

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Rūta Stanislauskienė

ARTHROBACTER SPP. PLAZMIDŲ TYRIMAS

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

VILNIUS, 2012

Disertacija rengta 2006–2011 metais Vilniaus universiteto Biochemijos institute.

Mokslinis vadovas:

dr. Rolandas Meškys (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P)

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	10
1.1. <i>Arthrobacter</i> genties charakteristika.....	10
1.2. Plazmidžių charakteristika	13
1.2.1. Plazmidžių replikacijos tipai	14
1.2.2. Plazmidžių (ne)stabilumas ir (ne)suderinamumas	18
1.3 <i>Arthrobacter</i> genties bakterijų plazmidės	20
1.3.1. <i>Arthrobacter</i> spp. katabolinės plazmidės	24
1.3.1.1. <i>Arthrobacter oxydans</i> P52 plazmidė.....	24
1.3.1.2. <i>Arthrobacter</i> spp. rūšių, degraduojančių p-nitrofenolį, plazmidės	24
1.3.1.3. <i>Arthrobacter</i> sp. RC100 plazmidės.....	25
1.3.1.4. <i>Arthrobacter globiformis</i> D47 plazmidės	26
1.3.1.5. <i>Arthrobacter keyseri</i> 12B plazmidės.....	26
1.3.1.6. <i>Arthrobacter</i> spp. kamienų, skaidančių atraziną, plazmidės.....	27
1.3.1.7. <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> 165 kb plazmidė pAO1	30
1.3.1.8. <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> Rū61a linijinė plazmidė pAL1	32
1.3.1.9. Plazmidės iš <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1, FB24 ir Chr15 kamienų	33
1.3.1.10. <i>Arthrobacter arilaitensis</i> Re117 plazmidės	34
1.3.1.11. <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3.....	34
1.3.2. <i>Arthrobacter</i> spp. mažosios plazmidės	35
1.4. Hibridiniai vektoriai, sukurti <i>Arthrobacter</i> spp. bakterijoms.....	35
1.4.1. Pirmieji hibridiniai vektoriai	35
1.4.2. pART grupės vektoriai	36
1.4.3. Hibridinis vektorius pSVJ21	37
1.5. Piridino ir jo darinių skaidymas	40
1.5.1. Piridino skaidymas.....	40
1.5.2. Bakterinis metilintų piridino skaidymas	47
1.5.3. 2-hidroksipiridino skaidymas.....	51
1.6. Ftalio rūgšties skaidymas	53
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	57
2.1. Reagentai	57
2.2. Bakteriniai kamienai ir plazmidės.....	58
2.3. Pradmenys.....	60
2.4. Terpės ir auginimo sąlygos	61
2.5. Plazmidinės DNR išskyrimas	62
2.6. Genominės DNR skyrimas	62
2.7. DNR hidrolizė, defosforilinimas ir fosforilinimas	63
2.8. DNR elektroforezė agarozės gelyje	63
2.9. Pulsuojančio lauko elektroforezė	64
2.10. DNR fragmentų gryninimas iš gelio	64
2.11. DNR klonavimas.....	64
2.12. <i>Escherichia coli</i> DH5α elektroimlių ląstelių ruošimas ir elektroporacija	65
2.13. <i>Arthrobacter</i> spp. ir <i>Rhodococcus</i> spp. elektroimlių ląstelių ruošimas ir elektroporacija.....	65
2.14. Plazmidinės DNR ruošimas sekų nustatymui ir jų analizė	66

2.15. Nukleotidų ir aminorūgščių filogenetinė analizė	67
2.16. Genomo sekos nustatymas	67
2.17. Baltymų <i>de novo</i> sekos nustatymas	67
2.18. Bakterijų gydymas nuo plazmidžių	68
2.19. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)	68
2.20. Kiekybinė PGR analizė plazmidės pRMU824Km kopijų skaičiaus nustatymui <i>Arthrobacter</i> sp. 68b kamiene	69
2.21. Minimalaus replikono nustatymas	69
2.22. <i>E. coli</i> – <i>A. rhombi</i> vektorių kūrimo pradmenys ir PGR	70
2.23. Plazmidžių stabilumo tyrimas	70
2.24. Plazmidžių suderinamumo tyrimas	71
2.25. Substratinio specifiškumo tyrimas	71
2.26. Optimalios ftalio rūgšties koncentracijos nustatymas	72
2.27. Ftalato 4,5-dioksigenazės ir 4,5-dihydro-4,5-dihidroksiftalato dehidrogenazės aktyvumų nustatymas	72
2.28. Biovirsimų tyrimas panaudojant intaktines ląsteles	73
2.29. Beląstelinio ekstrakto paruošimas	73
2.30. Baltymų kiekio nustatymas	74
2.31. Baltymų elektroforezė	74
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	75
3.1. <i>Arthrobacter</i> sp. 68b bakterijų plazmidės ir katabolinių kelių tyrimas	75
3.1.1. <i>Arthrobacter</i> sp. 68b bakterijų plazmidės	77
3.1.2. Ftalio rūgšties skaidymas	87
3.1.2.1. Ftalio rūgšties skaidymo operono analizė	91
3.1.3.2. Ftalio rūgšties skaidymo baltymų filogenetinė analizė	93
3.1.3. 2-Metilpiridino ir piridino skaidymas	98
3.1.3.1. 2-metilpiridinu ir piridinu indukuojamų baltymų tyrimas	100
3.1.3.2. Genų, koduojančių 2-metilpiridino ir piridino skaidymo baltymus, paieška ir tyrimas	103
3.1.3.3. Galimas 2-metilpiridino ir piridino skaidymo kelias <i>Arthrobacter</i> sp. 68b bakterijose	105
3.2. 2-Hidroksipiridina skaidančių <i>Arthrobacter rhombi</i> bakterijų plazmidės	108
3.2.1. <i>Arthrobacter rhombi</i> PRH1 ir VP3 bakterijų didžiosios plazmidės	109
3.2.2. <i>Arthrobacter rhombi</i> pVP3 plazmidė	111
3.2.3. <i>Arthrobacter rhombi</i> PRH1 plazmidė	115
3.3. Vektorių, turinčių pPRH replikoną, konstravimas	122
3.3.1. <i>Escherichia coli</i> – <i>Arthrobacter rhombi</i> hibridinių vektorių konstravimas	122
3.3.2. Hibridinių vektorių savybės	125
3.4. Apibendrinimas	129
IŠVADOS	133
PADĖKA	134
LITERATŪROS SĄRAŠAS	135

SANTRUMPU SARAŠAS

<i>asr</i>	atviras skaitymo rėmelis (genas)
Asr	atviras skaitymo rėmelis (baltymas)
DSO	dvigrandinės DNR <i>ori</i>
EDTA	2,2',2'',2'''–etilendiamintetraacto rūgštis
FAD	flavinadenindinukleotidas
FMN	flavinmononukleotidas
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktozidas
IS	įterptinė seka
PGR	polimerazinė grandininė reakcija
kPGR	kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija
NAD	nikotinamido adenindinukleotidas
NADP	nikotinamido adenindinukleotido fosfatas
SDS	natrio dodecilsulfatas
SSO	viengrandinės DNR <i>ori</i>
Tris	tris-(hidroksimetil)-aminometanas
X-gal	5-brom-4-chlor-indolil-β-D-galaktopiranozidas

ĮVADAS

Arthrobacter yra Gram-teigiamos GC turtingos bakterijos (Jones ir Keddie, 2006), kurios priklauso *Actinomycetales* eilės, *Micrococcaceae* šeimai (Stackebrandt ir Schumann, 2006; Zhi ir kt., 2009). Atskiros šių bakterijų rūšys yra mezofilai arba psichrofilai (Jones ir Keddie, 2006). Šios genties bakterijos yra labiausiai paplitusios dirvožemyje (Jones ir Keddie, 2006), taip pat aptinkamos ledynuose (Margesin ir kt., 2004), nutekamųjų vandenių nuosėdose ir dumble (Bieszkiewicz ir kt., 1995; Kampfer ir kt., 1996; Kim ir kt., 2008; Li ir kt., 2008; Molokwane ir kt., 2008; Wu ir kt., 2010). Keletas rūšių buvo išskirta iš gyvūnų (Osorio ir kt., 1999) ir žmonių klinikinių mėginių (kraujo, šlapimo) bei žaizdų (Funke ir kt., 1996; Wauters ir kt., 2000; Huang ir kt., 2005; Mages ir kt., 2008). Šių bakterijų dominavimą lemia atsparumas išdžiūvimui ir badavimui bei mitybos įvairiapusiškumas, kurį lemia sugebėjimas skaidyti natūralius ar sintetinius aromatinius ir heterociklinius junginius (Jones ir Keddie, 2006).

Pastaruoju metu tiek mezofilinių, tiek psichrofilinių *Arthrobacter* spp. bakterijų metaboliniai keliai yra intensyviai tiriami. Ieškoma naujų fermentų, kurie galėtų būti pritaikyti įvairių sričių pramonėje ir biotechnologijoje. Nustatyta, kad šių bakterijų genai, koduojantys katabolinių kelių fermentus, yra dažniausiai susitelkę plazmidėse (Pohlenz ir kt., 1992; Hayatsu ir kt., 1999; Chauhan ir kt., 2000; Turnbull ir kt., 2001; Eaton, 2001; Mongodin ir kt., 2006; Igloi ir Brandsch, 2003; Parschat ir kt., 2007; Monnet ir kt., 2010). Šiuo metu yra žinomi genai, koduojantys ftalio rūgšties (Eaton, 2001), nikotino (Igloi ir Brandsch, 2003), herbicidų: atrazino (Sajjaphan ir kt., 2004; Mongodin ir kt., 2006), fenilkarbamato (Pohlenz ir kt., 1992) ir diurono, (Turnbull ir kt., 2001) skaidymo baltymus. Mažiau žinoma apie kitus *Arthrobacter* spp. katabolinius kelius ir juose dalyvaujančius fermentus, pavyzdžiui, piridino ir jo metilintų bei hidroksilintų darinių skaidymą.

Šiuo metu *Arthrobacter* spp. genų ir jų koduojamų baltymų tyrimą apsunkina tai, kad dažnai šios genties bakterijų baltymai, susintetinti *Escherichia coli* ląstelėse, yra neaktyvūs. Esamos problemos sprendimą palengvintų hibridiniai vektoriai, kurie patikimai veiktų *Arthrobacter* genties bakterijose.

Tokių vektorių konstravimui būtų labai naudingi mažųjų šios genties plazmidžių replikonai, tačiau šiuo metu yra žinomos tik trys mažos *Arthrobacter* spp. plazmidės: pA3 (Grosse, 1993), p54 (Miteva ir kt., 2008), pRE117-2 (Monnet ir kt., 2010). Viena iš jų, p54, buvo panaudota pirmo ir kol kas vienintelio hibridinio vektoriaus pSVJ1, turinčio replikoną iš *Arthrobacter* sp., konstravimui (Miteva ir kt., 2008). Žinomi dar du atvejai, kai buvo kuriami vektoriai šios genties bakterijoms, tačiau abu kartus buvo panaudoti replikonai iš kitų *Actinomycetales* bakterijų.

Šio darbo tikslas yra *Arthrobacter* spp. katabolinių ir mažų plazmidžių tyrimas ir hibridinių vektorių konstravimas.

Darbo uždaviniai:

- Nustatyti *Arthrobacter* sp. 68b kamieno bakterijose aptiktų didelės molekulinės masės plazmidžių lemiamą fenotipą;
- Ištirti ftalio rūgšties skaidymo kelią;
- Ištirti 2-metilpiridino ir piridino skaidymo kelią;
- Nustatyti genų, koduojančių 2-hidroksipiridino skaidymo baltymus, vietą *Arthrobacter rhombi* PRH1 ir VP3 bakterijų genome;
- Ištirti *A. rhombi* PRH1 ir VP3 mažąsias plazmidės;
- Konstruoti hibridinius vektorius panaudojant *Arthrobacter* spp. plazmidės/(-džių) replikoną/(-us).

Mokslinis naujumas:

Šio darbo metu buvo nustatyta, kad *Arthrobacter* sp. 68b kamienas, sugebantis skaidyti ftalio rūgštį, 2-metilpiridiną, piridiną ir nikotiną, turi bent dvi didelės molekulinės masės katabolines plazmidės. Atlikus minėto kamieno

ir jo mutantų, praradusių gebėjimą skaidyti išvardytus cheminius junginius, DNR analizę buvo nustatyta, kad *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose ftalio rūgšties, 2-metilpiridino ir piridino skaidymo baltymus koduojantys genai yra vienoje beveik 113 kb p2MP plazmidėje, nikotino – kitoje pNIC_68b plazmidėje.

Arthrobacter sp. 68b bakterijose 2-metilpiridino ir piridino skaidymas yra indukuojamas procesas. Abiem atvejais yra indukuojamas baltymas – hipotetinė monooksigenazė, kuri struktūriškai yra panašiausia į *Rhodococcus pyridinovorans* AK37 hipotetinę monooksigenazę, priklausančią liuciferazių šeimai.

Nustatyta, kad tiriamo kamieno bakterijos skaido ftalio rūgštį 3,4-dioksigenazės keliu, kuris yra būdingas Gram-teigiamoms bakterijoms. Šios bakterijos taip pat gali paversti chinolino rūgštį į hidroksilintą produktą. Anksčiau tokia savybė buvo nustatyta tik bakterijose, kurios ftalio rūgštį skaidė 4,5-dioksigenazės keliu.

2-Hidroksipiridiną skaidančiose *Arthrobacter rhombi* PRH1 ir VP3 bakterijose buvo aptikta po vieną didelės molekulinės masės plazmidę ir po vieną plazmidę, mažesnę nei 10 kb. Tyrimai parodė, kad PRH1 kamieno bakterijose 2-hidroksipiridino skaidymo genai yra didžiojoje plazmidėje. Nustatytos abiejų kamienų mažųjų plazmidžių nukleotidų sekos, aptikti atviri skaitymo rėmeliai ir įvardyti jų koduojami baltymai. Atlikus tyrimus, paaiškėjo, kad PRH1 kamieno plazmidės minimalus replikonas yra sudarytas iš *repAB* genų. Remiantis replikacijos baltymų homologija, minimalaus replikono sandara ir *ori* sekos panašumu, buvo padaryta išvada, kad minėto kamieno plazmidė priklauso teta tipo replikacijos Cole2 šeimos pAL5000 pošeimiui.

Naudojant PRH1 plazmidės minimalų replikoną, buvo sukonstruoti hibridiniai vektoriai pRMU824, pRMU824Km ir pRMU824Tc, kurie sėkmingai replikuojasi *Arthrobacter* spp., *Rhodococcus* spp. ir *Escherichia coli* DH5α kamienuose.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

- *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose genai, koduojantys piridino, 2-metilpiridino, nikotino ir ftalio rūgšties skaidymo baltymus, yra išsidėstę katabolinėse plazmidėse.
- *Arthrobacter* sp. 68b ftalio rūgštį skaido 3,4-dioksigenazės keliu ir sugeba hidroksilinti chinolino rūgštį.
- *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose 2-metilpiridino ir piridino skaidyme dalyvauja indukuojama monooksigenazė.
- *Arthrobacter rhombi* PRH1 kamieno bakterijose 2-hidroksipiridino biodegradacijos genai yra katabolinėje plazmidėje.
- *Arthrobacter rhombi* PRH1 bakterijų mažosios plazmidės pPRH minimalus replikonas yra *repAB*, ji replikuojasi teta būdu.
- Sukonstruoti hibridiniai vektoriai pRMU824, pRMU824Km ir pRMU824Tc sėkmingai replikuojasi *Arthrobacter* spp., *Rhodococcus* spp. ir *Escherichia coli* DH5a kamienuose ir gali būti panaudojami funkinei genų atrankai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *Arthrobacter* genties charakteristika

Arthrobacter yra Gram-teigiamos bakterijos, kurių chromosominės DNR GC nukleotidai sudaro 59–66 % (Jones ir Keddie, 2006). Šios genties bakterijos priklauso *Actinomycetales* eilės *Micrococcaceae* šeimai (Stackebrandt ir Schumann, 2006; Zhi ir kt., 2009). Ją sudaro *Micrococcus*, *Acaricomes*, *Arthrobacter*, *Citricoccus*, *Kocuria*, *Nesterenkonnia*, *Renibacterium*, *Rothia* ir *Zhihengliuella* gentys (Zhi ir kt., 2009). Šios šeimos bakterijoms yra būdingas L-lizinas peptidoglikano sluoksnyje ir izo- ir anteizo-šakotų ląstelės riebalų rūgščių dominavimas, tačiau jos tarpusavyje labai skiriasi tarpeptidinių tiltelių, menachinono ir polinių lipidų struktūra (Stackebrandt ir Schumann, 2006).

Remiantis peptidoglikano sandara, *Arthrobacter* genties bakterijos yra suskirstytos į dvi grupes. *A. globiformis/A. citreus* grupės bakterijos turi A3 α tipo peptidoglikaną, kurio tarpeptidiniai tilteliai yra sudaryti iš L-aminorūgščių arba glicino, arba abiejų kartu. *A. nicotianae* grupės bakterijoms būdingas A4 α tipo peptidoglikanas, kuriame tarpeptidiniai tilteliai yra sudaryti iš dikarboksilintų aminorūgščių (Stackebrandt ir Schumann, 2006).

Arthrobacter spp. bakterijos yra aerobai arba fakultatyviniai anaerobai. Jaunose kultūrose ląstelės yra lazdelės formos, vėliau jos tampa kokoidinėmis. Šios bakterijos yra nejudrios, sudaro apvalias arba netaisyklingų formų kolonijas. Optimali augimo temperatūra yra 25–30 °C, tačiau daugelis gali augti 10–35 °C temperatūroje, daug rūšių auga ir 5 °C, o kelios rūšys gali augti ir 37 °C temperatūroje. Kai kurios psichrofilinės rūšys gali dalintis esant - 5–20 °C temperatūrai (Jones ir Keddie, 2006).

Arthrobacter genties bakterijos dažniausiai aptinkamos dirvožemyje. Įvairiose pasaulio vietose jos sudaro didžiąją dalį kultivuojamų dirvos bakterijų

(Jones ir Keddie, 2006). Jų dominavimą lemia ypač didelis atsparumas išdžiūvimui ir badavimui. Žinoma, įtakos turi ir mitybos įvairiapusiškumas (Jones ir Keddie, 2006). Gounot (1967) aprašė pirmąsias psichrofilines *Arthrobacter* spp. rūšis, išskirtas iš ledynų. Per paskutinius 15 metų, tyrinėjant ledynų mikroflorą, šios genties bakterijos buvo išskirtos iš aukštikalnių ir jūrų ledynų arktyje ir antarktyje (Bowman ir kt., 1997; Lonhienne ir kt., 2001; Margesin ir kt., 2004; Miteva ir kt., 2008; Salwan ir kt., 2010; Hinsla-Leasure ir kt., 2010; Lee ir kt., 2011). Nustatyta, kad tirtuose mėginiuose *Arthrobacter* spp. bakterijos sudarė didžiąją mikroorganizmų dalį (Hinsla-Leasure ir kt., 2010; Lee ir kt., 2011). Šios genties bakterijų taip pat aptinkama nutekamųjų vandenų nuosėdose ir dumble (Bieszkiewicz ir kt., 1995; Kampfer ir kt., 1996; Kim ir kt., 2008; Li ir kt., 2008; Molokwane ir kt., 2008; Wu ir kt., 2010). Kai kurios šios genties rūšys buvo aptiktos gyvūnų vidaus organuose (Osorio ir kt., 1999) ir žmonių klinikiniuose mėginiuose (kraujo, šlapimo) bei žaizdose (Funke ir kt., 1996; Wauters ir kt., 2000; Huang ir kt., 2005; Mages ir kt., 2008), todėl kai kurios *Arthrobacter* sp. rūšys yra laikomos oportunistiniais patogenais (Huang ir kt., 2005).

Arthrobacter genties bakterijos gali panaudoti daugelį organinių junginių, tarp jų D-gliukozę, D-fruktozę, D-ksilozę, sacharozę, maltozę, acetatą, sukcinatą, L-malatą, citratą, gliukonatą, etanolį, propanolį, glicerolį kaip vienintelį anglies šaltinį, bet negali skaidyti D-manozės, D-galaktozės, sorbozės, L-arabinozės, celobiozės, piruvato, malonatų. Jos hidrolizuoja želatiną ir kazeiną, nitratai verčia nitritu (Jones ir Keddie, 2006).

Tyrimais nustatyta, kad *Arthrobacter* spp. bakterijos gali skaidyti ir panaudoti kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį aromatinius (ftalio rūgštį, fenantreną) (Eaton, 2001; Kallimanis ir kt., 2009) bei heterociklinius (nikotiną, piridiną ir jo darinius, chinaldiną) junginius (Brandsch ir kt., 1986; Shukla, 1974; Kolenbrander ir Weinberger, 1977; Zefirov ir kt., 1994; O'Loughlin ir kt., 1999; Seménaitė ir kt., 2003; Overhage ir kt., 2005; Parschat ir kt., 2007; Khasaeva ir kt., 2011a; Khasaeva ir kt., 2011b), taip pat gali skaidyti įvairių rūšių pesticidus: herbicidus (atraziną, diuroną, fenilkarbamatai) (Pohlenz ir kt.,

1992; Turnbull ir kt., 2001; Rousseaux ir kt., 2002; Sajjaphan ir kt., 2004; Aislabie ir kt., 2005; Mongodin ir kt., 2006), insekticidus (karbarilą) (Hayatsu ir kt., 1999) ir fungicidus (*p*-nitrofenolį) (Hanne ir kt., 1993; Chauhan ir Jain, 2000; Chauhan ir kt., 2000).

Kadangi *Arthrobacter* genties bakterijos dominuoja įvairių tipų skirtingų geografinių vietų dirvožemyje bei sugeba skaidyti įvairius natūralius ar sintetinius cheminius junginius, taip pat ir pesticidus (Jones ir Keddie, 2006), todėl jas būtų galima panaudoti užteršto dirvožemio, nutekamųjų vandenų valymui ir pavojingų atliekų nukenksminimui (Li ir kt., 2008). Šioms bakterijoms yra būdinga mitybinė įvairovė, todėl yra įdomūs jų gaminami fermentai. Jie galėtų būti naudojami cheminių junginių, sunkiai gaunamų žinomais organinės chemijos metodais, sintezėje. Kai kurios *Arthrobacter* spp. rūšys gali gaminti eritromiciną, gliukozės izomerazę (Shaw ir Hartley, 1988), biologinės kilmės detergentus (Morikawa ir kt., 1994), augalų hormonus ar riboflaviną (Jones ir Keddie, 2006).

Psichrofilinių rūšių fermentai dėl savo išskirtinių savybių sulaukė didelio dėmesio, nes gali būti panaudoti biotechnologinių procesų kūrimui. Proteazės gali būti pritaikomos pieno, odos ir farmacijos pramonėje. Šarminių proteazių turinčios psichrofilinės bakterijos gali būti naudojamos pramoninių ir buitinių organinių atliekų, kuriose daug baltymų, nukenksminimui (Salwan ir kt., 2010). Psichrofilinių bakterijų fermentų didžiausias aktyvumas yra žemoje temperatūroje (Lonhienne ir kt., 2001; Salwan ir kt., 2010), todėl, vykdamas reakcijas, sutaupoma energijos, o tai teikia ekonominę naudą. Be to, esant būtinybei, fermentai gali būti lengvai termiškai inaktyvuojami (Salwan ir kt., 2010).

Arthrobacter spp. bakterijų fermentai galėtų būti naudingi įvairių sričių pramonėje ir biotechnologijoje. Deja, jie nėra plačiai naudojami, nes daugelis šios genties baltymų yra neaktyvūs *Escherichia coli* ląstelėse. Todėl hibridiniai vektoriai, kurie patikimai veiktų *Arthrobacter* spp. bakterijose, palengvintų šios problemos sprendimą.

Literatūros apžvalgoje yra aprašytos *Arthrobacter* spp. bakterijų didelės (katabolinės) ir mažosios plazmidės, šioms bakterijoms sukurti hibridiniai vektoriai. Taip pat pateikiami heterociklinių (piridino ir jo darinių) ir aromatinių (ftalio rūgšties) junginių, kuriuos sugeba skaidyti minėtos genties bakterijos, degradacijos keliai.

1.2. Plazmidžių charakteristika

Plazmidės yra dvigrandinės DNR molekulės, kurios sugeba savarankiškai replikuotis (Couturier ir kt., 1988, Dennis, 2005). Dažniausiai jos būna žiedinės struktūros, tačiau vis daugiau aptinkama ir linijinių (Hayes, 2003). Plazmidžių dydis būna nuo dviejų (savarankiškai besireplikuojantys elementai) iki kelių šimtų ar tūkstančių (megaplazmidės) kilobazių. Paprastai didelių plazmidžių kopijų skaičius ląstelėje yra stabilus – viena ar dvi kopijos, o mažųjų gali būti dešimtys ar net šimtai kopijų, tenkančių vienai chromosomai (Hayes, 2003; Miljkovic-Selimovic ir kt., 2007).

Daugelis plazmidžių yra apibūdinamos kaip kriptinės, kadangi bakterijai šeimininkei jos nesuteikia jokių pastebimų fenotipinių požymių (Hayes, 2003; Miljkovic-Selimovic ir kt., 2007), tačiau jos gali apsaugoti ląstelę šeimininkę nuo giminingų svetimų plazmidžių patekimo arba gali tapti naujų didesnių plazmidžių pirmtakėmis (Hayes, 2003). Daugelis kitų plazmidžių bakterijoms suteikia savybių, kurios padeda prisitaikyti ir išgyventi pavojingoje ar pakitusioje aplinkoje (Hayes, 2003), kadangi jose yra genai, lemiantys bakteriocino ir kolicino, antibiotikų, enterotoksinų, chemolizino gamybą, taip pat atsparumą antibiotikams, sunkiesiems metalams (švinui, gyvsidabriui, cinkui) ar UV spinduliavimui (Hayes, 2003; Miljkovic-Selimovic ir kt., 2007). Genai, koduojantys baltymus, kurie dalyvauja įvairių toksinių junginių (aromatinių angliavandenilių, heterociklinių junginių bei jų darinių) skaidyme, taip pat paprastai yra susitelkę plazmidėse (Hayes, 2003). Žinoma, kad plazmidės turi genus, reikalingus jų funkcionavimui ir padalijimui

ląstelėse. Šių genų produktai dalyvauja replikacijoje, konjugacijoje ir užtikrina plazmidžių stabilumą (Miljkovic-Selimovic ir kt., 2007).

Plazmidės tarp bakterijų gali plisti horizontalaus genų perdavimo būdu vykstant konjugacijai ar transdukcijai (Dennis, 2005; Miljkovic-Selimovic ir kt., 2007). Atskiroms plazmidžių dalims ar genams padeda išplisti mobilūs genomo elementai: transpozonai, integronai, įterptinės sekos (IS, *angl.* insertion sequence), genominės salelės ir integruoti konjugaciniai elementai. Mobilūs genomo elementai supa daugelį operonų, kuriuose yra genai, koduojantys cheminių junginių skaidymo baltymus ar lemiantys atsparumą antibiotikams, sunkiesiems metalams, radiacijai (Dennis, 2005; Vedler, 2009).

Katabolinės plazmidės turi genus, kurie koduoja cheminių junginių skaidyme dalyvaujančius fermentus. Paprastai tokios plazmidės yra didelės (nuo 50 kb iki 1 ar daugiau Mb) ir mažakopijinės. Šių plazmidžių dydį lemia tai, kad jose yra genai, reikalingi replikacijai ir perdavimui dukterinėms ląstelėms, taip pat kataboliniai genai ar operonai, reikalingi pilnai cheminių junginių degradacijai, be to, jose gausu transpozonų ar IS elementų (Dennis, 2005; Vedler, 2009).

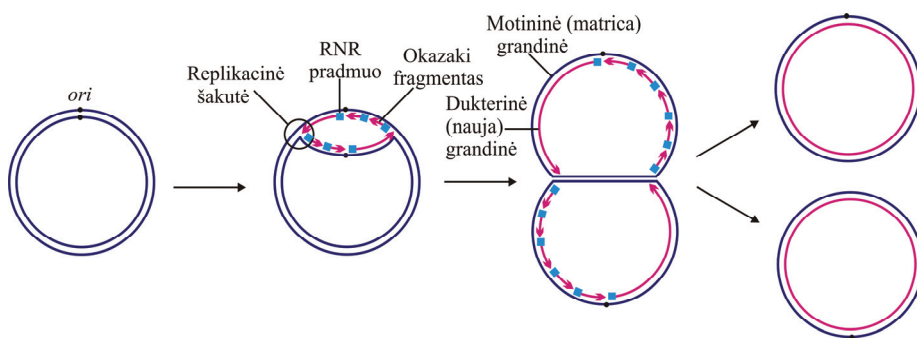
1.2.1. Plazmidžių replikacijos tipai

Plazmidės, kaip ir chromosomos, replikuojausi ląstelės ciklo metu, kad abi dukterinės ląstelės gautų bent po vieną plazmidės kopiją. Didelės plazmidės dažnai turi daugybę replikonų, išsibarsčiusių skirtingose plazmidės vietose, arba koduoja skirtingus replikacijos baltymus. Skirtingi plazmidės replikacijos mechanizmai užtikrina jos funkcionavimą kelių tipų bakterijose (Hayes, 2003).

Daugeliui mažų (<10 kb) žiedinių plazmidžių būdingi trys pagrindiniai replikacijos tipai: teta, riedančio rato ir grandinės išstūmimo. Plazmidėse yra genai arba sritys, dalyvaujančios replikacijoje ir jos kontrolėje. DNR

replikacija prasideda nuo pradžios srities *ori* (nuo *angl.* origin), kuri yra tipiška kiekvienam replikonui (Del Solar ir kt., 1998).

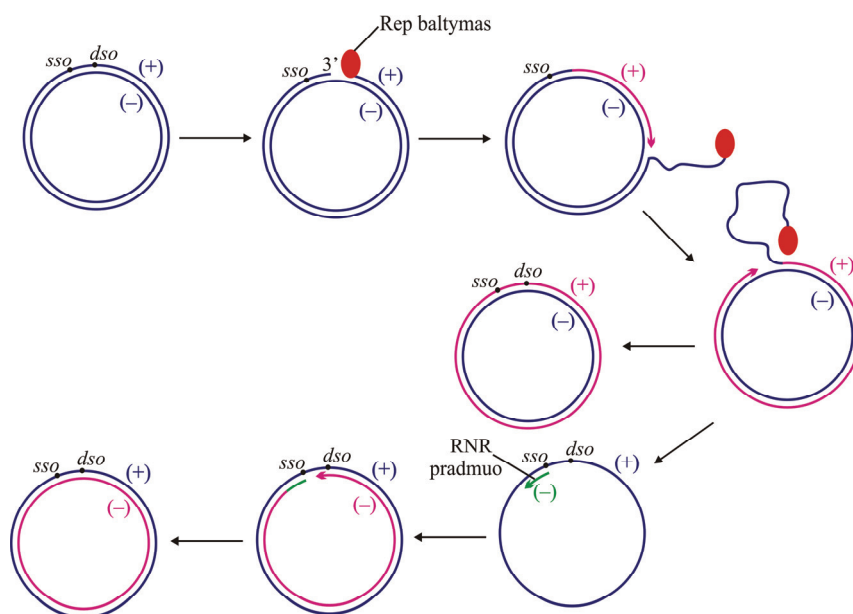
Teta replikacija yra būdinga ir Gram-neigiamų, ir Gram-teigiamų bakterijų plazmidėms. Vykstant teta tipo replikacijai, yra išskiriamos motininės DNR grandinės, susintetinamas RNR pradmuo ir, jį prijungus, inicijuojama DNR sintezė. Vienoje iš grandinių (pirmaujančioje) DNR sintezė yra nenutrūkstanti, kitoje (atsiliekančioje) nutrūkstanti (1.1 pav.). DNR sintezė gali prasidėti nuo vienos ar kelių *ori* sričių, replikacija gali būti vienakryptė arba dvikryptė (Del Solar ir kt., 1998).



1.1 pav. Teta tipo replikacijos schema (remiantis Rocha, 2004; Campbell ir Reece, 2008).

Riedančio rato replikacijos mechanizmas lemia DNR sintezę viena kryptimi. Šis procesas laikomas asimetriniu, kadangi pirmaujančiosios ir atsiliekančiosios grandinių sintezė yra atskirta. Vienas svarbiausių šio replikacijos tipo požymių yra tas, kad naujai susintetinta pirmaujančioji (plius) grandinė lieka susijungusi su ta pačia motinine plus grandine (Del Solar ir kt., 1998). Riedančio rato būdu replikuojasi ir Gram-teigiamų, ir Gram-neigiamų bakterijų plazmidės (Khan, 1997; Del Solar ir kt., 1998). Plazmidės pirmaujančios grandinės replikacija prasideda nuo dvigrandinės DNR *ori* (DSO; *angl.* double-strand ori) ir vyksta viena kryptimi. Pilnai funkcionuojantis DSO yra sudarytas iš mažiau nei 100 bp. Replikacijos baltymams prisijungus prie DSO, susiformuoja kryžiaus pavidalo struktūros. Atsiliekančiosios grandinės replikacija prasideda nuo viengrandinės DNR *ori*

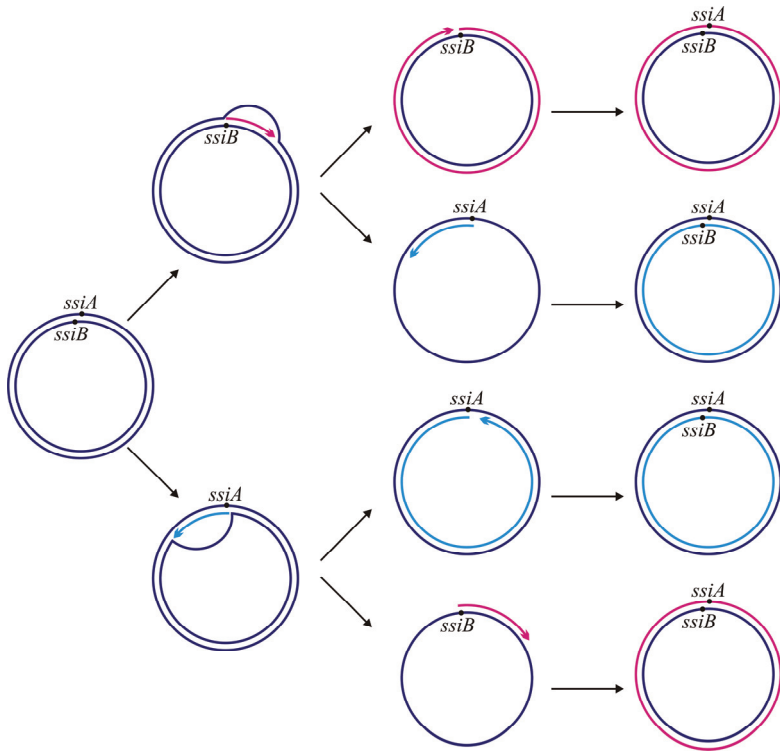
(SSO; *angl.* single strand *ori*), kuri dažniausiai yra netoli DSO. Šios grandinės sintezėje dalyvauja tik ląstelės šeimininkės baltymai. RNR polimerazė prisijungia prie SSO ir susintetina maždaug 20 nt RNR pradmenį. Tuomet DNR polimerazė I pradeda DNR sintezę, kurią vėliau tęsia DNR polimerazė III (1.2 pav.) (Khan, 1997). SSO funkcionuoja tik viengrandinės DNR būsenoje, taigi atsiliekančios grandinės replikacija nėra inicijuojama tol, kol pirmaujančioji grandinė nėra pilnai susintetinta. Ląstelėje esanti viengrandinė plazmidinė DNR įrodo, kad plazmidė replikuojasi riedančio rato mechanizmu (Khan, 1997).



