vyksta substrato surišimas, būtinas vykstančiai deaminavimo reakcijai (Hall ir kt., 2010). Pastaruoju metu, pasitelkiant mašininio mokymosi algoritmus sukurta nemažai metodų įvertinti baltymų aktyviojo centro substratinį specifiškumą, nežinant jo konkrečios tretinės struktūros (Shen ir kt., 2019; Stokes ir kt., 2020). Šie didžiasiais duomenimis paremti metodai taikomi daugiausia tokiems baltymams, kaip, pavyzdžiui, proteazės, t.y. baltymams, kurių žinomų tretinių struktūrų gausa leidžia iš didžiulio turimo informacijos (angl. *pool*) kiekio prognozuoti aktyviajame centre už substrato surišimą atsakingų aminorūgščių išsidėstymą ir substrato surišimo tendencijas esant vis kitokiam substratui (Fan ir kt., 2019).

Mūsų atveju, eksperimentiškai nustatytų amidohidrolazių tretinių struktūrų Baltymų Duomenų Banko (angl. *PDB*) duomenų bazėje nėra daug, ypač trūksta struktūrinės informacijos apie nukleozidų/nukleotidų/nukleobazių amidohidrolazių tretines struktūras ir sąveikas su substratais. Dėl šios priežasties bioinformatinę baltymų aktyviųjų centrų analizę atliksime rankiniu būdu analizuojant pagal giminingiausius šablonus sugeneruotų modelių aktyvius centrus ir į juos algoritmo pagalba kompleksuojant (angl. *docking*) izocitozino ir PreQ<sub>0</sub> molekules.

Visų pirma sudarytas daugybinis baltymų sekų palyginys tarp Vcz ir CMP deaminazės, CYDE1 ir CYDE2. Į sekų palyginį įtrauktos Molekulinės Mikrobiologijos ir Biotechnologijos skyriuje atrastų izocitozino deaminazių URA3, URA4, izocitozino ir citozino substratinis specifiškumu pasižymintios citozino deaminazės KANOS, citozino deaminazės CodA, 8-oksoguanino deaminazės sekos, taip pat mūsų tiksliniams baltymams artimiausių amidohidrolazių iš PDB duomenų bazės sekos (Aučynaitė ir kt., 2018). Šių baltymų sekos sulygintos naudojant ClustalOmega algoritmą (3.6.1 pav.).

Šios sekos palyginiui pasirinktos dėl to, nes izocitozino ir 8-oksoguanino deaminazės suriša sąlyginai struktūriškai panašius substratus, lyginant su 7-ciano-7-deazaguaninu, pakankamai detaliam charakterizuoti jų aktyviajame centre deaminavimo metu vykstantys procesai, yra struktūrinių duomenų apie šiuos baltymus ir jų aktyvius centrus (Manta ir kt., 2014; Hall ir kt., 2010).

Remiantis minėta literatūra, šiame daugybiniame sekų palyginyje (pav. 3.6.1) po sekomis sužymėtos citozino deaminazių (žaliai) ir 8-oksoguanino deaminazių (mėlynai) aktyviojo centro aminorūgštys. Dalis vienos grupės fermentų aktyviojo centro aminorūgščių persikloja su kitos grupės fermentų aktyviojo centro aminorūgštimis, tad abu aktyvieji centrai erdviškai yra vienas šalia kito, o tai gali daryti įtaką plačiam substratų specifiškumui (Seibert ir Raushel, 2005).

Pagal gautą palyginį galima teigti, kad dauguma sulygintų fermentų pasižymi sąlyginai konservatyviu aktyviuoju centru, fermentai savo sekose turintys atitinkamas aminorūgštis His- 93, His-95, His-259, His-296 ir Asp-347 vietose (pagal PDB – 3HPA) yra metalo katijoną (cinką 8-oksoguanino deaminazių atveju) surišantys baltymai (Seibert ir Raushel, 2005).

CYDE1\_ir\_VCZ\_artimiausia\_PDB

1 10 20 30 40 TT 50

CYDE1\_ir\_VCZ\_artimiausia\_PDB MGADRRGERMNLQEHAGARAPNTSSSRPKTLLV<sup>β1</sup>KHADV<sup>β1</sup>LVT<sup>β1</sup>MD...DTRRE<sup>β1</sup>RD...  
 SINO2\_CMP\_deaminaz~/1-198 .....MP.....LA.....TGYT<sup>β1</sup>MLPAW<sup>β1</sup>LVDQ<sup>β1</sup>ID.....ELPRE<sup>β1</sup>STLERR  
 CMP\_artimiausia\_PDB .....GH.....MN.....DALH<sup>β1</sup>GLPFF<sup>β1</sup>LVQ<sup>β1</sup>AN.....NEFRV<sup>β1</sup>LAAPPEAR  
 SINO2\_CYDE1/1-456 .....MSLL<sup>β1</sup>VTHAR<sup>β1</sup>LI<sup>β1</sup>T<sup>β1</sup>IP<sup>β1</sup>.AGTADPGY<sup>β1</sup>IED.....  
 SINO2\_CYDE2/1-458 .....VSRAR<sup>β1</sup>LVPDL<sup>β1</sup>VVT<sup>β1</sup>MD.....DDNSV<sup>β1</sup>LVG.....  
 CYDE2\_artimiausia\_PDB .....MV.....DPLMTNAPPEPCDL<sup>β1</sup>LEAGY<sup>β1</sup>VVP<sup>β1</sup>IE.....PHAVV<sup>β1</sup>LED.....  
 Vcz\_izocitozino\_deaminaz~ .....MHKRTL<sup>β1</sup>LKNAEL<sup>β1</sup>LVT<sup>β1</sup>MD.....DERRE<sup>β1</sup>IRG.....  
 8-oksoguanino\_deaminaz~ .....MSRTW<sup>β1</sup>LRNPLA<sup>β1</sup>IFT<sup>β1</sup>ANG.....LDAA.....  
 URA3\_izocitozino\_deaminaz~ .....MAKTL<sup>β1</sup>LKNAEL<sup>β1</sup>LVT<sup>β1</sup>MD.....GQRRE<sup>β1</sup>IRQ.....  
 URA4\_izocitozino\_deaminaz~ .....MNSLL<sup>β1</sup>HNAACI<sup>β1</sup>AT<sup>β1</sup>FDHADPAKGRE<sup>β1</sup>LKD.....  
 KANOS\_citozino\_deaminaz~ .....METKAL<sup>β1</sup>RVI<sup>β1</sup>QN.....VRLTGR<sup>β1</sup>.....  
 CodA\_citozino\_deaminaz~ .....M<sup>β1</sup>SNNAL<sup>β1</sup>QTI<sup>β1</sup>IN.....L<sup>β1</sup>ARLPGK<sup>β1</sup>.....

CYDE1\_ir\_VCZ\_artimiausia\_PDB

β2 β3 η1 β4 β5 β6 η2

60 70 80 90 100

CYDE1\_ir\_VCZ\_artimiausia\_PDB ...AC<sup>β2</sup>Y<sup>β2</sup>IEDNR<sup>β2</sup>VAVG<sup>β2</sup>SAE<sup>β2</sup>TE...TAEV<sup>β2</sup>L<sup>β2</sup>DLR<sup>β2</sup>GH<sup>β2</sup>L<sup>β2</sup>VIP<sup>β2</sup>GL<sup>β2</sup>VNT<sup>β2</sup>H<sup>β2</sup>HMY<sup>β2</sup>SI<sup>β2</sup>TRAV  
 SINO2\_CMP\_deaminaz~/1-198 MTLVN<sup>β2</sup>LLADRNR<sup>β2</sup>REGGG<sup>β2</sup>PF<sup>β2</sup>AAIVDDSDSGEL<sup>β2</sup>VS<sup>β2</sup>GVN<sup>β2</sup>VVLGT<sup>β2</sup>G<sup>β2</sup>IT<sup>β2</sup>SGHAEV<sup>β2</sup>MLALAQ  
 CMP\_artimiausia\_PDB MGYV<sup>β2</sup>LEL<sup>β2</sup>VRA<sup>β2</sup>N<sup>β2</sup>AADG<sup>β2</sup>PF<sup>β2</sup>AAAVFERDSGLL<sup>β2</sup>IA<sup>β2</sup>AGTNR<sup>β2</sup>VVPG<sup>β2</sup>RC<sup>β2</sup>SA<sup>β2</sup>AHAEIL<sup>β2</sup>LSLAQ  
 SINO2\_CYDE1/1-456 ...GWM<sup>β2</sup>L<sup>β2</sup>VEDGR<sup>β2</sup>AA<sup>β2</sup>IGSGT<sup>β2</sup>PD...VTADET<sup>β2</sup>LD<sup>β2</sup>VAGK<sup>β2</sup>FVAP<sup>β2</sup>G<sup>β2</sup>VSS<sup>β2</sup>H<sup>β2</sup>SHL<sup>β2</sup>F<sup>β2</sup>SGLRGL  
 SINO2\_CYDE2/1-458 ...AG<sup>β2</sup>IL<sup>β2</sup>IEDGV<sup>β2</sup>I<sup>β2</sup>AVD<sup>β2</sup>LAH<sup>β2</sup>.AHPDAER<sup>β2</sup>EL<sup>β2</sup>PDR<sup>β2</sup>L<sup>β2</sup>VMP<sup>β2</sup>GL<sup>β2</sup>VNT<sup>β2</sup>H<sup>β2</sup>HSS<sup>β2</sup>MLRGT  
 CYDE2\_artimiausia\_PDB ...HAVA<sup>β2</sup>VSNGV<sup>β2</sup>VAV<sup>β2</sup>LTADARV<sup>β2</sup>.RFAPART<sup>β2</sup>VS<sup>β2</sup>RPDA<sup>β2</sup>ALMP<sup>β2</sup>GL<sup>β2</sup>VNT<sup>β2</sup>H<sup>β2</sup>HNPMT<sup>β2</sup>LLRGV  
 Vcz\_izocitozino\_deaminaz~ ...GCL<sup>β2</sup>L<sup>β2</sup>VEGNR<sup>β2</sup>VAVG<sup>β2</sup>DEL<sup>β2</sup>CAA...PADEE<sup>β2</sup>LD<sup>β2</sup>LRG<sup>β2</sup>H<sup>β2</sup>L<sup>β2</sup>VIP<sup>β2</sup>GL<sup>β2</sup>VNT<sup>β2</sup>H<sup>β2</sup>HMY<sup>β2</sup>SI<sup>β2</sup>TRAV  
 8-oksoguanino\_deaminaz~ ...GG<sup>β2</sup>L<sup>β2</sup>V<sup>β2</sup>VEDGR<sup>β2</sup>IV<sup>β2</sup>ELL<sup>β2</sup>GAG<sup>β2</sup>QPA...QPCASQ<sup>β2</sup>FD<sup>β2</sup>ASRH<sup>β2</sup>V<sup>β2</sup>VLP<sup>β2</sup>GL<sup>β2</sup>VNT<sup>β2</sup>H<sup>β2</sup>HMY<sup>β2</sup>SI<sup>β2</sup>TRAV  
 URA3\_izocitozino\_deaminaz~ ...GG<sup>β2</sup>MF<sup>β2</sup>IEDNR<sup>β2</sup>VQV<sup>β2</sup>GAEE<sup>β2</sup>LPQ...TAEV<sup>β2</sup>L<sup>β2</sup>DLK<sup>β2</sup>GK<sup>β2</sup>V<sup>β2</sup>VIP<sup>β2</sup>GL<sup>β2</sup>VNT<sup>β2</sup>H<sup>β2</sup>HMY<sup>β2</sup>SI<sup>β2</sup>TRAV  
 URA4\_izocitozino\_deaminaz~ ...AS<sup>β2</sup>LF<sup>β2</sup>VRDNV<sup>β2</sup>EW<sup>β2</sup>IG<sup>β2</sup>TAE<sup>β2</sup>LPRALRESAGEV<sup>β2</sup>IDA<sup>β2</sup>HGH<sup>β2</sup>L<sup>β2</sup>VIP<sup>β2</sup>GL<sup>β2</sup>VNT<sup>β2</sup>H<sup>β2</sup>HMY<sup>β2</sup>SI<sup>β2</sup>TRAV  
 KANOS\_citozino\_deaminaz~ EGLWQ<sup>β2</sup>L<sup>β2</sup>ADGK<sup>β2</sup>QAIT<sup>β2</sup>MG<sup>β2</sup>VE<sup>β2</sup>QQ...ESGQA<sup>β2</sup>LD<sup>β2</sup>GEGG<sup>β2</sup>L<sup>β2</sup>AIAP<sup>β2</sup>FVE<sup>β2</sup>PH<sup>β2</sup>H<sup>β2</sup>LD<sup>β2</sup>TTQTAGQ  
 CodA\_citozino\_deaminaz~ EGLWQ<sup>β2</sup>L<sup>β2</sup>HDGK<sup>β2</sup>ISA<sup>β2</sup>LD<sup>β2</sup>QSG<sup>β2</sup>VMP...VTENS<sup>β2</sup>L<sup>β2</sup>DAEQ<sup>β2</sup>L<sup>β2</sup>VLP<sup>β2</sup>FP<sup>β2</sup>VVE<sup>β2</sup>PH<sup>β2</sup>H<sup>β2</sup>LD<sup>β2</sup>TTQTAGQ