1.2 pav. Riedančio rato replikacijos schema (pagal Espinosa ir kt., 1995)

Grandinės išstūmimo replikacijoje dalyvauja *ori*, trys plazmidės koduojami replikacijos baltymai: RepA, RepB, RepC, ir DNR Pol III bei SSB. Minimalų *ori* regioną sudaro trys tapatūs 20 bp iteronai ir 174 bp sritis, kurioje yra GC-turtingas ir AT-turtingas segmentai, taip pat dvi mažos palindrominės sekos, kuriose yra *ssiA* ir *ssiB* sritys, išsidėsčiusios priešingose grandinėse. Pirmoje replikacijos stadijoje RepC prisijungia prie *ori* iteronų, RepA helikazė prie abiejų grandinių AT-turtingų regionų, tuomet duplexas išsilydo ir

aktyvuojamos *ssi* sritys (jose iniciacija gali vykti nepriklausomai). Jas atpažįsta RepB praimazė ir pradeda nenutrūkstamą sintezę, RepA helikazė išstumia nereplikuojamą motininę grandinę, kuri sudaro D kilpą (1.3 pav.).



1.3 pav. Grandinės išstūmimo replikacijos schema (remiantis Scherzinger ir kt., 1991; Brown, 2002).

Grandinės išstūmimo replikacijos galutiniai produktai yra viengrandiniai žiedai ir dvigrandiniai superspiralizuoti žiedai. Viengrandinės DNR molekulės gali atitikti bet kurią DNR grandinę ir turėti arba *ssiA*, arba *ssiB* sekas. Jos yra naudojamos komplementarios grandinės sintezės iniciacijai, tuomet gaunami dvigrandiniai superspiralizuoti žiedai (Del Solar ir kt., 1998).

1.2.2. Plazmidžių (ne)stabilumas ir (ne)suderinamumas

Plazmidžių stabilumas yra dviejų tipų: struktūrinis ir išskyrimo (segregacinis). Delecijos, insercijos, rekombinacija ar kiti veiksniai, susiję su DNR, būna dažniausia struktūrinio nestabilumo priežastimi. Išskyrimo (segregacinį) nestabilumą lemia nevienodas plazmidžių paskirstymas ląstelės dalijimosi metu. Plazmidžių stabilumui įtakos turi genetiniai (plazmidės kopijų skaičius, ląstelės šeimininkės savybės) ir aplinkos (mitybinė aplinka, temperatūra, deguonies kiekis) veiksniai (Zhang ir kt., 1996).

Vienas svarbiausių veiksnių yra kopijų skaičiaus kontrolė. Gamtinės plazmidės turi tokios kontrolės sistemą, kuri užtikrina, kad kiekvienos plazmidės replikacija vyktų bent kartą ląstelės ciklo metu. Daugiakopijinės plazmidės dažniausiai būna palyginti mažos ir, manoma, kad jų stabilumas priklauso nuo atsitiktinio kopijų pasiskirstymo ląstelės dalijimosi metu. Deja, ne visos daugiakopijinės plazmidės yra tokios stabilios, kaip galima būtų tikėtis. Jų nestabilumą lemia kopijų skaičių mažinantys veiksniai: nevienodas plazmidžių kopijų skaičius atskirose ląstelėse, plazmidžių telkiniai (Ebersbach ir Gerdes, 2005) arba plazmidžių multimerizacija vykstant homologinei rekombinacijai. Taigi, daugelis gamtinių plazmidžių turi vietai savitas skaidymo sistemas, kurios plazmidžių multimerus suskaido į monomerus (Ebersbach ir Gerdes, 2005; Bahl ir kt., 2009).

Mažakopijinės plazmidės suteikia ląstelei šeimininkei mažesnę metabolinę naštą, nors ir yra didesnės už daugiakopijines. Mažakopijinių plazmidžių stabilumo negali užtikrinti atsitiktinis kopijų paskirstymas (Ebersbach ir Gerdes, 2005). Todėl šios plazmidės turi padalijimo sistemą (Ebersbach ir Gerdes, 2005; Bahl ir kt., 2009), kurią sudaro genų *parA* ir *parB* koduojami baltymai. Šie baltymai, sąveikaudami tarpusavyje ir su DNR, sudaro nukleoproteininį kompleksą, kuris veikia kaip į centromerą panašus elementas ir prieš dalijimąsi paskirsto plazmidinės DNR kopijas dukterinėms ląstelėms (Bahl ir kt., 2009). Be to, daugelis mažakopijinių plazmidžių turi dar vieną efektyvų stabilumo mechanizmą – žudymo po pasidalijimo sistemą

(Ebersbach ir Gerdes, 2005; Bahl ir kt., 2009), dar žinomą kaip toksino–antitoksino sistema (Bahl ir kt., 2009). Ją sudaro bent dviejų genų operonas. Vienas genas koduoja stabilų toksiną, kitas – atitinkamą nestabilų antitoksiną (Bahl ir kt., 2009). Žudymo po pasidalijimo sistema lemia plazmidės išlaikymą ląstelėje, nes plazmidės neturinčios ląstelės žūna (Ebersbach ir Gerdes, 2005). Dar vienas plazmidžių stabilumo mechanizmas yra horizontalus plazmidės perdavimas, kuris gali būti įvardinamas kaip reinfekcija po pasidalijimo, kadangi konjugacinės plazmidės gali elgtis kaip parazitiniai DNR elementai ar savanaudiška DNR (Bahl ir kt., 2009).

„Papildomo bagažo“ teorija teigia, kad esant neatrankioms sąlygoms, ląstelės, neturinčios plazmidės, nukonkuruos plazmidės turinčias ląsteles, todėl plazmidės tampa nereikalingos ir yra pametamos (Bahl ir kt., 2009). Be to, kiekviena plazmidė yra papildoma metabolinė našta ląstelei šeimininkei (Zhang ir kt., 1996). Taigi, kad ląstelė šeimininkė kuo ilgiau išlaikytų plazmidę, ji turi teikti ląstelei papildomas funkcijas, lemiančias pranašumą, arba turėti efektyvią sistemą, kuri užtikrintų tikslų kopijų paskirstymą ląstelės dalijimosi metu, arba elgtis kaip parazitinis elementas, plintantis horizontaliu genų perdavimo būdu (Bahl ir kt., 2009).

Plazmidžių nesuderinamumą lemia funkciškai vienodi replikacijos vienetai, kurių neatskiria ląstelės šeimininkės replikacijos ir kopijų padalijimo mechanizmai (Petersen, 2011). Nesuderinamos plazmidės negali stabiliai funkcionuoti toje pačioje ląstelėje, todėl vienas atsitiktinis replikonas išnyksta po daugelio ląstelės pasidalijimų. Nustatyta, kad trys tipinio plazmidinio replikono elementai: *cop*, *rep/ori*, *par*, lemia plazmidžių nesuderinamumą (Novick, 1987). Esant replikaciniam nesuderinamumui, vienos plazmidės replikaciją reguliuojantys veiksniai (iteronai, antiprasminė RNR ir kiti) gali daryti įtaką ir kitos plazmidės replikacijai. Padalijimo nesuderinamumas yra siejamas su plazmidžių, turinčių vienodą į centromerą panašų elementą, abipusiu nestabilumu. Tokios plazmidės varžosi dėl ribotų savitų prisijungimo vietų dukterinėse ląstelėse. Likusios neprisijungusios plazmidės atsitiktinai išsibarsto ir dažnai yra prarandamos. Šio tipo nesuderinamumą taip pat gali

lemti vieno ar kito padalijimo baltymo (ParA arba ParB) perteklius (Bouet ir kt., 2007). Visos plazmidės yra skirstomos į nesuderinamumo grupes.

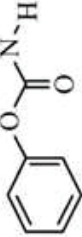
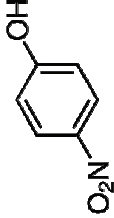
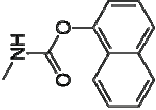
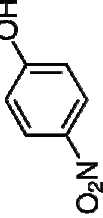
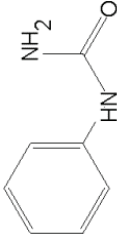
Plazmidės, turinčios suderinamus replikonus ir skirtingus genetinius žymenis, gali būti naudojamos kelių baltymų raiškai toje pačioje ląstelėje. Tai puikus genetinis įrankis, palengvinantis baltymo-baltymo sąveikos, daugybinių kompleksų susirinkimo tyrimus, biocheminių kelių analizę (Novy ir kt., 2002).

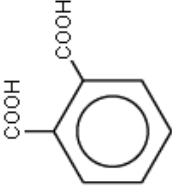
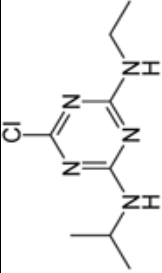
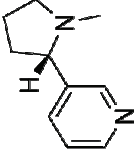
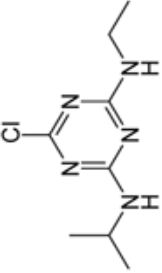
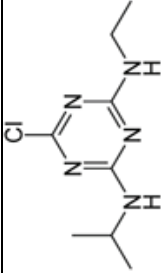
1.3 *Arthrobacter* genties bakterijų plazmidės

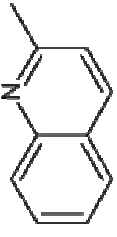
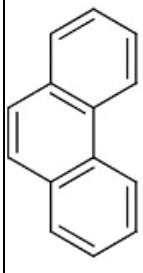
Arthrobacter spp. bakterijos yra intensyviai tiriamos, kadangi gali skaidyti įvairius aromatinius, heterociklinius junginius, taip pat ir pesticidus. Tyrimais nustatyta, kad daugelis rūšių turi katabolines plazmides (lentelė 1.2), kuriose yra minėtų cheminių junginių skaidymo genai. Aptiktų plazmidžių genetinio ištyrimo lygis skiriasi. Anksčiausiai aprašytoms plazmidėms yra priskirta tik tam tikrų junginių skaidymo funkcija. Vėliau tiriant plazmides, buvo nustatomos plazmidžių fragmentų, kuriuose yra skaidymo genai, ar atskirų genų nukleotidų sekos. Paskutiniu metu literatūroje pasirodo vis daugiau duomenų apie pilnai nustatytas *Arthrobacter* spp. bakterijų plazmidžių (pAO1 (*A. nicotinovorans*), pAL1 (*A. nitroguajacolicus* Rü61a), pSI-1 (*Arthrobacter* sp. AK-1), pFB24-104 ir pFB24-105 bei pFB24-136 (*Arthrobacter* sp. FB24), pChr15 (*Arthrobacter* sp. Chr15)) ir genomų (*A. aurescens* TC1, *A. arilaitensis* Re117, *A. phenanthrenivorans* Sphe3) sekas. Tolesniuose skyreliuose žinomos *Arthrobacter* genties plazmidės, pradėdant nuo anksčiausiai aprašytų literatūroje, bus nagrinėjamos smulkiau. Bakterijų plazmidės, lemiančios to paties junginio skaidymą, bus minimos bendrame skyrelyje. Verta paminėti, kad kol kas nėra nustatytas nei vienos katabolinės plazmidės replikacijos tipas.

Informacijos apie mažas *Arthrobacter* spp. plazmides (lentelė 1.1) literatūroje nėra daug. Šiuo metu yra žinomos tik trys plazmidės: pA3, p54, pRE117-2. Jos taip pat bus aptariamoms atskirame skyrelyje.

Lentelė 1.1. *Arthrobacter* spp. plazmidės.

Kamienas	Plazmidės	Plazmidžių dydžiai, kb	Sekų ištyrimo lygis	Plazmidės suteikiamas fenotipas	Šaltinis
Katabolinės plazmidės					
<i>A. oxydans</i> P52	pHP52	41	nustatyta fenilkarbamato hidrolazės geno seka	fenilkarbamato (3-metoksikarbonil-aminofenil 3'-metilkarbanilatas) skaidymas 	Pohlenz ir kt., 1992
<i>A. aureescens</i> TW17	dvi plazmidės		sekos nenustatytos	<i>p</i> -nitrofenolio skaidymas 	Hanne ir kt., 1993
<i>Arthrobacter</i> sp. RC100	pRC1 pRC2 pRC3	110 120 130	sekos nenustatytos	karbarilo (1-naftilo metilkarbamatas) skaidymas 	Hayatsu ir kt., 1999
<i>A. protophormiae</i> RKJ100		65	sekos nenustatytos	<i>p</i> -nitrofenolio skaidymas 	Chauhan ir kt., 2000
<i>A. globiformis</i> D47	pHRIM620 pHRIM621	47 35	nustatyta fenilurėjos hidrolazės geno seka	fenilurėjos (fenilkarbamidas) skaidymas 	Tumbull ir kt., 2001

<i>A. keyseri</i> 12B	pRE1 pRE2 pRE3	130 80 70	nustatyta pRE1 fragmento seka	ftalio rūgštis (benzeno-1,2- dikarboksirūgštis) skaidymas		Eaton, 2001
<i>A. crystallopoietes</i> Cit2, Dij1, Ep1		426 182 117	sekos nenustatytos	atrazino (2-chloro-4- etilamino-6- izopropilamino- 1,3,5-triazinas) skaidymas		Rousseaux ir kt., 2002
<i>A. nicotinovorans</i>	pAO1	165,137	nustatyta plazmidės seka	nikotino (3-[(2S)-1- metilpirolidin-2- il]piridinas) skaidymas		Igloi, Brandsch, 2003
<i>A. aurescens</i> TC1	pTC1 (pAA1) pTC2 (pAA2)	408,237 300,725	nustatytos chromosomos ir plazmidžių sekos	atrazino (2-chloro-4- etilamino-6- izopropilamino- 1,3,5-triazinas) skaidymas		Sajaphan ir kt., 2004; Mongodin ir kt., 2006
<i>A. nicotinovorans</i> HIM		96 53	sekos nenustatytos	atrazino (2-chloro-4- etilamino-6- izopropilamino- 1,3,5-triazinas) skaidymas		Aislabie ir kt., 2005

<i>A. nitroguajacolicus</i> Rü61a	pAL1	112,992	nustatyta plazmidės seka	chinaldino (2-metilchinalinas) skaidymas 	Overhage ir kt., 2005; Parschat ir kt., 2007
<i>Arthrobacter</i> sp. AK1	pSI-1	99,213	nustatyta plazmidės seka	atsparumas sunkiesiems metalams	Jerke ir kt., 2008
<i>Arthrobacter</i> sp. FB24	pFB24-104 pFB24-105 pFB24-106	96,488 115,507 159,538	nustatytos chromosomos ir plazmidžių sekos	visos plazmidės lemia atsparumą sunkiesiems metalams	Jerke ir kt., 2008
<i>Arthrobacter</i> sp. Chr15	pChr15	49,633	nustatyta plazmidės seka	atsparumas sunkiesiems metalams	Jerke ir kt., 2008
<i>A. arilaitensis</i> Re117	pRE117-1 pRE117-2	50,407 8,528	nustatytos chromosomos ir plazmidžių sekos	nenustatytas	Monnet ir kt., 2010
<i>A. phenanthrenivorans</i> Sphe3	pASPHE301 pASPHE302	190,450 94,456	nustatytos chromosomos ir plazmidžių sekos	fenantreno skaidymas 	Kallimanis ir kt., 2011
Mažosios plazmidės					
<i>Arthrobacter</i> sp.	pA3	2,205	nustatyta plazmidės seka	nenustatytas	Grosse, 1993
<i>A. agilis</i> GIC54	p54	1,950	nustatyta plazmidės seka	nenustatytas	Miteva ir kt., 2008

1.3.1. *Arthrobacter* spp. katabolinės plazmidės

1.3.1.1. *Arthrobacter oxydans* P52 plazmidė

A. oxydans P52 kamienas, išskirtas iš dirvos, sugeba skaidyti fenilkarbamato (3-metoksikarbonil-aminofenil-3-metilkarbonilatas) herbicidus (fenmedifamą ir desmedifamą) hidrolizuodamas jų centrinį karbamatinį ryšį. Nustatyta, kad šių junginių degradacijoje dalyvauja fermentas fenilkarbamato hidrolazė (fenmedifamo hidrolazė) (Pohlenz ir kt., 1992). Šį fermentą koduoja *pcd* genas, esantis 41 kb dydžio pHP52 plazmidėje. Geno tyrimams 3,3 kb plazmidės fragmentas buvo klonuotas į pUC19 vektorių. Šiame fragmente buvo nustatyta 1867 bp seka bei joje nustatytas vienas atviras skaitymo rėmelis (*asr*), koduojantis 55 kDa molekulinės masės baltymą (Pohlenz ir kt., 1992).

Fermentas yra labai specifiškas substratui. Difenilkarbamatai, fenmedifamas ir desmedifamas yra hidrolizuojami panašiu greičiu, tuo tarpu fenizofamo (prie karbamato azoto prijungta papildoma alkilo grupė) hidrolizės greitis yra labai mažas. Chlorprofamas (prie karbamato grupės prijungtos arilo ir alkilo liekanos) hidrolizuojamas apie 100 kartų lėčiau nei fenmedifamas. Karbamato hidrolazė neatakuoja herbicido diurono (*N*-(3,4-dichlorofenil)-*N,N*-dimetil urėjos) (Pohlenz ir kt., 1992).

1.3.1.2. *Arthrobacter* spp. rūšių, degraduojančių *p*-nitrofenolį, plazmidės

Hanne ir kt. išskyrė keletą *Actinomycetales* eilės bakterijų, sugebančių skaidyti *p*-nitrofenolį (Hanne ir kt., 1993). Iš *Arthrobacter aurescens* TW17 kamieno ląstelių buvo išskirtos dvi didelės plazmidės. Nustatyta, kad bakterijos, turinčios abi plazmides, gali skaidyti *p*-nitrofenolį, o netekusios šios savybės bakterijos yra praradusios didesniąją plazmidę. Tai įrodo, kad joje yra genai, koduojantys *p*-nitrofenolio skaidymo baltymus (Hanne ir kt., 1993).

A. aurescens TW17 sugeba degraduoti nitrofenolius, turinčius nitro grupę ne tik *para*, bet ir *meta* padėtyje, taip pat 4-nitrokatecholį ir 3-metil-4-nitrofenolį. Kamienai, išgydyti nuo plazmidžių, nesugebėjo skaidyti nei vieno iš šių junginių. Degradacijoje dalyvaujantys fermentai yra indukuojami substratu arba į substratą panašiais junginiais (Hanne ir kt., 1993).

Arthrobacter protophormiae RKJ100 kamienas gali skaidyti *o*-nitrobenzoatą (3-nitrobenzoatą) (Chauhan ir Jain, 2000), *p*-nitrofenolį ir 4-nitrokatecholį (4-nitro-benzen-1,2-diolį) (Chauhan ir kt., 2000) kaip vienintelį anglies, azoto ir energijos šaltinį. *o*-Nitrobenzoatas yra skaidomas deguoniui neįtraukiant redukciniu keliu (Chauhan ir Jain, 2000), o kiti du junginiai oksidaciniu keliu (Chauhan ir kt., 2000).

Šio kamieno bakterijos turi 65 kb dydžio plazmidę, kuri koduoja fermentus, dalyvaujančius naujai nustatytame *o*-nitrobenzoato degradacijos kelyje (Chauhan ir Jain, 2000) ir *p*-nitrofenolio bei 4-nitrokatecholio skaidyme (Chauhan ir kt., 2000). Netekęs plazmidės, kamienas praranda sugebėjimą degraduoti visus šiuos junginius (Chauhan ir Jain, 2000; Chauhan ir kt., 2000). Tyrimų rezultatai taip pat parodė, kad *A. protophormiae* RKJ100 bakterijos 65 kb plazmidėje turi atsparumą kobaltui lemiantį geną (Chauhan ir Jain, 2000).

1.3.1.3. *Arthrobacter* sp. RC100 plazmidės

RC100 bakterinis kamienas sugeba panaudoti karbarilą (1-naftilo metilkarbamata) kaip vienintelį anglies šaltinį. Pagal 16S rRNR geno seką šis kamienas yra giminingiausias *Arthrobacter globiformis* (panašumas 96,9%). Nustatyta, kad RC100 kamienas turi tris dideles plazmides: 110, 120 ir 130 kb, jos atitinkamai pavadintos pRC1, pRC2, pRC3 (Hayatsu ir kt., 1999).

Atlikus tyrimus, paaiškėjo, kad pRC1 plazmidėje yra genai, koduojantys karbarilo hidrolizės baltymus. Baltymų, skaidančių 1-naftolį iki 2,5-dihidroksibenzoinės rūgšties, genai, buvo nustatyti plazmidėje pRC2. Bakterijos, praradusios abi šias plazmides, netenka sugebėjimo skaidyti

1-naftilo metilkarbamata ir 1-naftolį, tačiau gali panaudoti 2,5-dihidroksibenzoinę rūgštį kaip vienintelį anglies šaltinį. Tai rodo, kad šios rūgšties skaidymo kelio baltymai yra koduojami chromosomoje. Plazmidžių pRC1 ir pRC2 dalyvavimą atitinkamų medžiagų metabolizme įrodė ir jų perkėlimas konjugacijos būdu. Tuo pačiu buvo įrodyta, kad pilnai karbarilo degradacijai reikia abiejų plazmidžių (Hayatsu ir kt., 1999).

1.3.1.4. *Arthrobacter globiformis* D47 plazmidės

Bakterinis kamienas D47, sugebantis skaidyti herbicidą diuroną (*N*-(3,4-dichlorofenil)-*N,N*-dimetil urėją) buvo išskirtas iš dirvos. Jis priklauso *A. globiformis* rūšiai (Cullington ir Walker, 1999). Šios bakterijos, auginamos minimalioje terpėje, taip pat gali skaidyti kitus herbicidus, turinčius urėjos: izoproturoną, chlortoluroną, linuroną ir monolinuroną. D47 kamieno bakterijose buvo aptiktos dvi plazmidės: pHRIM620 (47 kb) ir pHRIM621 (35 kb). Daugelis genų, koduojančių degradacijos fermentus, buvo priskirti plazmidėms (Turnbull ir kt., 2001).

Bakterijos, sugebančios skaidyti diuroną, turi arba abi, arba didesniąją plazmidę, o bakterijos, praradusios šį sugebėjimą, turi tik mažesniąją arba neturi nei vienos plazmidės. Atlikus DNR sekos analizę, nustatyta, kad fermentą, dalyvaujantį diurono degradacijoje, koduoja 1368 bp dydžio atviras skaitymo rėmelis. Genas, pavadintas *puhA*, koduoja 456 amino rūgščių, apytiksliai 48,9 kDa dydžio baltymą – fenilurėjos hidrolazę, kuri šioje herbicidų grupėje skelia jungtį tarp dviejų anglies atomų (Turnbull ir kt., 2001).

1.3.1.5. *Arthrobacter keyseri* 12B plazmidės

A. keyseri 12B (Keyser, 1974) verčia ftalata (1,2-benzendikarboksi-rūgštį) į 3,4-dihidroksibenzoinę rūgštį (Eaton, 2001). Šio kamieno bakterijos

turi tris plazmides: pRE1 (130 kb), pRE2 (80 kb), pRE3 (70 kb). Norint nustatyti, kurioje plazmidėje yra genai, koduojantys ftalato skaidyme dalyvaujančius baltymus, bakterijos buvo gydomos nuo plazmidžių. Visi kamienai, kurie galėjo skaidyti ftalata, turėjo didžiąją plazmidę pRE1. Buvo nustatyta jos 26274 bp dydžio fragmento nukleotidų seka (Eaton, 2001).

DNR analizė parodė, kad fragmentą sudaro keletas skirtingų genetinių vienetų: *pht* operonas, kuri sudaro genai fermentų, dalyvaujančių ftalato degradacijoje iki 3,4-dihidroksibenzoinės rūgšties; *pcm* operonas, koduojantis minėtos rūgšties skaidymo fermentus; numanomas *ptr* operonas, kuriame yra galimo ftalato, 3,4-dihidroksibenzoinės rūgšties ar ftalato esterio nešiklio genas; galimas ftalato esterio hidrolazės genas, *pehA*; ir transpozono rezolvazės genas, *tnpR* (Eaton, 2001).

A. keyseri 12B kamienas taip pat sugeba transformuoti ir ftalato analogus: 2-trifluorometilbenzoatą, 2-nitrobenzoatą, 2-jodobenzoatą, 2-chlorobenzoatą, 2-bromobenzoatą, 2-acetilbenzoatą, 2-metoksibenzoatą, 2,6-diclorobenzoatą, 2-chloro-6-fluorobenzoatą, monometilftalata ir 2-fluoro-6-jodobenzoatą (Eaton, 2001).

1.3.1.6. *Arthrobacter* spp. kamienų, skaidančių atrazina, plazmidės

Rousseaux ir kt. (2002) išskyrė 25 kamienus, sugebančius skaidyti atrazina (2-chloro-4-etilamino-6-izopropilamino-1,3,5-triazina). Trys (Cit2, Dij1, Ep1) iš jų priklauso *Arthrobacter crystallopoietes* rūšiai. Visi šie kamienai turi po tris plazmides, kurių dydis yra 426, 182 ir 117 kb. Šios bakterijos atrazina verčia į 1,3,5-triazintriolį. *atzBC* genai, koduojantys fermentus, kurie dalyvauja atrazino skaidyme, yra išsidėstę 117 kb dydžio plazmidėje. Nustatyta, kad *A. crystallopoietes* kamienai neturi *atzA* geno, tačiau turi triazino hidrolazės geną – *trzN* (Rousseaux ir kt., 2002).

Kelios mokslininkų grupės: Sajjaphan su bendradarbiais bei Mongodin su bendradarbiais, tyrė *Arthrobacter aurescens* TC1 kamieno bakterijas,

galinčias panaudoti atraziną kaip vienintelį anglies ir azoto šaltinį (Sajjaphan ir kt., 2004; Mongodin ir kt., 2006). Anksčiau buvo nustatyta, kad TC1 kamienas gali metabolizuoti 23 skirtingus *s*-triazino (1,3,5-triazino) junginius (Strong ir kt., 2002). Šis kamienas, veikiant trijų genų (*trzN*, *atzB*, *atzC*) produktams, skaido atraziną iki cianuro rūgšties (1,3,5-triazintriolio), kuri išskiriama į augimo terpę (Sajjaphan ir kt., 2004; Mongodin ir kt., 2006).

Nustatyta, kad TC1 kamienas turi dvi plazmidės: pAA1 ir pAA2, kurių dydis atitinkamai yra 380 ir 290 kb (Sajjaphan ir kt., 2004). Mongodin ir kt. (2006) nustatė TC1 kamieno viso genomo nukleotidų seką. Tuomet paaiškėjo, kad plazmidės pTC1 (pAA1) ir pTC2 (pAA2) atitinkamai yra 328237 ir 300725 bp dydžio. Kadangi pTC1 plazmidė turi šešias tapačias 16 kb pasikartojančio regiono kopijas, tad galutinis plazmidės dydis yra apie 408 kb (Mongodin ir kt., 2006). Abi mokslininkų grupės nepriklausomais tyrimais nustatė, kad genai, koduojantys atrazino skaidymo fermentus, yra didesnėje plazmidėje (Sajjaphan ir kt., 2004; Mongodin ir kt., 2006).

Sajjaphan ir kt. tyrė didesnės plazmidės 161264 nukleotidų dydžio fragmentą. Nustačius jo seką, paaiškėjo, kad GC sudaro 63,5%, buvo aptikti 178 atviri skaitymo rėmeliai. Atlikus DNR analizę, buvo nustatyti tik trys genai, koduojantys amidohidrolazių superšeimos baltymus (*TrzN*, *AtzB*, *AtzC*). Kiti šio fragmento genai atrazino katabolizme nedalyvauja. *trzN*, *atzB*, *atzC* genai yra apsupti įvairių IS elementų arba transpozonų. Manoma, kad jų raiška vyksta nepriklausomai vienas nuo kito. Be to, tirtame regione aptikti genai, lemiantys atsparumą metalams ir atliekantys transportavimo funkciją Gram-teigiamose bakterijose (Sajjaphan ir kt., 2004).

Mongodin ir kt. teigimu pTC1 plazmidės GC sudaro 64,6 %, joje aptikti 297 atviri skaitymo rėmeliai. Išanalizavus sekas, visi trys triazino hidrolazės genai, *trzN*, *atzB* ir *atzC* buvo aptikti tik didesnėje (pTC1) plazmidėje. Šie genai buvo aptikti pagal panašumą į genus iš *Pseudomonas* sp. ADP bakterijų pADP-1 plazmidės. Nustatyta, kad triazino hidrolazės genas, *trzN*, yra minėtame 16 kb pasikartojančiame regione. Didelis šio geno, kurio koduojamas baltymas dalyvauja pirmasis *s*-triazino skaidymo kelyje, kopijų

skaičius gali turėti svarbią reikšmę šių bakterijų sugebėjimui katabolizuoti didelį *s*-triazino junginių kiekį kaip vienintelį azoto ir anglies šaltinį (Mongodin ir kt., 2006).

16 kb pasikartojančiame regione taip pat nustatyta tiksli topoizomerazės-praimazės domeno (konservatyvi DNR praimazės sritis) geno duplikacija. Ši konservatyvi sritis atitinka topoizomerazės-praimazės domeną, būdingą DnaG praimazėms, topoizomerazėms ir RecR/M DNR reparacijos baltymams. pTC1 plazmidėje yra 14 transpozonų ir/arba IS elementų. Visa grupė genų (*ipu*), koduojančių izopropilamino skaidymo baltymus, aptikta abiejose TC1 bakterijų plazmidėse. Greičiausiai šių genų produktai skaido keletą *s*-triazinų, todėl bakterijos juos gali panaudoti kaip vienintelį anglies ir azoto šaltinį. pTC1 ir pTC2 plazmidėse esantys *ipu* genai sudaro grupę, tačiau nesuformuoja vieno operono (Mongodin ir kt., 2006).

pTC1 plazmidės genai yra mažai homologiški kitų plazmidžių, kurių sekos nustatytos, genams. Dvidešimt šeši baltymai, kurių genai yra pTC1 plazmidėje, pagal aminorūgščių seką yra labiausiai panašūs į baltymus iš *A. nicotinovorans* pAO1 plazmidės. Tarp žinomų baltymų didžiausias panašumas nustatytas į galimą Soj/Par šeimos baltymą (88 %), galimą ParB padalijimo baltymą (51 %), DNR invertazę (70 %) (vietai savitos rekombinazės/rezolvazės šeimos baltymą). Tai leidžia teigti, kad pTC1 ir pAO1 genai, dalyvaujantys plazmidžių paskirstyme, turi bendrą protėvį (Mongodin ir kt., 2006).

A. aurescens TC1 kamieno chromosomoje ir plazmidėje pTC1 yra aptikti penki vienodi genai, susiję su citochromu *c*: trys citochromo *c* biosintezės genai, vienas numanamo citochromo *c* surinkimo baltymo ir vienas citochromo *c* oksidazės subvieneto III. TC1 bakterijose yra penki chromosominiai genai, kurie lemia atsparumą kobaltui-cinkui-kadmiui, ir septyni pTC1 plazmidės genai, lemiantys atsparumą variui (Mongodin ir kt., 2006).

Plazmidė pTC2 turi 275 atvirus skaitymo rėmelius, jos GC sudaro 61,3 %. Didelė dalis joje esančių genų koduoja baltymus, dalyvaujančius azotą

turinčių junginių skaidyme, energijos metabolizme, taip pat transkripcijos reguliatorius. Šioje plazmidėje yra devyni transpozonai ir/arba IS elementai. Joje taip pat nustatyti trys genai, lemiantys atsparumą variui, keturi – arsenui ir vienas – kobaltui-cinkui-kadmiui (Mongodin ir kt., 2006).

Arthrobacter nicotinovorans HIM bakterijos, sugebančios skaidyti atrazinę, buvo išskirtos iš dirvožemio (Aislabie ir kt., 2005). Jos taip pat sugeba skaidyti pesticidus: simaziną, terbutilaziną, propaziną ir prometriną, ir panaudoti kaip azoto šaltinį, bet nesugeba utilizuoti terbumetono. *A. nicotinovorans* HIM, kaip ir anksčiau aprašytos bakterijų rūšys, skaido atrazinę iki cianuro rūgšties. Atrazino skaidymo baltymus koduojantys genai (*atzA*, *atzB* ir *atzC*) buvo aptikti PGR būdu. Vėliau nustatyta, kad šis kamienas turi dvi plazmidės (96 kb ir 53 kb). Atlikus tyrimus, paaiškėjo, kad visi trys genai yra didesnėje plazmidėje (Aislabie ir kt., 2005).

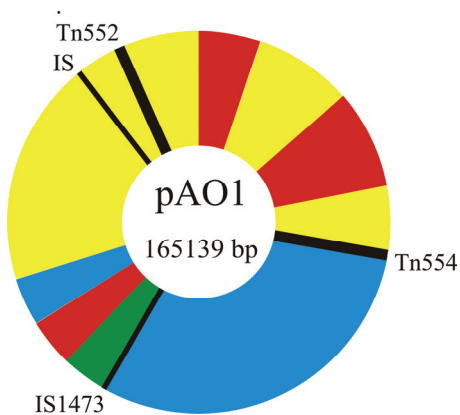
1.3.1.7. *Arthrobacter nicotinovorans* 165 kb plazmidė pAO1

Dirvos bakterijos *A. nicotinovorans* gali panaudoti nikotiną (3-[(2*S*)-1-metilpirolidin-2-il]piridino) kaip anglies ir azoto šaltinį (Igloi ir Brandsch, 2003). Šią savybę suteikia bakterijose esanti katabolinė plazmidė – pAO1. Joje yra genai, koduojantys L-nikotino degradacijos baltymus: nikotino dehidrogenazę, kuri hidroksilina nikotino piridino žiedo C6 atomą, 6-hidroksi-L-nikotino oksidazę, atveriančią nikotino pirolidino žiedą, ir ketonų dehidrogenazę, hidroksilinančią piridino žiedo C2 atomą. Kai nikotinas naudojamas kaip vienintelis anglies ir azoto šaltinis, bakterijos sugeba skaidyti ir 2,3,6-trihidroksipiridiną (Igloi ir Brandsch, 2003).