CYDE1\_ir\_VCZ\_artimiausia\_PDB

α1 α2 β7

110 120 130 140 150

CYDE1\_ir\_VCZ\_artimiausia\_PDB .....PA<sup>α1</sup>QNAE<sup>α1</sup>L<sup>α1</sup>FGW<sup>α1</sup>LTN<sup>α1</sup>.LYKIWAHL...T<sup>α1</sup>PF<sup>α1</sup>M<sup>α1</sup>TEVSTLTAMAEI<sup>α1</sup>L<sup>α1</sup>Q<sup>α1</sup>SC<sup>α1</sup>CT<sup>α1</sup>SS.  
 SINO2\_CMP\_deaminaz~/1-198 QALGRWDLGADGANL<sup>α1</sup>.SL<sup>α1</sup>IVN...WRP...CVQCYGATM<sup>α1</sup>W<sup>α1</sup>SV<sup>α1</sup>RS<sup>α1</sup>L<sup>α1</sup>VV  
 CMP\_artimiausia\_PDB AKLDTHDLSADGLPACELVTS...AEP...CVMCFGAVIWS<sup>α1</sup>SV<sup>α1</sup>RS<sup>α1</sup>L<sup>α1</sup>VV  
 SINO2\_CYDE1/1-456 .....GVAD<sup>α1</sup>L<sup>α1</sup>YWG<sup>α1</sup>WCA<sup>α1</sup>.MLGTTA<sup>α1</sup>HM...T<sup>α1</sup>PD<sup>α1</sup>QL<sup>α1</sup>YWS<sup>α1</sup>TLHGSLD<sup>α1</sup>FL<sup>α1</sup>SN<sup>α1</sup>GT<sup>α1</sup>AY.  
 SINO2\_CYDE2/1-458 .....AEHL<sup>α1</sup>P<sup>α1</sup>VEW<sup>α1</sup>LR<sup>α1</sup>HL<sup>α1</sup>HID<sup>α1</sup>PM<sup>α1</sup>H<sup>α1</sup>RVL...R<sup>α1</sup>PD<sup>α1</sup>E<sup>α1</sup>AAAWL<sup>α1</sup>CYAEGL<sup>α1</sup>LS<sup>α1</sup>GT<sup>α1</sup>VV.  
 CYDE2\_artimiausia\_PDB .....ADDL<sup>α1</sup>PM<sup>α1</sup>VML<sup>α1</sup>Q<sup>α1</sup>QH<sup>α1</sup>IWP<sup>α1</sup>VEAV...T<sup>α1</sup>GP<sup>α1</sup>EF<sup>α1</sup>AD<sup>α1</sup>GT<sup>α1</sup>TL<sup>α1</sup>IAEML<sup>α1</sup>LR<sup>α1</sup>GT<sup>α1</sup>CVN.  
 Vcz\_izocitozino\_deaminaz~ .....PDA<sup>α1</sup>QDGE<sup>α1</sup>L<sup>α1</sup>FD<sup>α1</sup>W<sup>α1</sup>LNN<sup>α1</sup>.LYPTW<sup>α1</sup>AGL...T<sup>α1</sup>PE<sup>α1</sup>M<sup>α1</sup>IRISTQTAMAEI<sup>α1</sup>LS<sup>α1</sup>GT<sup>α1</sup>SS.  
 8-oksoguanino\_deaminaz~ .....AP<sup>α1</sup>VN<sup>α1</sup>Q<sup>α1</sup>LF<sup>α1</sup>P<sup>α1</sup>WL<sup>α1</sup>K<sup>α1</sup>I<sup>α1</sup>.LYPV<sup>α1</sup>ARL...T<sup>α1</sup>PE<sup>α1</sup>K<sup>α1</sup>LELATKVALAEI<sup>α1</sup>LS<sup>α1</sup>GT<sup>α1</sup>AA.  
 URA3\_izocitozino\_deaminaz~ .....PAA<sup>α1</sup>QDGE<sup>α1</sup>L<sup>α1</sup>FN<sup>α1</sup>LTN<sup>α1</sup>.LYPTW<sup>α1</sup>ARL...T<sup>α1</sup>PE<sup>α1</sup>M<sup>α1</sup>I<sup>α1</sup>QVSTQTAMAEI<sup>α1</sup>LS<sup>α1</sup>GT<sup>α1</sup>SS.  
 URA4\_izocitozino\_deaminaz~ .....PG<sup>α1</sup>VQDAE<sup>α1</sup>LF<sup>α1</sup>SW<sup>α1</sup>LRG<sup>α1</sup>.LYPTW<sup>α1</sup>ARL...T<sup>α1</sup>PE<sup>α1</sup>M<sup>α1</sup>V<sup>α1</sup>QVSTQTAMAEI<sup>α1</sup>LS<sup>α1</sup>GT<sup>α1</sup>SS.  
 KANOS\_citozino\_deaminaz~ PS...W...N<sup>α1</sup>QSGT<sup>α1</sup>LF<sup>α1</sup>E<sup>α1</sup>GT<sup>α1</sup>IER...W<sup>α1</sup>AERKALLSH<sup>α1</sup>D<sup>α1</sup>V<sup>α1</sup>KHRAW<sup>α1</sup>TLK<sup>α1</sup>WQ<sup>α1</sup>L<sup>α1</sup>AN<sup>α1</sup>CT<sup>α1</sup>QV<sup>α1</sup>VR.  
 CodA\_citozino\_deaminaz~ PN...W...N<sup>α1</sup>QSGT<sup>α1</sup>LF<sup>α1</sup>E<sup>α1</sup>GT<sup>α1</sup>IER...W<sup>α1</sup>AERKALLTH<sup>α1</sup>D<sup>α1</sup>V<sup>α1</sup>KQRAW<sup>α1</sup>TLK<sup>α1</sup>WQ<sup>α1</sup>L<sup>α1</sup>AN<sup>α1</sup>CT<sup>α1</sup>QV<sup>α1</sup>VR.

CYDE1\_ir\_VCZ\_artimiausia\_PDB

TT α3 β8

160 170 180

CYDE1\_ir\_VCZ\_artimiausia\_PDB .D<sup>β8</sup>H...LYI<sup>β8</sup>YPNG<sup>β8</sup>SRLD...D<sup>β8</sup>S<sup>β8</sup>GAAQRI<sup>β8</sup>GM<sup>β8</sup>RFHAS...RGAM  
 SINO2\_CMP\_deaminaz~/1-198 AG<sup>β8</sup>H...GPL<sup>β8</sup>.LEELTGF<sup>β8</sup>DE<sup>β8</sup>GPVVD...D<sup>β8</sup>WT<sup>β8</sup>AQFEQR<sup>β8</sup>GA...  
 CMP\_artimiausia\_PDB AAR...SDD<sup>β8</sup>.V<sup>β8</sup>EAI<sup>β8</sup>GF<sup>β8</sup>DE<sup>β8</sup>GP<sup>β8</sup>PE...N<sup>β8</sup>WM<sup>β8</sup>GGLEAR<sup>β8</sup>GT...  
 SINO2\_CYDE1/1-456 .NF...TDP<sup>β8</sup>.LQAWES<sup>β8</sup>MVD<sup>β8</sup>GKRTGTAGIRGLE<sup>β8</sup>YHYR<sup>β8</sup>QAD<sup>β8</sup>GT<sup>β8</sup>LDS<sup>β8</sup>GRFVDA...SGMD  
 SINO2\_CYDE2/1-458 .DM...WR<sup>β8</sup>.YMD<sup>β8</sup>...A<sup>β8</sup>AAASAL<sup>β8</sup>G<sup>β8</sup>NR...  
 CYDE2\_artimiausia\_PDB .EN...YF<sup>β8</sup>.FADV...Q<sup>β8</sup>AAVYKQH<sup>β8</sup>G<sup>β8</sup>FRALV...GAV  
 Vcz\_izocitozino\_deaminaz~ .D<sup>β8</sup>H...LYV<sup>β8</sup>YPNG<sup>β8</sup>CLRD...D<sup>β8</sup>SD<sup>β8</sup>GAREI<sup>β8</sup>GM<sup>β8</sup>RFHAC...R<sup>β8</sup>SGM  
 8-oksoguanino\_deaminaz~ .D<sup>β8</sup>H...HYL<sup>β8</sup>FP<sup>β8</sup>GL<sup>β8</sup>EQAI...D<sup>β8</sup>V<sup>β8</sup>QAGVVEEL<sup>β8</sup>GM<sup>β8</sup>RAML<sup>β8</sup>T...R<sup>β8</sup>SGM  
 URA3\_izocitozino\_deaminaz~ .D<sup>β8</sup>H...LYI<sup>β8</sup>YPNG<sup>β8</sup>CLRD...D<sup>β8</sup>S<sup>β8</sup>I<sup>β8</sup>HAAGEI<sup>β8</sup>GM<sup>β8</sup>RFHAA...R<sup>β8</sup>SGM  
 URA4\_izocitozino\_deaminaz~ .D<sup>β8</sup>H...LYI<sup>β8</sup>YPNG<sup>β8</sup>VRLE...D<sup>β8</sup>S<sup>β8</sup>I<sup>β8</sup>EAAQRI<sup>β8</sup>GM<sup>β8</sup>RFVAT...R<sup>β8</sup>SGM  
 KANOS\_citozino\_deaminaz~ .T<sup>β8</sup>H<sup>β8</sup>V<sup>β8</sup>VS<sup>β8</sup>DP<sup>β8</sup>TL<sup>β8</sup>TALKAM<sup>β8</sup>LEV<sup>β8</sup>.QEV...APW<sup>β8</sup>VEL<sup>β8</sup>Q<sup>β8</sup>I<sup>β8</sup>VAF<sup>β8</sup>PQE<sup>β8</sup>GL<sup>β8</sup>SYPNGEAL<sup>β8</sup>LEAL  
 CodA\_citozino\_deaminaz~ .T<sup>β8</sup>H<sup>β8</sup>V<sup>β8</sup>VS<sup>β8</sup>DAT<sup>β8</sup>LTALKAM<sup>β8</sup>LEV<sup>β8</sup>.QEV...APW<sup>β8</sup>ID<sup>β8</sup>L<sup>β8</sup>Q<sup>β8</sup>I<sup>β8</sup>VAF<sup>β8</sup>PQE<sup>β8</sup>GL<sup>β8</sup>SYPNGEAL<sup>β8</sup>LEAL

CYDE1\_ir\_VCZ\_artimiausia\_PDB

α4 β9

190 200 210 220 230 240

CYDE1\_ir\_VCZ\_artimiausia\_PDB SV<sup>β9</sup>GQRDGG<sup>β9</sup>L<sup>β9</sup>PPDSVVEREPDIL<sup>β9</sup>RLDTQRLIET<sup>β9</sup>YHDEGRYAML<sup>β9</sup>RVV<sup>β9</sup>VAP<sup>β9</sup>CS<sup>β9</sup>FFS<sup>β9</sup>V<sup>β9</sup>SRDL<sup>β9</sup>MRD  
 SINO2\_CMP\_deaminaz~/1-198 ...VT<sup>β9</sup>TDV<sup>β9</sup>ERD  
 CMP\_artimiausia\_PDB ...VT<sup>β9</sup>TGL<sup>β9</sup>LRD  
 SINO2\_CYDE1/1-456 V...TVGS<sup>β9</sup>SDVE<sup>β9</sup>FERFAAEVAHTRAMP<sup>β9</sup>FAFA.LGSSIMGQV...QWS<sup>β9</sup>P<sup>β9</sup>HPEAE<sup>β9</sup>EF  
 SINO2\_CYDE2/1-458 L<sup>β9</sup>VT<sup>β9</sup>VNYVGA<sup>β9</sup>HPDF...DYFD<sup>β9</sup>ILDDNERMLKEWTGA<sup>β9</sup>AKGRIM.PWV<sup>β9</sup>GLEHWFY<sup>β9</sup>DEAG<sup>β9</sup>QRR  
 CYDE2\_artimiausia\_PDB I<sup>β9</sup>ID<sup>β9</sup>FP<sup>β9</sup>TAWA<sup>β9</sup>SSDD...EYFARAG...ELHQ<sup>β9</sup>QRDD<sup>β9</sup>PLIS...TAF<sup>β9</sup>AP<sup>β9</sup>HAP<sup>β9</sup>Y<sup>β9</sup>TNDAN<sup>β9</sup>FER  
 Vcz\_izocitozino\_deaminaz~ SV<sup>β9</sup>GRSKGG<sup>β9</sup>L<sup>β9</sup>PPDEL<sup>β9</sup>VENEQAI<sup>β9</sup>LED<sup>β9</sup>SRL<sup>β9</sup>LI<sup>β9</sup>HSYHDAQ<sup>β9</sup>RY<sup>β9</sup>SMLR<sup>β9</sup>I<sup>β9</sup>ALAP<sup>β9</sup>CS<sup>β9</sup>FFS<sup>β9</sup>S<sup>β9</sup>REI<sup>β9</sup>LVK  
 8-oksoguanino\_deaminaz~ SL<sup>β9</sup>GEK<sup>β9</sup>DGG<sup>β9</sup>L<sup>β9</sup>PPQ<sup>β9</sup>TVQE<sup>β9</sup>AET<sup>β9</sup>L<sup>β9</sup>LAD<sup>β9</sup>SER<sup>β9</sup>L<sup>β9</sup>I<sup>β9</sup>ARYHQ<sup>β9</sup>RGD<sup>β9</sup>GAR<sup>β9</sup>V<sup>β9</sup>I<sup>β9</sup>ALAP<sup>β9</sup>CS<sup>β9</sup>FFS<sup>β9</sup>V<sup>β9</sup>PEI<sup>β9</sup>MR  
 URA3\_izocitozino\_deaminaz~ SV<sup>β9</sup>GRSQGG<sup>β9</sup>L<sup>β9</sup>PPDSVVEKEADIL<sup>β9</sup>KESQRL<sup>β9</sup>IEDYHDA<sup>β9</sup>AHGSML<sup>β9</sup>R<sup>β9</sup>VV<sup>β9</sup>VAP<sup>β9</sup>CS<sup>β9</sup>FFS<sup>β9</sup>V<sup>β9</sup>SRDL<sup>β9</sup>MR  
 URA4\_izocitozino\_deaminaz~ SV<sup>β9</sup>G<sup>β9</sup>RSQGG<sup>β9</sup>L<sup>β9</sup>PPDSVVEKEADIL<sup>β9</sup>KDSQRL<sup>β9</sup>IEAW<sup>β9</sup>HS<sup>β9</sup>AEHGAM<sup>β9</sup>V<sup>β9</sup>QVAL<sup>β9</sup>AP<sup>β9</sup>CS<sup>β9</sup>FFS<sup>β9</sup>V<sup>β9</sup>SRDL<sup>β9</sup>MR  
 KANOS\_citozino\_deaminaz~ RL<sup>β9</sup>GADV<sup>β9</sup>GA<sup>β9</sup>IPHF<sup>β9</sup>EFTREYG...V...E<sup>β9</sup>SL<sup>β9</sup>HK  
 CodA\_citozino\_deaminaz~ RL<sup>β9</sup>GADV<sup>β9</sup>GA<sup>β9</sup>IPHF<sup>β9</sup>EFTREYG...V...E<sup>β9</sup>SL<sup>β9</sup>HK

3.6.1 pav. Daugybinis pasirinktų fermentų sekų palyginys (1 dalis). Palyginys sudarytas iš citozino, izocitozino, 8-oksoguanino deaminazių bei tikslinių fermentų CMP deaminazės, CYDE1 bei CYDE2, taip pat jiems artimiausių PDB duomenų bazėje esančių amidohidrolazių struktūrų. Palyginio apipavidalinimas atliktas naudojantis ESPrpt serveriu (Robert ir Gouet, 2014).



Nustačius, kad palyginyje pavaizduotų baltymų aminorūgščių sekos pasižymi konservatyvumu, ypač aktyviajame amidohidrolazės centre, nuspręsta sugeneruoti CMP deaminazės, CYDE1, CYDE2 ir Vcz baltymų tretinės struktūros modelius pagal kiekvienam baltymui panašiausius struktūrinius homologus, esančius PDB duomenų bazėje.

CMP deaminazės atveju kaip struktūrinis homologas buvo panaudota cinką surišanti citidino ir deoksicitidilato deaminazė iš *Nitrosomonas europaea* (PDB – 2G84), pasižyminti 46% sekos panašumu į *Microbacterium sp.* SINO2 CMP deaminazę.

CYDE1 ir Vcz izocitozino deaminazės atvejais kaip struktūrinis homologas buvo panaudota 8-oksoguanino deaminazė, izoliuota iš metagenominių bibliotekų (PDB – 3HPA). Šis fermentas pasižymėjo ~30% sekos panašumu į CYDE1 fermentą bei ~70% sekos panašumu į Vcz izocitozino deaminazę, struktūrinio homologo seka padengia beveik visą abiejų baltymų ilgį.

CYDE2 fermento atveju kaip struktūrinis homologas buvo panaudota adenozino deaminazė, surišanti cinko joną iš *Xanthomonas campestris* (PDB – 4DZH). CYDE2 pasižymėjo ~33% sekos panašumu į šio struktūrinio homologo seką, daugiau nei 90% padengia struktūrinio homologo grandinės ilgį.

Sugeneravus baltymų tretinių struktūrų modelius pagal višuje aprašytus struktūrinius homologus, baltymų struktūrų kokybė buvo įvertinta ProSA įrankiu. Pagal geriausią ProSA įvertį pasirinkta po vieną kiekvieno fermento modelį (2 lentelė), su kuriais vėliau tėti substrato kompleksacijos (angl. *protein-ligand docking*) eksperimentai.

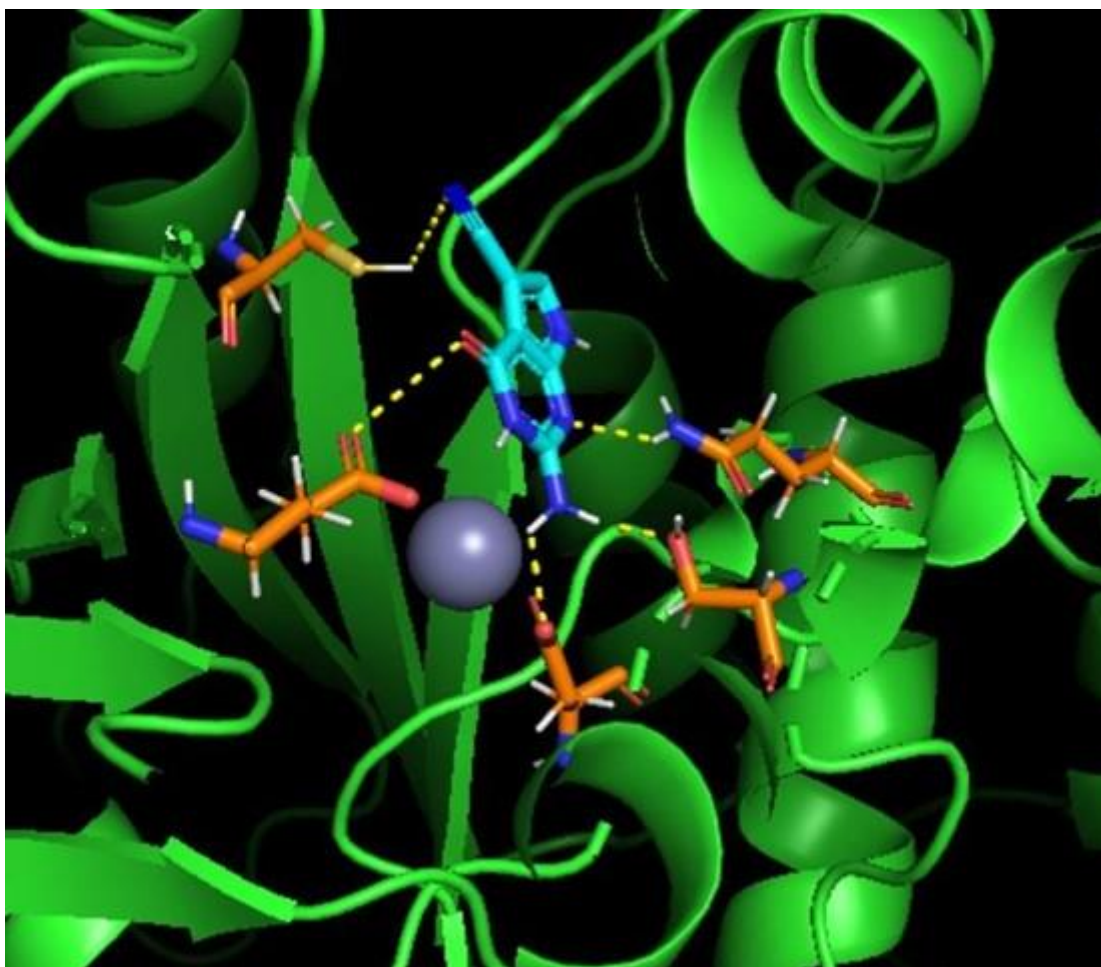
**2 lentelė.** Sugeneruotų baltymų modelių įverčiai pagal ProSA algoritimą.