Plazmidėje yra taip pat aptikti angliavandenių skaidymo baltymų genai. Nustatyti trys operonai, kuriuos valdo transkripcijos reguliatorius, transkribuojamas į priešingą pusę nei struktūriniai genai. Pirmojo operono genai koduoja baltymus, kurie galėtų dalyvauti glikolipidų katabolizme. Heksozių oksidavime dalyvaujančių baltymų genai sudaro antrąjį operoną.

Trečiajame operone nustatyti genai, kurių baltymai dalyvauja skirtingų angliavandenių pernešime (Ganas ir kt., 2009).

Žiedinė plazmidė yra sudaryta iš 165139 bp, GC sudaro 59,7 %. Nustatyta, kad genai sudaro 83,2 % plazmidės DNR. Buvo nustatyti 165 atviri skaitymo rėmeliai, iš jų 126 *asr* buvo įvardyti. 39-ių *asr* koduojamų baltymų homologai nebuvo nustatyti. pAO1 plazmidės struktūra yra modulinė, ji yra sudaryta iš DNR segmentų, kuriuos supa transpozonai, homologiški *Staphylococcus aureus* Tn554 ir Tn552, ir IS1473 bei elementai, panašūs į IS1473 (1.4 pav.). Didžioji dalis genų, koduojančių nikotino skaidymo baltymus, yra išsidėstę DNR segmente, kurį supa Tn552 ir IS1473. Fragmento GC sudaro 56,7 %, ši reikšmė yra mažesnė nei kitų plazmidės segmentų, kuriuose yra angliavandenių skaidymo, plazmidės replikacijos, paskirstymo, padalijimo ir konjugacijos genai (Igloi ir Brandsch, 2003).



1.4 pav. Plazmidės pAO1 struktūrinė schema. Nurodytos sritys, kuriose yra metabolizmo ir plazmidės funkcijos genai: mėlyna – nikotino skaidymo, žalia – molibdeno kofaktoriaus biosintezės, raudona – angliavandenių skaidymo, geltona – genai, susiję su plazmidės replikacija, padalijimu ir konjugacija (Ganas ir kt., 2009).

Atvirų skaitymo rėmelių, koduojančių galimus replikacijos baltymus, telkiniai yra išsibarstę po visą pAO1 plazmidę. Joje aptikti ParA ir ParB baltymus koduojantys genai. Šie baltymai dalyvauja DNR kopijų padalijime. pAO1 plazmidėje neįprasta yra tai, kad ParB yra sudarytas iš trijų atskirų genų produktų, o ParA genas yra nutolęs nuo *parB* maždaug 28 kb atstumu ir jį supa *asr*, kurių produktai nėra panašūs į žinomus baltymus. Kiti baltymai ar elementai reikalingi replikacijai pAO1 plazmidėje nėra aptikti, kol kas plazmidės replikacijos *ori* seka nėra nustatyta (Igloi ir Brandsch, 2003).

Plazmidėje aptikti keli *asr*, giminingi baltymams, atliekantiems pilės biogenezės, paviršiaus atskyrimo ir konjugacinės DNR metabolizmo funkcijas. Taigi, galima teigti, kad pAO1 yra konjugacinė plazmidė (Iglói ir Brandsch, 2003).

1.3.1.8. *Arthrobacter nitroguajacolicus* Rū61a linijinė plazmidė pAL1

A. nitroguajacolicus Rū61a kamienas gali panaudoti chinaldiną (2-metilchinoliną), kuris yra anglies dervos sudedamoji dalis, kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį. Šis kamienas minėtą medžiagą skaido antranilato keliu iki anglies monooksido ir *N*-acetilantranilato (Overhage ir kt., 2005), o pastarasis paverčiamas antranilatu susidarant acetatui (Parschat ir kt., 2007). Pastebėjus, kad bakterijos spontaniškai praranda gebėjimą skaidyti chinaldiną, 1*H*-4-oksochinaldiną ir *N*-acetilantranilatą, buvo iškelta hipotezė, kad genai, koduojantys chinaldino skaidymo baltymus, yra plazmidėje (Overhage ir kt., 2005).

Genominės DNR tyrimas parodė, kad *A. nitroguajacolicus* Rū61a bakterijos turi apie 100 kb linijinę plazmidę, pavadintą pAL1. Tolimesni tyrimai patvirtino, kad baltymai, skaidantys chinaldiną iki antranilato, yra koduojami plazmidėje. Nustatyta, kad mutantai, praradę plazmidę ir negalintys skaidyti chinaldino, sugebėjo skaidyti antranilatą. Tai rodo, kad šio junginio skaidymo baltymus koduojantys genai greičiausiai yra chromosomoje (Overhage ir kt., 2005).

Vėliau buvo nustatyta pAL1 plazmidės (112992 bp) seka. Jos GC sudaro 60,87 %, nustatyti 103 atviri skaitymo rėmeliai, kurie dengia 84,6 % plazmidės sekos, 49 galimų genų funkcija nebuvo įvardyta. Chinaldino skaidymo baltymų genai ir genai, kurie, manoma, koduoja antranilato degradacijos baltymus, sudaro 31 kb dydžio telkinį. DNR mobilizacijos, plazmidės padalijimo ir DNR replikacijos bei reparacijos baltymų genai yra

aptinkami 53 kb dydžio plazmidės fragmente (1.5 pav.). Šioje plazmidėje transpozonų ir IS elementų neaptikta (Parschat ir kt., 2007).



1.5 pav. Plazmidės pAL1 struktūrinė schema. Genai pagal funkciją yra suskirstyti į sritis: mėlyna – dalyvaujantys chinolino ar antranilato skaidyme; geltona – susiję su DNR mobilizacija konjugacijos ar transpozicijos būdu; raudona – DNR replikacijos, reparacijos, modifikacijos ir plazmidės padalijimo baltymų; žalia – įvairių funkcijų; pilka – genai, koduojantys hipotetinius baltymus (pagal Parschat ir kt., 2007).

Kaip minėta anksčiau, manoma, kad antranilato skaidymo baltymų genai yra chromosomoje, tačiau plazmidės *asr* sekų analizė, leidžia daryti prielaidą, kad *A. nitroguajacolicus* Rū61a bakterijose yra dar vienas šio junginio skaidymo kelias (Parschat ir kt., 2007).

1.3.1.9. Plazmidės iš *Arthrobacter* sp. AK-1, FB24 ir Chr15 kamienų

Plazmidė pSI-1 (99213 bp) buvo išskirta iš švinui atsparaus *Arthrobacter* sp. AK-1 kamieno. Nustatyta, kad *Arthrobacter* sp. kamienas FB24, išskirtas iš ksilenu ir chromatu užteršto dirvožemio, turi tris plazmides: pFB24-104 (96488 bp), pFB24-105 (115507 bp) ir pFB24-136 (159538 bp). *Arthrobacter* sp. Chr15 kamienas buvo išskirtas iš dirvožemio auginant ant terpės, turinčios kalio chromato. Šiame kamiene aptikta plazmidė pChr15 yra 49633 bp dydžio. Minėtų plazmidžių GC sudaro 61,9–65,0 %. Visos plazmidės lemia atsparumą sunkiesiems metalams (Jerke ir kt., 2008).

Visose plazmidėse aptikti genai, koduojantys plazmidžių padalijime dalyvaujantį baltymą ParA. Galimi genai, koduojantys ParB baltymą, buvo nustatyti tik pSI-1, pFB24-105, pChr15 plazmidėse. Manoma, kad plazmidėse pFB24-104 ir pFB24-136 *parB* genai galėjo būti neaptikti dėl jų sekų nepanašumo į žinomų baltymų sekas. Nustatyta, kad *parA* ir *parB* genai

plazmidėse, kurios turi juos abu, yra nutolę vienas nuo kito bent 20 kb atstumu (Jerke ir kt., 2008).

pSI-1 plazmidės srityje, esančioje prieš *parA* geną, buvo aptiktos sekos panašios į iteronus ir DnaA prisijungimo sritis. pChr15 analizė parodė, kad greta *parA* geno, yra iteronų sritis, kurioje yra didelis AT kiekis. Kitose plazmidėse nustatyta, kad prieš *parA* geną yra nepilnai tiesiogiai pasikartojančių seku, kurių ilgis yra 6–11 nt, jos gali veikti kaip iteronai. Šie rezultatai rodo, kad plazmidės replikacijos *ori* galėtų būti prieš *parA* genus (Jerke ir kt., 2008).

1.3.1.10. *Arthrobacter arilaitensis* Re117 plazmidės

A. arilaitensis Re117 yra tipinis kamienas, aptinkamas ant brandinto sūrio paviršiaus (Monnet ir kt., 2010). Jo genomas yra sudarytas iš žiedinės chromosomos ir dviejų plazmidžių: pRE117-1 (50407 bp) ir pRE117-2 (8528 bp) (žr. sk. 1.3.2.). Nustatyta, kad didžioji plazmidė koduoja 47 baltymus, daugelio jų (28) funkcija nenustatyta. Maždaug 10 % plazmidės sekos sudaro IS elementai. pRE117-1 koduoja tris DNR mobilizacijos baltymus ir galimą sekretuojamą peptidazę. Dešimt šios plazmidės baltymų yra panašiasi į kitų *Arthrobacter* spp. plazmidžių baltymus (Monnet ir kt., 2010).

1.3.1.11. *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3

A. phenanthrenivorans Sphe3 kamienas, galintis skaidyti fenantreną ir panaudoti jį kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį, buvo išskirtas iš dirvožemio. Jis taip pat gali skaidyti ir antraceną (Kallimanis ir kt., 2009). Nustačius šio kamieno genomo seką paaiškėjo, kad jis turi dvi dideles plazmides: pASPHE301 (190450 bp) ir pASPHE302 (94456 bp) (Kallimanis ir kt., 2011). Smulkesnė plazmidžių genų analizė literatūroje nepateikta.

1.3.2. *Arthrobacter* spp. mažosios plazmidės

Pirmoji GenBank duomenų bazėje užregistruota *Arthrobacter* sp. maža plazmidė yra pA3 (AJ131246), kurios dydis yra vos 2205 bp. Joje nustatyti 5 atviri skaitymo rėmeliai, tačiau koduojami baltymai nėra įvardyti (Grosse, 1993).

Neseniai *Arthrobacter agilis* GIC54 kamieno bakterijose, išskirtose iš Grenlandijos ledo, aptikta viena maža plazmidė p54. Ji yra 1950 bp dydžio, GC sudaro 59,6 % (Miteva ir kt., 2008). Nors plazmidėje nustatyti 7 atviri skaitymo rėmeliai, didesni nei 50 aminorūgščių, tačiau tik keli iš jų buvo panašūs į žinomos funkcijos baltymus. Taip pat aptikta trumpa seka (22 nt), kuri buvo 100 % panaši į mažų teta būdu besireplikuojančių *Rhodococcus* sp. plazmidžių pB264, pKNRO2 ir pKA22 sekas. Nustatytos trys iš eilės einančios tiesiogiai pasikartojančios sekos ir vienas invertuotas pasikartojimas, kurie greičiausiai yra susiję su teta replikacija. Be to, aptikta nemažai IS elementų. Dalis jų yra kilę iš *Leifsonia xyli*, *Corynebacterium* spp., *Rhodococcus* spp. ir kitų Gram-teigiamų bakterijų, kurioms būdingas didelis GC kiekis (Miteva ir kt., 2008).

Arthrobacter arilaitensis Re117 kamiene be minėtos didelės plazmidės (žr. sk. 1.3.1.10.) buvo aptikta ir maža plazmidė pRE117-2 (8528 bp). Joje nustatyta 13 atvirų skaitymo rėmelių, iš jų devyni yra hipotetiniai. Manoma, kad du genai koduoja mobilizacijos baltymus (Monnet ir kt., 2010).

1.4. Hibridiniai vektoriai, sukurti *Arthrobacter* spp. bakterijoms

1.4.1. Pirmieji hibridiniai vektoriai

Naudodami *Corynebacterium glutamicum* pCG100 ir *Brevibacterium linens* pBL100 plazmidės, Shaw ir Hartley (1988) sukonstravo hibridinius vektorius *Arthrobacter* sp. NRRL B3728 kamieno, naudojamo gliukozės izomerazės gamybai pramonėje, bakterijoms. Buvo sukurtos trys hibridinės

plazmidės: pBL2100, pCG2100 ir pCG1100. pBL2100 sukurta naudojant *E. coli* plazmidę pBR322 ir kriptinę plazmidę pBL100; pCG2100 ir pCG1100 naudojant plazmides pBR322 ir pCG100 (Shaw ir Hartley, 1988).

Plazmidė pBR322 turi atsparumo ampicilinui ir tetraciklinui genus (Bolivar ir kt., 1977). Žinoma, kad atsparumo ampicilinui genai tinkamai neveikia *Actinomycetales* bakterijose, o atsparumo kanamicinui genai veikia gerai (Batt ir kt., 1985; Martin ir kt., 1987). Taigi, genas, lemiantis atsparumą kanamicinui, iš plazmidės pNCAT4 buvo klonuotas į hibridines plazmides. *Arthrobacter* NRRL B3728 protoplastai buvo transformuoti sukonstruotais vektoriais. Transformacija visomis trimis plazmidėmis buvo sėkminga ir pavyko gauti kolonijas, atsparias kanamicinui. pCG2100 vektoriuje, pašalinus 1 kb dydžio fragmentą, buvo gauta pCG2120 hibridinė plazmidė, kuri taip pat gali būti naudojama kaip vektorius (Shaw ir Hartley, 1988). *Arthrobacter* NRRL B3728 bakterijose sukonstruotos hibridinės plazmidės yra spontaniškai prarandamos, jei nėra selektyvių sąlygų. Sukurtos plazmidės gali būti naudojamos kaip vektoriai ne tik *Arthrobacter* sp., bet ir *Corynebacterium glutamicum* ir *Brevibacterium lactofermentum* bakterijose (Shaw ir Hartley, 1988).

1.4.2. pART grupės vektoriai

pART2 (4634 bp) ir pART3 (5406 bp) hibridiniai vektoriai buvo sukurti genų raiškos tyrimui *Arthrobacter nicotinovorans* bakterijose (Sandu ir kt., 2005). Jų konstravimui panaudoti DNR fragmentai iš *A. nicotinovorans*, *Corynebacterium glutamicum* ir *Escherichia coli* plazmidžių. pART plazmidėse yra 1,9 kb dydžio fragmentas iš *C. glutamicum* ATCC 13058 kriptinės plazmidės pCG100. Jame yra replikacijos *ori*, todėl plazmidės gali autonomiškai replikuotis *A. nicotinovorans* ir *A. globiformis*. Sukurtose plazmidėse taip pat yra *ColE1 ori* iš *E. coli* ir *kan* (atsparumo kanamicinui) genas iš Tn903. Genų raišką reguliuoja 6-D-hidroksinikotino oksidazės (*hdnO*)

geno promotorius/operatorius iš *A. nicotinovorans* plazmidės pAO1 (Sandu ir kt., 2005).

Plazmidė pART2 yra nuolatinės genų raiškos vektorius, o pART3 yra skirta kontroliuojamai genų raiškai tirti *Arthrobacter* spp. bakterijose. Ši plazmidė turi *hnoR* geną – *hdnO* slopiklį. HnoR baltymas jungiasi prie *hdnO* IR1 ir IR2 operatorių ir blokuoja šio promotoriaus reguliuojamų genų raišką. pART3 suteikia galimybę tirti genų raišką, priklausomą nuo nikotino ir nuo 6-hidroksinikotino, *A. nicotinovorans* ir *A. globiformis* arba kitose *Arthrobacter* sp. rūšyse, kurios turi nikotino panaudojimo sistemą (Sandu ir kt., 2005).

Plazmidžių pART2 ir pART3 veiklos ir reguliacijos tyrimui buvo panaudota žaliai fluorescuojančio baltymo geno raiška. Klonavus fermento 2,6-dihidroksipiridino 3-hidroksilazės geną į pART vektorius, buvo tiriama galimybė baltymus gaminti *A. nicotinovorans* bakterijose ir vėliau juos išgryninti (Sandu ir kt., 2005).

Klonavus *malE* geną į vektorius pART2, buvo gauta plazmidė pART2*malE* (Kolkenbrock ir Fetzner, 2010). Į minėtą geną, koduojantį maltozę surišantį baltymą, galima klonuoti tiriamo baltymo geną. Tuomet, vykstant geno raiškai, gaunami sulieti baltymai. Maltozę surišantis baltymas užtikrina, kad sulieto baltymo raiška vyktų citoplazmoje, taip pat palengvina baltymų gryninimą. Paveikus jungtį tarp sulietų baltymų tam tikra proteaze, gaunamas grynas tiriamas baltymas (Maina ir kt., 1988, LaVallie ir McCoy, 1995).

1.4.3. Hibridinis vektorius pSVJ21

Pirmasis hibridinis vektorius pSVJ21, turintis *Arthrobacter* sp. *ori*, buvo sukonstruotas panaudojant plazmidės p54 iš *Arthrobacter agilis* GIC54, pUC18 ir pKSV7 iš *Bacillus* sp. (Miteva ir kt., 2008). Hidrolizuotos plazmidės p54 ir pUC18 buvo sujungtos, o paskui į jas buvo klonuotas atsparumo

chloramfenikoliui genas iš pKSV7. Gautas 6002 bp konstruktas, kuris turi atsparumo ampicilinui ir chloramfenikoliui genus, Gram-teigiamų ir Gram-neigiamų bakterijų replikonus (Miteva ir kt., 2008).

Ištyrus pSVJ21 vektoriaus struktūrinį ir segregacinį stabilumą, padarytos išvados, kad, auginant terpėje su antibiotiku, jis yra labai stabilus visuose tirtuose kamienuose. Esant neatrankiom sąlygom, nustatytas mažesnis segregacinis stabilumas, kuris skyrėsi priklausomai nuo kamieno ir auginimo temperatūros (Miteva ir kt., 2008).

Šiuo metu yra aprašyti trys atvejai apie sukonstruotus hibridinius vektorius, skirtus būtent *Arthrobacter* sp. bakterijoms. Kol kas vienintelis vektorius, turintis minėtos genties replikoną, yra pSVJ21, kitų anksčiau aprašytų hibridinių plazmidžių kūrimui buvo naudojami kitų *Actinomycetales* genčių bakterijų replikonai (1.2 lentelė).

1.2 lentelė. Hibridiniai vektoriai, sukonstruoti *Arthrobacter* spp. bakterijoms.

Vektorius	Dydis	<i>E. coli</i> replikonas	<i>Actinomycetales</i> replikonas	Atsparumas	Kiti genetiniai elementai	Balymo raiška	Šaltinis
pBL2100	10,36 kb	pBR322	<i>Brevibacterium lactofermentum</i> NCIB 9567 pBL100 (pAM330)	<i>kan</i> iš pNCAT4	neturi	netirta	Shaw ir Hartley, 1988
pCG1100, pCG2100	8,86 kb	pBR322	<i>Corynebacterium glutamicum</i> NCIB 10026 pCG100 (pHM1519)	<i>kan</i> iš pNCAT4	neturi	D-ksilozės (D-gliukoazės) izomerazė	Shaw ir Hartley, 1988; Loviny-Anderton ir kt., 1991
pART2	4,63 kb	ColE1 <i>ori</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13058 pCG100	<i>kan</i> iš Tn903	6-D-hidroksimikotino oksidazės geno (<i>hdnO</i>) promotorius iš pAO1	žaliai fluorescuojantis baltymas; 2,6-dihidroksi-piridino 3-hidroksilazė	Sandu ir kt., 2005
pART3	5,4 kb	ColE1 <i>ori</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13058 pCG100	<i>kan</i> iš Tn903	6-D-hidroksimikotino oksidazės geno (<i>hdnO</i>) promotorius ir <i>hdnO</i> slopiklio genas (<i>hmoR</i>) iš pAO1	žaliai fluorescuojantis baltymas; 2,6-dihidroksi-piridino 3-hidroksilazė	Sandu ir kt., 2005
pSVJ21	6,0 kb	pUC18	<i>Arthrobacter agilis</i> GIC54 p54	<i>bla</i> iš pUC18; <i>cat</i> iš pKSV7	neturi	netirta	Miteva ir kt., 2008

1.5. Piridino ir jo darinių skaidymas

Piridinas – yra šešianaris heterociklinis junginys, kurio vienas anglies atomas yra pakeistas azotu. Piridinas ir jo dariniai naudojami dažų, tirpiklių, sprogmenų, pesticidų gamyboje. Šie junginiai susidaro kaip atliekos anglies pramonėje, jų aptinkama naftos perdurbimo ir farmacinių įmonių nuotekų vandenyje (Sims ir O'Loughlin, 1989).

Piridinas ir jo dariniai yra vieni iš didžiausių susirūpinimą keliančių aplinkos teršalų, kadangi pasižymi toksišku ir teratogeniniu poveikiu. Jie aptinkami paviršiniame ir popaviršiniame dirvožemyje. Dėl savo heterociklinės prigimties jie geriau tirpsta vandenyje nei jų analogai, sudaryti tik iš anglies atomų (turintys benzeno žiedą), todėl gali lengviau prasiskverbti į požeminius vandenis (Kaiser ir kt., 1996).

Paprastai piridinas ir jo dariniai pagal mikrobiologinio skaidymo lengvumą yra išsidėstę tokia tvarka: piridino karboksirūgštys > piridinas ≡ monohidroksipiridai > metilpiridiniai > aminopiridiniai ≡ chloropiridiniai (Fetzner, 1998).

1.5.1. Piridino skaidymas

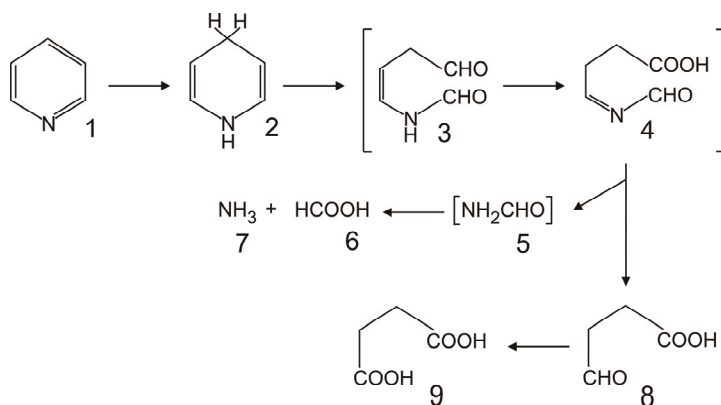
Cheminiu požiūriu piridino žiedas yra linkęs redukuotis, tuomet jį atakuoja nukleofilinis agentas (C2 arba C4 padėtyse) (Fetzner, 1998). Nors tyrimai rodo, kad nemažai mikroorganizmų sugeba skaidyti heterociklinius aromatinus junginius, tačiau piridino žiedo skilimo mechanizmas vis dar yra neaiškus (Kaiser ir kt., 1996; Fetzner, 1998). Šiuo metu yra išskiriami du pagrindiniai piridino bakterinio skaidymo keliai: pirmas, hidroksilinimo reakcijos, po kurių seka redukcija; antras, redukcija nėra inicijuojama hidroksilinimo (Fetzner, 1998).

Shukla (1973) išskyrė iš dirvožemio *Corynebacterium* spp. ir *Brevibacterium* spp. bakterijas, sugebančias skaidyti piridiną. Tiriant piridino

skaidymą abiejų rūšių bakterijose, nustatyta, kad susidaro skruzdžių rūgštis ir amoniakas, kurie yra išskiriami į terpę. Kai terpėje yra slopiklis pusiau karbazidas, tai kaip tarpinis produktas kaupiasi gintaro rūgšties pusiau aldehidas (Shukla ir Kaul, 1974; Shukla ir Kaul, 1975).

Watson ir Cain (1975) tyrė piridino skaidymo metabolinius kelius *Bacillus* sp. 4 kamieno bakterijose. Jie nustatė tokius pat piridino skilimo produktus kaip ir *Corynebacterium* sp. bei *Brevibacterium* sp. bakterijose. Eksperimentai su žymėtu [¹⁴C2] piridinu parodė, kad skruzdžių rūgštis susidaro iš heterociklinio žiedo antro anglies atomo. Tai rodo, kad piridino žiedas yra skeliamas tarp 2 ir 3 anglies atomų. Taigi, buvo pasiūlytas piridino skaidymo kelias (1.6 pav.), kuris būdingas ne tik *Bacillus* sp. 4 (Watson ir Cain, 1975), bet ir *Corynebacterium* sp. bei *Brevibacterium* sp.

Nustatyta, kad šiame piridino skaidymo kelyje dalyvauja piridinu indukuojama nuo NAD priklausoma gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazė ir formamidazė (Watson ir Cain, 1975).



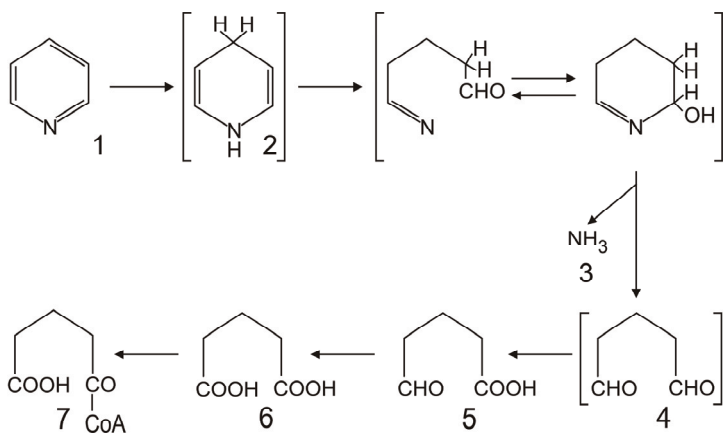
1.6 pav. Piridino skaidymas *Bacillus* sp. 4, *Corynebacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Micrococcus luteus* bakterijose. 1 – piridinas, 2 – 1,4-dihidropiridinas, 3 – 4-(*N*-formil)-amino-buten-3-enoin-1-aldehidas, 4 – 4-(*N*-formil)-amino-buten-3 enoinė rūgštis, 5 – formamidas, 6 – skruzdžių rūgštis, 7 – amoniakas, 8 – gintaro rūgšties pusiau aldehidas, 9 – gintaro rūgštis (Watson ir Cain, 1975).

Vėliau, buvo išskirtos *Micrococcus luteus* bakterijos, galinčios skaidyti piridiną. Tiriant jo skaidymo mechanizmą minėtose bakterijose, gauti duomenys leidžia teigti, kad jos piridiną skaido tuo pačiu keliu kaip *Bacillus* sp. 4, *Corynebacterium* sp. ir *Brevibacterium* sp. (Sims ir kt., 1986). Visos aprašytos bakterijų rūšys, galinčios panaudoti piridiną kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį, nesugeba augti ant monohidroksipiridinių, o jų ląstelių suspensijos ar ekstraktai neoksiduoja mono- arba dihidroksipiridinių (Sims ir kt., 1986).

Shukla ir Kaul (1986) pavyko išskirti *Nocardia* sp. bakterijas, kurios galėjo skaidyti ne tik piridiną, bet ir piridino-*N*-oksidą bei 2-hidroksipiridiną. Naudojant pusiau karbazidą, piridino transformacijos metu kaip tarpinis produktas susidarė gintaro rūgšties pusiau aldehidas. Taigi, buvo padaryta išvada, kad *Nocardia* sp. bakterijos skaido piridiną tokiu pat keliu kaip *Bacillus* sp. 4 (Shukla ir Kaul, 1986).

Warson ir Cain (1975) tyrė piridino skaidymą ir *Nocardia* sp. Z1 kamiene ir nustatė, kad kaip tarpinis produktas susidaro glutaro rūgšties pusiau aldehidas. Penkis anglies atomus turinčio produkto susidarymas rodo, kad piridino žiedas turėtų būti skeliamas tarp heteroatomo ir antro anglies atomo. Taigi, jie pasiūlė dar vieną piridino skaidymo kelią (1.7 pav.) (Watson ir Cain, 1975).

Piridino žiedui skilus tarp heteroatomo ir C2 atomo, susidaręs produktas yra deamininamas, tuomet susidaro glutaro dialdehidas, kuris vėliau virsta glutaro rūgšties pusiau aldehidu, glutaro rūgštimi, glutaril-CoA ir galiausiai acetil-CoA. Skaidyme dalyvauja piridinu indukuojamos nuo NAD priklausoma glutaro rūgšties dehidrogenazė ir izocitrazė (Watson ir Cain, 1975).



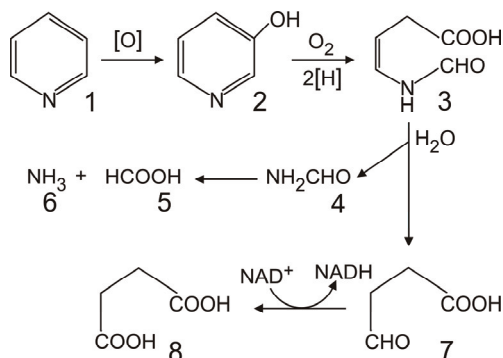
1.7 pav. Piridino skaidymas *Nocardia* sp. Z1, *Azoarcus* sp. pF6 bakterijose. 1 – piridinas, 2 – 1,4-dihidropiridinas, 3 – amoniakas, 4 – glutaro dialdehidas, 5 – glutaro rūgšties pusiau aldehidas, 6 – glutaro rūgštis, 7 – glutaril-CoA (Watson ir Cain, 1975).

Azoarcus sp. pF6 bakterijos sugeba skaidyti piridiną aerobinėmis ir anaerobinėmis (esant nitratui) sąlygomis (Rhee ir kt., 1997). Nustatyta, kad terpėje su piridinu augintų ląstelių ekstraktai nesugeba skaidyti nei 2-, 3-, 4-hidroksipiridino, nei 2,3-, 2,4-, 2,6-dihidroksipiridino, tad greičiausiai šių bakterijų piridino skaidymo kelyje hidroksipiridinai nesusidaro. Gauti rezultatai rodo, kad pF6 bakterijose piridinas indukuoja nuo NAD priklausomą glutaro rūgšties dialdehido dehidrogenazę bei izocitrazę, ir leidžia teigti, kad šiose bakterijose piridinas skaidomas tuo pačiu keliu kaip ir *Nocardia* sp. Z1 (Rhee ir kt., 1997).

Anksčiau aprašytuose piridino skaidymo tyrimuose hidroksilinti piridino dariniai nebuvo aptinkami (Kaiser ir kt., 1996; Fetzner, 1998), tačiau *Rhodococcus opacus* ir *Arthrobacter crystallopoietes* kamienų kultūrinio skysčio ekstraktuose buvo nustatyta nemažai hidroksilintų piridino, susidariusių piridino skaidymo metu (Fetzner, 1998).

Korosteleva ir kt. (1981), remdamiesi tyrimų rezultatais su *Nocardia* sp. KM-2 kamieno bakterijomis, pirmieji pasiūlė piridino skaidymo kelią, kurio pirmame etape susidaro hidroksipiridinas (1.8 pav.). Tolimesnių reakcijų

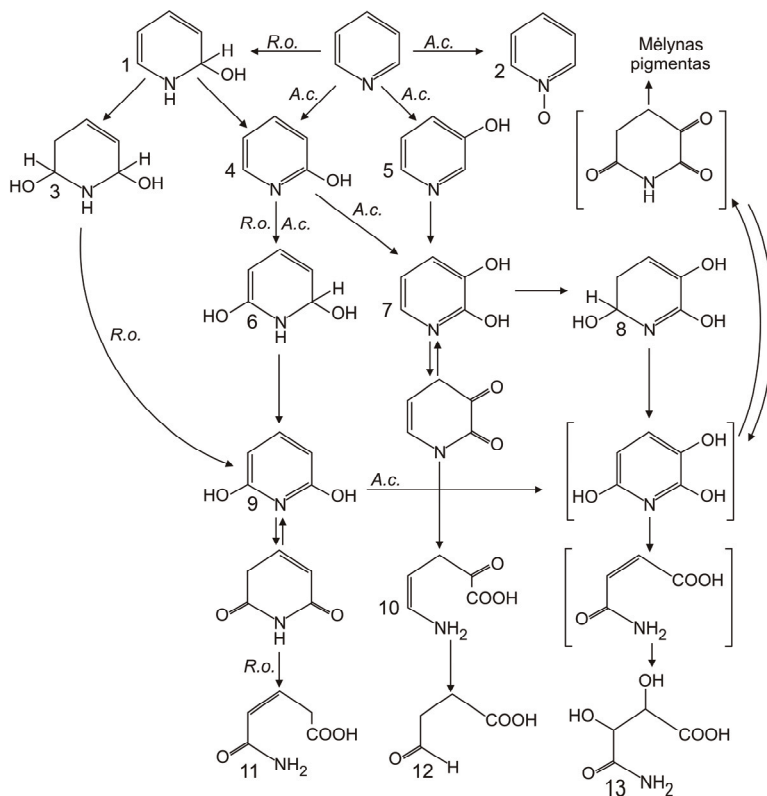
metu jis verčiamas iki gintaro rūgšties išsiskiriant amoniakui ir skruzdžių rūgščiai (Korosteleva ir kt., 1981).



1.8 pav. Piridino skaidymas *Nocardia* sp. KM-2 bakterijose. 1 – piridinas, 2 – 3-hidroksipiridinas, 3 – 4-(*N*-formil)-amino-buten-3-enoin-1-aldehidas, 4 – formamidas, 5 – skruzdžių rūgštis, 6 – amoniakas, 7 – gintaro rūgšties pusiau aldehidas, 8 – gintaro rūgštis (Korosteleva ir kt., 1981).

Arthrobacter crystallopoietes ir *Rhodococcus opacus* bakterijose piridino skaidymo tarpinių metabolitų struktūros buvo nustatomos panaudojant UV ir IR spektroskopiją ir dujų chromatografiją/masių spektrometriją. Išanalizavus gautus rezultatus, buvo pasiūlyti nauji šio junginio skaidymo keliai, kurių metu susidaro hidroksipiridiniai (1.9 pav.) (Zefirov ir kt., 1994).