Baltymo erdvinės struktūros modelis	ProSA įvertis
CMP deaminazės modelis, sugeneruotas Swiss-Model serveryje, struktūra tikslinta	-7.38
CYDE1 modelis, sugeneruotas HHpred serveryje, struktūra tikslinta	-8.88
CYDE2 modelis, sugeneruotas Swiss-Model serveryje, struktūra tikslinta	-10
Vcz modelis, sugeneruotas Swiss-Model serveryje, struktūra tikslinta	-11.22

Sugeneravus keturių pasirinktų baltymų modelius, vykdyti fermento-substrato kompleksacijos *in silico* eksperimentai. AutoDock Vina bei SwissDock algoritmai po sugeneruotų kompleksacijos modelių pateikia jų kokybę išreiškdami teorinę baltymo-ligando sąveikos Gibso laisvąją energiją ( $\Delta G$ ). Pagal mažiausią Gibso laisvąją energiją iš daugybės gautų molekulių dokingo modelių atrinkta po keletą geriausiai įvertintų dokingo modelių su kiekvienu fermentu ir kiekvienu substratu, sąveikos toliau analizuotos rankiniu būdu PyMOL programos pagalba.

Išanalizavus Vcz izocitozino deaminazės modelį kompleksacijoje su PreQ<sub>0</sub>, identifikuota nemažai vandenilinių ryšių sąveikų (pav. 3.6.2). Gauto modelio atveju parodyta, kaip PreQ<sub>0</sub>

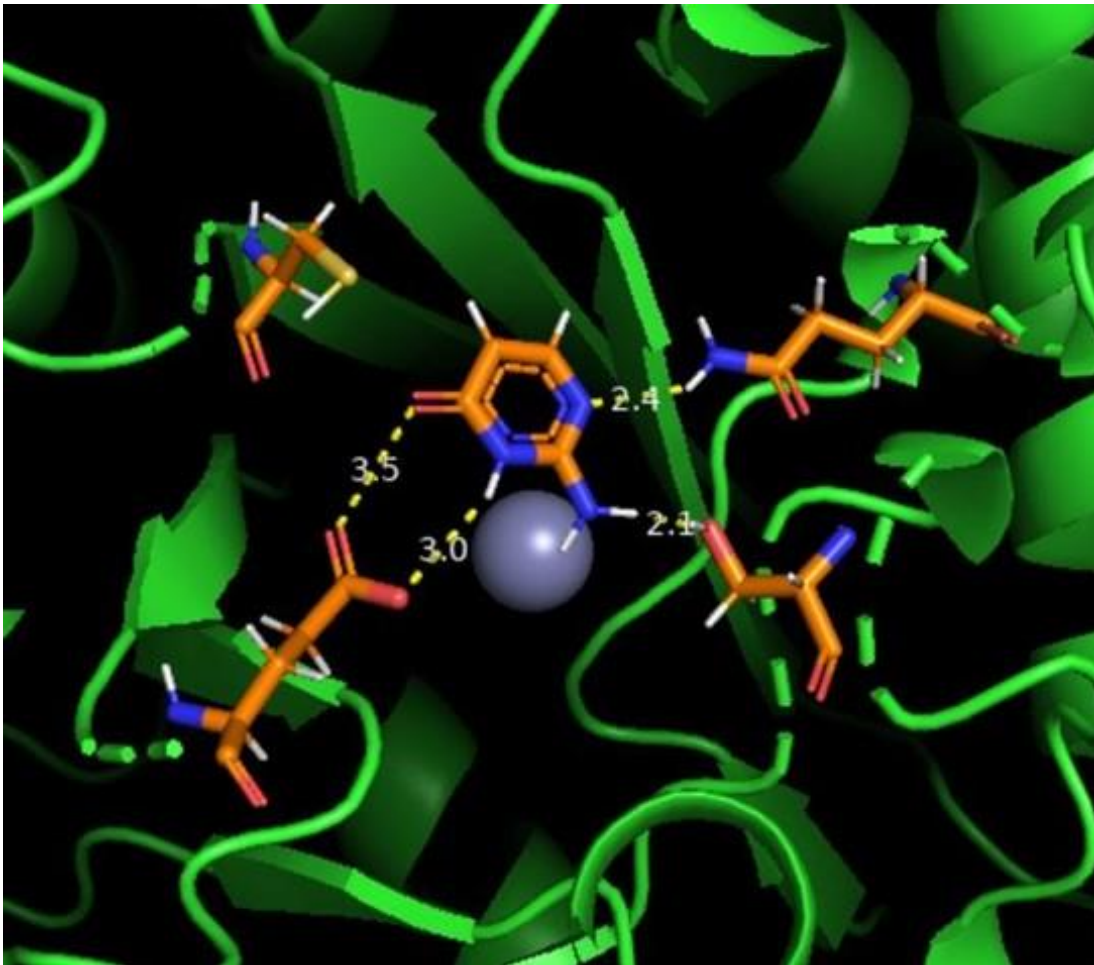
molekulės heteroatomai galėtų sąveikauti su aktyviajame centre išsidėsčiusiomis Gln-75, Cys- 210, Glu-240, Asp-325 bei Ser-329.



**3.6.2 pav. Vcz fermento ir PreQ0 sąveikos modelis.** Violetinės spalvos sfera pavaizduotas cinko atomas. Geltonos spalvos brūkšninė linija atvaizduoja teoriškai galimas sąveikas tarp substrato ir sumodeliuotų aktyviojo centro aminorūgščių.

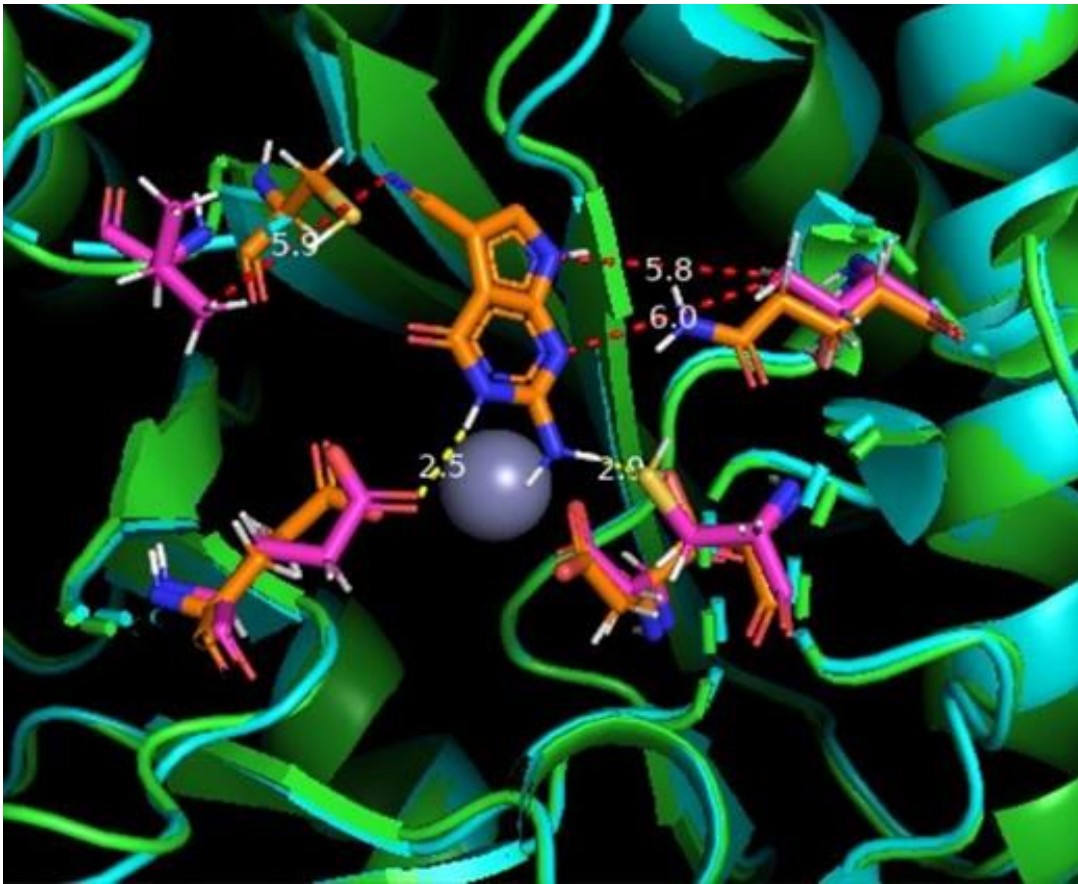
Panašiai Vcz modelio aktyviojo centro aminorūgštys sąveikauja ir su izocitozinu. Patikrinus daugelį kompleksacijos modelių, viename iš šių modelių izocitozino molekulė erdviškai išsidėsto labai panašiai, kaip PreQ<sub>0</sub>, sąveikauja su beveik tomis pačiomis aminorūgštimis (3.6.3 pav.). Teoriškai, izocitozinas nebesąveikauja su Cys-210, nes neturi nitrilo grupės, tačiau šį substratą aktyviajame centre teoriškai stabilizuoti padeda Gln-75, kuris sąveikauja su izocitozino N1 azotu. Panašus į šį erdvinis izocitozino išsidėstymas sugeneruotas ir CYDE1 bei CYDE2 fermentų atveju.

Dėl susidariusios sąveikos, izocitozinas ir PreQ<sub>0</sub> guanidino fragmentas deaminavimo reakcijos metu gali būti atakuojamas vandens molekulės, kuri aktyvuojama cinko jono pagalba (violetinės spalvos sfera) (Hall ir kt. 2010).



**3.6.3 pav. Vcz fermento ir izocitozino sąveikos modelis.** Skaičiai paveikslėlyje nurodo atstumą tarp dviejų erdvės taškų angstromais ( $10^{-10}$  m). Geltona brūkšninė linija atvaizduoja teoriškai galimas sąveikas.

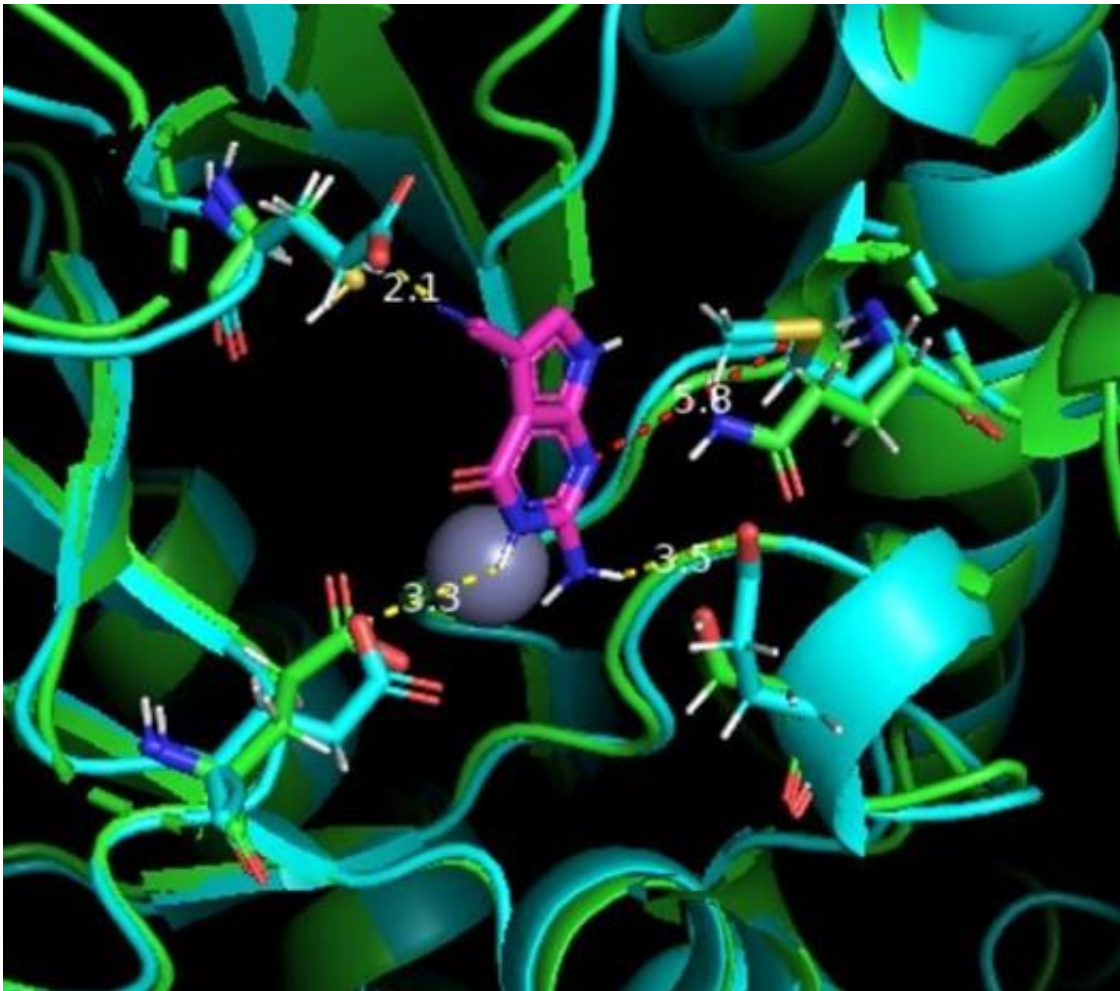
CYDE1 aktyvaus centro sąveikos su substratu modelio atveju aminorūgščių išsidėstymas nėra palankus nei PreQ<sub>0</sub>, nei izocitozino surišimui. Vcz Cys-210 aminorūgštis šio fermento modelio atveju erdvėje pakeičiamas hidrofobišku valinu (pav. 3.6.4, kairėje viršuje), kuris teoriškai pagal pavaizduotą PreQ<sub>0</sub> išsidėstymo modelį negali sąveikauti su šio substrato nitriline grupe. Tai galėtų nulemti, kad CYDE1 fermentas negali deamininti PreQ<sub>0</sub> substrato. Vcz Gln-75 CYDE1 modelio atveju erdvėje pakeičiamas treoninu (pav. 3.6.4; dešinėje viršuje). Nors pagal savo elektroninę prigimtį treoninas galėtų sąveikauti su tretiniu azoto atomu ir jo elektronų pora, treonino hidroksilo grupės konformacija nepalanki sąveikai su PreQ<sub>0</sub> bei su izocitozino molekulės N1 azoto atomu (pav. 3.6.; dešinėje viršuje). Būtent gliutamino pakeitimas erdvėje treoninu teoriškai nebeleidžia sąveikauti CYDE1 fermentui su izocitoziniu.



**3.6.5 pav. Vcz ir CYDE1 fermentų aktyviųjų centrų sąveikos su substratu modelis.** Žalia spalva pažymėta Vcz tretinė struktūra, ciano spalva – CYDE1. Oranžinės/mėlynos aminorūgštys atvaizduoja Vcz izocitozino deaminazės aktyviojo centro modelio aminorūgštis, rožinės – CYDE1 fermento aminorūgštis. Skaičiai paveikslėlyje nurodo atstumą tarp dviejų erdvės taškų angstromais ( $10^{-10}$  m). Geltona brūkšninė linija atvaizduoja teoriškai galimas sąveikas, raudona – teoriškai negalimas sąveikas tarp aminorūgščių ir substrato.

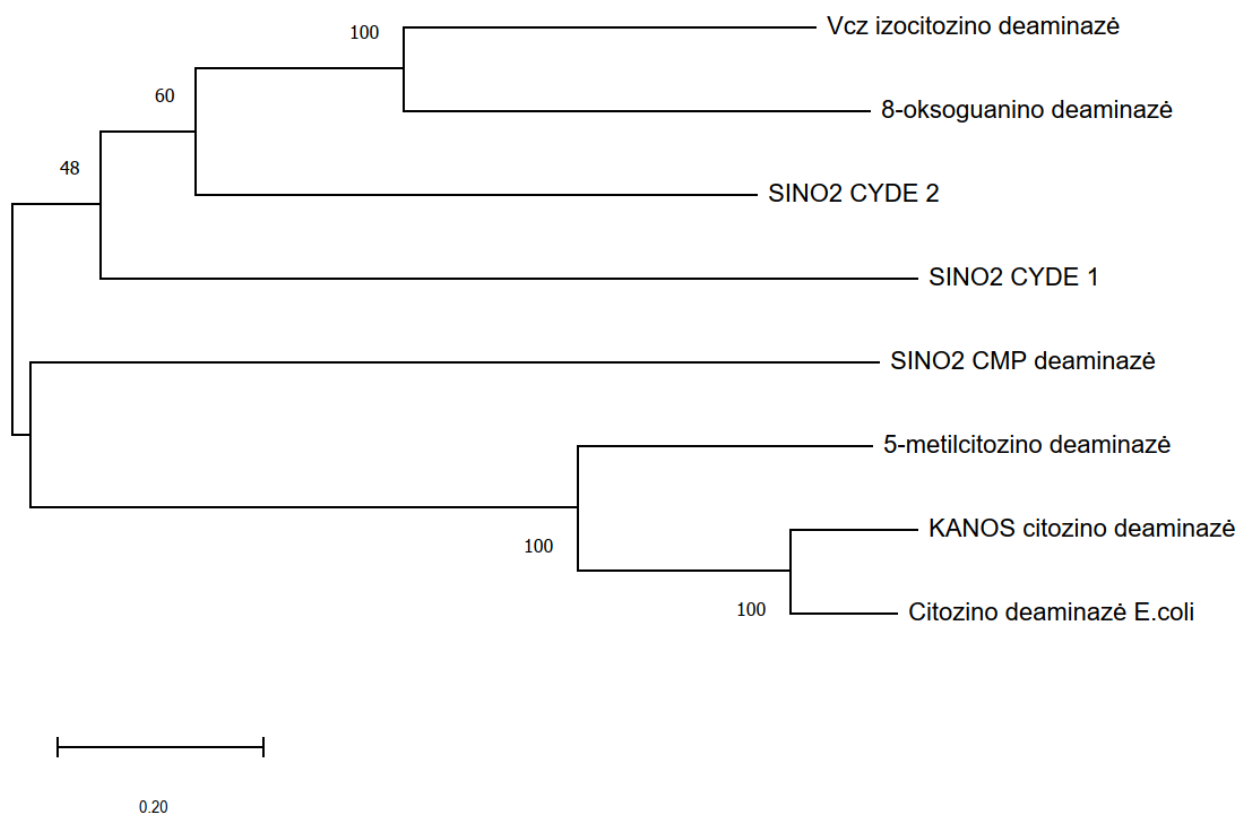
CYDE2 fermento atveju išanalizavus substrato-fermento kompleksacijos modelį galima išvelgti, kad CYDE2 teoriškai galėtų sąveikauti su PreQ<sub>0</sub> ir negali sąveikauti su izocitozinu, su ta sąlyga, jei izocitozino kompleksacijos vieta fermento aktyviajame centre nelabai skiriasi nuo PreQ<sub>0</sub>. Kaip ir CYDE1 atveju, substrato ir CYDE2 fermento sąveiką nulemia dvi erdvėje pasikeitusios aminorūgštys. Vcz deaminazės Cys-210 aminorūgštis erdvėje CYDE2 modelio atveju pakeista gliutamo rūgštimi (pav. 3.6.6; viršuje kairėje), kuri per druskų tiltelį gali sąveikauti su PreQ<sub>0</sub> molekulės nitrilo grupės azoto atomu ir taip padidinti šio substrato afiniškumą. CYDE2 aktyviajame centre Vcz deaminazės Gln-75 aminorūgštis erdvėje pakeista metioninu (pav. 3.6.6; viršuje kairėje). Metioninas negali sąveikauti su tretiniu azoto atomu izocitozino molekulėje, nes fiziologinėse sąlygose nėra pakankamai aktyvus, kad galėtų sudaryti druskų tiltelį. Remiantis modelių duomenimis, būtų galima teigti, kad šio fermento atveju pakaktų trijų aminorūgščių sąveikų su PreQ<sub>0</sub>, kad šis substratas galėtų būti deamininamas, tačiau nepakanka dviejų aminorūgščių sąveikos su izocitozinu, kad šis substratas galėtų būti deamininamas.





**3.6.6 pav. Vcz ir CYDE2 fermentų aktyviųjų centrų sąveikos su substratu modelis.** Žalia spalva pažymėta Vcz tretinė struktūra, ciano spalva – CYDE2. Oranžinės/mėlynos aminorūgštys atvaizduoja Vcz izocitozino deaminazės aktyviojo centro modelio aminorūgštis, rožinės – CYDE1 fermento aminorūgštis. Skaičiai paveikslėlyje nurodo atstumą tarp dviejų erdvės taškų angstromais ( $10^{-10}$  m). Geltona brūkšninė linija atvaizduoja teoriškai galimas sąveikas, raudona – teoriškai negalimas sąveikas tarp aminorūgščių ir substrato.

3.5 dalyje pavaizduoti trijų tikslinių deaminazių filogenetiniai medžiai pademonstruoja šių deaminazių sąsajas su kiekvienam fermentui artimiausiomis sekomis. Filogenetiškai analizuojant CMP deaminazę, CYDE1, CYDE2, Vcz ir keletą kitų deaminazių trapusavyje, galima matyti, kad būtent *Microbacterium sp. SINO2* CYDE2 fermentas yra artimiausiais Vcz izocitozino deaminazei bei 8- oksoguanino deaminazei (3.6.7 pav.). Remiantis šia informacija taip pat galima teigti, kad labiausiai tikėtina, jog CYDE2 iš *Microbacterium sp. SINO2* yra atsakingas už PreQ<sub>0</sub> deaminimą.



**3.6.7 pav. Filogenetinis medis, vaizduojantis *Microbacterium sp.* SINO2 bakterijos tikslinių deaminazių trapusavio giminingumą. Filogenetinė analizė didžiausio tikėtimumo metodu. Analizė atlikta MEGAX programa. Skaičiai prie šakų rodo grupių išskyrimo patikimumą procentais.**

Sugeneravus CMP deaminazės modelį bei atlikus komplementacijos eksperimentus, gauti pakankamai dideli teoriniai laisvosios Gibso enerijos pokyčiai ( $\Delta G > -6$  kcal/mol). Tai nėra geras komplementacijos eksperimentų įvertis, lyginant su kitų dviejų fermentų modelių atveju komplementacijos būdu gautais  $\Delta G$  (čia vidutiniškai  $\Delta G < -7$  kcal/mol). Analizuojant daugybinių palyginį galima matyti, kad šio fermento aktyvusis centras sudarytas iš kitokių aminorūgščių, nei būdinga citozino, izocitozino bei 8-oksoguanino deaminazėms. Analizuojant substratų ir CMP deaminazės fermentų sąveikas, nepastebėta modelių, kuriuose substratas reikšmingai sąveikautų su aminorūgštimis, dėl to CMP deaminazės ir ligandų kompleksavimo modeliai šiame darbe nepavaizduoti.

Pagal šiuos atliktus prognostinius bioinformatinius modeliavimus bei filogenetinę analizę galima būtų teigti, kad iš trijų pasirinktų tikslinių *Microbacterium sp.* SINO2 fermentų labiausiai tikėtina, kad už PreQ<sub>0</sub> deamininimą bus atsakingas CYDE2 fermentas. Vcz deaminazė deaminina PreQ<sub>0</sub> ir izocitoziną, o SINO2 bakterijos deaminina tik PreQ<sub>0</sub>. Jeigu paaiškės, kad už šį virsmą atsakinga CYDE2, tai galėtų būti paaiškinama pagrinde dėl dviejų išsidėsčiusių aminorūgščių aktyviajame centre – su PreQ<sub>0</sub> sąveikaujantis fermento aktyvusis centras turi turėti pakankamai ilgos grandinės polinę aminorūgštį, gebančią sąveikauti su šios molekulės nitrilo grupe, o su izocitozinu sąveikaujantis fermentas turi turėti hidrofilinę aminorūgštį, kad tinkamai sąveikautų su izocitozino N1 azoto atomu.