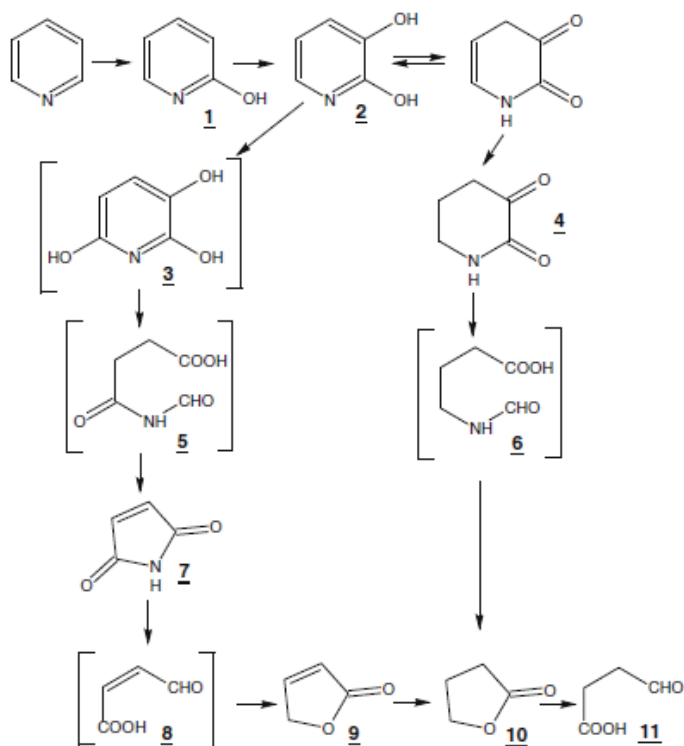
A. crystallopoietes piridino žiedo skaidymas prasideda hidroksiliniu trečioje padėtyje, toliau seka 2,3-dihidroksipiridino susidarymas ir žiedo skilimas, po kurio susidaro gintaro rūgšties pusiau aldehidas. Nustatytas tarpinis produktas – 2,6-dihidroksipiridinas, leidžia teigti, kad hidroksilinimas gali vykti ir kitokiu eiliškumu. Tuomet gali susidaryti trihidroksipiridinas, kuris arba verčiamas į 2,3-dihidroksigintaro rūgšties monoamidą, arba iš jo susidaro mėlynos spalvos pigmentas. *R. opacus* piridino skaidymas vyksta susidarant 2-hidroksipiridinui, paskui 2,6-dihidroksipiridinui, kuris yra suskaidomas iki 3-pentenoinės rūgšties monoamido (Zefirov ir kt., 1994).



1.9 pav. Piridino skaidymas *Arthrobacter crystallopoietes* (A.c.) ir *Rhodococcus opacus* (R.o.) bakterijose. 1 – 2-hidroksi-1,2-dihidropiridinas; 2 – piridino-*N*-oksidas; 3 – 2,6-dihidroksi-1,2,3,6-tetrahidropiridinas; 4 – 2-hidroksipiridinas; 5 – 3-hidroksi-piridinas; 6 – 2,6-dihidroksi-1,2-dihidropiridinas; 7 – 2,3-dihidroksipiridinas; 8 – 1,2-dihidro-2,5,6-trihidroksipiridinas; 9 – 2,6-dihidroksipiridinas; 10 – 5-amino-2-okso-4-pentanoinė rūgštis; 11 – 3-pentanoinės rūgšties monoamidas; 12 – gintaro rūgšties pusiau aldehidas; 13 – tartaro rūgšties monoamidas. Junginiai skliausteliuose yra galimi tarpiniai metabolitai (Zefirov ir kt., 1994).

Arthrobacter sp. KM-4 bakterijos, galinčios skaidyti piridiną, 2-metilpiridiną, 4-metilpiridiną ir 2,6-dimetilpiridiną, buvo išskirtos iš dirvožemio (Khasaeva ir kt., 2011a). Jose piridino skaidymo kelias buvo tiriamas panaudojant dujų chromatografiją/masių spektrometriją. Nustatę aptiktus produktus, autoriai pasiūlė naują šio junginio skaidymo kelią (1.10 pav.) (Khasaeva ir kt., 2011a).

Autorių teigimu pirmieji piridino skaidymo etapai yra žiedo hidroksilinimas iš pradžių antroje, paskui trečioje padėtyse. Dalis dihidroksipiridino verčiama į 2,3,6-trihidroksipiridiną, o kitas dalis į piperidin-2,3-dioną. Toliau iš 2,3,6-trihidroksipiridino susidaro 4-formilamino-butano rūgštis, kuri verčiama 2,5-pirolidionu, tuomet, manoma, kad susidaro maleino rūgšties pusiau aldehidas, iš jo – furanonas-2, paskui butirolaktonas ir galiausiai gintaro rūgšties pusiau aldehidas. Šis junginys taip pat susidaro ir iš piperidin-2,3-diono (Khasaeva ir kt., 2011a).



1.10 pav. Piridino skaidymas *Arthrobacter* sp. KM-4 bakterijose. 1 – hidroksipiridinas, 2 – dihidroksipiridinas, 3 – trihidroksipiridinas, 4 – piperidin-2,3-dionas, 5 – 4-formilamino-butano rūgštis, 6 – 4-formilamino-4-oksobutano rūgštis, 7 – 2,5-pirolidionas; 8 – maleino rūgšties pusiau aldehidas, 9 – furanonas-2, 10 – butirolaktonas, 11 – gintaro rūgšties pusiau aldehidas. Junginiai skliausteliuose yra galimi tarpiniai metabolitai (Khasaeva ir kt., 2011a).

Piridino skaidymo tyrimai vykdomi jau daugelį metų. Nustatytos dvi piridino žiedo skaidymo strategijos: pirmoji, kai pradiniuose etapuose vyksta hidrinimo reakcijos ir tarp tarpinių metabolitų nėra hidroksipiridinų; antroji, kai vyksta hidroksilinimas ir susidaro mono-, di- arba trihidroksipiridiniai. Nors pasiūlyti piridino skaidymo keliai skiriasi, tačiau daugeliu atveju kaip galutinis produktas susidaro gintaro rūgšties pusiau aldehidas arba gintaro rūgštis.

Nepaisant to, kad daugelis piridino skaidymo tarpinių metabolitų yra nustatyti, tačiau beveik nieko nežinoma apie reakcijose dalyvaujančius fermentus ir juos koduojančius genus. Šiuo metu yra žinoma, kad *Arthrobacter crystallopoietes* KM-4a bakterijų, skaidančių 2,6-dimetilpiridiną ir piridiną (Agapova ir kt., 1992), ir *Pseudomonas* sp. P12, skaidančių piridiną (Mohan ir kt., 2003), genai yra plazmidėse (Agapova ir kt., 1992; Mohan ir kt., 2003).

1.5.2. Bakterinis metilintų piridinių skaidymas

Bakterinis alkilpiridinių skaidymas gali prasidėti piridino žiede arba alkilintame pakaite. Heterociklinio žiedo oksidacija lemia piridino-*N*-oksido arba hidroksipiridinų susidarymą. Oksiduojant alkilo grupę turintį radikala, susidaro hidroksialkilpiridiniai (Kaiser ir kt., 1996).

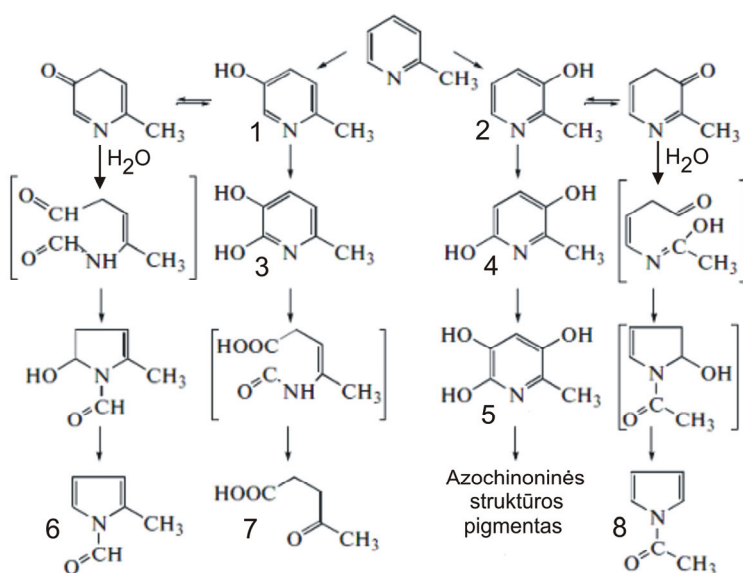
Arthrobacter sp. bakterijos, skaidančios 2-metilpiridiną (2-pikoliną), kaip alternatyvius substratus galėjo panaudoti 2-etilpiridiną arba piperidiną (Shukla, 1974). Ląstelės, augintos terpėje su 2-metilpiridinu, gali oksiduoti 2-etilpiridiną ir atvirkščiai. Tirtos bakterijos neskaidė 2-pikolinato ir 2-metil-6-hidroksipiridino, tai rodo, kad 2-metilpiridino skaidymas neprasideda nei metilo grupės oksidavimu, nei hidroksilinimu 6 žiedo padėtyje. 2-Metilpiridino skaidymo tyrimai, naudojant *Arthrobacter* sp. intaktinių ląstelių suspensiją, kurioje yra slopintojo pusiau karbazido, parodė, kad kaupiasi gintaro rūgšties pusiau aldehidas ir piruvatas (Shukla, 1974). Kadangi kiti tarpiniai metabolitai nebuvo nustatyti, skaidymo kelias nepateiktas.

Tiriant *Arthrobacter* sp. R1 (O'Loughlin ir kt., 1999), *Pseudomonas* sp. ir *Nocardia* sp. (Padoley ir kt., 2009) 2-metilpiridino skaidymą, nustatyta, kad augimo terpėje atsiranda amoniako, kurio didėjantis kiekis tiesiogiai koreliuoja su mažėjančiu 2-metilpiridino kiekiu (O'Loughlin ir kt., 1999; Padoley ir kt., 2009). Tai leidžia teigti, kad, vykstant skaidymui, azotas yra atpalaiduojamas iš žiedo (O'Loughlin ir kt., 1999). Nors *Arthrobacter* sp. R1 atveju tarpiniai metabolitai nebuvo nustatyti, pastebėta, kad vėlyvoje logaritminėje augimo fazėje terpė tampa blyškiai geltona. Atlikus chromatografinę analizę, nustatyti du chromoforai: riboflavinas ir lumichromas (riboflavino darinys) (O'Loughlin ir kt., 1999). Minėtų bakterijų 2-metilpiridino skaidymo keliai nėra pateikti.

Khasaeva ir kt. (2011b) tyrinėjo *Arthrobacter* sp. KM-2MP kamieno bakterijas, kurios gali panaudoti 2-metilpiridiną kaip vienintelį anglies, azoto ir energijos šaltinį. Joms augant skystoje mineralinėje terpėje, susidaro geltonas, greičiausiai azachinonų tipo, pigmentas (Khasaeva ir kt., 2011b).

2-Metilpiridino skaidymo metu susidarę metabolitai buvo aptinkami ir analizuojami panaudojant dujų chromatografiją/masių spektrometriją. Tarp 2-metilpiridino skaidymo tarpinių produktų buvo nustatyti *N*-acetilpirolas ir *N*-formil-2-metilpirolas. Tai pirmas kartas, kai pirolai yra nustatomi kaip bakterinio piridino darinių skaidymo tarpiniai junginiai. Manoma, kad *N*-acetilpirolas susidaro hidroksilinto piridino žiedui atsiveriant tarp C2 ir C3 atomų ir susijungiant anglies (buvusios 3 piridino žiedo padėtyje) ir azoto atomams. Nors chemiškai toks jungties skilimas yra negalimas, tačiau katalizuojant fermentams visai įmanomas. *N*-formil-2-metilpirolas greičiausiai susidaro panašiu būdu, kaip ir *N*-acetilpirolas, bet fermentinis piridino žiedo skilimas vyksta tarp C5 ir C6 atomų, tuomet susijungia anglies (buvusios 5 piridino žiedo padėtyje) ir azoto atomai. Minėti pirolų dariniai vėliau yra skaidomi iki pirolų, tuomet vyksta žiedo atidarymas išsiskiriant amoniakui ir susidarant 1,4-butandiolui, iš kurio susidaro anglies dioksidas po eilės oksidacijos reakcijų (Khasaeva ir kt., 2011b).

4-Oksopentanoinė rūgštis taip pat buvo nustatyta kaip tarpinis 2-metilpiridino skaidymo produktas *Arthrobacter* sp. KM-2MP bakterijose. Ji verčiama į 2-butanoną, kuris oksiduojamas iki 2-oksopropanoinės, o paskui iki oksalo rūgšties. Didžioji dalis dihidroksi-2-metilpiridino, susidariusio 2-metilpiridino skaidymo metu, yra toliau hidroksilinama ir gaunamas trihidroksi-2-metilpiridinas. Iš jo susidaro azochinoninės struktūros pigmentas vykstant 2,3,6-trihidroksipiridino autooksidacijai. Pastarasis junginys yra laikomas piridino žiedo tarpiniu metabolitu ir pigmento pirmtaku (Khasaeva ir kt., 2011b).



1.11 pav. 2-Metilpiridino skaidymas *Arthrobacter* sp. KM-2MP bakterijose. 1 – 5-hidroksi-2-metilpiridinas; 2 – 3-hidroksi-2-metilpiridinas; 3 – 5,6-dihidroksi-2-metilpiridinas; 4 – 3,6-dihidroksi-2-metilpiridinas; 5 – 3,5,6-trihidroksi-2-metilpiridinas; 6 – *N*-formil-2-metilpirolas; 7 – 4-oksopentanoinė rūgštis; 8 – *N*-acetilpirolas. Junginiai skliausteliuose yra galimi tarpiniai metabolitai (Khasaeva ir kt., 2011b).

Apibendrinę gautus rezultatus, autoriai pateikė 2-metilpiridino skaidymo kelią *Arthrobacter* sp. KM-2MP bakterijose (1.11 pav.) ir teigia, kad šis junginys skaidomas vykstant tokioms reakcijoms. Pirma, skaidymas prasideda hidroksilinimu piridino žiedo 3 ir 5 padėtyse ir susidaro hidroksi-2-

metilpiridinas. Antra, 3-hidroksi-2-metilpiridino žiedas atsidaro per C2–C3 ryšį, paskui susidaro 5 atomus turintis žiedas – *N*-acetilpirolas. Kitu atveju, 5-hidroksi-2-metilpiridino žiedas atsidaro per ryšį, esantį tarp C5 ir C6 atomų, ir susiformuoja *N*-formil-2-metilpirolas. Hidroksi-2-metilpiridinai yra oksiduojami į dihidroksi-2-metilpiridinus. Iš 5,6-dihidroksi-2-metilpiridino, atsidarant žiedui, susiformuoja 4-oksopentanoinė rūgštis. Tolimesnis 3,6-dihidroksi-2-metilpiridino hidroksilinimas lemia trihidroksi-2-metilpiridino susidarymą, kuris virsta azochinoninės struktūros pigmentu (*Khasaeva ir kt., 2011b*).

Nustatyta, kad *Pseudomonas* sp. KM-3 bakterijos, kurios skaido 3-metilpiridiną (3-pikoliną), pirmiausia oksiduoja metilo grupę ir gaunamas 3-hidroksimetilpiridinas. Jis yra oksiduojamas ir susidaro nikotino rūgštis. Vykstant tolimesniam oksidavimui, susidaro 2,5-dihidroksipiridinas. Toliau jį skaidant, išsiskiria amoniakas ir susidaro maleatas (*Korosteleva ir kt., 1981*).

Gordonia nitida LE31 (*Yoon ir kt., 2000*) skaido 3-metilpiridiną. Nustatyta, kad aromatiniai ar alifatiniai tarpiniai metabolitai nesusidaro, tačiau į terpę yra išskiriamas amoniakas (*Lee ir kt., 2001*). Tyrimai parodė, kad 3-metilpiridino skaidymo metu žiedas yra skeliamas tarp C2-C3 atomų, susidaro levulino rūgštis ir formamidas, kuris skaidomas iki skruzdžių rūgšties ir amoniako (*Lee ir kt., 2001*).

Pseudonocardia sp. M43 bakterijoms skaidant 4-metilpiridiną (4-pikoliną), amoniako koncentracija terpėje didėja. Tai rodo, kad aromatinis žiedas yra skeliamas atsiskiriant jo azoto atomui. Nustatyta, kad 2-hidroksi-4-metilpiridinas yra tarpinis skaidymo produktas (*Lee ir kt., 2006*). Anksčiau šis junginys buvo nustatytas kaip tarpinis anaerobinio 4-metilpiridino skaidymo metabolitas (*Kaiser ir kt., 1993*).

1.5.3. 2-hidroksipiridino skaidymas

Kolenbrander ir Weinberger (1977) aprašė trijų *Arthrobacter* genties rūšių: *A. crystallopoietes*, *A. pyridinolis* ir *A. viridescens*, bakterijas, sugebančias skaidyti 2-hidroksipiridiną kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį. Visų rūšių bakterijos, kultivuojamos skystoje terpėje su 2-hidroksipiridinu, išskiria mėlynos spalvos užlaštelinį kristalinį pigmentą (4,5,4',5'-tetrahidroksi-3,3'-diazodifenochinono-(2,2')). Kultivuojant bakterijas ant agarizuotos terpės, pigmento kristalai yra įstrigę kolonijų masėje, todėl šis yra matomas blizgančios žalios spalvos (Kolenbrander ir Weinberger, 1977).

Nustatyta, kad visose trijose tirtose *Arthrobacter* spp. rūšyse pirmajame 2-hidroksipiridino oksidacijos etape dalyvauja fermentas – monooksigenazė. FMN stimuliuoja šį fermentą, o FAD ir riboflavinai ne. Flavino analogas, kvinakrinai, jį slopina. 2-Hidroksipiridino fermentinei oksidacijai reikia molekulinio deguonies, NADH ir substrato lygiomis dalimis. Tokios fermentinių reakcijų sąlygos būdingos kelioms monooksigenazėms – salicilato hidroksilazei, imidazolacetato monooksigenazei ir 2,6-dihidroksipiridino oksidazei (Kolenbrander ir Weinberger, 1977).

A. crystallopoietes bakterijose 2-hidroksipiridino monooksigenazę koduojantys genai yra išsidėstę plazmidėje, o *A. pyridinolis* ir *A. viridescens* – chromosomoje. Nustatyta, kad *A. crystallopoietes* netenka sugebėjimo skaidyti 2-hidroksipiridiną ir gaminti užlaštelinį pigmentą spontaniškai arba naudojant gydomąsias medžiagas – akridino oranžą ir mitomiciną. *A. pyridinolis* ir *A. viridescens* nepraranda šio sugebėjimo bet kuriuo atveju (Kolenbrander ir Weinberger, 1977).

Vėliau *A. crystallopoietes* tyrimai buvo atliekami su bakterijomis, išskiriančiomis pigmentą (Pig⁺) ir jo neišskiriančiomis (Pig⁻). Nustatyta, kad ir Pig⁺, ir Pig⁻ bakterijos turi plazmides, tačiau, analizuojant genomine DNR, buvo pastebėti kiekybiniai ir kokybiniai skirtumai. Atlikus papildomus tyrimus, paaiškėjo, kad Pig⁺ bakterijos turi dvi plazmides: vieną identišką Pig⁻ kriptinei plazmidei, o kitą truputį didesnę. Padaryta išvada, kad genai,

koduojantys 2-hidroksipiridino skaidymo fermentus, yra didesnėje plazmidėje (Weinberger ir Kolenbrander, 1979).

Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje buvo išskirta keliolika bakterinių kamienų, galinčių skaidyti 2-hidroksipiridiną. Atlikus jų 16S rRNR genų analizę, buvo nustatyta, kad jie priklauso *Rhodococcus* ir *Arthrobacter* gentims (Semėnaitė ir kt., 2003).

Genų koduojančių 2-hidroksipiridino skaidymo fermentus, vietai genome nustatyti buvo tiriamos *Rhodococcus* sp. PY11, *Arthrobacter oxydans* PY21 ir *Arthrobacter rhombi* PY22 bakterijos. Atliekant tyrimą, buvo gauti *Rhodococcus* sp. PY11 mutantai, kurie nesugeba panaudoti 2-hidroksipiridino kaip vienintelio anglies šaltinio. Tai galėtų būti siejama su katabolinės plazmidės praradimu. Deja, kol kas šio kamieno bakterijose plazmidės (plazmidžių) nepavyko aptikti nei horizontalios, nei pulsuojančio lauko elektroforezės pagalba (Gasparavičiūtė, 2008).

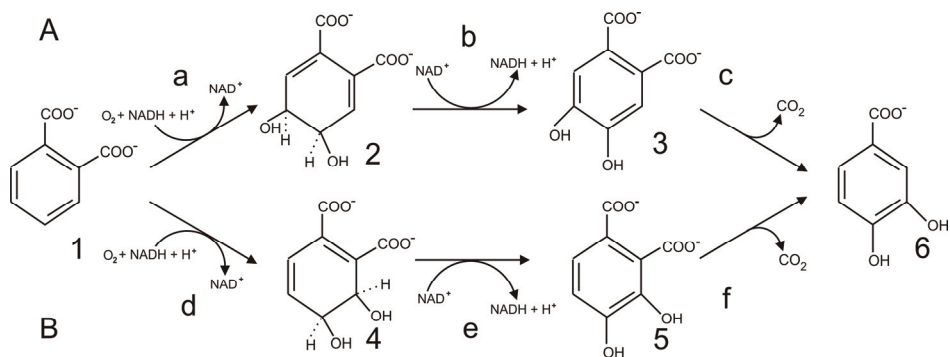
A. oxydans PY21 ir *A. rhombi* PY22 bakterijose buvo aptikta po vieną didelę plazmidę. Norint nustatyti plazmidžių funkciją, buvo bandoma gauti klonus, kurie neaugtų ant terpės su 2-hidroksipiridinu. Sugebėjimas skaidyti šį junginį nebuvo prarandamas spontaniškai. Todėl, naudojant etidžio bromidą ar novobiociną, bakterijos buvo gydomos nuo plazmidžių. *A. oxydans* PY21 bakterijos, netekusios plazmidės, prarado sugebėjimą skaidyti 2-hidroksipiridiną. Visos pastangos gauti *A. rhombi* PY22 bakterijas, kurios nesugebėtų panaudoti 2-hidroksipiridino, buvo nesėkmingos. Teigiama, kad šiame kamiene genai, atsakingi už 2-hidroksipiridino skaidymą yra chromosomoje. Taigi, abu *Arthrobacter* spp. kamienai turi plazmides, tačiau tik *A. oxydans* PY21 kamieno plazmidė dalyvauja 2-hidroksipiridino skaidyme (Bondareva ir kt., 2000).

1.6. Ftalio rūgšties skaidymas

Ftalio rūgštis (benzen-1,2-dikarboksirūgštis) yra benzendikarboksi-rūgštis *orto*-izomeras. Kiti šios rūgšties izomerai yra: *meta* – izoftalio rūgštis (benzen-1,3-dikarboksirūgštis), *para* – tereftalio rūgštis (benzen-1,4-dikarboksirūgštis) (Liang ir kt., 2008). Ftalio rūgštis yra pagrindinis ftalato esterių ir kai kurių policiklinių aromatinių angliavandenilių (pireno, fenantreno, fluoreno ir fluorantreno) skaidymo tarpinis metabolitas (Choi ir kt., 2007). Ftalatai ir jų esteriai yra pramoniniai cheminiai preparatai, plačiai naudojami plastiko gamyboje (Chatterjee ir Dutta, 2008). Jie yra statybinių medžiagų, maisto pakuočių, žaislų, klijų, fotojuostų, medicinos priemonių, kosmetikos sudedamoji dalis (Vamsee-Krishna ir Phale, 2008), taip pat įeina į įvairių purškalo (įskaitant pesticidus) sudėtį (Chatterjee ir Karlovsky, 2010). Dėl plataus vartojimo ftalato esteriai yra aptinkami nutekamųjų vandėnu nuosėdose, vandens telkiniuose, dirvožemyje ir vandens organizmuose (Chatterjee ir Dutta, 2008; Chatterjee ir Karlovsky, 2010). Taip pat šių junginių yra rasta geriamajame vandenyje, ore ir maiste (Chatterjee ir Karlovsky, 2010). Ftalato esteriai pasižymi teratogeniniu (Liang ir kt., 2008; Vamsee-Krishna ir Phale, 2008), kancerogeniniu, toksiniu kepenims (Liang ir kt., 2008) poveikiu, sukelia reprodukcinės sistemos sutrikimus (Vamsee-Krishna ir Phale, 2008).

Didelis ftalio rūgščių ir jų esterių paplitimas lėmė tai, kad mikroorganizmai, gyvenantys užterštoje aplinkoje, sugebėjo išvystyti naujus ftalatų ir jų esterių skaidymo kelius. Bakterinė degradacija yra veiksminga, nes šie junginiai yra arba biotransformuojami, arba pilnai suskaidomi (Vamsee-Krishna ir Phale, 2008). Paprastai ftalatų skaidymas susideda iš dviejų procesų: pirmas, ftalato diesterių skaidymas iki ftalato monoesterių ir tuomet iki ftalio rūgšties; antras, jos skaidymas iki anglies dvideginio arba/ir metano (Staples ir kt., 1997). Be to, nustatyta, kad ftalato esterių skaidymas yra tuo lėtesnis, kuo ilgesnė jų šoninė grandinė. Didelės šių junginių ir/arba jų metabolitų koncentracijos slopina jų skaidymą (Liang ir kt., 2008).

Ftalio rūgšties izomerai ir jų esteriai gali būti metabolizuojami tiek aerobiniu, tiek anaerobiniu būdu, tačiau paprastai anaerobinis skaidymas vyksta daug lėčiau nei aerobinis (Liang ir kt., 2008; Vamsee-Krishna ir Phale, 2008). Anaerobiniu būdu ftalatus daugiausia skaido metanogeninių bakterijų bendrijos. Jos skaido visus tris ftalato izomerus ir jų esterius išskirdamos acetatą ir metaną kaip galutinius produktus (Vamsee-Krishna ir Phale, 2008). Nustatyta, kad anaerobinėmis sąlygomis greičiausiai yra skaidomas ftalatas, tuomet tereftalatas, o ilgiausiai izoftalatas (Kleerebezem ir kt., 1999). Anaerobai, skaidantys ftalio rūgšties esterius, priklauso *Clostridium*, *Bacillus* (Chang ir kt., 2005), ir *Pelotomaculum* (Qiu ir kt., 2006) gentims. Bakterijos *Pseudomonas pseudoalcaligenes* B20b1 (Benckiser ir Ohow, 1982), *Agrobacterium* sp. DMT (Cheung ir kt., 2007), *Thauera* sp. DMP, *Xanthobacter* sp. DMI (Liang ir kt., 2008), *Rhodococcus* sp. Y22 (Wu ir kt., 2007) skaido ftalatus mažai deguonies turinčioje aplinkoje (Liang ir kt., 2008).



1.12 pav. Pradiniai ftalio rūgšties skaidymo Gram-neigiamose (A) ir Gram-teigiamose (B) bakterijose keliai. 1 – ftalio rūgštis; 2 – *cis*-4,5-dihidroksi-4,5-dihidroftalatas; 3 – 4,5-dihidroksiftalatas; 4 – *cis*-3,4-dihidroksi-3,4-dihidroftalatas; 5 – 3,4-dihidroksiftalatas; 6 – protokatechuatas. Fermentai: a – ftalato 4,5-dioksigenazė; b – *cis*-4,5-dihidroksi-4,5-dihidroftalato dehidrogenazė; c – 4,5-dihidroksiftalato-2-dekarboksilazė; d – ftalato 3,4-dioksigenazė; e – *cis*-3,4-dihidroksi-3,4-dihidroftalato dehidrogenazė; f – 3,4-dihidroksiftalato-2-dekarboksilazė (pagal Choi ir kt., 2007).

Žinomi du aerobinio ftalio rūgšties skaidymo keliai, kurių metu kaip galutinis produktas susidaro protokatechuatas (1.12 pav.). Gram-neigiamoms

bakterijoms (*Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* spp.) oksiduojant ir dehidrinant ftalato C4 ir C5 atomus, susidaro 4,5-dihidroksiftalatas, kuris po dekarboksilinimo virsta protokatechatu (Eaton, 2001). Gram-teigiamoms *Arthrobacter keyseri* 12B, *Terrabacter* sp. DBF63, *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1, *Rhodococcus* spp. RHA1, DK17 ir TFB bakterijoms yra būdingas 3,4-dioksigenazės kelias, kai iš pradžių ftalatas yra oksiduojamas ir susidaro 3,4-dihidro-3,4-dihidroksiftalatas (ftalato dihidrodiolis), kuris yra dehidrinamas ir dekarboksilinamas, kad susidarytų protokatechatus (Eaton, 2001; Habe ir kt., 2003; Stingley ir kt., 2004; Patrauchan ir kt., 2005; Choi ir kt., 2005; Tomás-Gallardo ir kt., 2006).

Gram-teigiamų bakterijų *pht* operoną sudaro genai, koduojantys fermentus, kurie dalyvauja ftalio rūgšties skaidyme iki protokatechato (Eaton, 2001). Paprastai ši operoną sudaro 6 genai: *phtAaAbAcAd* koduoja dioksigenazę (didįjį, mažąjį, feredoksino ir reduktazės subvienetus), *phtB* – dehidrogenazę, *phtC* – dekarboksilazę (Eaton, 2001). *M. vanbaalenii* PYR-1 bakterijos neturi dekarboksilazės geno (Stingley ir kt., 2004). Nustatyta, kad *Rhodococcus* sp. DK17, TFB, *M. vanbaalenii* PYR-1 ir *Terrabacter* sp. DBF63 bakterijose į *pht* operoną yra įsiterpę po vieną nežinomos funkcijos geną (Choi ir kt., 2005; Tomás-Gallardo ir kt., 2006; Stingley ir kt., 2004; Habe ir kt., 2003). Minėtų kamienų bakterijų genų išsidėstymas operono viduje skiriasi.

Nustatyta, kad *M. vanbaalenii* PYR-1 bakterijose *pht* operonas yra chomosomoje (Stingley ir kt., 2004), *A. keyseri* 12B ir *Rhodococcus* sp. TFB – plazmidėje (Eaton, 2001; Tomás-Gallardo ir kt., 2006). *Rhodococcus* sp. DK17 turi po *pht* operono kopiją dviejose plazmidėse (pDK2, pDK3) (Choi ir kt., 2007). Ftalio rūgšties skaidymo operonas yra dviejose linijinėse *Terrabacter* sp. DBF63 (pDBF1, pDBF2) (Nojiri ir kt., 2002) ir *Rhodococcus* sp. RHA1 (pRHL1, pRHL2) plazmidėse (Patrauchan ir kt., 2005).

phtR koduoja operono reguliatorių (Eaton, 2001). Šis genas *A. keyseri* 12B ir *Terrabacter* sp. DBF63 kamienuose yra už operono ir transkribuojamas ta pačia kryptimi (Eaton, 2001; Habe ir kt., 2003). *Rhodococcus* sp. DK17,

RHA1, TFB ir *M. vanbaalenii* PYR-1 operono reguliatoriaus genas yra prieš operoną ir transkribuojamas priešinga operonui kryptimi (Choi ir kt., 2005; Patrauchan ir kt., 2005; Tomás-Gallardo ir kt., 2006; Stingley ir kt., 2004).

Taigi, *Arthrobacter* spp. bakterijos yra plačiai paplitusios dirvožemyje, ledynuose, nutekamųjų vandenų nuosėdose ir dumble. Didžioji dalis šios genties bakterijų sugeba skaidyti įvairius natūralius ar sintetinius aromatinius ir heterociklinius junginius. Daugelis aprašytų rūšių turi vieną ar kelias katabolines plazmides, kurios lemia mitybinę įvairovę. Plazmidėse koduojami baltymai galėtų būti naudojami cheminių junginių sintezėje, biotechnologinių procesų kūrime, pritaikomi pramonėje. Deja, daugelis *Arthrobacter* spp. baltymų nėra aktyvūs *Escherichia coli* ląstelėse, o patikimų vektorių, kurie veiktų šios genties bakterijose, kol kas nėra sukurta.

Atsižvelgiant į tai šio darbo pagrindiniai tikslai buvo ištirti *Arthrobacter* spp. bakterijų, skaidančių piridiną ir jo darinius, didelės molekulinės masės plazmides, kuriose yra susitelkę degradacijos genai. Taip pat ištirti *Arthrobacter rhombi* VP3 ir PRH1 kamienuose aptiktas plazmides, mažesnes nei 10 kb. Panaudojant vienos ar abiejų mažųjų plazmidžių replikonus, konstruoti hibridinius vektorius.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Reagentai

Medžiagos	Šaltinis
Kanamycinas, Tris	AppliChem, Vokietija
Glicerolis	Barta a Cihlar, Čekija
Acto rūgštis	Chempur, Lenkija
Etilo alkoholis	Vilniaus degtinė, Lietuva.
β -merkaptioetanolis	Ferak, Vokietija
5-bromo-4-chloro-indolil- β -D-galaktopiranozidas (X-gal), izopropil- β -D-galaktopiranozidas (IPTG). Restrikcijos endonukleazės, T4 ligazė, CIAP, FastAP, T4 polinukleotidkinazė, Proteinazė K, DNA išskyrimo iš gelio rinkinys, Gene Ruler DNA ladder Mix ir MassRuler High Range DNA Ladder molekulių masių žymenys, Unstained Protein Molecular Weight Marker – baltymų molekulių masių žymenys, Maxima Hot Start Green PCR Master Mix, TrueStart Taq DNA Polymerase, TrueStart Taq buferis, MgCl ₂	Fermentas – Thermo Fisher Scientific, Lietuva
Amonio acetatas, ampicilinas, chinolininė rūgštis, kalio acetatas, tetraciklinas	Fluka, Vokietija
K ₂ HPO ₄	Girochem, Slovėnija
AccuPrime Pfx DNA polymerase	Invitrogen, JAV
Gliukozė	Lach-Ner, Čekija
KCl, MgSO ₄ , NaCl	Lachema, Čekija
Agaras, dimetilformamidas (DMF), NaOH, nikotinas, <i>p</i> -nitroanilinas	Merck, Vokietija
Mielų ekstraktas, NA (nutrient agar), NB (nutrient broth)	Oxoid, Anglija
CaCl ₂	Penta, Čekija

CaCl ₂ ×2H ₂ O, chloroformas, FeSO ₄ ×7H ₂ O, ftalio rūgštis, gintaro rūgštis (sukcinatas), K ₃ PO ₄ , KH ₂ PO ₄ , lizocimas, MgCl ₂ , MgSO ₄ ×7H ₂ O, MnSO ₄ ×4H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ , NaNO ₂ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ Cl, piridinas	Reachim, Rusija
Akrilamidas, etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA), fenolio-chloroformo mišinys	Roth, Vokietija
Agarozė, etidžio bromidas, chloramfenikolis	Serva, Vokietija
2-hidroksipiridinas, 2-metilpiridinas, 3-metilpiridinas, 4-metilpiridinas	Sigma–Aldrich, Vokietija
Natrio dodecilsulfatas (SDS)	Sigma, JAV
ZYMO Plasmid PREP	Zymo Research Corporation, JAV
Pradmenys	Metabion, Vokietija; Integrated DNA technology, Vokietija.