Atliktas bioinformatinis eksperimentas tik teoriškai atvaizduoja galimas substratų sąveikas su fermentų aktyviaisiais centrais. Būtent šis atliktas eksperimentas nėra tikslus, kadangi iš eilės atlikti du predikcinio tipo eksperimentai – tikslinių baltymų tretinės struktūros nustatymo eksperimentas bei pats substrato-fermento komplementacijos eksperimentas, kurio tiklumas priklauso nuo to, kaip tiksliai prieš tai buvo sugeneruotas(-i) tiriamo(-ų) baltymo(-ų) modelis(-iai). Baltymų komplementacijos tyrimas su plačiu substratų spektru tiksliau būtų atliktas tuo atveju, jei tikslinių baltymų struktūros prieš tai būtų nustatytos eksperimentiškai. Šiuos bioinformatinių tyrimu metu gautus teorinius duomenis bei hipotezes būtų tikslinga patikrinti eksperimentiškai, pavyzdžiui, tikslinės mutagenezės būdu gavus Vcz arba CYDE2 fermentus su pakeistomis tikslinėmis aminorūgštimis, būtų galima patikrinti šių mutantinių fermentų fermentinį aktyvumą su izocitozinu bei PreQ<sub>0</sub>.

Apibendrinant viso darbo rezultatus galima teigti, kad 7-ciano-7-deazaguaniną skaidančių bakterijų paieškos iš dirvožemio mėginių metu buvo atrasta SINO2 bakterija, gebanti katalizuoti pirmąjį PreQ<sub>0</sub> degradacijos etapą – deamininimo reakciją. Mūsų žiniomis, šio tyrimo metu pirmą kartą pademonstruota, kaip biologinėje aplinkoje gali vykti 7-ciano-7-deazaguanino deaminimo reakcija, susidarant naujam PreQ<sub>0</sub> skaidymo produktui. Pagal 16S rRNR geno seką bakterija priklauso *Microbacterium* genčiai. Atlikus genomo sekoskaitą, identifikuotos trys deaminazės – CMP deaminazė, CYDE1 ir CYDE2. Sėkmingai klonuota CMP deaminazė, optimizuota šio fermento sintezė. Tęsiant darbus planuojama klonuoti CYDE1 bei CYDE2 genus į raiškos vektorių ir atlikus analogišką eksperimentų seką, kaip buvo atlikta CMP deaminazės atveju, patikrinti visų 8 plazmidžių koduojamų fermentų fermentinius aktyvumus PreQ<sub>0</sub> atžvilgiu.

## IŠVADOS

1. Dirvožemio bakterija SINO2 katalizuoja pirmą PreQ<sub>0</sub> transformacijos reakciją.
2. Naujai atrinkta ir išgryninta SINO2 bakterija yra *Microbacterium* sp. genties atstovė.
3. *Microbacterium* sp SINO2 bakterija PreQ<sub>0</sub> verčia į 2,4-diokso-2,3,4,7-tetrahidro-1*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidino-5-karbonitrilą, t.y. katalizuoja PreQ<sub>0</sub> deamininimo reakciją.

## SANTRAUKA

Simonas Norvaišis

### „7-Ciano-7-deazaguaniną skaidančių bakterijų paieška ir tyrimas“

Darbo vadovė dr. Jonita Stankevičiūtė

Vilniaus Universitetas

Chemijos ir geomokslų fakultetas

Vilnius, 2021

7-Ciano-7-deazaguaninas yra potranskripciskai modifikuotų 7-deazaguanozinų šeimos nukleotidų bei gamtinių junginių (sangivamicino, tojokamicino) pirmtakas. Ši grupė modifikuotų nukleotidų bei gamtiniai junginiai pasižymi įdomiomis fiziologinėmis bei funkcinėmis savybėmis. Nemažai žinoma apie šių modifikuotų nukleotidų bei gamtinių junginių biosintezės kelius, tačiau nieko nėra žinoma apie jų skaidymą.

Šio darbo metu buvo tirtas 7-ciano-7-deazaguanino (PreQ<sub>0</sub>) skaidymas bakterijose. Iš dirvožemio mėginių buvo identifikuota SINO2 bakterija, transformuojanti PreQ<sub>0</sub> UV-Vis sugerties spektrą. Išsiaiškinta, kad ši bakterija geba katalizuoti pirmą PreQ<sub>0</sub> biodegradacijos etapą – PreQ<sub>0</sub> deamininimo reakciją iki 2,4-diokso-2,3,4,7-tetrahidro-1*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidino-5-karbonitrilo. Pagal 16S rRNR geno seką SINO2 bakterija priklauso *Microbacterium* genčiai. Nusekvenavus *Microbacterium sp.* SINO2 bakterijos genomą ir pasirinkus tris deaminazes CYDE1, CYDE2 bei CMP deaminazę, bandyta rekombinatinių baltymų sintezės būdu susintetinti šiuos tris tikslinius fermentus bei jų pagalba atlikti PreQ<sub>0</sub> deamininimo eksperimentus. Pagal *Microbacterium sp.* SINO2 bakterijos deaminazių CMP deaminazės, CYDE1 bei CYDE2 sekas sumodeliavus šių fermentų tretines struktūras bei atlikus ligando-fermento kompleksavimo tyrimą, galima būtų teigti, kad labiausiai tikėtina už PreQ<sub>0</sub> deamininimą atsakingas CYDE2 fermentas, tačiau šį teiginį reikėtų patvirtinti eksperimentiškai. Mūsų žiniomis, šio tyrimo metu pirmą kartą pademonstruota, kaip biologinėje aplinkoje gali vykti 7-ciano-7-deazaguanino deamininimo reakcija.

## SUMMARY

Simonas Norvaišis

### **„Isolation and Characterization of 7-Cyano-7-deazaguanine-Degrading Bacterium“**

Scientific Supervisor Dr. Jonita Stankevičiūtė

Vilnius University

Faculty of Chemistry and Geosciences

Vilnius, 2021

7-Cyano-7-deazaguanine is a biosynthetic precursor of the modified nucleotides of the 7-deazaguanosine-family as well as precursor to several natural products, such as sangivamycin and toyocamycin. The latter group of modified nucleotides and both sangivamycin and toyocamycin are characterized as widely distributed functional molecules of life and therapeutically-interesting compounds. The metabolic pathways of these molecules are extensively studied for many years but almost nothing is known about degradation pathways of the 7-deazaguanines.

In this study we examined the degradation processes of 7-cyano-7-deazaguanine (PreQ<sub>0</sub>) in soil bacteria. From the soil samples we have isolated SINO2 bacterium that could transform the UV-Vis absorbance spectrum of the PreQ<sub>0</sub>. We have identified that SINO2 is capable to deaminate PreQ<sub>0</sub> to 2,4-dioxo-2,3,4,7-tetrahydro-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carbonitrile, which might be the first biodegradation step of PreQ<sub>0</sub>. Based on 16s rRNA gene sequence, SINO2 could be attributed as the bacterium of the genus *Microbacterium*. By sequencing and analysing the genome of the bacterium, we chose three target deaminases CYDE1, CYDE2 and CMP deaminase. We have tried to synthesize these three recombinant deaminases and tried to perform PreQ<sub>0</sub> deamination experiments with these enzymes. By modeling the structures of deaminases CYDE1, CYDE2 and CMP deaminase of *Microbacterium sp.* SINO2 bacterium and by performing protein-ligand docking experiments we speculate that CYDE2 may be the most feasible enzyme to catalyze the deamination of PreQ<sub>0</sub> although this hypothesis should be tested experimentally. To the best of our knowledge, this is the first-time demonstration of how the 7-cyano-7-deazaguanine can be transformed to other compound while in biological setting.

## **PADĖKA**

Dėkoju Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus vadovui prof. dr. Rolandui Meškiui už suteiktą galimybę atlikti šį darbą.

Dėkoju savo vadovei dr. Jonitai Stankevičiūtei už vertingus patarimus ir pagalbą atliekant eksperimentus bei analizuojant duomenis.

Dėkoju Justui Vaitekūnui už patarimus prieš atliekant įvairius eksperimentus ir pagalbą dirbant su HPLC-MS įranga.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Acs, G., Reich, E., & Mori, M. (1964). Biological and biochemical properties of the analogue antibiotic tubercidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 52(2), 493–501. <https://doi.org/10.1073/pnas.52.2.493>
- Aučynaitė, A., Rutkienė, R., Tauraitė, D., Meškys, R., & Urbonavičius, J. (2018). Discovery of bacterial deaminases that convert 5-fluoroisocytosine into 5-fluorouracil. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02375>
- Aytac, U., & Gunduz, U. (1994). Q-modification of tRNAs in human brain tumors. *Cancer Biochemistry Biophysics*, 14(2), 93–98. <https://europepmc.org/article/med/7889496>
- Bagwell, C. E., Bhat, S., Hawkins, G. M., Smith, B. W., Biswas, T., Hoover, T. R., Saunders, E., Han, C. S., Tsodikov, O. V., & Shimkets, L. J. (2008). Survival in nuclear waste, extreme resistance, and potential applications gleaned from the genome sequence of *Kineococcus radiotolerans* SRS30216. *PLoS ONE*, 3(12), 3878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003878>
- Baranowski, W., Dirheimer, G., & Andrzej Jakowicki, J. (1994). Deficiency of Queuine, a Highly Modified Purine Base, in Transfer RNAs from Primary and Metastatic Ovarian Malignant Tumors in Women. In *CANCER RESEARCH* (Vol. 54).
- Bartosik, K., Debiec, K., Czarnecka, A., Sochacka, E., & Leszczynska, G. (2020). Synthesis of nucleobase-modified RNA oligonucleotides by post-synthetic approach. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25153344>
- Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Bloch, A., Leonard, R. J., & Nichol, C. A. (1967). On the mode of action of 7-deaza-adenosine (tubercidin). *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*, 138(1), 10–25. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(67\)90581-3](https://doi.org/10.1016/0005-2787(67)90581-3)
- Boccaletto, P., MacHnicka, M. A., Purta, E., Pitkowski, P., Baginski, B., Wirecki, T. K., De Crécy-Lagard, V., Ross, R., Limbach, P. A., Kotter, A., Helm, M., & Bujnicki, J. M. (2018). MODOMICS: A database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D303–D307. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1030>
- Caballero, V. C., Toledo, V. P., Maturana, C., Fisher, C. R., Payne, S. M., & Salazar, J. C. (2012). Expression of *Shigella flexneri* gluQ-rs gene is linked to dksA and controlled by a transcriptional terminator. *BMC Microbiology*, 12, 226. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-226>
- Cavins, J., Hall, T., Olson, K., Khung, C. L., Horton, J., Colsky, J., & Shadduck, R. (1967). Initial toxicity study of sangivamycin (NSC-65346). Undefined.
- Chen, K., Zhao, B. S., & He, C. (2016). Nucleic Acid Modifications in Regulation of Gene Expression. In *Cell Chemical Biology* (Vol. 23, Issue 1, pp. 74–85). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.11.007>



- Dineshkumar, T. K., Thanedar, S., Subbulakshmi, C., & Varshney, U. (2002). An unexpected absence of queuosine modification in the tRNAs of an *Escherichia coli* B strain. In *Microbiology* (Vol. 148, Issue 12, pp. 3779–3787). Society for General Microbiology. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-12-3779>
- Dubois, D. Y., Blaise, M., Becker, H. D., Campanacci, V., Keith, G., Giegé, R., Cambillau, C., Lapointe, J., & Kern, D. (2004). An aminoacyl-tRNA synthetase-like protein encoded by the *Escherichia coli* yadB gene glutamylates specifically tRNA<sup>Asp</sup>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20), 7530–7535. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401634101>
- Dubrul, E. F., & Farkas, W. R. (1976). Partial purification and properties of the reticulocyte guanylylating enzyme. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*, 442(3), 379–390. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(76\)90312-9](https://doi.org/10.1016/0005-2787(76)90312-9)
- Eichhorn, C. D., Kang, M., & Feigon, J. (2014). Structure and function of preQ1 riboswitches. In *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* (Vol. 1839, Issue 10, pp. 939–950). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.04.019>
- El Yacoubi, B., Bailly, M., & De Crécy-Lagard, V. (2012). Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annual Review of Genetics*, 46, 69–95. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155641>
- Emmerich, B., Zubrod, E., Weber, H., Maubach, P. A., Kersten, H., & Kersten, W. (1985). Relationship of Queuine-lacking Transfer RNAs to the Grade of Malignancy in Human Leukemias and Lymphomas. *Cancer Research*, 45(9).
- Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. In *Quantitative Biology* (Vol. 7, Issue 2, pp. 83–89). Higher Education Press. <https://doi.org/10.1007/s40484-019-0172-y>
- Fergus, C., Barnes, D., Alqasem, M. A., & Kelly, V. P. (2015). The queuine micronutrient: Charting a course from microbe to man. In *Nutrients* (Vol. 7, Issue 4, pp. 2897–2929). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu7042897>
- Fergus, C., Barnes, D., Alqasem, M. A., & Kelly, V. P. (2015). The queuine micronutrient: Charting a course from microbe to man. In *Nutrients* (Vol. 7, Issue 4, pp. 2897–2929). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu7042897>
- Gabler, F., Nam, S. Z., Till, S., Mirdita, M., Steinegger, M., Söding, J., Lupas, A. N., & Alva, V. (2020). Protein Sequence Analysis Using the MPI Bioinformatics Toolkit. *Current Protocols in Bioinformatics*, 72(1), 108. <https://doi.org/10.1002/cpbi.108>
- Gasparavičiūtė, R., Kropa, A., & Meškys, R. (2006). A new *Arthrobacter* strain utilizing 4-hydroxypyridine. *Biologija*.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2016). Precipitation of DNA with ethanol. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(12), 1116–1120. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093377>
- Gregson, J. M., Crain, P. F., Edmonds, C. G., Gupta, R., Hashizume, T., Phillipson, D. W., & McCloskey, J. A. (1993). Structure of the archaeal transfer RNA nucleoside G<sup>\*</sup>-15 (2-amino-4,7-dihydro-4-oxo-7-β-D-ribofuranosyl-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carboximidamide

(Archaeosine)). *Journal of Biological Chemistry*, 268(14), 10076–10086. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)82174-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)82174-3)

Grosdidier, A., Zoete, V., & Michielin, O. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), W270. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr366>

Gunduz, U., & Katze, J. R. (1984). Queuine salvage in mammalian cells. Evidence that queuine is generated from queuosine 5'-phosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 259(2), 1110–1113. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)43573-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43573-3)

Hall, R. S., Fedorov, A. A., Marti-Arbona, R., Fedorov, E. V., Kolb, P., Sauder, J. M., Burley, S. K., Shoichet, B. K., Almo, S. C., & Raushel, F. M. (2010). The hunt for 8-oxoguanine deaminase. *Journal of the American Chemical Society*, 132(6), 1762–1763. <https://doi.org/10.1021/ja909817d>

Helm, M. (2006). Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 34, Issue 2, pp. 721–733). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj471>

Heo, L., Park, H., & Seok, C. (2013). GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), W384. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt458>

Hulpia, F., Campagnaro, G. D., Scortichini, M., Van Hecke, K., Maes, L., de Koning, H. P., Caljon, G., & Van Calenbergh, S. (2019). Revisiting tubercidin against kinetoplastid parasites: Aromatic substitutions at position 7 improve activity and reduce toxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 164, 689–705. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.050>

Hutinet, G., Kot, W., Cui, L., Hillebrand, R., Balamkundu, S., Gnanakalai, S., Neelakandan, R., Carstens, A. B., Fa Lui, C., Tremblay, D., Jacobs-Sera, D., Sassanfar, M., Lee, Y. J., Weigele, P., Moineau, S., Hatfull, G. F., Dedon, P. C., Hansen, L. H., & de Crécy-Lagard, V. (2019). 7-Deazaguanine modifications protect phage DNA from host restriction systems. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13384-y>

Hutinet, G., Kot, W., Cui, L., Hillebrand, R., Balamkundu, S., Gnanakalai, S., Neelakandan, R., Carstens, A. B., Fa Lui, C., Tremblay, D., Jacobs-Sera, D., Sassanfar, M., Lee, Y. J., Weigele, P., Moineau, S., Hatfull, G. F., Dedon, P. C., Hansen, L. H., & de Crécy-Lagard, V. (2019). 7-Deazaguanine modifications protect phage DNA from host restriction systems. *Nature Communications*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13384-y>

Hutinet, G., Swarjo, M. A., & de Crécy-Lagard, V. (2017). Deazaguanine derivatives, examples of crosstalk between RNA and DNA modification pathways. In *RNA Biology* (Vol. 14, Issue 9, pp. 1175–1184). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1265200>

Iwata-Reuyl, D. (2008). An embarrassment of riches: the enzymology of RNA modification. In *Current Opinion in Chemical Biology* (Vol. 12, Issue 2, pp. 126–133). <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.041>

- Jackman, J. E., & Alfonzo, J. D. (2013). Transfer RNA modifications: Nature's combinatorial chemistry playground. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 4, Issue 1, pp. 35–48). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1002/wrna.1144>
- Jackson, C. D., Irving, C. C., & Sells, B. H. (1970). Changes in rat liver transfer RNA following growth hormone administration and in regenerating liver. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*, 217(1), 64–71. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(70\)90123-1](https://doi.org/10.1016/0005-2787(70)90123-1)
- Janknecht, R., De Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R. A., Nordheim, A., & Stunnenberg, H. G. (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(20), 8972–8976. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.20.8972>
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 7, pp. 484–492). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Kasai, H., Kuchino, Y., Nihei, K., & Nishimura, S. (1975). Distribution of the modified nucleoside Q and its derivatives in animal and plant transfer RNA's. *Nucleic Acids Research*, 2(10), 1931–1940. <https://doi.org/10.1093/nar/2.10.1931>
- Katze, J. R., Beck, W. T., Cheng, C. S., & McCloskey, J. A. (1983). Why is tumor tRNA hypomodified with respect to Q nucleoside? Recent Results in Cancer Research. *Fortschritte Der Krebsforschung. Progrès Dans Les Recherches Sur Le Cancer*, 84, 146–159. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-81947-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-81947-6_10)
- Katze, J. R., Basile, B., & McCloskey, J. A. (1982). Queuine, a modified base incorporated posttranscriptionally into eukaryotic transfer RNA: Wide distribution in nature. *Science*, 216(4541), 55–56. <https://doi.org/10.1126/science.7063869>
- Kawamura, T., Hirata, A., Ohno, S., Nomura, Y., Nagano, T., Nameki, N., Yokogawa, T., & Hori, H. (2015). Multisite-specific archaeosine tRNA-guanine transglycosylase (ArcTGT) from *Thermoplasma acidophilum*, a thermo-acidophilic archaeon. *Nucleic Acids Research*, 44(4), 1894–1908. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1522>
- Kazlauskas, A., Darinskas, A., Meškys, R., Tamašauskas, A., & Urbonavičius, J. (2019). Isocytosine deaminase Vcz as a novel tool for the prodrug cancer therapy. *BMC Cancer*, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5409-7>
- Kersten, H. (1988). The nutrient factor queuine: Biosynthesis, occurrence in transfer RNA and function. *BioFactors*, 1(1), 27–29. <https://europepmc.org/article/med/3076430>
- Kersten, H., & Kersten, W. (1990). Biosynthesis and Function of Queuine and Queuosine tRNAs. *Journal of Chromatography Library*, 45(PB), B69–B108. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(08\)61488-8](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)61488-8)
- Kirino, Y., Yasukawa, T., Marjavaara, S. K., Jacobs, H. T., Holt, I. J., Watanabe, K., & Suzuki, T. (2006). Acquisition of the wobble modification in mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(CUN) bearing the G12300A mutation suppresses the MELAS molecular defect. *Human Molecular Genetics*, 15(6), 897–904. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl007>

- Kulikov, E. E., Golomidova, A. K., Letarova, M. A., Kostyukova, E. S., Zelenin, A. S., Prokhorov, N. S., & Letarov, A. V. (2014). Genomic sequencing and biological characteristics of a novel Escherichia Coli bacteriophage 9g, a putative representative of a new siphoviridae genus. *Viruses*, 6(12), 5077–5092. <https://doi.org/10.3390/v6125077>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Loomis, C. R., & Bell, R. M. (1988). Sangivamycin, a Nucleoside Analogue, Is a Potent Inhibitor of Protein Kinase C\*. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 263, Issue 4). [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)77930-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)77930-7)
- Manta, B., Raushel, F. M., & Himo, F. (2014). Reaction mechanism of zinc-dependent cytosine deaminase from escherichia coli: A quantum-chemical study. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(21), 5644–5652. <https://doi.org/10.1021/jp501228s>
- Marks, T., & Farkas, W. R. (1997). Effects of a diet deficient in tyrosine and queuine on germfree mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 230(2), 233–237. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.5768>
- McCarty, R. M., & Bandarian, V. (2012). Biosynthesis of pyrrolopyrimidines. *Bioorganic Chemistry*, 43, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2012.01.001>
- McCown, P. J., Ruzkowska, A., Kunkler, C. N., Breger, K., Hulewicz, J. P., Wang, M. C., Springer, N. A., & Brown, J. A. (2020). Naturally occurring modified ribonucleosides. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 11, Issue 5). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/wrna.1595>
- Meier, F., Suter, B., Grosjean, H., Keith, G., & Kubli, E. (1985). Queuosine modification of the wobble base in tRNA<sup>His</sup> influences “in vivo” decoding properties. *The EMBO Journal*, 4(3), 823–827. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1985.tb03704.x>
- Miles, Z. D., McCarty, R. M., Molnar, G., & Bandarian, V. (2011). Discovery of epoxyqueuosine (oQ) reductase reveals parallels between halorespiration and tRNA modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), 7368–7372. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018636108>
- Motorin, Y., Muller, S., Behm-Ansmant, I., & Branlant, C. (2007). Identification of Modified Residues in RNAs by Reverse Transcription-Based Methods. In *Methods in Enzymology* (Vol. 425, pp. 21–53). *Methods Enzymol.* [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)25002-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)25002-5)
- Müller, M., Hartmann, M., Schuster, I., Bender, S., Thüring, K. L., Helm, M., Katze, J. R., Nellen, W., Lyko, F., & Ehrenhofer-Murray, A. E. (2015). Dynamic modulation of Dnmt2-dependent tRNA methylation by the micronutrient queuine. *Nucleic Acids Research*, 43(22), 10952–10962. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv980>
- Muto, A., & Osawa, S. (1987). The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(1), 166–169. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.1.166>