2.2. Bakteriniai kamienai ir plazmidės

Bakteriniai kamienai	Genotipas, savybės	Šaltinis
<i>Escherichia coli</i> DH5α	φ80dlacZΔM15 Δ(lacZY-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) sup E44 thi-1 gyrA96 relA1	Pharmacia
<i>Arthrobacter rhombi</i> : PRH1, VP3; <i>A. oxydans</i> PY21	sugeba panaudoti 2-hidroksipiridiną kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį.	Semėnaitė ir kt., 2003
<i>Arthrobacter</i> sp. 68b	sugeba panaudoti 2-metilpiridiną, nikotiną, ftalio rūgštį, piridiną kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį.	Gasparavičiūtė, 2008
<i>Arthrobacter</i> sp. 68b mut4, mut5	<i>Arthrobacter</i> sp. 68b 2-metilpiridino ir piridino katabolizmo mutantai.	Gasparavičiūtė, 2008
<i>Arthrobacter</i> sp.: 83; 85	sugeba panaudoti 2-metilpiridiną, nikotiną kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį.	Gasparavičiūtė, 2008
<i>Rhodococcus</i> sp. TMP1	sugeba panaudoti 2,3,5,6-tetrametilpiraziną kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį.	Kutanovas, nepublikuota

<i>Arthrobacter globiformis</i>	NRRL B-2979	ARS culture collection
<i>Rhodococcus erythropolis SQ1</i>	ATCC 4277-1	Quan ir Dabbs, 1993
Plazmidės	Savybės	Šaltinis
pTZ57R	Ap ^R , lacZ, fl, 2,9 kb	Mead ir kt., 1986
pACYC184	Cm ^R , Tc ^R , 4,2 kb	Chang ir Cohen, 1978; Rose, 1988
p34S-Tc	Ap ^R , Tc ^R , 4,1 kb	Dennis ir Zylstra, 1998
pART2	Km ^R , 4,6 kb	Sandu ir kt., 2005
pART2gfp	Km ^R , 5,3 kb	Sandu ir kt., 2005
pPRH	5,0 kb plazmidė iš <i>A. rhombi</i> PRH1	Šis darbas
pPRHHind4	pPRH klonuota į pTZ57R, Ap ^R , 7,9 kb	Šis darbas
pAPrepAB4	pPRH <i>repAB</i> klonuota į pART2, kurio pCG100 <i>ori</i> pašalintas, Km ^R , 4,4 kb	Šis darbas
pAPrepA2	pPRH <i>repA</i> klonuota į pART2, kurios pCG100 <i>ori</i> pašalintas, Km ^R , 4,1 kb	Šis darbas
pRMU8	replikonai iš pPRH ir pACYC184, Cm ^R , 3,2 kb	Šis darbas
pRMU824	replikonai iš pPRH ir pACYC184, lacZ, Cm ^R , 4,0 kb	Šis darbas
pRMU824Km	replikonai iš pPRH ir pACYC184, lacZ, Cm ^R , Km ^R , 4,9 kb	Šis darbas
pRMU824Tc	replikonai iš pPRH ir pACYC184, lacZ, Cm ^R , Tc ^R , 5,3 kb	Šis darbas
pVP3	6,1 kb plazmidė iš <i>A. rhombi</i> VP3	R. Meškienė (nepublikuota)
pVP3Sal24	pVP3 klonuota į pTZ19, Ap ^R , 9,0 kb	R. Meškienė (nepublikuota)
pVPAD2	3,4 kb pVP3 fragmentas klonuotas į pART2, kurio pCG100 <i>ori</i> pašalintas, Km ^R , 5,9 kb	Šis darbas

pVPAM11	2,7 kb pVP3 frgmentas klonuotas į pART2, kurio pCG100 <i>ori</i> pašalintas, Km ^R , 5,3 kb	Šis darbas
---------	---	------------

2.3. Pradmenys

Pradmens pavadinimas	Seka 5'→3'
M13/pUC F	GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA
M13/pUC R	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
T7 promoter pradmuo	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 terminator pradmuo	TATGCTAGTTATTGCTCAG
DP1	AACCAGCAATAGACATAAGCGGCT
RP1	ATCGATGATAAGCTGTCAAAC
DP2	TGGTCAAACCGTGCGGGGACCCTT
RP2	<u>AGATCTAACCTAGGTGGCCATCAGGCCGTCACCTT</u>
DP3	GAAG <u>AGATCTTTTT</u> ACGGTT
RP3	TGA <u>ACCTAGGCTTACA</u> ATTTCCA
DP4	A <u>ACCTAGGGAACAATAAA</u> ACTGTCTGCT
RP4	A <u>ACCTAGGTCTGATTAGAAAA</u> ACTCATC
DP5	T <u>ACCTAGGGCTCATGTTT</u> GACAGCTTAT
RP5	A <u>TCCTAGGGCTTCCATTCAGGTCGAGGT</u>
rep R	CCAGTGCTTCCGAATCG
repB F	AGCCTCGACATGAATTCCTGG
Cm F	TTCCGGATGAGCATTTCATCAGG
HFDH F	CTAGAGATGCCCCGCTAGATATAC
HFDH R	GGTTCTGGTATGAAGAGAATGGA
FOXG F	GAGATCCGTCCATGACTGACCAC
FOXG R	GTCCTCTTCTTCGCCTTCCATT
FOXGS F	GAGGACGAGCAGTCGCCCCAGAACA
FOXGS R	CTGCCTTTGCTCTTCGTGGGCCAC

FDK F	CAGCGTGCAGGAACTCCGGGACAAAC
FDK R	CGCATGCTTTGTATCGTACCCAGCGC
FEH F	GACATCCGAACAGTTTAGGAAGAGG
FEH R	GTATATCTAGGCGGGCATCTCTAG
fruF1	ATTGGATCCGCAGGATTGGCAATGTTCACTAC
fruR1	TAGGGATCCATTAGTACCAATCCTTAAGTGAG
c00419F1	GCGGGAGCCCATGCAAATCA
c00419R1	CGACACGTGGAACGGTCCAT
hpyD F	AACATATGGCATTGAAAGCAACGATCGTCCG
hpyD R	TTTACGCGGCCGCTGTTGAGAGAGAAGCGGTCCG
hpyE F	TGCATATGGCACTTGACCGGAAAATCGTCC
hpyE R	TTCATGCGGCCGCTGCGTCGAGCTCGCGCAAGT
GlyOX68F	GGAAACCAATGGCAGATCCCCGCCATACC
GlyOX68R	TTCCCTCGAGTTTGATGTTCATGCTGTTTCC

2.4. Terpės ir auginimo sąlygos

Terpė	Sudėtis
NA	28 g/l NA (nutrient agar)
NB	13 g/l NB (nutrient broth)
½ NB	6,5 g/l NB (nutrient broth)
EFA	10 g/l K ₂ HPO ₄ , 4 g/l KH ₂ PO ₄ , 1 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,5 g/l mielių ekstrakto, 0,4 g/l MgSO ₄ ×7H ₂ O, 10 ml/l druskų tirpalo
EFAA (EFA agarizuota)	EFA + 15 g/l agaro
Druskų tirpalas	2 g/l CaCl ₂ ×2H ₂ O, 1 g/l MnSO ₄ ×4H ₂ O, 0,5 g/l FeSO ₄ ×7H ₂ O, viskas ištirpinta 0,1N HCl

Visos terpės buvo autoklavuojamos 30 min. 121 °C temperatūroje esant 1 atmosferos slėgiui.

Escherichia coli DH5α bakterijos ant agarizuotų terpių buvo auginamos 37 °C, o *Arthrobacter* spp., *Rhodococcus* spp. bakterijos 30 °C

temperatūroje. Skystose terpėse visų kamienų bakterijos buvo auginamos 30 °C temperatūroje aeruojant.

2.5. Plazmidinės DNR išskyrimas

Bakterijos auginamos NB terpėje 30 °C temperatūroje aeruojant per naktį. Suspensija centrifuguojama 10 min. 3220×g šaldant. Supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos viename tūryje I-o tirpalo ir laikoma 15–20 min. kambario temperatūroje (Sambrook ir kt., 1989). Kai plazmidė skiriama iš *Arthrobacter* spp. ir *Rhodococcus* sp. kamienų, tuomet į I-ą tirpalą dedama sauso lizocimo (galutinė koncentracija 10 mg/ml) (Denis–Larosa ir kt., 1997). Po to įpilama 2 tūriai II-o tirpalo ir laikoma 15–20 min. kambario temperatūroje. Kai tirpalas tampa skaidrus, įpilama 1,5 tūrio 7,5 M amonio acetato ir laikoma 2–3 val. ledo vonioje, kol iškrenta varškės pavidalo nuosėdos. Gauta suspensija centrifuguojama (15 min. 3220×g šaldant). Supernatantas perpilamas į švarų mėgintuvėlį ir užpilama 2 tūriais etilo alkoholio ir dedama į – 20 °C šaldytuvą mažiausiai vienai valandai. Iškritus nuosėdoms, tirpalas centrifuguojamas 15 min. 3220×g šaldant. Supernatantas nupilamas, nuosėdos išdžiovinamos ir ištirpinamos nedideliame kiekyje vandens (Sambrook ir kt., 1989).

I-as tirpalas: 250 μl 40 % gliukozės, 50 μl 1 M Tris-OH (pH 8,0), 20 μl 0,5 M EDTA, 680 μl H₂O.

II-as tirpalas: 0,2N NaOH, 1 % SDS.

2.6. Genominės DNR skyrimas

Genominė DNR iš *Arthrobacter* sp. 68b kamieno buvo skiriama pakeistu Woo ir kt. (1992) pasiūlytu DNR skyrimo metodu. Bakterijos buvo auginamos tris paras 200 ml ½ NB terpėje su 0,1 % 2-metilpiridino. Suspensija centrifuguojama 20 min. 3220×g šaldant. Supernatantas nupilamas, o ląstelės

suspenduojamos 5 ml TNE buferio. Suspensija centrifuguojama 10 min. minėtomis sąlygomis. Tuomet supernatantas nupilamas ir ląstelės suspenduojamos 2 ml TNE buferio. Užpilama 2 ml TNE buferio, kuriame yra 2 % Triton X-100. Įdedama sauso lizocimo (10 mg/ml) ir inkubuojama 30 min. 37 °C temperatūroje. Tada įdedama 200 µl proteinazės K ir inkubuojama 2 val. 65 °C. Gautas tirpalas centrifuguojamas 15 min. 3220×g šaldant. Supernatantas perpilamas į švarų mėgintuvėlį ir užšaldomas.

TNE buferis: 50 mM Tris-OH (pH 7,5), 140 mM NaCl, 5 mM EDTA.

2.7. DNR hidrolizė, defosforilinimas ir fosforilinimas

DNR buvo hidrolizuojama įprastomis arba FastDigest restrikcijos endonukleazėmis. DNR defosforilinimui naudojama CIAP (veršelio žarnų šarminė fosfatazė) arba FastAP (šilumai jautri šarminė fosfatazė). DNR fosforilinimui naudota T4 PNK (T4 polinukleotidkinazė), reakciją vyko A buferyje. Visos reakcijos buvo atliekamos laikantis Fermentas – Thermo Fisher Scientific pateiktų rekomendacijų.

2.8. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė buvo atliekama horizontaliame 0,8–1,0 % agarozės gelyje TAE buferyje (Sambrook ir kt., 1989). Po elektroforezės gelis buvo dažomas etidžio bromido tirpalu ir analizuojamas ultravioletinėje šviesoje. DNR fragmentų molekulinės masės buvo nustatomos naudojant Gene Ruler™ DNA Ladder Mix.

50 x TAE: 121 g Tris-OH, 18,6 g Na₂EDTA, 28,6 ml acto rūgšties, H₂O iki 500 ml.

2.9. Pulsuojančio lauko elektroforezė

DNR mėginiai buvo sumaišyti su 1,2 % žemoje temperatūroje besilydančia (low-melting) agaroze ir suleidžiami į 1,2 % agarozės gelio šulinėlius. Pulsuojančio lauko elektroforezė buvo vykdoma Gene Navigator sistemoje (Pharmacia Biotech) 0,5 % TBE buferyje 24 valandas 8 °C temperatūroje. Pulso trukmė: 10 s – 4 val.; 15 s – 4 val.; 20 s – 6 val.; 25 s – 10 val. Tada gelis buvo dažomas 30 min etidžio bromido (0,5 µg/ml) tirpale, po to atplautas distiliuotu vandeniu ir analizuotas ultravioletinėje šviesoje.

5 % TBE: 54 g/l Tris-OH, 27,5 g/l boro rūgšties, 20 ml/l EDTA (pH 8,0).

2.10. DNR fragmentų gryninimas iš gelio

Tiriama DNR buvo hidrolizuojama pasirinktomis restrikcijos endonukleazėmis ir frakcionuojama agarozės gelyje. Reikiamų dydžių fragmentai buvo išpjaunami iš gelio ir išskiriami naudojant DNR gryninimo rinkinį laikantis Fermentas – Thermo Fisher Scientific pateiktų rekomendacijų.

2.11. DNR klonavimas

DNR buvo klonuojama į plazmidinį vektorių, hidrolizuotą atitinkama (-omis) restrikcijos endonukleaze (-ėmis), naudojant T4 DNR ligazę 10 °C temperatūroje 16 val. arba 1 val. kambario temperatūroje (22 °C). Reakcijos mišinys, norint inaktyvuoti ligazę, buvo kaitinamas 15 min 65 °C. Po to atvėsinus mišinį, juo buvo transformuojamos bakterijų ląstelės.

2.12. *Escherichia coli* DH5a elektroimlių ląstelių ruošimas ir elektroporacija

Escherichia coli DH5a ląstelės buvo užsėjamos į 5 ml NB terpės ir auginamos per naktį (15–16 val.) 30 °C temperatūroje aeruojant. 1 ml naktinės kultūros buvo užsėjama į 20 ml NB terpės. Auginama aeruojant 37 °C temperatūroje iki optinio tankio (A_{600}) 0,5–0,9. Tuomet ląstelės atvėsinaamos laikant 15 min. ledo vonioje. Paskui centrifuguojama 10 min 3220×g šaldant, supernatantas pašalinamas. Ląstelės praplaunamos 10 ml, paskui 5 ml šalto 10 % glicerolio tirpalo: jos resuspenduojamos ir surenkamos centrifuguojant anksčiau minėtomis sąlygomis. Po to ląstelės suspenduojamos 1 ml šalto 10 % glicerolio tirpalo (Sharma ir Schimke, 1996).

Elektroporacijai naudojamos ląstelės ir kiuvetės atšaldomos ledo vonioje. Į 100 µL elektroimlių ląstelių įdedama 1 µg DNR ir inkubuojama kelias minutes lede. Tuomet ląstelių suspensija su DNR perkeliama į atšaldytą kiuvetę. Po elektros šoko (20 kV/cm), kurio impulso trukmė 4,8–5,6 ms, ant ląstelių nedelsiant užpilama 100 µl NB terpės. Suspensija perkeliama į mėgintuvėlį. Ląstelės inkubuojamos 45 min 37 °C temperatūroje, surenkamos centrifuguojant 1 min 16100×g ir išsėjamos ant NA terpės su atitinkamu antibiotiku (Sharma ir Schimke, 1996).

2.13. *Arthrobacter* spp. ir *Rhodococcus* spp. elektroimlių ląstelių ruošimas ir elektroporacija

Arthrobacter spp. ir *Rhodococcus* spp. ląstelės užsėjamos į 5 ml NB terpės ir auginama per naktį (15–16 val.) 30 °C temperatūroje aeruojant. 1 ml naktinės kultūros užsėjamas į 20 ml NB terpės ir auginama aeruojant 30 °C temperatūroje, kol optinis tankis (A_{580}) pasieks 0,5. Suspensija atšaldoma laikant ledo vonioje 15 min. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min 3220×g, po to suspenduojamos 10 ml šalto 10 % glicerolio tirpalo. Įdedama 100 µl lizocimo (4 mg/ml) ir inkubuojama 30 °C temperatūroje 30 min.

Ląstelės vėl surenkamos centrifuguojant ir du kartus praplaunamos šaltu 10 % glicerolio tirpalu, paskui suspenduojamos 1 ml šalto 10 % glicerolio tirpalo (Gartemann ir Eichenlaub, 2001).

Į 100 µL paruoštų ląstelių įdedama 1 µg DNR. Elektroporacijos sąlygos: įtampa 20 kV/cm, impulso trukmė 4,8–5,6 ms. Po reakcijos ant ląstelių nedelsiant užpilama 100 µL NB terpės. Suspensija perkeliama į mėgintuvėlį ir inkubuojama 30 °C temperatūroje per naktį. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 1 min. 16100×g ir išsėjamos ant NA terpės su atitinkamu antibiotiku.

2.14. Plazmidinės DNR ruošimas sekų nustatymui ir jų analizė

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

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

Nukleotidų sekos nustatymas. Nukleotidų sekų nustatymui buvo naudojami standartiniai M13/pUC pradmenys. DNR nukleotidų sekos buvo nustatytos Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre (Lietuva) arba MacroGen (Pietų Korėja).

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

2.15. Nukleotidų ir aminorūgščių filogenetinė analizė

Nukleotidų (16S rRNR genu) ir aminorūgščių (ftalio rūgšties skaidymo ir reguliacijos baltymų bei 2-metilpiridino skaidyme dalyvaujančios monooksigenazės) sekų filogenetinė analizė buvo atliekama naudojant MEGA 5.0 (Tamura ir kt., 2011) programą. Evoliucinės kilmės analizė buvo atliekama artimiausių grupių apjungimo metodu (Saitou ir Nei, 1987). Analizuojamų taksonominių vienetų evoliucijai atspindėti buvo paimtos įkėlos (bootstraps) iš 1000 pakartojimų. Procentinė įkėlos sutapimo su tiriamu taksonominiu vienetu išraiška nurodyta šalia atsišakojimo (Felsenstein, 1985). Evoliuciniai atstumai buvo apskaičiuoti Poisson korekcijos metodu (Zuckerkanndl ir Pauling, 1965) ir yra pateikti tokiais vienetais: pakeistų nukleotidų/aminorūgščių skaičius tenkantis vienai pozicijai. Iš duomenų apskaičiavimo pašalintos visos pozicijos su tarpais ir pozicijos apie kurias duomenų nėra (pilno pašalinimo funkcija; complete deletion option).

Arthrobacter rhombi PRH1 plazmidės pPRH replikacijos baltymų filogenetinei analizei buvo naudojama Mr. Bayes-3.1.2 programa (Huelsenbeck, Ronquist, 2001).

2.16. Genomo sekos nustatymas

Arthrobacter sp. 68b genomo nukleotidų sekos buvo nustatomos naudojant 454 platformą ir ILLUMINA technologiją Macrogen (Pietų Korėja) ir GATC (Vokietija).

2.17. Baltymų *de novo* sekos nustatymas

Baltymai, išpjauti iš poliakrilamidinio gelio, buvo ruošiami peptidų masių spektrometrinei analizei: peptidų molekulinės masės ir *de novo* sekų nustatymui, pagal Vilniaus universiteto Biochemijos institute Proteomikos

centro reikalavimus. Šiame centre buvo atliekama peptidų masių spektrometrinė analizė. Pagal nustatytą peptidų seką, naudojant programą BioEdit 7.1.3 (Hall, 1999), buvo ieškoma geno, koduojančio indukuotą baltymą.

2.18. Bakterijų gydymas nuo plazmidžių

Kultivavimas aukštesnėje nei optimali temperatūroje. Bakterijos buvo kultivuojamos 1 ml NB terpės 35 °C, 37 °C, 40 °C, 42 °C ir 45 °C temperatūroje per naktį (18 val.) aeruojant. Tuomet 20 µL ląstelių kultūros buvo išsėjama ant NA su 0,2 % 2-hidroksipiridino arba EFAA su 0,2 % 2-hidroksipiridino.

Kultivavimas su novobiocinu. Bakterijos buvo kultivuojamos 5 ml NB terpės be novobiocino ir su 5, 10 ir 15 µg/ml novobiocino per naktį (18 val.) 30 °C temperatūroje aeruojant. Po inkubacijos matuojamas optinis tankis (A_{600}) ir įvertinamas novobiocino poveikis ląstelių dauginimuisi. Tuomet 20 µL ląstelių kultūros buvo išsėjama ant NA su 0,2 % 2-hidroksipiridino. Vėliau atskiros bakterijų kolonijos buvo persėtos ant EFAA su 0,2 % 2-hidroksipiridino.

2.19. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)

Šiame darbe PGR (išskyrus fragmentų padauginimą vektoriaus konstravimui) buvo naudojama 2X Maxima Hot Start Green PCR Master Mix. Reakcijos mišinys buvo paruoštas laikantis gamintojo rekomendacijų. PGR buvo atliekama T personal thermocycler (Biometra) ir *Mastercycler epgradient* S (Eppendorf) aparatais.

PGR programa: 94 °C 10 min.; 94 °C 30 s, 50–60 °C 30 s, 72 °C 1 min/kb – 30 ciklų; 72 °C 5 min.

2.20. Kiekybinė PGR analizė plazmidės pRMU824Km kopijų skaičiaus nustatymui *Arthrobacter* sp. 68b kamiene

Kiekybinė tikro laiko PGR buvo vykdoma 15 µL reakcijos mišinyje 0,1 ml mėgintuvėliuose naudojant Rotor-Gene Q 6plex aparatą (Qiagen). kPGR reakcijos mišinį sudarė: 200 nM kiekvieno pradmens, 200 µM dNTP, 3 mM MgCl₂, 1,5 µM Syto9 (Invitrogen-Molecular Probes), 0,04 U/µL TrueStart™ Taq DNA Polymerase, TrueStart™ Taq buffer ir 1 µL tiriamos DNR, kurios pavyzdžiai (50 µg/ml) prieš jų analizę buvo praskiesti 100 ir 1000 kartų.

Chromosomoje esantis genas buvo panaudotas kaip vienos kopijos standartas. Neigiama kontrolė buvo naudojama nustatyti nespecifinį pradmenų prisijungimą. Kopijų skaičius buvo apskaičiuotas nuo slenkstinio ciklo (C^T). Jo vertės buvo apskaičiuojamos automatiškai pagal padauginimo plotą (duomenys nepateikti). Tuomet buvo apskaičiuojamas chromosominio ir plazmidės fragmentų-taikinių C^T verčių vidurkių skirtumas.

kPGR programa: 95 °C 4 min.; 95 °C 20 s, 56 °C 60 s ir 72 °C 60 s – 35 ciklai. Fluorescencijos duomenys buvo užrašomi po pradmens prilydymo etapo. Eksperimentas buvo kartojamas tris kartus.

2.21. Minimalaus replikono nustatymas

Plazmidės pPRH *ori* seka su *repAB* operonu (1,9 kb *Bam*HI-*Sal*I fragmentas) ir *ori* seka su *repA* genu (1,6 kb *Bam*HI-*Xho*I fragmentas) buvo klonuoti į plazmidę pART2, hidrolizuotą *Bg*II ir *Sal*I restrikcijos endonukleazėmis. Tokios hidrolizės metu yra pašalinamas pART2 esantis pCG100 replikacijos operonas, lemiantis gebėjimą replikuotis *Actinomycetales* bakterijose.

Plazmidė pVP3 buvo hidrolizuojama su *Bg*II ir *Sal*I restrikcijos endonukleazėmis ir gauti 2,7 kb ir 3,4 kb fragmentai buvo klonuoti į plazmidę pART2, hidrolizuotą minėtomis restrikcijos endonukleazėmis.

2.22. *E. coli*–*A. rhombi* vektoriaus kūrimo pradmenys ir PGR

Naudojant sukurtus pradmenis (DP1 – DP5, RP1 – RP5) ir AccuPrime *Pfx* DNR polimerazę, buvo padauginta plazmidės pACYC184 fragmentas, kuriame yra *E. coli* replikonas bei atsparumo chloramfenikoliui genas (*cat*), *repA* ir *repB* genus turintis plazmidės pPRH fragmentas, *lacZ* operono dalis iš pTZ57R, taip pat *tet* (atsparumo tetraciklinui) iš p34S-Tc ir *kan* (atsparumo kanamicinui) iš pART2 genai.

pPRH fragmento atvirkštinis pradmuo buvo sukurtas 5' gale pridant sekas, kurias atpažįsta restrikcijos endonukleazės *Bgl*III ir *Xma*II. pTZ57R fragmento tiesioginio pradmens 5' gale buvo įterpta *Bgl*III, o atvirkštinio pradmens – *Xma*II atpažinimo seka. p34S-Tc ir pART2 fragmentų abiejų pradmenų 5' galuose buvo įterpta seka, kurią atpažįsta *Xma*II. Sukurti pradmenys pateikti skyrelyje 2.3., įterptos restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekos yra pabrauktos.

PGR mišinį, kurio bendras tūris 25 µl, sudarė: 0,5 µl DNR matricos (50–100 ng), 2,5 µl 10X AccuPrime *Pfx* mišinio, 0,5 µl kiekvieno pradmens (galutinė koncentracija 2 µM) ir 0,5 µl AccuPrime *Pfx* DNR polimerazės (1,25 vnt.). Reakcijos sąlygos: 95 °C – 5 min.; 30 ciklų: 95 °C – 30 s, 52–62 °C – 30 s, 72 °C – 1 min/kb; 72 °C – 5 min. Visos PGR reakcijos buvo atliekamos T personal thermocycler (Biometra) aparatu.

2.23. Plazmidžių stabilumo tyrimas

E. coli–*A. rhombi* vektoriaus pRMU824Km stabilumas buvo tiriamas keliuose *Actinomycetales* kamienuose: *Arthrobacter* sp. 68b ir *Rhodococcus erythropolis* SQ1. Bakterijos, turinčios minėtą plazmidę, buvo auginamos 16 val. NB terpėje su kanamicinu, tuomet jos buvo persėjamos į neatrankią NB terpę (75 ml), kad pradinis optinis tankis (A_{600}) būtų 0,05. Tada bakterijos buvo auginamos 30 °C temperatūroje aeruojant. Po 2, 4, 6 ir 8 auginimo valandų buvo paima 100 µl ląstelių kultūros ir atliekami nuoseklūs skiedimai. Tuomet

paėmus 50 μ l ląstelių suspensijos iš kelių pasirinktų skiedimo variantų, bakterijos buvo išsėjamos ant neatrankios NA terpės ir augintos dvi paras. Po 24 val. auginimo skystoje terpėje bakterijos buvo vėl persėjamos į neatrankią NB terpę (75 ml), kad pradinis optinis tankis (A_{600}) būtų 0,05. Tuomet bakterijų skiedimo ir auginimo procedūra buvo pakartota taip, kaip aprašyta anksčiau.

Tada visų variantų 200 atsitiktinai pasirinktų kolonijų buvo persėjamos atitinkamai ant neatrankios ir atrankios NA terpės. Stabilumo procentinis dydis buvo apskaičiuojamas tokiu būdu: kolonijų, užaugusių ant atrankios terpės, skaičius padalintas iš kolonijų, užaugusių ant neatrankios terpės, skaičiaus ir padauginta iš 100 % (Picardeau ir kt., 2000).

2.24. Plazmidžių suderinamumo tyrimas

Plazmidžių pPRH ir pART2gfp replikonų suderinamumas buvo tiriamas *Arthrobacter oxydans* PY21 ląstelėse. Bakterijos, turinčios plazmidę pRMU824Tc, buvo transformuotos pART2gfp plazmide. Atranka buvo vykdoma ant terpės su tetraciklinu ir kanamicinu. Plazmidine DNR, išskirta iš atskirų klonų, buvo transformuotos į *E. coli* ląstelės, klonų atranka buvo vykdoma atskirai ant terpės su atitinkamu antibiotiku, nes minėtų plazmidžių *E. coli* replikonai yra nesutaikomi. Plazmidinė DNR iš *E. coli* buvo analizuojama hidrolizuojant restrikcijos endonukleazėmis ir analizuojama agaroziniame elektroforezės gelyje.

2.25. Substratinio specifiškumo tyrimas

Arthrobacter sp. 68b kamieno bakterijos buvo išsėjamos iki vienos kolonijos ant agarizuotos EFA terpės su 0,1 % piridino, 0,2 % 2-hidroksipiridino, 0,1 % 3-metilpiridino, 0,1 % 4-metilpiridino, 0,1 % nikotino, 0,1 % ftalio rūgšties, 0,3 % gintaro rūgšties, 0,5 % glicerolio, ir ant

EFAA be anglies šaltinio. Lėkštelės buvo inkubuojamos 30°C termostate 3 paras. Bakterijų augimas buvo vertinamas vizualiai.

2.26. Optimalios ftalio rūgšties koncentracijos nustatymas

Arthrobacter sp. 68b kamieno bakterijos buvo užsėjamos į NB terpę ir auginamos per naktį. 1 ml naktinės kultūros perkeltas į kolbutes su 20 ml EFA terpės, kurioje yra 0,1 %, 0,2 %, 0,5 % arba 1 % ftalio rūgšties koncentracijos. Kontrolei naudojama EFA terpė be anglies šaltinio. Kultūros optinis tankis (A_{600}) buvo matuojamas kas 24 valandas.

2.27. Ftalato 4,5-dioksigenazės ir 4,5-dihydro-4,5-dihidroksiftalato dehidrogenazės aktyvumų nustatymas

Norint nustatyti ftalato 4,5-dioksigenazės ir 4,5-dihydro-4,5-dihidroksiftalato dehidrogenazės aktyvumus buvo naudojamas diazotintas *p*-nitroanilinas (Nomura ir kt., 1989). Reagentas buvo gautas sumaišus 0,3 % *p*-nitroaniliną, ištirpintą 0,8 N HCl, su 5 % natrio nitrito tirpalu santykiu 50:3 prieš pat panaudojimą. *Arthrobacter* sp. 68b bakterijos buvo auginamos 20 ml EFA terpėje su 0,5 % ftalio rūgšties 2 paras 30 °C temperatūroje aeruojant. Ląstelės buvo surinktos centrifuguojant ir praplautos 20 mM Tris-HCl buferiu (pH 8,0), po to resuspenduotos 1 ml to paties buferio. Tuomet įdėta chinolino rūgšties, kad jos pradinė koncentracija būtų 2,5 mM. Ląstelės buvo inkubuojamos 30 °C, pavyzdžiai tiriami po 1 ir 2 valandų. Ląstelės nusodintos centrifuguojant, supernatantas buvo perpilamas į kiuvetę. Tuomet buvo įpilama 2 μl diazotinto *p*-nitroanilino ir sugerties spektras matuotas 300–700 nm intervale.

2.28. Biovirsmų tyrimas panaudojant intaktines ląsteles

Biovirsmų tyrimams *Arthrobacter* sp. 68b bakterijos buvo auginamos 20 ml EFA terpėje su 0,1 % 2-metilpiridino ir piridino bei 0,5 % ftalio rūgšties 2 paras 30 °C temperatūroje aeruojant. Ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant 1 min. 10000×g, tuomet tris kartus plaunamos buferiu (detalizuota toliau).

2-metilpiridino ir piridino biovirsmų tyrimui naudotos ląstelės iš 2,25 ml kultūrinio skysčio. Jos buvo plaunamos 25 mM kalio fosfatiniu buferiu (pH 7,2) ir suspenduojamos 1 ml to paties buferio. Tuomet buvo įdedama 2-metilpiridino ir piridino, kurių pradinė koncentracija reakcijos mišinyje atitinkamai buvo 0,05 μM ir 0,25 μM.

Ftalio ir chinolino rūgščių biovirsmų tyrimui naudotos ląstelės iš 1,5 ml kultūrinio skysčio. Jos buvo plaunamos 20 mM kalio fosfatiniu buferiu (pH 7,5) ir suspenduojamos 1 ml to paties buferio. Paskui buvo įdėta ftalio ir chinolino rūgščių, kurių pradinės koncentracijos reakcijos mišinyje atitinkamai buvo 1 mM ir 0,4 mM.

Paruošus reakcijų mišinius, ląstelės buvo resuspenduojamos ir nedelsiant nucentrifuguojamos. Tuomet supernatantas perkeltas į kiuvetę ir užrašytas pradinis spektras 200–350 nm intervale. Po to supernatantas buvo perkeliamas į tą patį mėgintuvėlį, ląstelės buvo resuspenduojamos ir inkubuojamos 30 °C temperatūroje purtyklėje Thermomixer compact (Eppendorf) (350 aps./min.). Vėliau spektrai užrašomi pasirinktais laiko intervalais (detalizuota skyr. 3.1.2 ir 3.1.3) ir analizuojami jų pokyčiai.

2.29. Beląstelinio ekstrakto paruošimas

Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min. 3220×g šaldant, supernatantas nupilamas ir jos plaunamos 20 mM kalio fosfatiniu buferiu (pH 7,2). Tuomet vėl centrifuguojamos anksčiau nurodytomis sąlygomis. Po to, pašalinus supernatantą, ląstelės suspenduojamos 2 ml minėto buferio ir

ardomos 2 min. ultragarsiniu dezintegratoriumi SONICS vibra cell (22 kHz, amplitudė 40 %, ledo-vandens vonioje). Ląstelių nuolaužos pašalinamos centrifuguojant 5 min 3220×g šaldant.

2.30. Baltymų kiekio nustatymas

Prieš ruošiant pavyzdžius elektroforezei, baltymų kiekis buvo nustatomas naudojant Folino reagentą pagal Lowry ir kt. (1951) aprašytą metodiką.

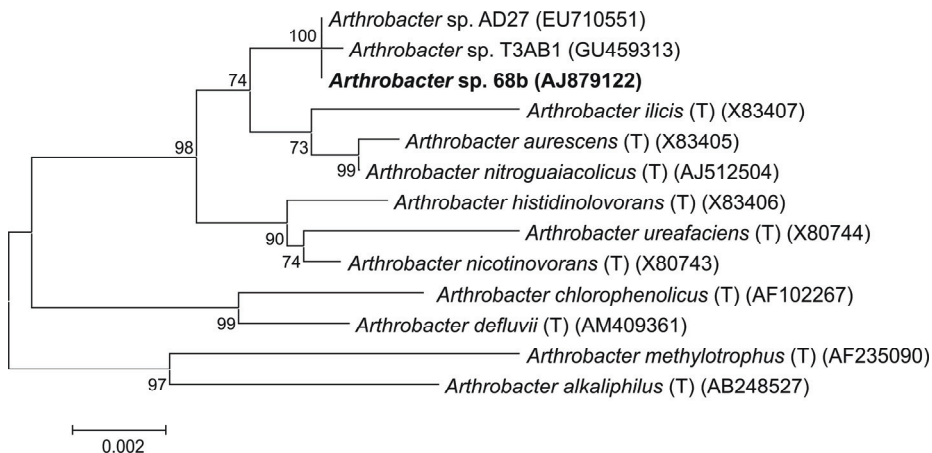
2.31. Baltymų elektroforezė

Baltymų elektroforezė buvo vykdoma denatūruojančiomis sąlygomis, naudojant 4,5 % koncentruojantį ir 10 % skirstomąjį poliakrilamido gelius. Baltymai dažyti Coomasie Brilliant Blue R-250 dažais, gelis atplaunamas 7 % acto rūgštimi (Laemmli, 1970).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. *Arthrobacter* sp. 68b bakterijų plazmidės ir katabolinių kelių tyrimas

Ankstesnių Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus darbų metu iš dirvožemio buvo išskirtos 68b kamieno bakterijos, galinčios panaudoti 2-metilpiridiną kaip vienintelį anglies šaltinį. 16S rRNR genų filogenetinė analizė parodė, kad kamienas priklauso *Arthrobacter* genčiai (Gasparavičiūtė, 2008). Šio darbo metu dalinai nustačius 68b kamieno bakterijų genomo nukleotidų seką, buvo patikslinta 16S rRNR geno seka. Filogenetinė analizė (3.1 pav.) parodė, kad *Arthrobacter* sp. 68b bakterijos yra giminingiausios *Arthrobacter* sp. AD27 ir T3AB1 kamienų bakterijoms, kurios buvo išskirtos iš dirvožemio kaip sugebančios skaidyti atraziną (2-chloro-4-etilamino-6-izopropilamino-1,3,5-triaziną). Tai galėtų būti nauja rūšis, kuriai įvardyti reikia tolimesnių tyrimų.



3.1 pav. 68b kamieno filogenetinis medis, sudarytas remiantis 16S rRNR geno analize. Filogenetinė padėtis buvo tiriama artimiausių grupių apjungimo metodu. Šalia atsišakojimų nurodyta procentinė įkėlos sutapimo su tiriamu taksonominiu vienetu procentinė išraiška. Mastelis atitinka 2 pakeistų nukleotidų skaičių, tenkantį tūkstančiui nukleotidų. Šalia bakterinių kamienų nurodyti genų banko prieigos numeriai.

Iš literatūros duomenų žinoma, kad *Arthrobacter* spp. bakterijos pasižymi mitybiniu įvairiapusiškumu (Jones ir Keddie, 2006). Taigi, buvo tiriama, ar *Arthrobacter* sp. 68b bakterijos be 2-metilpiridino gali panaudoti kitus heterociklinius junginius (piridiną, 2-hidroksipiridiną, 3-metilpiridiną, 4-metilpiridiną, nikotiną), ftalio ir gintaro rūgštis bei glicerolį kaip vienintelį anglies šaltinį. Nustatyta, kad jos sugeba skaidyti piridiną, nikotiną, ftalio ir gintaro rūgštis, glicerolį, bet neskaido 2-hidroksipiridino, 3-metilpiridino bei 4-metilpiridino. Ankstesnių darbų metu buvo gauti *Arthrobacter* sp. 68b bakterijų mutantai (mut4, mut5), pradėję gebėjimą skaidyti 2-metilpiridiną (Gasparavičiūtė, nepublikuota). Šio darbo metu buvo nustatyta, kad mut4 negali panaudoti nei vieno junginio, kurį skaido gamtinio tipo *Arthrobacter* sp. 68b bakterijos, kaip anglies šaltinio. Kitas mutantas (mut5) gali panaudoti nikotiną, gintaro rūgštį ir glicerolį. Tyrimų rezultatai yra pateikti 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. *Arthrobacter* sp. 68b ir jo mutantų sugebėjimo skaidyti įvairius anglies šaltinius įvertinimas po 3 parų augimo. "+" – skaido, "-" – neskaido.

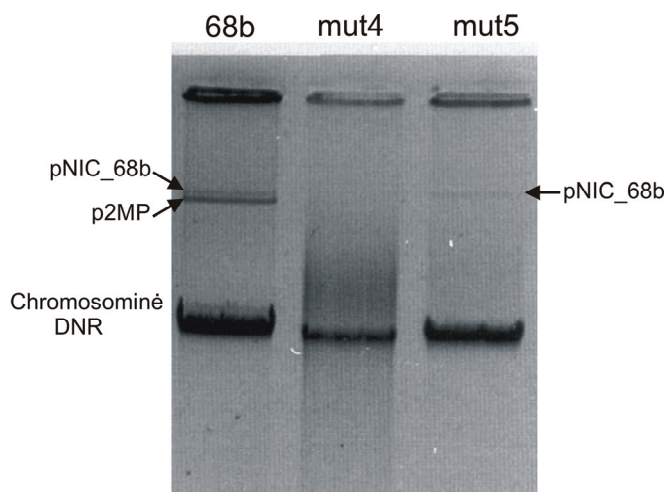
	68b	mut4	mut5
Piridinas	+	-	-
2-Hidroksipiridinas	-	-	-
3-Metilpiridinas	-	-	-
4-Metilpiridinas	-	-	-
Nikotinas	+	-	+
Ftalio rūgštis	+	-	-
Gintaro rūgštis	+	-	+
Glicerolis	+	-	+

Arthrobacter sp. 68b kamieno ir jo mutantų substratinio specifiškumo tyrimo rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad gamtinio tipo bakterijos gali turėti vieną ar kelias katabolines plazmides. Iš literatūros šaltinių yra žinoma, kad bakterijų, skaidančių įvairius cheminius junginius, įskaitant piridiną ir jo darinius, katabolinius baltymus koduojantys genai dažniausiai yra susitelkę

didelės molekulinės masės plazmidėse (Agapova ir kt., 1992; Mohan ir kt., 2003; Vedler, 2009). Prarastas gebėjimas skaidyti tiriamas medžiagas yra siejamas su plazmidžių netekimu (Kolenbrander ir Weinberger, 1977, Weinberger ir Kolenbrander, 1979; Overhage ir kt., 2005).

3.1.1. *Arthrobacter* sp. 68b bakterijų plazmidės

Norint išsiaiškinti, ar *Arthrobacter* sp. 68b bakterijos turi didelės molekulinės masės plazmidžių, taip pat ar jos yra susijusios su gebėjimu skaidyti tam tikrus junginius, buvo tiriama *Arthrobacter* sp. 68b ir jo mutantų mut4 ir mut5, suminė genomine DNR. Ji buvo analizuojama agaroziniame gelyje horizontalios ir pulsuojančio lauko elektroforezės metodais. Nustatyta, kad gamtinio tipo bakterijos turi bent dvi didelės molekulinės masės plazmides. Jo mutantas mut4, kuris neskaido nei vieno tirto junginio, yra praradęs abi plazmides, o mut5 – vieną, mažesniąją (3.2 pav.). Remiantis substratinio specifiškumo ir DNR analizės rezultatais, galima teigti, kad genai, koduojantys 2-metilpiridino, piridino ir ftalio rūgšties degradacijos baltymus, yra mažesnėje plazmidėje, pavadintoje p2MP, o dalyvaujantys nikotino skaidyme yra didesnėje plazmidėje, pNIC_68b.



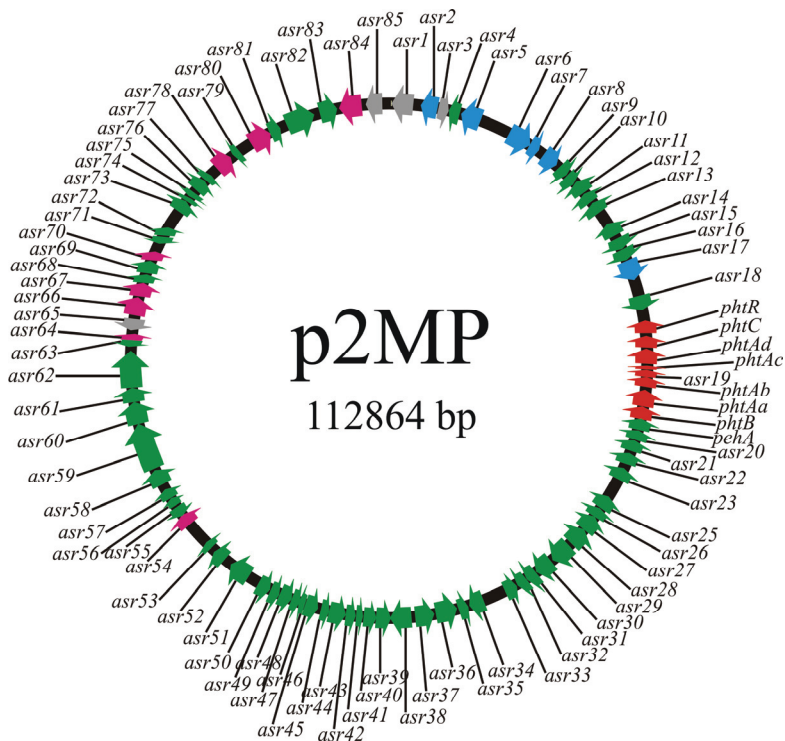
3.2 pav. *Arthrobacter* sp. 68b, mut4 ir mut5 genominės DNR pasiskirstymas horizontalios elektroforezės gelyje.

Arthrobacter sp. 68b genomą buvo nuskaitomas naudojant 454 platformą ir ILLUMINA technologiją. Surinkus nustatytą nukleotidų seką, buvo gautas fragmentas, kuriame yra genai, koduojantys nikotino skaidymo baltymus, ir beveik 113 kb žiedinė plazmidė, kurioje yra ftalio rūgšties ir galimų 2-metilpiridino ir piridino skaidymo baltymų genai. Galima teigti, kad surinktas fragmentas yra pNIC_68b plazmidės dalis. Analizuojant nikotino skaidymo baltymų ir juos koduojančių genų seką, buvo nustatyta 90 ir daugiau procentų homologija analogiškiems *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1 (165 kb) genams ir jų produktams (duomenys nepateikti) (Igloi ir Brandsch, 2003). Galima daryti prielaidą, kad pNIC_68b plazmidė yra panašaus dydžio kaip pAO1. *Arthrobacter* sp. 68b plazmidė pNIC_68b toliau darbe nebus nagrinėjama, nes tokios pačios struktūros jau yra aprašyta literatūroje.

Plazmidė p2MP yra 112864 bp dydžio, GC sudaro 61 %, aptikti 93 atviri skaitymo rėmeliai (3.3 pav.), jų koduojami baltymai yra pateikti 3.2 lentelėje. Nustatyta GC reikšmė patenka į *Arthrobacter* sp. chromosominei DNR būdingų reikšmių intervalą. Analizuojant plazmidės genų produktų seką ir ieškant homologų, buvo pastebėta, kad daugelis baltymų yra panašiausi į *Arthrobacter* spp. arba *Rhodococcus* spp. baltymus. Plazmidėje nustatyti 11,3 kb (*asr34–asr44*) ir 2,5 kb (*asr45–asr49*) fragmentai, kurie yra atitinkamai panašūs į *Arthrobacter* sp. AK-1 pSI-1 ir *Arthrobacter* sp. FB24 pFB24-136 plazmidžių dalis. Aptikti genai (*asr20–asr23*), koduojantys nitrato/sulfonato/bikarbonato ABC (nuo *angl.* ATP-binding cassette) nešiklio baltymus.

Kaip buvo minėta literatūrinėje dalyje, šiuo metu yra nuskaityta *Arthrobacter keyseri* 12B plazmidės pRE1 (130 kb) 26274 bp fragmentas (Eaton, 2001) ir *A. aurescens* TC1 bakterijų pTC1 (408 kb) ir pTC2 (301 kb) (Mongodin ir kt., 2006), *A. nicotinovorans* pAO1 (165 kb) (Igloi ir Brandsch, 2003), *A. nitroguajacolicus* Rü61a pAL1 (113 kb) (Parschat ir kt., 2007), *Arthrobacter* sp. AK-1 pSI-1 (99 kb), *Arthrobacter* sp. FB24 pFB24-104 (96 kb), pFB24-105 (115 kb) ir pFB24-136 (159 kb), *Arthrobacter* sp. Chr15 pChr15 (50 kb) (Jerke ir kt., 2008), *A. arilaitensis* Re117 pRE117-1 (50 kb)

(Monnet ir kt., 2010) ir *A. phenanthrenivorans* pASPHE301 (190 kb), pASPHE302 (94 kb) (Kallimanis ir kt., 2011) plazmidės. Visos yra žiedinės, tik pAL1 linijinė.



3.3 pav. *Arthrobacter* sp. 68b katabolinė plazmidė p2MP. Mėlyna spalva pažymėti atviri skaitymo rėmeliai, koduojantys galimus 2-metilpiridino ir piridino skaidymo baltymus; raudona – ftalio rūgšties skaidymo baltymus koduojantys genai; rožine – DNR replikacijos, rekombinacijos, konjugacijos, kopijų padalijimo baltymų genai; pilka – transpozazių ir integrazių genai; žalia – kitų funkcijų baltymus koduojantys genai.

Nustatyta, kad p2MP plazmidėje yra genai, koduojantys ftalio rūgšties skaidymo iki protokatechuito baltymus. Ftalato skaidymo baltymų genai taip pat yra nustatyti pRE1 ir pASPHE301 plazmidėse (Eaton, 2001; Kallimanis ir kt., 2011). Rekombinacijos baltymų genai aptikti nagrinėjamoje plazmidėje ir visose anksčiau minėtose, išskyrus pAL1. Plazmidėje p2MP nustatyti atviri skaitymo rėmeliai, koduojantys replikacijos baltymus. Genai, kurių produktai dalyvauja replikacijoje, taip pat yra rasti pAL1, pFB24-136, pFB-104, pRE117-1 ir pASPHE301 plazmidėse.

3.2 lentelė. *Arthrobacter* sp. 68b bakterijų plazmidėje p2MP nustatytų atvirų skaitymo rėmelių koduojami baltymai.

<i>asr</i>	Kodujamo baltymo dydis ar.	Homologas	Duomenų bazių prieigos nr.	Identišku ar./bendras ar. sk. (%)	E vertė	Literatūros šaltinis
<i>asr1</i>	490	transpozazė IS4 šeimos baltymas <i>Nakamuraella multipartita</i> DSM 44233	YP_003199534	248/528 (47%)	4e-143	Tice ir kt., 2010
<i>asr2</i>	384	į liuciferazę panaši monoooksigenazė <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> AK37	ZP_09310356	147/360 (41%)	2e-82	Kriszt ir kt., 2012
<i>asr3</i>	167	integrazės katalitinis regionas <i>Saccharopolyspora spinosa</i> NRRL 18395	ZP_08877666	49/81 (60%)	2e-19	Pan ir kt., 2011
<i>asr4</i>	165	riboflavino kinazė/FAD sintetazė <i>Amycolatopsis mediterranei</i> U32	YP_003764712	66/138 (48%)	2e-32	Zhao ir kt., 2010
<i>asr5</i>	465	gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazė <i>Streptomyces</i> sp. S4	ZP_09178778	330/456 (72%)	0	Seipke ir kt., nepublikuota
<i>asr6</i>	558	amidohidrolazė <i>Nocardopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111	YP_003678962	289/544 (53%)	0	Sun ir kt., 2010
<i>asr7</i>	178	flavino reduktazė, FMN-surisantis baltymas <i>Mycobacterium</i> sp. MCS	YP_638703	86/154 (56%)	9e-52	Copeland ir kt., nepublikuota
<i>asr8</i>	384	į liuciferazę panaši monoooksigenazė <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> AK37	ZP_09310356	147/360 (41%)	2e-82	Kriszt ir kt., 2012
<i>asr9</i>	88	neįvardyto baltymo produktas <i>Arthrobacter</i> sp. FB24	YP_833278	39/71 (55%)	1e-17	Copeland ir kt., nepublikuota
<i>asr10</i>	76	hipotetinis baltymas Asphe3_34180 <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004242657	22/55 (40%)	9e-06	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr11</i>	230	3,4-dihidroksi-2-butanon-4-fosfato sintazė <i>Arthrobacter globiformis</i> NBRC 12137	ZP_09280002	155/200 (78%)	2e-104	Miyazawa ir kt., nepublikuota

<i>asr12</i>	85	hipotetinis baltymas ARGLB_036_00300 <i>Arthrobacter globiformis</i> NBRC 12137	ZP_09279305	22/44 (50%)	0,029	Miyazawa ir kt., nepublikuota
<i>asr13</i>	139	hipotetinis baltymas SchaN1_07861 <i>Streptomyces chartreusis</i> NRRL 12338	ZP_09951866	51/126 (40%)	1e-22	Doroghazi ir kt., 2011
<i>asr14</i>	396	hipotetinis baltymas SACE_3483 <i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	YP_001105682	128/361 (35%)	8e-51	Oliynyk ir kt., 2007
<i>asr15</i>	115	glioksilazė/atsparumo bleomicinui baltymas/dioksigenazė <i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190	YP_004335127	73/112 (65%)	6e-37	Sales ir kt., 2011
<i>asr16</i>	100	D-fruktozės-6-fosfato amidotransferazė <i>alpha proteobacterium</i> BAL199	ZP_02188273	37/94 (39%)	5e-14	Hagstrom ir kt., nepublikuota
<i>asr17</i>	494	gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazė <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004240547	439/486 (90%)	0	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr18</i>	337	AraC šeimos transkripcijos reguliatorius <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	YP_700292	166/315 (53%)	2e-91	McLeod ir kt., 2006
<i>phtR</i>	284	PhtR šeimos transkripcijos reguliatorius <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243277	221/269 (82%)	6e-157	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>phtC</i>	249	3,4-dihidroksifalato dekarboksilazė <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243276	201/247 (81%)	6e-140	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>phtAd</i>	411	ftalato 3,4-dioksigenazė, feredoksino reduktazės subvienetas <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243275	333/409 (81%)	0	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>phtAc</i>	65	feredoksinas <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243274	55/64 (86%)	1e-32	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>orf19</i>	111	hipotetinis baltymas Arth_4365 <i>Arthrobacter</i> sp. FB24	YP_829383	92/109 (84%)	1e-59	Copeland ir kt., nepublikuota
<i>phtAb</i>	202	ftalato 3,4-dioksigenazės beta subvienetas <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243272	169/195 (87%)	5e-124	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>phtAa</i>	474	ftalato 3,4-dioksigenazės alfa subvienetas <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243447	430/473 (91%)	0	Lucas et al., nepublikuota

<i>phbB</i>	289	3,4-dihidroksi-3,4-dihydroftalato dehidrogenazė <i>Arthrobacter keyseri</i>	AF331043_13	221/288 (77%)	2e-163	Eaton, 2001
<i>pehA</i>	222	galima ftalato esterio hidrolazė <i>Arthrobacter keyseri</i>	AF331043_12	190/214 (89%)	1e-140	Eaton, 2001
<i>ast-20</i>	267	nitratų/sulfonatų/bikarbonatų ABC nešiklio permeazė <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243451	236/265 (89%)	1e-144	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>ast-21</i>	267	nitratų/sulfonatų/bikarbonatų ABC nešiklio permeazė <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243451	236/265 (89%)	1e-144	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>ast-22</i>	276	nitratų/sulfonatų/bikarbonatų ABC nešiklio ATPazė <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243266	247/275 (90%)	1e-178	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>ast-23</i>	335	nitratų/sulfonatų/bikarbonatų ABC nešiklio sistemos periplazminis baltymas <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243265	284/334 (85%)	0	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>ast-24</i>	326	oksidoreduktazė <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	YP_706605	171/328 (52%)	6e-111	McLeod ir kt., 2006
<i>ast-25</i>	176	hipotetinis baltymas RHA1_ro06673 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	YP_706604	71/152 (47%)	1e-32	McLeod ir kt., 2006
<i>ast-26</i>	390	hipotetinis baltymas AK37_11196 <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> AK37	ZP_09309319	215/369 (58%)	3e-123	Kriszt ir kt., 2012
<i>ast-27</i>	428	Rieske (2Fe-2S) baltymas <i>Rhodococcus imtechensis</i> RKJ300	ZP_10002289	356/427 (83%)	0	Kumar ir kt., nepublikuota
<i>ast-28</i>	514	IcIR šeimos transkripcijos reguliatorius <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> AK37	ZP_09309323	124/239 (52%)	4e-72	Kriszt ir kt., 2012
<i>ast-29</i>	434	transportavimo baltymas <i>Rhodococcus imtechensis</i> RKJ300	ZP_10002293	250/391 (64%)	1e-173	Kumar ir kt., nepublikuota
<i>ast-30</i>	140	hipotetinis baltymas AAur_1893 <i>Arthrobacter aureus</i> TC1	YP_947642	55/68 (81%)	3e-28	Mongodin ir kt., 2006
<i>ast-31</i>	98	hipotetinis baltymas Achl_0077 <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	YP_002486169	29/58 (50%)	1e-07	Lucas ir kt., nepublikuota

<i>asr32</i>	294	2 šeimos glikoziltransferazė <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	YP_002487344	135/254 (53%)	2e-64	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr33</i>	332	ląstelės dalijimosi ATP-surišantis baltymas FtsE <i>Arthrobacter</i> sp. FB24	ABK04044	135/221 (61%)	3e-86	Copeland ir kt., nepublikuota
<i>asr34</i>	152	hipotetinis baltymas pSI-1_30 <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001741970	126/142 (89%)	8e-88	Jerke ir kt., 2008
<i>asr35</i>	590	galimas konjugacinio pernešimo genų komplekso baltymas <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001741969	572/589 (97%)	0	Jerke ir kt., 2008
<i>asr36</i>	452	hipotetinis baltymas pSI-1_28 <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001741968	437/451 (97%)	0	Jerke ir kt., 2008
<i>asr37</i>	503	hipotetinis baltymas pSI-1_27 <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001741967	492/502 (98%)	0	Jerke ir kt., 2008
<i>asr38</i>	418	hipotetinis baltymas pSI-1_26 <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001741966	316/426 (74%)	1e-142	Jerke ir kt., 2008
<i>asr39</i>	292	hipotetinis baltymas pSI-1_25 <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001741965	127/252 (50%)	9e-61	Jerke ir kt., 2008
<i>asr40</i>	90	hipotetinis baltymas pSI-1_24 <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001741964	89/89 (100%)	1e-51	Jerke ir kt., 2008
<i>asr41</i>	197	hipotetinis baltymas pSI-1_23 <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001741963	188/196 (96%)	3e-132	Jerke ir kt., 2008
<i>asr42</i>	478	hipotetinis baltymas pSI-1_22 <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001741962	443/477 (93%)	0	Jerke ir kt., 2008
<i>asr43</i>	133	hipotetinis baltymas pSI-1_21 <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001741961	119/132 (90%)	1e-79	Jerke ir kt., 2008
<i>asr44</i>	359	CHAP domena turintis baltymas <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001741960	311/359 (87%)	0	Jerke ir kt., 2008
<i>asr45</i>	116	hipotetinis baltymas Arth_4511 <i>Arthrobacter</i> sp. FB24	YP_829261	74/111 (67%)	1e-38	Copeland ir kt., nepublikuota

<i>asr46</i>	144	hipotetinis baltymas Arth_4512 <i>Arthrobacter</i> sp. FB24	YP_829262	117/142 (82%)	5e-78	Copeland ir kt., nepublikuota
<i>asr47</i>	340	hipotetinis baltymas Arth_4513 <i>Arthrobacter</i> sp. FB24	YP_829263	174/324 (54%)	6e-108	Copeland ir kt., nepublikuota
<i>asr48</i>	189	hipotetinis baltymas Arth_4514 <i>Arthrobacter</i> sp. FB24	YP_829264	108/181 (60%)	1e-69	Copeland ir kt., nepublikuota
<i>asr49</i>	284	hipotetinis baltymas Arth_4515 <i>Arthrobacter</i> sp. FB24	YP_829265	186/282 (66%)	8e-130	Copeland ir kt., nepublikuota
<i>asr50</i>	612	hipotetinis baltymas Achl_4545 <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	YP_002478472	435/618 (70%)	0	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr51</i>	257	kobirino rūgšties a,c-diamido sintazė <i>Arthrobacter</i> sp. FB24	YP_829398	232/256 (91%)	5e-170	Copeland ir kt., nepublikuota
<i>asr52</i>	108	hipotetinis baltymas Arth_4175 <i>Arthrobacter</i> sp. FB24	YP_829397	66/107 (62%)	1e-25	Copeland ir kt., nepublikuota
<i>asr53</i>	337	hipotetinis baltymas AAur_pTC10275 <i>Arthrobacter aureus</i> TCI	YP_950144	216/330 (65%)	2e-82	Mongodin ir kt., 2006
<i>asr54</i>	200	galima vietai savita rekombinazė <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001741953	188/199 (94%)	2e-130	Jerke ir kt., 2008
<i>asr55</i>	86	konservatyvus hipotetinis baltymas <i>Nocardioides</i> sp. JS614	YP_921291	39/82 (48%)	7e-11	Coleman ir kt., 2011
<i>asr56</i>	174	hipotetinis baltymas ARGLB_008_00050 <i>Arthrobacter globiformis</i> NBRC 12137	ZP_09278157	97/174 (56%)	4e-50	Miyazawa ir kt., nepublikuota
<i>asr57</i>	380	DNR-citozino metiltransferazė <i>Cellvibrio gilvus</i> ATCC 13127	YP_004602009	190/352 (54%)	3e-131	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr58</i>	1097	hipotetinis baltymas OPAG_00219 <i>Rhodococcus opacus</i> PD630	EHI41030	350/1017 (34%)	5e-169	Holder ir kt., 2011
<i>asr59</i>	520	hipotetinis baltymas RER_40510 <i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	YP_002767498	187/498 (38%)	4e-94	Sekine ir kt., 2006

<i>asr60</i>	333	hipotetinis baltymas A20C1_10409 jūrinė aktinobakterija PHSC20C1	ZP_01129291	125/314 (40%)	1e-66	Murray ir kt., nepublikuota
<i>asr61</i>	1030	hipotetinis baltymas GOAMR_50_01130 <i>Gordonia amarae</i> NBRC 15530	ZP_09216759	470/1063 (44%)	0	Takarada ir kt., nepublikuota
<i>asr62</i>	105	hipotetinis baltymas Achl_4499 <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	YP_002478426	75/104 (72%)	2e-47	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr63</i>	103	hipotetinis baltymas Arth_0995 <i>Arthrobacter</i> sp. FB24	YP_830492	87/102 (85%)	1e-65	Copeland ir kt., nepublikuota
<i>asr64</i>	180	nuo ATP-priklausoma DNR ligazė <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243397	101/133 (76%)	1e-65	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr65</i>	508	transpozazė <i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665	YP_002957277	352/480 (73%)	0	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr66</i>	242	DNR replikacijos baltymas <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004239991	208/241 (86%)	3e-150	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr67</i>	189	sigma-70 šeimos RNR polimerazės sigma faktorius <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243335	98/175 (56%)	4e-60	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr68</i>	287	peptidazė M56 šeimos baltymas <i>Arthrobacter globiformis</i> NBRC 12137	ZP_09279059	178/278 (64%)	9e-112	Miyazawa ir kt., nepublikuota
<i>asr69</i>	142	konservatyvus hipotetinis baltymas <i>Streptomyces lividans</i> TK24	ZP_06531183	63/132 (48%)	1e-37	Fischbach ir kt., nepublikuota
<i>asr70</i>	84	DNR ligazė <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243362	62/83 (75%)	7e-34	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr71</i>	110	hipotetinis baltymas pSI-1_88 <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001742026	68/96 (71%)	4e-36	Jerke ir kt., 2008
<i>asr72</i>	143	hipotetinis baltymas Asphe3_41650 <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243364	117/142 (82%)	1e-83	Lucas ir kt., nepublikuota

<i>asr73</i>	329	hipotetinis baltymas Arth_4331 <i>Arthrobacter</i> sp. FB24	YP_829349	160/335 (48%)	7e-93	Copeland ir kt., nepublikuota
<i>asr74</i>	50	hipotetinis baltymas Asphe3_41720 <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3	YP_004243371	23/46 (50%)	2e-05	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr75</i>	71	hipotetinis baltymas pSI-1_75 <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001742015	41/68 (60%)	5e-18	Jerke ir kt., 2008
<i>asr76</i>	357	galimas smf šeimos baltymas <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001742013	311/383 (81%)	0	Jerke ir kt., 2008
<i>asr77</i>	104	hipotetinis baltymas <i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	CAD48021	55/102 (54%)	7e-28	Grether-Beck ir kt., 1994
<i>asr78</i>	470	į ParB-panašus padalijimo baltymas <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	YP_002478569	374/450 (83%)	0	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr79</i>	103	hipotetinis baltymas pSI-1_71 <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001742011	91/102 (89%)	2e-57	Jerke ir kt., 2008
<i>asr80</i>	601	galima relaksazė <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001742009	437/457 (96%)	0	Jerke ir kt., 2008
<i>asr81</i>	253	hipotetinis baltymas pSI-1_68 <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001742008	217/252 (86%)	1e-134	Jerke ir kt., 2008
<i>asr82</i>	819	hipotetinis baltymas Achl_0171 <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	YP_002486262	266/785 (34%)	1e-114	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr83</i>	411	hipotetinis baltymas AoriK_08859 <i>Actinomyces oris</i> K20	ZP_08126590	269/407 (66%)	0	Yamane ir Nambu, nepublikuota
<i>asr84</i>	518	galima vietai savita rekombinazė <i>Arthrobacter</i> sp. AK-1	YP_001741999	247/521 (47%)	1e-157	Jerke ir kt., 2008
<i>orf85</i>	371	integrazijų šeimos baltymas <i>Mycobacterium rhodesiae</i> JS60	EHB53325	208/363 (57%)	7e-145	Lucas ir kt., nepublikuota

Konjugacijos genų kompleksą turi p2MP, pTC1, pAO1, pAL1, pSI-1, pChr15, pRE117-1 ir visos *Arthrobacter* sp. FB24 plazmidės.

Plazmidės kopijų skaičiaus padalijime dalyvaujančių baltymų (ParA ir ParB) genai nustatyti *A. aurescens* (pTC1, pTC2) ir *A. phenanthrenivorans* (pASPHE301, pASPHE302) plazmidėse, taip pat *Arthrobacter* sp. pSI-1, pChr15 ir pFB24-105 bei *A. nicotinovorans* pAO1 plazmidėse. pAL1 ir pFB-136 bei pFB-104 plazmidės turi tik *parA* geną, o p2MP atveju nustatytas tik ParB koduojantis atviras skaitymo rėmelis. Padalijimo baltymų genai neaptikti pRE117-1 plazmidėje.

p2MP ir minėtose plazmidėse, išskyrus pChr15, nustatyti genai, koduojantys transpozazes. Mažesnė dalis plazmidžių (p2MP, pTC1, pTC2, pASPHE302 ir visos FB24 bakterijų plazmidės) taip pat turi integrazes koduojančius genus.

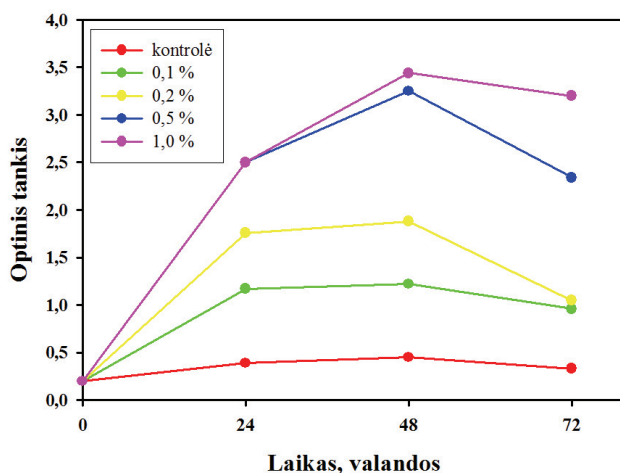
Kaip minėta, plazmidėje p2MP buvo nustatyti ftalio rūgšties skaidymo fermentų genai. Joje taip pat aptikti atviri skaitymo rėmeliai, koduojantys galimus 2-metilpiridino ir piridino degradacijos baltymus. Plačiau šių junginių skaidymo fermentai, jų genai ir kataboliniai keliai bus nagrinėjami toliau tekste.

3.1.2. Ftalio rūgšties skaidymas

Kaip minėta literatūrinėje dalyje, ftalio rūgštį sugeba panaudoti ir Gram-neigiamos, ir Gram-teigiamos bakterijos, tačiau jos skaido šį junginį skirtingais keliais – atitinkamai 4,5-dioksigenazės ir 3,4-dioksigenazės (Eaton, 2001). *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose, kurios gali panaudoti ftalio rūgštį kaip vienintelį anglies šaltinį, buvo tiriamas minėto junginio skaidymo kelias bei ieškoma genų, koduojančių katabolinius baltymus.

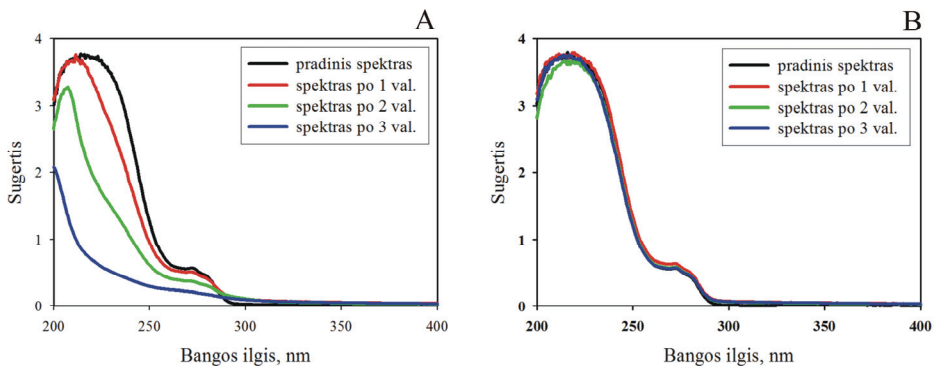
Pirmiausia, pagal 2.26 skyrelyje aprašytą metodiką buvo tiriama šių bakterijų augimo priklausomybė nuo ftalio rūgšties koncentracijos terpėje. Rezultatai parodė, kad pirmą parą bakterijos geriausiai auga, kai substrato

koncentracija yra 0,5% ir 1% (3.4 pav.). Vėliau bakterijų biomasės kiekis nežymiai skiriasi esant minėtoms koncentracijoms. Trečią parą visais tirtais atvejais stebimas optinio tankio sumažėjimas. Taigi, iš tirtų ftalio rūgšties koncentracijų *Arthrobacter* sp. 68b bakterijų augimui optimaliausia yra 1%, didžiausia biomasė gaunama auginant 2 paras.