- Nishimura, H., Katagiri, K., Sato, K., Mayama, M., & Shimaoka, N. (1956). Toyocamycin, a new anti-candida antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 9(2), 60–62. [https://doi.org/10.11554/antibiotcsa.9.2\\_60](https://doi.org/10.11554/antibiotcsa.9.2_60)
- Nishimura, S., & Watanabe, K. (2006). The discovery of modified nucleosides from the early days to the present: A personal perspective. *Journal of Biosciences*, 31(4), 465–475. <https://doi.org/10.1007/BF02705186>
- Noguchi, S., Nishimura, Y., Hirota, Y., & Nishimura, S. (1982). Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant lacking tRNA-guanine transglycosylase. Function and biosynthesis of queuosine in tRNA. *Journal of Biological Chemistry*, 257(11), 6544–6550. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)65176-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)65176-6)
- Ohkuma, K. (1960). Chemical Structure of Toyocamycin. *The Journal of Antibiotics, Series A*, 13(5), 361–361. [https://doi.org/10.11554/ANTIBIOTCSA.13.5\\_361](https://doi.org/10.11554/ANTIBIOTCSA.13.5_361)
- Okada, N., & Nishimura, S. (1977). Enzymatic synthesis of Q nucleoside containing mannose in the anticodon of tRNA: Isolation of a novel mannosyltransferase from a cell-free extract of rat liver. *Nucleic Acids Research*, 4(8), 2931–2937. <https://doi.org/10.1093/nar/4.8.2931>
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., German Grehov, O. G., Kandrov, D., Rasputin, K., Syabro, M., & Tleukenov, T. (2012). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. In *Bioinformatics* (Vol. 28, Issue 8, pp. 1166–1167). *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Oliva, R., Tramontano, A., & Cavallo, L. (2007). Mg<sup>2+</sup> binding and archaeosine modification stabilize the G15-C48 Levitt base pair in tRNAs. *RNA*, 13(9), 1427–1436. <https://doi.org/10.1261/rna.574407>
- Ott, G., & Kersten, H. (1985). Differential Turnover of Trnas of the Queuosine Family in *Dictyostelium Discoideum* and its possible Role in Regulation. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 366(1), 69–76. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1985.366.1.69>
- Pathak, C., & Vinayak, M. (2005). Modulation of lactate dehydrogenase isozymes by modified base queuine. *Molecular Biology Reports*, 32(3), 191–196. <https://doi.org/10.1007/s11033-004-6941-2>
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2016). Development of an efficient bacterial consortium for the potential remediation of hydrocarbons from contaminated sites. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUL), 1092. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01092>
- Pedulla, M. L., Ford, M. E., Houtz, J. M., Karthikeyan, T., Wadsworth, C., Lewis, J. A., Jacobs-Sera, D., Falbo, J., Gross, J., Pannunzio, N. R., Brucker, W., Kumar, V., Kandasamy, J., Keenan, L., Bardarov, S., Kriakov, J., Lawrence, J. G., Jacobs, W. R., Hendrix, R. W., & Hatfull, G. F. (2003). Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell*, 113(2), 171–182. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00233-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00233-2)
- Penzo, M., Guerrieri, A. N., Zacchini, F., Treré, D., & Montanaro, L. (2017). RNA pseudouridylation in physiology and medicine: For better and for worse. In *Genes* (Vol. 8, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes8110301>

- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Phillips, G., El Yacoubi, B., Lyons, B., Alvarez, S., Iwata-Reuyl, D., & De Crécy-Lagard, V. (2008). Biosynthesis of 7-deazaguanosine-modified tRNA nucleosides: A new role for GTP cyclohydrolase I. *Journal of Bacteriology*, 190(24), 7876–7884. <https://doi.org/10.1128/JB.00874-08>
- Rakovich, T., Boland, C., Bernstein, I., Chikwana, V. M., Iwata-Reuyl, D., & Kelly, V. P. (2011). Queuosine deficiency in eukaryotes compromises tyrosine production through increased tetrahydrobiopterin oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19354–19363. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.219576>
- Randerath, E., Agrawal, H. P., & Randerath, K. (1984). Specific Lack of the Hypermodified Nucleoside, Queuosine, in Hepatoma Mitochondrial Aspartate Transfer RNA and Its Possible Biological Significance. *Cancer Research*, 44(3).
- Rao, K. V. (1968). Structure of sangivamycin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 11(5), 939–941. <https://doi.org/10.1021/jm00311a005>
- Reisser, T., Langgut, W., & Kersten, H. (1994). The nutrient factor queuine protects HeLa cells from hypoxic stress and improves metabolic adaptation to oxygen availability. *European Journal of Biochemistry*, 221(3), 979–986. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18814.x>
- Rios, A. C., & Tor, Y. (2013). On the origin of the canonical nucleobases: An assessment of selection pressures across chemical and early biological evolution. In *Israel Journal of Chemistry* (Vol. 53, Issues 6–7, pp. 469–483). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1002/ijch.201300009>
- Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W320–W324. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>
- Rozov, A., Demeshkina, N., Khusainov, I., Westhof, E., Yusupov, M., & Yusupova, G. (2016). Novel base-pairing interactions at the tRNA wobble position crucial for accurate reading of the genetic code. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10457>
- Sabri, M., Häuser, R., Ouellette, M., Liu, J., Dehbi, M., Moeck, G., García, E., Titz, B., Uetz, P., & Moineau, S. (2011). Genome annotation and intraviral interactome for the streptococcus pneumoniae virulent phage Dp-1. *Journal of Bacteriology*, 193(2), 551–562. <https://doi.org/10.1128/JB.01117-10>
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning a laboratory manual*. Vol. 2, 3rd edn. (n.d.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. - References - Scientific Research Publishing. Retrieved May 20, 2021, from [https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=76751](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=76751)
- Schwartz, S., & Motorin, Y. (2017). Next-generation sequencing technologies for detection of modified nucleotides in RNAs. In *RNA Biology* (Vol. 14, Issue 9, pp. 1124–1137). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1251543>

- Seibert, C. M., & Raushel, F. M. (2005). Current Topics Structural and Catalytic Diversity within the Amidohydrolase Superfamily †. <https://doi.org/10.1021/bi047326v>
- Seidel, A., Brunner, S., Seidel, P., Fritz, G. I., & Herbarth, O. (2006). Modified nucleosides: An accurate tumour marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control. *British Journal of Cancer*, 94(11), 1726–1733. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603164>
- Seo, J. S., Keum, Y. S., & Li, Q. X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 6, Issue 1, pp. 278–309). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijerph6010278>
- Shen, C., Ding, J., Wang, Z., Cao, D., Ding, X., & Hou, T. (2020). From machine learning to deep learning: Advances in scoring functions for protein–ligand docking. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* (Vol. 10, Issue 1, p. e1429). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1002/wcms.1429>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Singh, D. K. (2008). Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments. In *Indian J. Microbiol* (Vol. 48).
- Song, C., Sakurai, M., Shiromoto, Y., & Nishikura, K. (2016). Functions of the RNA editing enzyme ADAR1 and their relevance to human diseases. In *Genes* (Vol. 7, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes7120129>
- Spitale, R. C., Torelli, A. T., Krucinska, J., Bandarian, V., & Wedekind, J. E. (2009). The structural basis for recognition of the preQ0 metabolite by an unusually small riboswitch aptamer domain. *Journal of Biological Chemistry*, 284(17), 11012–11016. <https://doi.org/10.1074/jbc.C900024200>
- Stal, L., & Zehr, J. (2008). Cyanobacterial nitrogen fixation in the ocean : diversity, regulation and ecology. *Environmental Science*.
- Stankevičiūtė, J., Vaitekūnas, J., Petkevičius, V., Gasparavičiūtė, R., Tauraitė, D., & Meškys, R. (2016). Oxyfunctionalization of pyridine derivatives using whole cells of *Burkholderia* sp. MAK1. *Scientific Reports*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep39129>
- Stokes, J. M., Yang, K., Swanson, K., Jaakkola, T. S., Barzilay, R., Correspondence, J. J. C., Jin, W., Cubillos-Ruiz, A., Donghia, N. M., Macnair, C. R., French, S., Carfrae, L. A., Bloom-Ackermann, Z., Tran, V. M., Chiappino-Pepe, A., Badran, A. H., Andrews, I. W., Chory, E. J., Church, G. M., ... Collins, J. J. (2020). A Deep Learning Approach to Antibiotic Discovery Article A Deep Learning Approach to Antibiotic Discovery. *Cell*, 180, 688–702.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.021>
- Tavitian, A., Uretsky, S. C., & Acs, G. (1969). The effect of toyocamycin on cellular RNA synthesis. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*, 179(1), 50–57. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(69\)90121-X](https://doi.org/10.1016/0005-2787(69)90121-X)
- Thiaville, J. J., Kellner, S. M., Yuan, Y., Hutinet, G., Thiaville, P. C., Jumpathong, W., Mohapatra, S., Brochier-Armanet, C., Letarov, A. V., Hillebrand, R., Malik, C. K., Rizzo, C. J., Dedon, P. C., &

- De Crécy-Lagard, V. (2016). Novel genomic island modifies DNA with 7-deazaguanine derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(11), E1452–E1459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518570113>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Turner, B., Burkhart, B. W., Weidenbach, K., Ross, R., Limbach, P. A., Schmitz, R. A., De Crécy-Lagard, V., Stedman, K. M., Santangelo, T. J., & Iwata-Reuyl, D. (2020). Archaeosine modification of archaeal tRNA: Role in structural stabilization. *Journal of Bacteriology*, 202(8). <https://doi.org/10.1128/JB.00748-19>
- Turner, B., Burkhart, B. W., Weidenbach, K., Ross, R., Limbach, P. A., Schmitz, R. A., De Crécy-Lagard, V., Stedman, K. M., Santangelo, T. J., & Iwata-Reuyl, D. (2020). Archaeosine modification of archaeal tRNA: Role in structural stabilization. *Journal of Bacteriology*, 202(8). <https://doi.org/10.1128/JB.00748-19>
- Van Lanen, S. G., Reader, J. S., Swairjo, M. A., de Crécy-Lagard, V., Lee, B., & Iwata-Reuyl, D. (2005). From cyclohydrolase to oxidoreductase: Discovery of nitrile reductase activity in a common fold. In *PNAS March* (Vol. 22, Issue 12). [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0408056102](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0408056102)
- Vinayak, M., & Pathak, C. (2010). Queuosine modification of tRNA: its divergent role in cellular machinery. In *Bioscience reports* (Vol. 30, Issue 2, pp. 135–148). *Biosci Rep.* <https://doi.org/10.1042/bsr20090057>
- Vogels, G. D., & Van Der Drift, C. (1976). Degradation of Purines and Pyrimidines by Microorganisms (Vol. 40, Issue 2).
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Weber, J., Hartmann, T., & Zeidler, R. (1989). Compilation of trna sequences and sequences of trna genes. *Nucleic Acids Research*, 17(Suppl), r1–r172. <https://doi.org/10.1093/nar/17.suppl.r1>
- White, B. N., Teneb, G. M., Holden, J., & Suzuki, D. T. (1973). Activity of a transfer RNA modifying enzyme during the development of *Drosophila* and its relationship to the su(s) locus. *Journal of Molecular Biology*, 74(4), 635–651. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(73\)90054-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90054-5)
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35, W407. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>
- Xi, H., Schneider, B. L., & Reitzer, L. (2000). Purine Catabolism in *Escherichia coli* and Function of Xanthine Dehydrogenase in Purine Salvage. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 182, Issue 19).



Xu, D., Ma, M., Liu, Y., Zhou, T., Wang, K., Deng, Z., & Hong, K. (2014). PreQ0 Base, an Unusual Metabolite with Anti-cancer Activity from *Streptomyces qinglanensis* 172205. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 15(3), 285–290. <https://doi.org/10.2174/18715206146666141027144653>

Zallot, R., Yuan, Y., & De Crécy-Lagard, V. (2017). The *Escherichia coli* COG1738 member YhhQ is involved in 7-cyanodeazaguanine (PreQ0) transport. *Biomolecules*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/biom7010012>