3.4 pav. *Arthrobacter* sp. 68b augimas EFA terpėje su įvairiomis ftalio rūgšties koncentracijomis. Kontrolė – EFA be ftalio rūgšties.

Atliekant ftalio rūgšties biovirsmų tyrimą, buvo naudojamos *Arthrobacter* sp. 68b intaktinės ląstelės, augintos terpėje su ftalio arba gintaro (kontrolė) rūgštimi. Aerobinė biokonversija buvo vykdoma 20 mM kalio fosfatiniame buferyje (pH 7,5) 30 °C temperatūroje. Pradinė substrato koncentracija buvo 1 mM. Reakcijos mišinys, nusodinus ląsteles centrifuguojant, buvo tiriamas po 1, 2, 3 ir 4 inkubavimo valandų. Nustatyta, kad bakterijos galėjo panaudoti ftalio rūgštį, jei buvo augintos terpėje su šiuo substratu. Ląstelės, augintos terpėje su gintaro rūgštimi, negalėjo panaudoti ftalio rūgšties (3.5 pav.). Taigi, iš gautų duomenų galima daryti išvadą, kad *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose ftalio rūgšties skaidymas yra indukuojamas procesas.

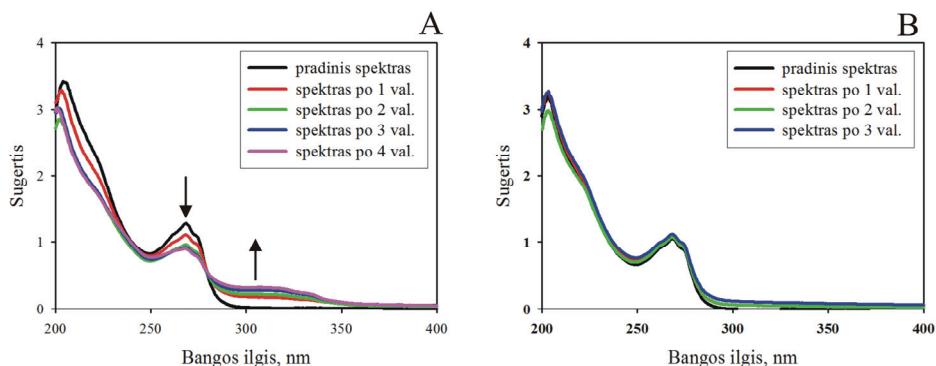


3.5 pav. Ftalio rūgšties biokonversija panaudojant *Arthrobacter* sp. 68b intaktines ląsteles. A – bakterijos, augintos terpėje su ftalio rūgštimi, B – su gintaro rūgštimi.

Nomura ir kt. (1989) pasiūlė metodą ftalato 4,5-dioksigenazės ir 4,5-dihidro-4,5-dihidroksiftalato dehidrogenazės aktyvumams nustatyti. Diazotintas *p*-nitroanilinas yra įdedamas į ląstelių, inkubuotų su ftalio rūgštimi, suspensiją, ir gaunamas raudonos spalvos junginys, kurio absorbcijos maksimumas yra 512 nm bangos ilgyje (Nomura ir kt., 1989). Šiuo metodu (smulkiau aprašyta skyr. 2.27) buvo tiriama, ar *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose yra ftalio rūgšties 4,5-dioksigenazės skaidymo kelias. Tyrimo metu raudonos spalvos junginys nesusidarė, todėl galima teigti, kad *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose ftalio rūgšties skaidymas vyksta 3,4-dioksigenazės keliu.

Nomura ir kt. (1989) taip pat paskelbė, kad *Pseudomonas putida* bakterijos, skaidančios ftalio rūgštį 4,5-dioksigenazės keliu, gali hidroksilinti chinolino rūgštį. Panaudojant *Arthrobacter* sp. 68b intaktines ląsteles, buvo tiriama, ar šios bakterijos, indukuotos ftalio rūgštimi, gali vartoti chinolino rūgštį. Ląstelės buvo inkubuojamos 20 mM kalio fosfatiniame buferyje (pH 7,5) 30 °C temperatūroje. Pradinė substrato koncentracija buvo 0,4 mM. Reakcijos mišinys, nusodinus ląsteles centrifuguojant, buvo tiriamas po 1, 2, 3 ir 4 inkubavimo valandų. Nustatyta, kad ląstelės, augintos su ftalatu, gali modifikuoti chinolino rūgštį. Šio junginio biotransformacijos spektro pokyčiai yra parodyti 3.6 A paveiksle. Vykstant biovirsmams, stebimas substrato koncentracijos mažėjimas ir sugerties padidėjimas 300-350 nm srityje. Tai

rodo, kad prie heterociklinio žiedo yra prijungiama hidroksigrupė (Taylor ir King, 1987). Ląstelės, augintos su gintaro rūgštimi, negalėjo panaudoti chinolino rūgšties (3.6 B pav.). Taigi, *Arthrobacter* sp. 68b ląstelėse reikia indukuoti ftalio rūgšties katabolinius genus, kad jos galėtų panaudoti chinolino rūgštį.



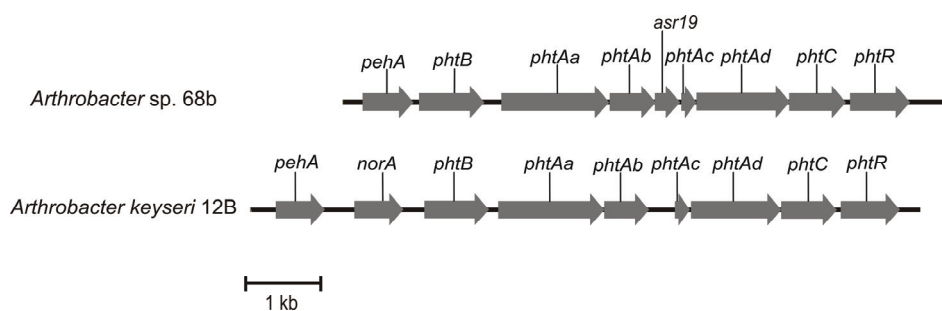
3.6 pav. Chinolino rūgšties biokonversija panaudojant *Arthrobacter* sp. 68b intaktines ląsteles. A – bakterijos, augintos terpėje su ftalio rūgštimi, B – su gintaro rūgštimi. Rodyklės rodo sugerties pokyčius vykstant biokonversijai.

Hidroksilinti dariniai iš chinolino rūgšties gali susidaryti keliais būdais. Pirmas, chinolino rūgštį veikia ftalato 3,4-dioksigenazė, tuomet susidariusi 4,5-dihidroksi-4,5-dihydrochinolino rūgštis yra oksiduojama 3,4-dihidroksi-3,4-dihydroftalato dehidrogenazės iki 4,5-dihidroksichinolino rūgšties. Antras, chinolino rūgštis yra veikiamą ftalato 3,4-dioksigenazės ir susidariusi 4,5-dihidroksi-4,5-dihydrochinolino rūgštis spontaniškai dehidratuoja iki 4-hidroksi arba 5-hidroksichinolino rūgšties. Abiem keliais susidaro produktai, kurie nėra lengvai gaunami žinomais organinės chemijos metodais. Norint nustatyti susidarančio junginio struktūrą, reikia atlikti daugiau tyrimų.

3.1.2.1. Ftalio rūgšties skaidymo operono analizė

Arthrobacter sp. 68b p2MP plazmidėje buvo aptikti *asr*, kurie koduoja baltymus, panašius į ftalio rūgšties skaidyme dalyvaujančius fermentus. Jie yra išsidėstę 8 kb dydžio fragmente. Potencialių šio junginio degradacijos baltymų *asr* sekos buvo padaugintos PGR būdu naudojant pradmenų poras: FEH F ir R; HFDH F ir R; FOXG F ir R; FOXGS F ir R; FDK F ir R. Gauti PGR produktai buvo klonuoti į pTZ57R/T plazmidinį vektorių. Tuomet buvo nustatomos atrinktų klonų DNR nukleotidų sekos. Rezultatai patvirtino tiriamų *asr* išsidėstymą ir jų koduojamų baltymų funkcijas. Taigi, *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose genai, koduojantys ftalio rūgšties skaidymo baltymus, sudaro operoną, kurio seka buvo užregistruota Genų banke ir jai suteiktas JN381019 prieigos numeris.

Kaip buvo minėta literatūrinėje dalyje, ftalio rūgšties skaidymo operoną (*pht*) sudaro genai, koduojantys baltymus, skaidančius šį junginį iki protokatechuoato. Dažniausiai operoną sudaro 6 genai, kurie koduoja keturis dioksigenazės subvienetus (didįjį, mažąjį, feredoksino ir reduktazės), dehidrogenazę ir derkarboksilazę (Eaton, 2001). *Arthrobacter* sp. 68b atveju operoną sudaro septyni *asr*, kadangi tarp operonui būdingų genų yra išterpęs hipotetinį baltymą koduojantis genas, pavadintas *asr19* (3.7 pav.).



3.7 pav. *Arthrobacter* sp. 68b ir *A. keyseri* 12B (Eaton, 2001) ftalato degradacijos operonai ir genų išsidėstymas juose.

Ftalio rūgšties skaidymo genai ir reguliacinis genas yra išsidėstę *phtBAaAbAcAdCR* tvarka. Jų visų transkripcija vyksta ta pačia kryptimi.

Reguliacijos ir skaidymo genų produktai yra panašiausi į kitų *Arthrobacter* spp. baltymus (3.2 lentelė). Remiantis *Arthrobacter* sp. 68b bakterijų ftalio rūgšties skaidymo baltymų homologų paieškos rezultatais, galima patvirtinti, kad šiose bakterijose tiriamas junginys skaidomas 3,4-dioksigenazės keliu.

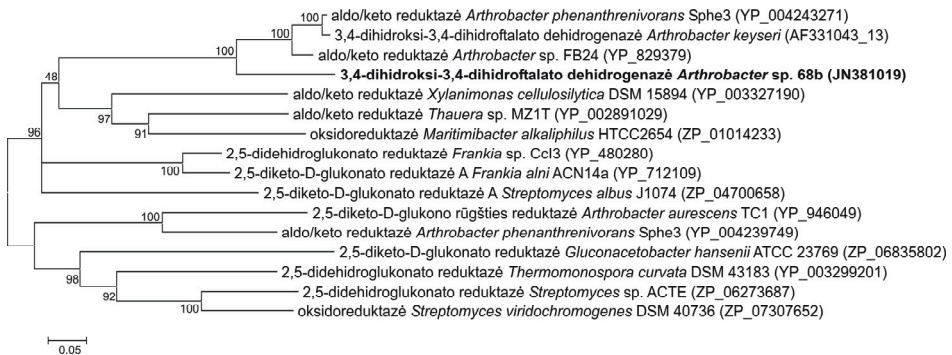
Tiriamų *Arthrobacter* sp. 68b bakterijų *pht* operono sandara buvo lyginama su *A. keyseri* 12B operonu. Abiejuose operonuose skaidymo baltymų genai ir reguliacinis genas yra išsidėstę vienoda tvarka ir jų transkripcija vyksta ta pačia kryptimi (3.7 pav.). Kaip minėta anksčiau, *Arthrobacter* sp. 68b operone yra papildomas genas *asr19*, įsiterpęs tarp *phtAb* ir *phtAc* genų. Jis persidengia su *phtAb* keturiais nukleotidais, o *phtC* ir *phtAd* pradžios kodonai persidengia vienu nukleotidu su prieš tai einančio geno pabaigos kodonu. *Arthrobacter* sp. 68b ir *A. keyseri* 12B bakterijų DNR sekose prieš *pht* operoną buvo aptiktas *pehA*, koduojantis numanomą ftalato esterio hidrolazę. Šio geno transkripcija vyksta ta pačia kryptimi kaip ir operono genų. *A. keyseri* 12B atveju papildomas *norA* genas (atsparumo antibiotikui nešiklio fragmentas) yra įsiterpęs tarp *pehA* geno ir *pht* operono (Eaton, 2001), bet tokio geno nėra *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose. Kadangi *Arthrobacter* sp. 68b ir *A. keyseri* 12B operonų struktūra yra panaši, tai *Arthrobacter* sp. 68b ftalato skaidymo operono genai buvo pavadinti pagal *A. keyseri* 12B genams naudotą nomenklatūrą (Eaton, 2001).

Nors *Arthrobacter* sp. 68b ir *A. keyseri* 12B ftalio rūgšties skaidymo operonai tarpusavyje yra panašūs, tačiau jų struktūra skiriasi nuo kitų *Actinomycetales* bakterijų *pht* operonų. *Rhodococcus* sp. DK17 ir TFB ir *Terrabacter* sp. DBF63 bakterijose ftalato skaidymo genai yra išsidėstę *phtAaAbBACAdC* tvarka (Choi ir kt., 2005; Tomás-Gallardo ir kt., 2006; Nojiri ir kt., 2002). *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 *pht* operone nėra geno, koduojančio dekarboksilazę, taigi genų tvarka yra *phtAaAbBACAd* (Stingley ir kt., 2004). Visose bakterijose genų, koduojančių ftalio rūgšties skaidymo baltymus iki protokatechuato, transkripcija vyksta viena kryptimi. *Rhodococcus* sp. DK17 ir TFB, *M. vanbaalenii* PYR-1 bakterijose *phtR* genas yra prieš operoną ir jo transkripcija vyksta priešinga kryptimi (Choi ir kt.,

2005; Tomás-Gallardo ir kt., 2006; Stingley ir kt., 2004), *Terrabacter* sp. DBF63 šis genas yra už operono. Jo transkripcija vyksta ta pačia kryptimi kaip operono genų (Nojiri ir kt., 2002).

3.1.3.2. Ftalio rūgšties skaidymo baltymų filogenetinė analizė

Atlikus ftalio rūgšties skaidymo baltymų genų filogenetinę analizę, nustatyta, kad *phtB* produktas (31,3 kDa) yra panašiausias į 3,4-dihidroksi-3,4-dihidroftalato dehidrogenazę iš *A. keyseri* 12B (3.8 pav.), kuri priklauso oksidoreduktazių superšeimai (Eaton, 2001). Baltymas yra homologiškas įvairių *Actinomycetales* eilės bakterijų ir kelių proteobakterijų aldo/keto reduktazėms, 2,5-didehidroglukonato reduktazėms, 2,5-diketo-D-gliukonato reduktazėms ir oksidoreduktazėms. Jis yra giminingiausias *A. keyseri* 12B, *Arthrobacter* sp. FB24, *A. phenanthrenivorans* Sphe3 baltymams ir su jais sudaro atskirą filogenetinę šaką.

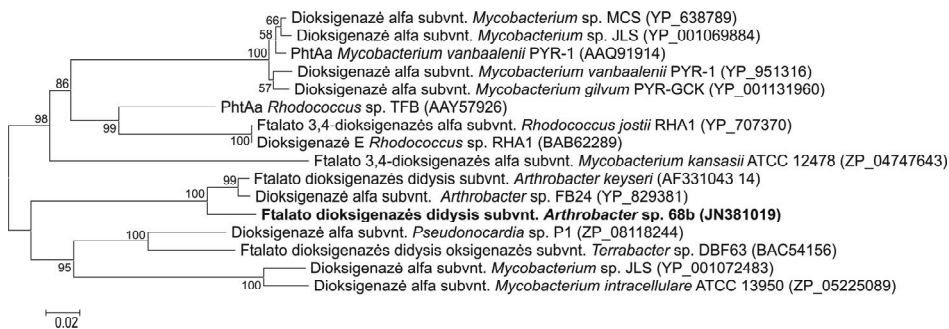


3.8 pav. 3,4-dihidroksi-3,4-dihidroftalato dehidrogenazės filogenetinis medis. Medis sudarytas artimiausių grupių apjungimo metodu. Šalia atsišakojimų nurodyta procentinė įkėlos sutapimo su tiriamu baltymu išraiška. Mastelis atitinka pakeistų aminorūgščių skaičių, tenkantį vienai vietai. Šalia tiriamo baltymo homologų nurodyti genų banko prieigos numeriai.

Genai *phtAaAbAcAd* koduoja 3,4-dioksigenazę, kuri yra trijų komponentų fermentas, sudarytas iš dviejų oksigenazės, vieno feredoksino ir vieno reduktazės subvieneto (Eaton, 2001; Habe ir kt., 2003). Panašiose

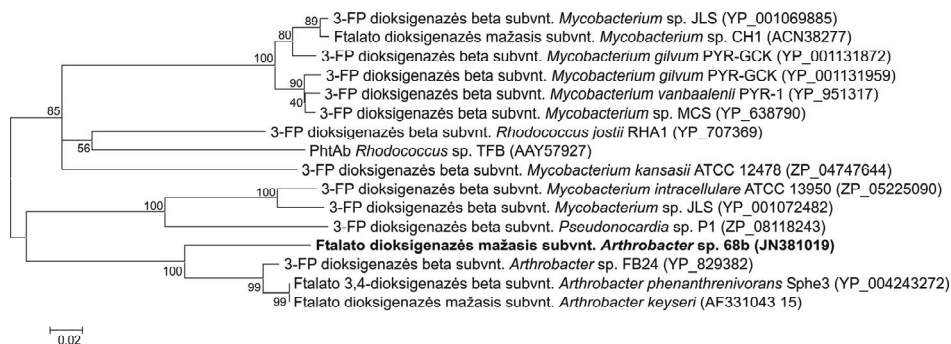
dioksigenazėse elektronai yra pernešami nuo NADPH per flavoproteininę reduktazę feredoksinui ir tuomet dviejų subvienetų oksigenazei. Sąveikaudama su aromatiniu substratu ir molekulinio deguonimi, redukuota dioksigenazė į aromatinį žiedą įveda dvi hidroksigrupes (Eaton, 2001).

Genas *phtAa* koduoja baltymą (53,7 kDa), kuris yra labiausiai homologiškas *A. keyseri* 12B ftalato dioksigenazės didžiajam subvienetui. Baltymas taip pat yra panašus į ftalato 3,4-dioksigenazės didįjį subvienetą arba žiedą hidroksilinančios dioksigenazės alfa subvienetą iš *Rhodococcus* spp. ir *Mycobacterium* spp. bakterijų. *Arthrobacter* sp. 68b *phtAa* produktas kartu su *Arthrobacter* sp. FB24 ir *A. keyseri* 12B baltymais sudaro atskirą grupę filogenetiniame medyje (3.9 pav.).



3.9 pav. Ftalato dioksigenazės didžiojo subvieneto filogenetinis medis. Analizė atlikta kaip aprašyta 3.8 pav.

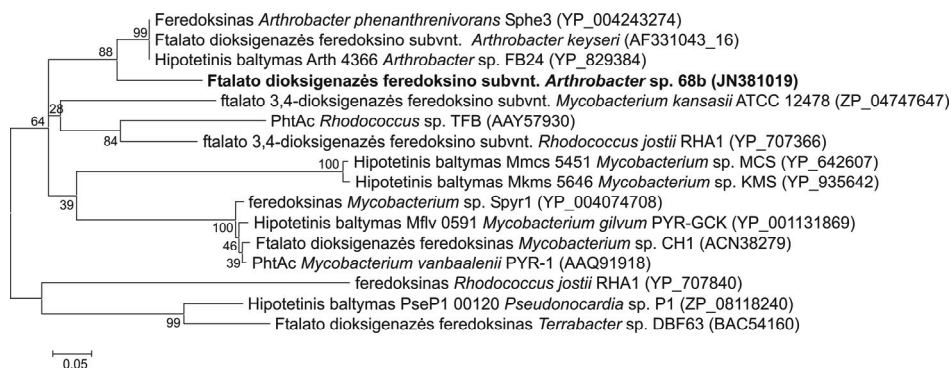
phtAb geno produktas (22,8 kDa) yra panašus į ftalato 3,4-dioksigenazės beta arba mažąjį subvienetą ir 3-fenilpropionato dioksigenazės beta subvienetą iš įvairių *Arthrobacter* spp., *Rhodococcus* spp. ir *Mycobacterium* spp. bakterijų. *Arthrobacter* sp. 68b baltymas su *Arthrobacter* sp. FB24, *A. keyseri* 12B ir *A. phenanthrenivorans* Sphe3 baltymais sudaro atskirą filogenetinę šaką (3.10 pav.).



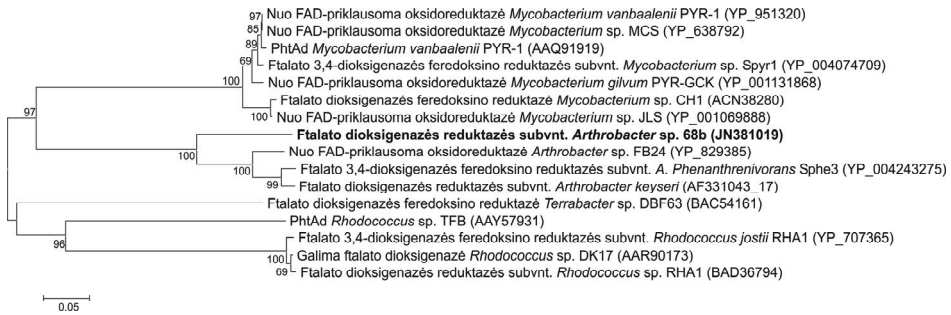
3.10 pav. Ftalato dioksigenazės mažojo subvieneto filogenetinis medis. 3-FP – fenilpropionatas. Analizė atlikta kaip aprašyta 3.8 pav.

phtAc polipeptidas (7,0 kDa) yra susijęs su elektronų pernašos baltymu – feredoksinu. Jo homologai yra baltymai iš įvairių *Actinomycetales* bakterijų. PhtAc yra panašiausias į *Arthrobacter* sp. FB24, *A. keyseri* 12B ir *A. phenanthrenivorans* Sphe3 baltymus. Kartu šie baltymai sudaro atskirą filogenetinę šaką (3.11 pav.).

phtAd koduojamas baltymas (43,7 kDa) yra panašus į ftalato 3,4-dioksigenazės feredoksino reduktazės subvienetą, nuo FAD priklausančio piridino nukleotido-disulfido oksidoreduktazę. Baltymo filogenetinė analizė parodė, kad jis yra giminingiausias *Arthrobacter* spp. baltymams. Šie baltymai sudaro atskirą filogenetinę šaką (3.12 pav.). PhtAd taip pat yra homologiškas baltymams iš *Mycobacterium* spp. ir *Rhodococcus* spp.

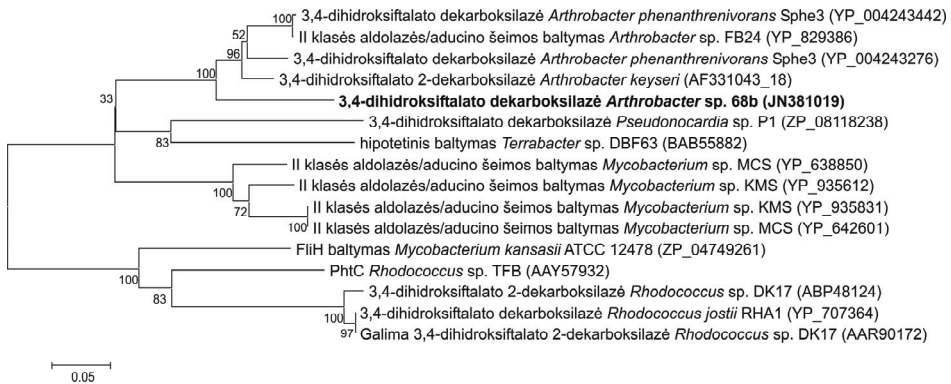


3.11 pav. Ftalato dioksigenazės feredoksino subvieneto filogenetinis medis. Analizė atlikta kaip aprašyta 3.8 pav.



3.12 pav. Ftlato dioksigenazės feredoksino reduktazės subvieneto filogenetinis medis. Analizė atlikta kaip aprašyta 3.8 pav.

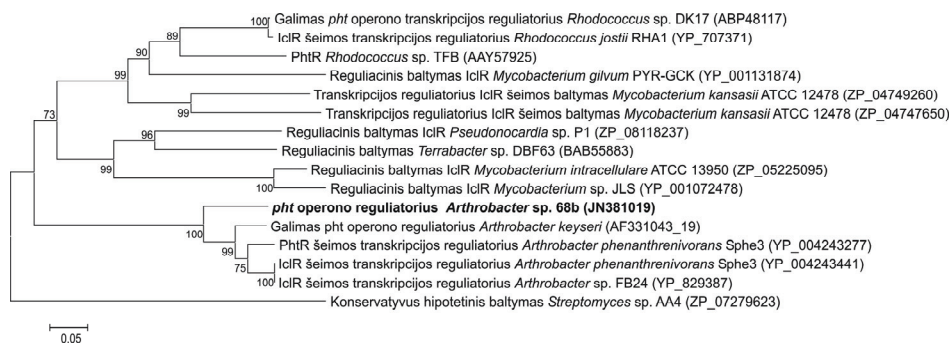
Geno *phtC* produktas (26,2 kDa) yra homologiškas 3,4-dihidroksifalato dekarboksilazėms, II klasės aldolazių/aducinių šeimos baltymams iš *Arthrobacter* spp., *Rhodococcus* spp. ir *Mycobacterium* spp. PhtC baltymas ir jo analogai iš *Arthrobacter* spp. formuoja atskirą filogenetinę šaką (3.13 pav.). Šios klasės fermentai turi konservatyvų glutamatą (90 padėtyje), todėl katalizės metu gali veikti kaip rūgštis ir bazė, ir tris konservatyvius histidinus (109, 111 ir 177 padėtyse), kurie koordinuoja katalizei reikalingus jonus (Eaton, 2001). Minėtos konservatyvios aminorūgštys aptiktos ir *Arthrobacter* sp. 68b bakterijų *phtC* geno produkte.



3.13 pav. 3,4-dihidroksifalato dekarboksilazės filogenetinis medis. Analizė atlikta kaip aprašyta 3.8 pav.

phtR koduoja baltymą (29,2 kDa), panašų į PhtR arba IclR šeimos transkripcijos reguliatorius iš *Actinomycetales* bakterijų. Manoma, kad šis

baltymas dalyvauja operono, koduojančio ftalio rūgšties skaidymo baltymus, reguliacijoje (Eaton, 2001). PhtR baltymo N-gale buvo nustatyta prisijungimo prie DNR sritis, kurioje yra spiralė-linkis-spiralė motyvas, ir C galo konservatyvi sritis, būdinga IclR šeimos baltymams (Eaton, 2001; Stingley ir kt., 2004). Šios šeimos baltymai gali būti ir transkripcijos aktyvatoriai, ir represoriai. Tomás-Gallardo ir kt. (2006) nustatė, kad, nesant ftalio rūgšties, tik PhtR baltymo genas yra transkribuojamas. Penki panašūs baltymai iš skirtingų *Arthrobacter* spp. kamienų sudaro atskirą šaką filogenetiniame medyje (3.14 pav.).



3.14 pav. *pht* operono reguliatoriaus filogenetinis medis. Analizė atlikta kaip aprašyta 3.8 pav.

Nors filogenetiniuose medžiuose *Arthrobacter* sp. 68b bakterijų ftalio rūgšties skaidymo ir reguliacijos baltymai sudaro bendrą grupę su kitais *Arthrobacter* spp. baltymais, tačiau visais atvejais tiriami baltymai yra išskirti į atskirą šaką.

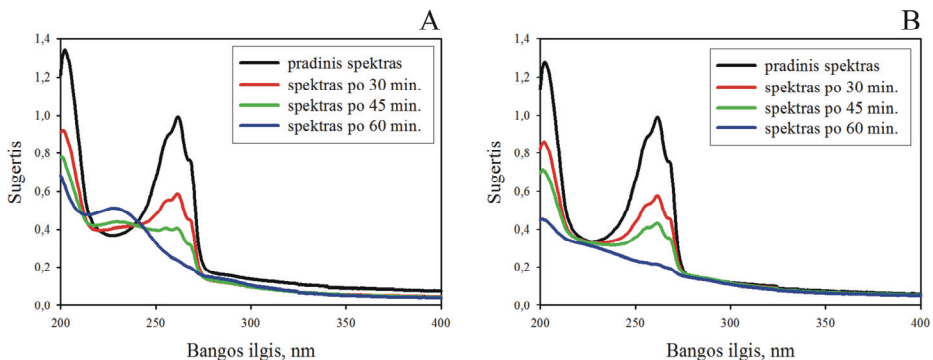
Apibendrinant ftalio rūgšties skaidymo *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose tyrimo rezultatus, galima teigti, kad šiose bakterijose ftalato skaidymas yra indukuojamas procesas ir vyksta 3,4-dioksigenazės keliu. Be to, ląstelės, augintos su ftalio rūgštimi, sugeba panaudoti ir chinolino rūgštį. Degradacijos baltymų filogenetiniai tyrimai parodė, kad jie skiriasi nuo giminingų *Arthrobacter* spp. baltymų.

3.1.3. 2-Metilpiridino ir piridino skaidymas

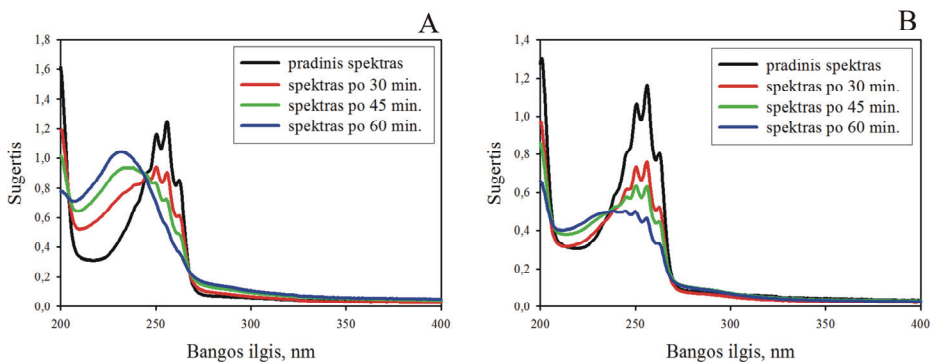
Iš literatūros šaltinių žinoma, kad piridiną ir jo darinius sugeba skaidyti Gram-neigiamos (*Azoarcus* sp., *Pseudomonas* sp.) (Korosteleva ir kt., 1981; Rhee ir kt., 1997; Padoley ir kt., 2009) ir Gram-teigiamos *Actinomycetales* (*Corynebacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Nocardia* sp., *Pseudonocardia* sp., *Gordonia* sp., *Arthrobacter* sp. *Rhodococcus* sp.) (Shukla, 1973; Shukla, 1974; Watson ir Cain, 1975; Shukla ir Kaul, 1986; Sims ir kt., 1986; Zefirov ir kt., 1994; O'Loughlin ir kt., 1999; Lee ir kt., 2001; Lee ir kt., 2006; Padoley ir kt., 2009; Khasaeva ir kt., 2011a; Khasaeva ir kt., 2011b) bakterijos. Daugeliu atveju nustatyta, kad tos pačios bakterijos gali degraduoti ne tik piridiną, bet taip pat dar vieną ar kelis jo junginius (Shukla, 1974; Shukla ir Kaul, 1986; Agapova ir kt., 1992; Khasaeva ir kt., 2011b). Tiriamo *Arthrobacter* sp. 68b kamieno bakterijos sugeba skaidyti ir piridiną, ir 2-metilpiridiną.

Arthrobacter sp. 68b intaktinės ląstelės, užaugintos EFA terpėje su 2-metilpiridinu, piridinu, gintaro rūgštimi ir minėtoje terpėje be substrato buvo naudojamos 2-metilpiridino ir piridino biovirsmų tyrimuose. Reakcija buvo vykdoma 1 ml 25 mM kalio fosfatiniame buferyje (pH 7,2) 30 °C temperatūroje. Pradinė 2-metilpiridino koncentracija buvo 0,05 μM, o piridino – 0,25 μM. Reakcijos mišinys, nusodinus ląsteles centrifuguojant, buvo tiriamas po 30, 45 ir 60 inkubavimo minučių.

Nustatyta, kad ląstelės, kultivuotos EFA terpėje be substrato arba su gintaro rūgštimi, nesugeba panaudoti nei 2-metilpiridino, nei piridino (duomenys nepateikti). Ląstelės, augintos su 2-metilpiridinu arba piridinu, gali skaidyti abi šias medžiagas (3.15 pav. ir 3.16 pav.). Įsisavinimas vyksta be papildomų kofaktorių, kosubstratų ar metalo jonų.



3.15 pav. 2-Metilpiridino biokonversija panaudojant *Arthrobacter* sp. 68b intaktines ląstelės. A – bakterijos, augintos terpėje su su 2-metilpiridinu, B – su piridinu.



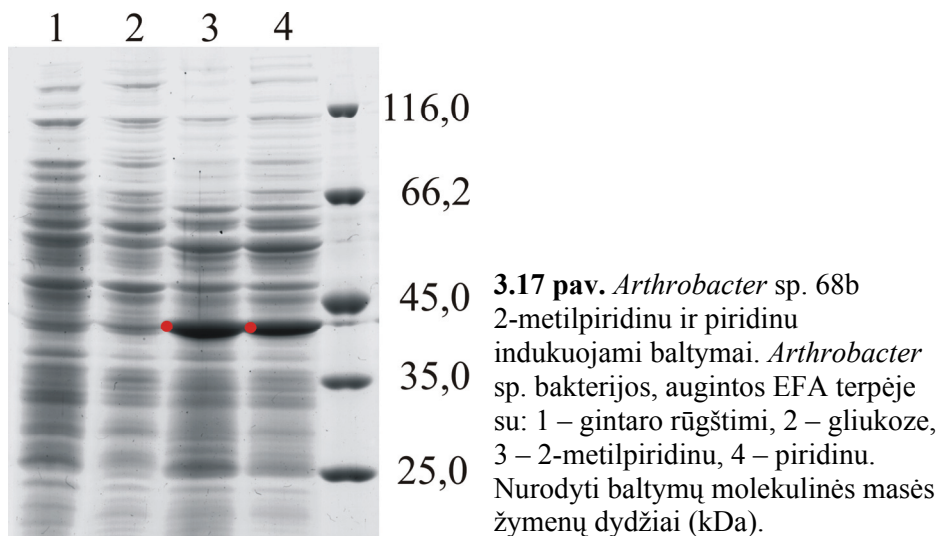
3.16 pav. Piridino biokonversija panaudojant *Arthrobacter* sp. 68b intaktines ląstelės. A – bakterijos, augintos terpėje su su 2-metilpiridinu, B – su piridinu.

Analizuojant spektro pokyčius, išryškėja kai kurie biovirsmų skirtumai. Jie priklauso nuo substrato, su kuriuo ląstelės buvo augintos. Kai 2-metilpiridiną panaudoja ląstelės, kultivuotos su šiuo substratu, susidaro junginys, kuris lemia nedidelį sugerties padidėjimą 200–250 nm srityje (3.15 pav. A). Tokie spektro pokyčiai nėra stebimi, kai 2-metilpiridiną skaido su piridinu kultivuotos ląstelės (3.15 pav. B). Minėtoje srityje žymiai didesni spektro pokyčiai atsiranda, kai piridiną panaudoja ląstelės, augintos su 2-metilpiridinu (3.16 pav. A). Sugerties padidėjimas rodo, kad kaupiasi junginys, susidaręs biovirsmų metu. Vykstant piridino biovirsmams, kai naudojamos su minėtu substratu augintos ląstelės, 200–250 nm srityje sugerties padidėjimas yra nežymus (3.16 pav. B). Biovirsmų tyrimai įrodo, kad abiejų

substratų skaidymas yra indukuojamas procesas. Dalis juose dalyvaujančių fermentų yra tie patys. Vis dėlto spektro pokyčių skirtumai leidžia teigti, kad *Arthrobacter* sp. 68b kamiene gali būti du atskiri – 2-metilpiridino ir piridino – skaidymo keliai.

3.1.3.1. 2-metilpiridinu ir piridinu indukuojamų baltymų tyrimas

Arthrobacter sp. 68b bakterijose buvo nustatyta, kad 2-metilpiridino ir piridino skaidymas yra indukuojamas procesas. Taip pat daroma prielaida, kad degradacijoje greičiausiai dalyvauja tie patys fermentai. Norint tai įrodyti, buvo tiriami šiais substratais indukuojami baltymai. Tuo tikslu bakterijos buvo auginamos EFA terpėje su minėtais substratais, gintaro rūgštimi (kontrolė) ir gliukoze (kontrolė) 2 paras. Tuomet ląstelės buvo suardomos ir, panaudojant beląstelinį ekstraktą, jų baltymų sudėtis buvo nagrinėjama poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis. Paaiškėjo, kad, auginant ląsteles su 2-metilpiridinu ir piridinu, yra indukuojamas panašios molekulinės masės (apie 40 kDa) baltymas (3.17 pav.).



2-Metilpiridinu ir piridinu indukuojamas baltymas buvo išpjautas iš gelio ir paruoštas *de novo* peptidų sekos nustatymui (žr. skyr. 2.17). Buvo aptikti keturi galimi peptidai ir nustatytos jų aminorūgščių sekos (3.18 pav.). Kadangi leucinas (L) ir izoleucinas (I) yra vienodos molekulinės masės, o lizino (K) (146,19 Da) ir glutamino (Q) (146,15 Da) masės yra labai panašios (Proteomikos centre naudojamas masių spektrometras jų negali atskirti), todėl L ir I arba K ir Q yra interpretuojamos lygiaverčiai.

Gauti peptidai panaudoti aptikant geną, koduojantį tiriamą indukuotą baltymą, dalinai nustatytame *Arthrobacter* sp. 68b genome. Naudojant programą BioEdit 7.1.3 (Hall, 1999), BLASTA analizės metodu visi keturi peptidai buvo aptikti vieno geno koduojamo baltymo teorinėje aminorūgščių sekoje (3.18 pav.). 1233,67 Da molekulinės masės peptidas yra 72 % panašus į teorinę tiriamo baltymo seką, sekos tarpusavyje nesutampa 3 aminorūgštimis. Nors 1440,75 Da seka pagal aminorūgščių sudėtį 100 % atitinka teorinę seką, bet nustatytame peptide asparaginas (N) ir prolinas (P) yra susikeitę vietomis. Kiti du nustatyti peptidai yra identiškai tiriamo baltymo aminorūgščių sekai.

Genas (*asr2/asr8*), koduojantis tiriamą baltymą, buvo aptiktas p2MP plazmidėje. Jo produktas yra panašiausias į hipotetinę monoooksigenazę (ar. identiškumas 40 %, ar. panašumas 60 %), kuri priklauso liuciferazių šeimai, iš *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 kamieno (Kriszt ir kt., 2012). Tarp tiriamo baltymo homologų aptinkamos liuciferazės šeimos monoooksigenazės iš įvairių *Actinomycetales* rūšių ir taip pat iš Gram-neigiamų bakterijų. Filogenetinė analizė (3.19 pav.) parodė, kad *Arthrobacter* sp. 68b monoooksigenazė yra giminingiausia *R. pyridinivorans* AK37, *Pseudomonas putida* S16 ir *Burkholderia ambifaria* AMMD liuciferazės šeimos baltymams. Šie baltymai sudaro atskirą šaką filogenetiniame medyje.

MKF GAINEGQVTK GTTHAVRIQEVIDEA VHADK LGFDYWG
 CSEQHLVESSWTI SSPQA IYGAVAALTKRIKLR TMSVI TL
 K**E**L**G**H**P**I**L**V**A**E**R**LATLDA ISQGRVEFGTARSNNAAYQDAF
 GIDPTTTRREQWRETVTEATLRAMQEDPFSFKGEIYNIDGPF
 HVS PRPYSMVPPP VWTAA SSVESHRLMGELGIGVLSLE SF
 LGWDYAKD IAAAH IEGFK **S**A**A**P**I** **G**G**L**Y**A** **P**N**P**G**R** AFFTF PC
 HVAETHDKAIDQARESTLGLVAHLADLYQTVAENEKEQGG
 KSYGYLLDLAEKILPFTKDIEALIEHSP TAMVGTPELIE
 RIQRLEKMGYNEIICK**F**D**N**H**G**H**R**NNLRAMEMFAKYVIPAV
 K**H**P**S**F**I**P**N**N**D**F**E**Q**R**GVAAKSFLI

1233,67 Da

EH**A**V**P**I**I**V**A**E**R**

1440,75 Da

SA**A**P**I**G**G**I **Y**A**N**P**P**G**R**

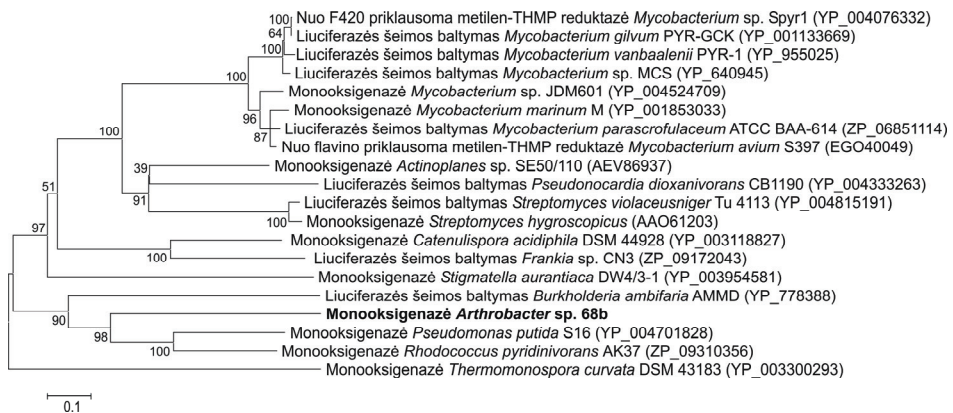
882,4 Da

FD**N**H**G**H**R**

HP**S**F**I**P**N**N**D**F**E**K**R**

1600,74 Da

3.18 pav. *De novo* nustatytų 4 potencialių peptidų aminorūgščių sekos ir molekulinės masės bei jų vieta *asr2/asr8* koduojamo teorinio baltymo sekoje.

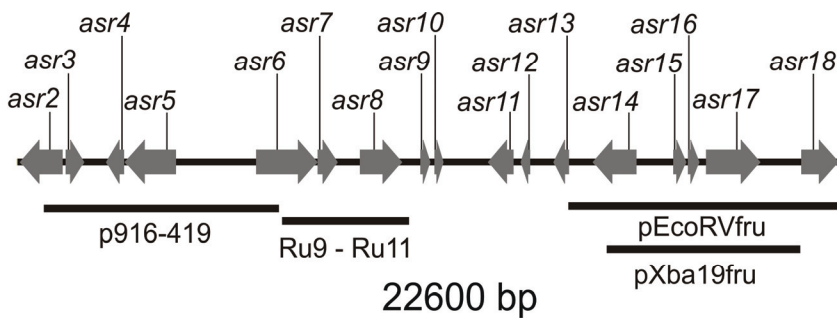


3.19 pav. *Arthrobacter* sp. 68b kamieno *asr2/asr8* koduojamo baltymo filogenetinis medis, sudarytas artimiausių grupių apjungimo metodu. Šalia atsišakojimų nurodyta procentinė įkėlos sutapimo su tiriamu baltymu išraiška. Mastelis atitinka pakeistų aminorūgščių skaičių, tenkantį vienai vietai. Šalia tiriamo baltymo homologų nurodyti genų banko prieigos numeriai. THMP – tetrahidrometanopterinas.

Anksčiau aprašyti ftalio rūgšties skaidymo fermentai yra giminingiausi *Arthrobacter* spp. baltymams, o tiriama monooksigenazė yra filogenetiškai artimiausia kelių rūšių bakterijoms, tarp kurių yra ir Gram-neigiamų. Tai rodo, kad analizuotų baltymų kilmė yra skirtinga, nors, remiantis tyrimais, tiek ftalio rūgšties, tiek piridino ir 2-metilpiridino degradacijos baltymų genai yra toje pačioje plazmidėje. Galima daryti prielaidą, kad genas, koduojantis Gram-neigiamoms bakterijoms giminingą baltymą, galėjo patekti vienu iš horizontalaus genų perdavimo būdų.

3.1.3.2. Genų, koduojančių 2-metilpiridino ir piridino skaidymo baltymus, paieška ir tyrimas

Kaip minėta, 2-metilpiridinu ir piridinu indukuojamą monooksigenazę koduojantis genas buvo aptiktas *Arthrobacter* sp. 68b plazmidėje p2MP. Analizuojant greta esančius atvirus skaitymo rėmelius ir jų koduojamus baltymus, buvo nustatyti galimai 2-metilpiridino ir piridino skaidyme dalyvaujančių baltymų genai. Jie yra pasiskirstę didesniame nei 22 kb fragmente (3.20 pav.). Norint patvirtinti, kad po sekos nustatymo šis fragmentas yra surinktas teisingai buvo atliekami tolimesni tyrimai. Remiantis jo seka, buvo sukurti pradmenys fru F ir R bei c00419 F ir R, kurie buvo naudojami plazmidžių atrankai iš anksčiau sukonstruotų *Arthrobacter* sp. 68b genų bibliotekų. Plazmidės p916–419 (7 kb), pXba19fru (7 kb) ir pEcoRVfru (9 kb) buvo aptiktos genų bibliotekose, kurių konstravimui buvo naudojamos atitinkamai *Hind*III, *Xba*I ir *Eco*RV restrikcijos endonukleazės. Nustačius šių plazmidžių sekas buvo patvirtinta, kad joms komplementari analizuojamo 22 kb fragmento dalis yra surinkta teisingai. Kita fragmento dalis (Ru9–Ru11) buvo patvirtinta nustačius nukleotidų seką fragmentų, gautų PGR metodu naudojant sekai komplementarių pradmenų poras: Ru9 F ir R, Ru10 F ir R bei Ru11 F ir R.



3.20 pav. *Arthrobacter* sp. 68b p2MP DNR fragmentas, kuriame yra genai galimai dalyvaujantys 2-metilpiridino ir piridino skaidyme.

Tiriamame fragmente nustatyta 17 atvirų skaitymo rėmelių, bet tik dalis jų koduoja galimus 2-metilpiridino ir piridino skaidymo baltymus. *asr2* ir

asr8 koduoja baltymus, labiausiai panašius į liuciferazės šeimos monooksigenazę iš *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 (Kriszt ir kt., 2012). Abiejų atvirų skaitymo rėmelių nukleotidų sekos tarpusavyje yra identiškos, todėl galima teigti, kad šiuo atveju greičiausiai yra įvykusi geno duplikacija.

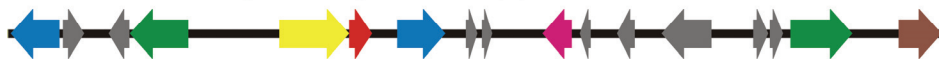
Fragmente taip pat nustatyti du atviri skaitymo rėmeliai: *asr5* ir *asr17*, koduojantys gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazę atitinkamai iš *Streptomyces* sp. S4 (Seipke ir kt., nepublikuota) ir *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 (Lucas ir kt., nepublikuota).

Homologų paieškos rezultatai parodė, kad *asr5* koduojamas baltymas (ar. identiškumas 72 %, ar. panašumas 84 %) yra mažiau panašus į gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazę nei baltymas (ar. identiškumas 89 %, ar. panašumas 94%), kurį koduoja *asr17*. Ankstesnių darbų metu buvo nustatyta, kad *asr17* baltymas yra indukuojamas 2-metilpiridinu, taip pat buvo parodytas jo dalyvavimas gintaro rūgšties pusiau aldehido biovirsmų tyrimuose naudojant intaktines ląsteles. Vėliau šis baltymas buvo išgrynintas (Bachmatova ir Marcinkevičienė, nepublikuota). Taigi, galima teigti, kad, *Arthrobacter* sp. 68b bakterijoms skaidant 2-metilpiridiną, susidaro gintaro rūgšties pusiau aldehidas. Kaip minėta literatūrinėje dalyje, *Arthrobacter* spp. bakterijose yra pasiūlyti skirtingi šio junginio skaidymo keliai, tačiau tik Shukla (1974) nustatė, kad, vykstant 2-metilpiridino degradacijai, kaupiasi gintaro rūgšties pusiau aldehidas. Minėtas junginys taip pat susidaro, kai piridinas yra skaidomas *Bacillus* sp. 4, *Corynebacterium* spp., *Brevibacterium* spp., *Micrococcus luteus*, *Nocardia* sp. KM-2, *Arthrobacter* sp. KM-4 bakterijose (Watson ir Cain, 1975; Shukla ir Kaul, 1974; Shukla ir Kaul, 1975; Sims ir kt., 1986; Korosteleva ir kt., 1981; Khasaeva ir kt., 2011b).

Arthrobacter sp. 68b tiriamo fragmento abi koduojamos monooksigenazės ir *asr17* koduojama gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazė yra panašios į atitinkamus baltymus iš *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 (Kriszt ir kt., 2012). Analizuojant pastarojo kamieno genus, esančius greta monooksigenazės ir gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazės genų, bei jų koduojamus baltymus buvo pastebėta, kad dalis

koduojamų baltymų yra funkciškai panašūs į tiriamo fragmento baltymus iš *Arthrobacter* sp. 68b.

Arthrobacter sp. 68b (22600 bp)



Rhodococcus pyridinivorans AK37 (10687 bp)



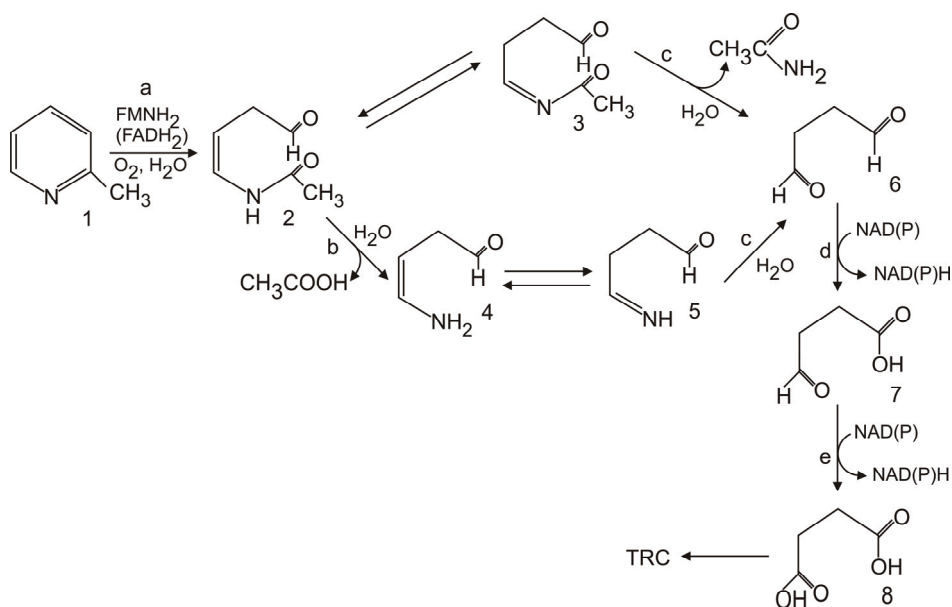
3.21 pav. *Arthrobacter* sp. 68b ir *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 galimų 2-metilpiridino ir piridino skaidymo operonų palyginimas. Monoooksigenazes koduojantys *asr* pažymėti mėlyna spalva; gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazes ir dialdehido dehidrogenazę – žalia; flavino reduktazę – raudona; amidohidrolazę – geltona; 3,4-dihidroksi-2-butanon-4-fosfato sintazę – rožine; transkripcijos reguliatorius – ruda; kitų funkcijų baltymus – pilka.

Lyginant *Arthrobacter* sp. 68b ir *R. pyridinivorans* AK37 panašius baltymus koduojančius fragmentus, galima pastebėti, kad 68b bakterijų genai yra plačiai pasiskirstę, o AK37 yra išsidėstę glausčiau (3.21 pav.). Be to, kaip buvo minėta, *Arthrobacter* sp. bakterijose yra po dvi monoooksigenazės ir gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazės genų kopijas, o *R. pyridinivorans* turi tik po vieną analogišką baltymą koduojantį geną. Abiejuose DNR fragmentuose yra amidohidrolazę, reduktazę, 3,4-dihidroksi-2-butanon-4-fosfato sintazę bei transkripcijos reguliatorių koduojantys genai. *R. pyridinivorans* DNR fragmente taip pat yra nuo NAD priklausoma aldehido dehidrogenazė, permeazė ir EthD baltymas, kurio funkcija nėra žinoma (3.21 pav).

3.1.3.3. Galimas 2-metilpiridino ir piridino skaidymo kelias *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose

Remiantis atliktais tyrimais, analizėmis ir gautais rezultatais, galima pasiūlyti 2-metilpiridino ir piridino skaidymo kelią *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose (3.22 pav.). Pirmiausia, veikiant monoooksigenazei (*asr2/asr8*), yra

skeliamas piridino žiedas tarp C2 ir C3 atomų ir 2-metilpiridino atveju susidaro *N*-[(1*Z*)-4-oksobut-1-en-1-yl]acetamidas. Šios reakcijos metu greičiausiai dalyvauja ir flavino reduktazė (*asr7*). Tuomet susidaręs junginys gali izomerizuotis į *N*[(1*Z*)-4-oksobutilideno]acetamidą arba, veikiant hidrolazei, atskyla acto rūgštis ir susidaro (3*Z*)-4-aminobut-3-enalis. Jis taip pat gali izomerizuotis į (3*Z*)-4-aminobut-3-enal-4-iminobutanalį. Iš jo spontaniškai arba veikiant amidohidrolazei (*asr6*) susidaro gintaro rūgšties dialdehidai. Šis junginys taip pat susidaro iš *N*[(1*Z*)-4-oksobutilideno]acetamido, kai, veikiant amidohidrolazei (*asr6*), atskyla acetamidas.



3.22 pav. Galimo 2-metilpiridino skaidymo *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose schema. 1 – 2-metilpiridinas, 2 – *N*-[(1*Z*)-4-oksobut-1-en-1-yl]acetamidas, 3 – *N*[(1*Z*)-4-oksobutilideno]acetamidas, 4 – (3*Z*)-4-aminobut-3-enalis, 5 – (3*Z*)-4-aminobut-3-enal-4-iminobutanalis, 6 – gintaro rūgšties dialdehidai, 7 – gintaro rūgšties pusiau aldehidai, 8 – gintaro rūgštis; a – monoooksigenazė ir flavino reduktazė, b – hidrolazė, c – amidohidrolazė, d – gintaro rūgšties dialdehidai dehidrogenazė, e – gintaro rūgšties pusiau aldehidai dehidrogenazė; TRC – trikarboksirūgščių ciklas.

Tuomet, reakciją katalizuojant gintaro rūgšties dialdehidai dehidrogenazei (*asr5*), susidaro gintaro rūgšties pusiau aldehidai, o iš jo,

veikiant gintaro rūgštis pusiau aldehido dehidrogenazei (*asr17*), susidaro gintaro rūgštis. Ji toliau yra panaudojama trikarboksirūgščių cikle.

Piridino skaidymas galėtų vykti analogiškai. Pirmiausia susidaro *N*-[(1*Z*)-4-oksobut-1-en-1-il]formamidas, kuris arba izomerizuojasi į *N*[(1*Z*)-4-oksobutilideno]formamidą, arba atskyla skruzdžių rūgštis ir susidaro (3*Z*)-4-aminobut-3-enalis, kuris, kaip minėta, gali izomerizuotis į (3*Z*)-4-aminobut-3-enal-4-iminobutanalį. Iš šio junginio ir iš *N*[(1*Z*)-4-oksobutilideno]formamido, atskilus formamidui, susidaro gintaro rūgštis dialdehidais, kuris skaidomas iki gintaro rūgštis.

Literatūroje 2-metilpiridino skaidymas yra aprašytas tik *Arthrobacter* sp. KM-2MP kamiene (Khasaeva ir kt., 2011a). Autorių teigimu, pirmiausia šis junginys yra hidroksilinamas, tuomet susidaro 3-hidroksi ir 5-hidroksi-2-metilpiridinai, kurie gali izomerizuotis. Minėti junginiai ir jų izomerai yra skaidomi toliau, kaip tarpiniai degradacijos produktai susidaro pirolo dariniai, 4-oksopentanoinė rūgštis ir azochinoninės struktūros pigmentas (Khasaeva ir kt., 2011a). *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose pasiūlytas 2-metilpiridino skaidymo kelias visiškai skiriasi nuo aprašyto *Arthrobacter* sp. KM-2MP bakterijose, nes nevyksta hidroksilinimas, nesusidaro 5 atomus turintys heterocikliniai junginiai. Shukla (1974) tirtose *Arthrobacter* sp. bakterijose nustatė, kad 2-metilpiridino skaidymas neprasideda metilo grupės oksidavimu ar hidroksiliniu 6 žiedo padėtyje. Tyrimai parodė, kad kaip tarpinis metabolitas susidaro gintaro rūgštis pusiau aldehidas, tačiau skaidymo kelias nebuvo pateiktas (Shukla, 1974). *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose pasiūlytas 2-metilpiridino skaidymo kelias turi panašumų su Shukla aprašyta degradacija, nes pirmame skaidymo etape taip pat nevyksta metilo grupės oksidacija ar žiedo hidroksilinimas ir susidaro gintaro rūgštis pusiau aldehidas.

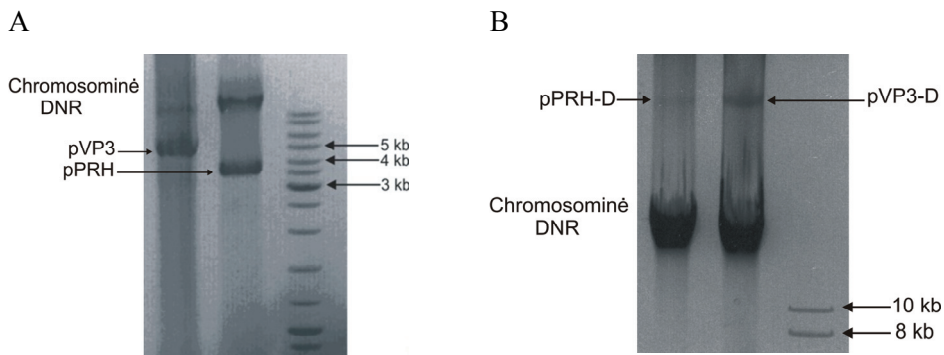
Spėjami piridino skaidymo bakterijose keliai dažniausiai prasideda redukcijos arba hidroksilinimo reakcijomis. Paskui, greičiausiai veikiant dioksigenazėms arba hidrolazėms, piridino žiedas yra skeliamas tarp C2 ir C3 atomų (Watson ir Cain, 1975; Sims ir kt., 1986; Korosteleva ir kt., 1981; Khasaeva ir kt., 2011b). Tuomet atskyla skruzdžių rūgštis ir susidaro gintaro

rūgšties pusiau aldehidas (Watson ir Cain, 1975; Sims ir kt., 1986; Korosteleva ir kt., 1981) arba susidaro 5 atomus turintys cikliniai junginiai (Khasaeva ir kt., 2011b). Vykstant oksidaciniam dekarboksilinimui, iš hidroksilintų junginių gali susidaryti monoamidai arba gintaro rūgšties pusiau aldehidas (Zefirov ir kt., 1994). *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose nevyksta nei žiedo hidrinimas, nei hidroksilinimas. Piridino žiedas yra iškart oksiduojamas ir skeliamas, kaip ir literatūroje aprašytais atvejais, tarp C2 ir C3 atomų. Nors yra pasiūlyta nemažai skirtingų piridino degradacijos kelių, daugeliu atvejų kaip tarpiniai skaidymo produktai susidaro gintaro rūgšties pusiau aldehidas ir gintaro rūgštis. Minėti junginiai taip pat susidaro vykstant piridino skaidymui pasiūlytu keliu *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose.

Taigi, tiriant 2-metilpiridino ir piridino skaidymą buvo nustatyta, kad tai yra indukuojamas procesas, kuriame dalyvauja hipotetinė monooksigenazė. Aptikti genai, kurie koduoja galimus šių junginių skaidymo baltymus. Taip pat, remiantis genų analize, buvo pasiūlytas minėtų substratų skaidymo kelias, kuris prasideda žiedo oksidavimu. Gintaro rūgšties pusiau aldehidas ir gintaro rūgštis yra tarpiniai 2-metilpiridino ir piridino skaidymo produktai.

3.2. 2-Hidroksipiridiną skaidančių *Arthrobacter rhombi* bakterijų plazmidės

Ankstesnių Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus darbų metu, tiriant *Arthrobacter* spp. kamienus, sugebančius skaidyti 2-hidroksipiridiną kaip vienintelį anglies šaltinį (Semėnaitė ir kt., 2003), buvo nustatyta, kad *Arthrobacter rhombi* PRH1 ir VP3 kamienai turi po vieną plazmidę, mažesnę nei 10 kb, atitinkamai pPRH1 ir pVP3 (Semėnaitė, 2003; Meškienė, nepublikuota) (3.23 pav. A). Tolimesnių tyrimų metu buvo nustatyta, kad abu minėti kamienai taip pat turi ir po vieną didelės molekulinės masės plazmidę: pPRH-D ir pVP3-D (3.23 pav. B).



3.23 pav. *Arthrobacter rhombi* PRH1 ir VP3 plazmidės: mažosios (A), didžiosios (B).

Šio darbo metu buvo tiriama *Arthrobacter rhombi* PRH1 ir VP3 bakterijų natyvių mažųjų plazmidžių struktūra ir replikacijos tipas bei didžiųjų plazmidžių lemiamas fenotipas.

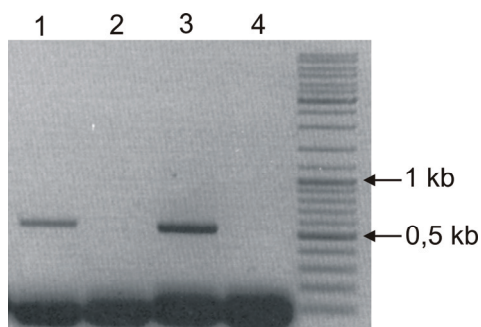
3.2.1. *Arthrobacter rhombi* PRH1 ir VP3 bakterijų didžiosios plazmidės

Kaip žinoma iš literatūros šaltinių, bakterijoms skaidant 2-hidroksipiridiną skystoje terpėje, susidaro mėlynos spalvos užlaštelinis kristalinis pigmentas. Auginant bakterijas ant agarizuotos terpės, jis yra matomas blizgančios žalios spalvos (Kolenbrander ir Weinberger, 1977). Kultivuojant PRH1 kamieno bakterijas ant agarizuotos EFA terpės su 2-hidroksipiridinu buvo pastebėta, kad kai kurios kolonijos neišskiria šio pigmento. Manoma, kad tai yra spontaniniai mutantai, pradėję gebėjimą skaidyti minėtą piridino darinį, kas galėtų būti siejama su plazmidės netekimu. Norint tai patvirtinti, iš PRH1 kamieno ir jo mutanto (PRH1mut1) bakterijų buvo išskirta suminė DNR. Jos analizė horizontalios elektroforezės gelyje parodė, kad PRH1mut1 bakterijos yra praradusios plazmidę (duomenys nepateikti). Todėl galima teigti, kad joje yra išsidėstę *A. rhombi* PRH1 bakterijų 2-hidroksipiridino katabolizmo genai.

Norėdami pilnai tuo įsitikinti, atlikome PGR naudodami hpyD F ir R bei hpyE F ir R pradmenis, kurie buvo sukurti pagal genų sekas iš

2-hidroksipiridino skaidymo operono, nustatyto *Arthrobacter* sp. PY22 bakterijose (Gasparavičiūtė, 2008). PGR produktai buvo gauti tik tuose reakcijų mišiniuose, kuriuose naudota PRH1 kamieno DNR (3.24 pav.). Šie rezultatai dar kartą patvirtina, kad 2-hidroksipiridino skaidymo genai yra išsidėstę PRH1 kamieno didžiojoje plazmidėje, tad ją galima vadinti kataboline.

Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad *A. rhombi* VP3 kamieno bakterijose 2-hidroksipiridino skaidymo genai taip pat galėtų būti didelės molekulinės masės plazmidėje. Šiuo atveju nebuvo pastebėta, kad bakterijos spontaniškai prarastų sugebėjimą išskirti mėlyną pigmentą. Tikintis gauti pigmento neišskiriančius mutantus, VP3 kamieno bakterijos buvo gydomos nuo plazmidžių. Tuo tikslu buvo naudojamos dvi skirtingos auginimo strategijos: aukštesnėje nei optimali temperatūroje (Ghosh ir kt., 2000) ir su novobiocinu (Hooper ir kt., 1984).



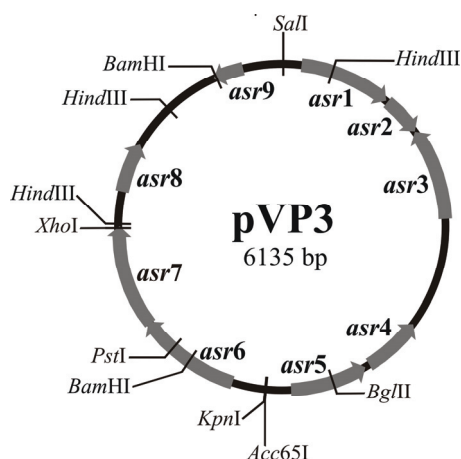
3.24 pav. *Arthrobacter rhombi* PRH1 ir jo mutanto PRH1mut1 DNR tyrimo rezultatai. Suminė DNR buvo analizuojama PGR metodu naudojant 2-hidroksipiridino skaidymo genų pradmenų poras. 1, 3 PRH1 DNR; 2, 4 PRH1mut1 DNR; 1, 2 naudota hpyD pradmenų pora; 3, 4 naudota hpyE pradmenų pora.

Žinoma, kad *Arthrobacter* spp. bakterijų optimali augimo temperatūra yra 30 °C (Jones ir Keddie, 2006). Gydant nuo plazmidžių, *A. rhombi* VP3 bakterijos buvo auginamos 35 °C, 37 °C, 40 °C, 42 °C ir 45 °C temperatūroje. Paskui bakterijos buvo išsėjamos ant atrankios terpės. Klonų, neišskiriančių mėlyno pigmento, gauti nepavyko. Tuomet minėto kamieno bakterijos buvo auginamos terpėje su skirtingomis novobiocino koncentracijomis: 5, 10 ir 15 µg/ml. Remiantis optinio tankio matavimais, nustatyta, kad visais atvejais novobiocinas bakterijų augimą slopino vienodai, tai yra bakterijos dauginosi 10

kartų lėčiau. Išsėjus bakterijas ant atrankių terpių, praradusių sugebėjimą išskirti mėlyną pigmentą klonų nebuvo pastebėta. Taigi, galima daryti prielaidą, kad *Arthrobacter rhombi* VP3 bakterijose 2-hidroksipiridino skaidymo genai yra chromosomoje.

3.2.2. *Arthrobacter rhombi* pVP3 plazmidė

Maža kriptinė plazmidė, išskirta iš VP3 kamieno bakterijų, buvo pavadinta pVP3. Jos DNR buvo hidrolizuojama įvairiomis restrikcijos endonukleazėmis ir sudaroma pirminė restrikcinė kartograma. Nustatyta, kad *Pst*I ir *Sal*I plazmidę hidrolizuoja vienoje vietoje ir gaunamas apie 6 kb dydžio fragmentas, kuris buvo klonuotas į pTZ18R vektorių hidrolizuotą atitinkamomis restrikcijos endonukleazėmis. Plazmidės, hidrolizuotos su *Sal*I, klonavimas buvo sėkmingesnis, taigi, buvo gauta hibridinė plazmidė pVP3Sal24 (R. Meškienė, nepublikuota). Atlikus restrikcinę analizę, nustatyta, kad pTZ18R promotorius P_{Lac} veikia *Sal*I-*Bgl*II-*Pst*I klonuoto fragmento kryptimi. Hibridinė plazmidė buvo hidrolizuojama įvairiomis restrikcijos endonukleazėmis bei jų deriniais ir konstruojami deleciniai variantai, kurie buvo naudojami plazmidės sekos nustatymui.



3.25 pav. *Arthrobacter rhombi* VP3 plazmidė pVP3. Nurodytos kai kurių restrikcijos endonukleazių hidrolizės vietos bei galimi atviri skaitymo rėmeliai (*asr*).

Nustačius pVP3 plazmidės seką, paaiškėjo, kad ji yra 6135 bp dydžio, GC nukleotidai sudaro 64,6 %. Atlikus kompiuterinę analizę, buvo nustatyti 9 atviri skaitymo rėmeliai, ilgesni nei 200 bp (3.25 pav.). Ieškant homologų duomenų bazėse, buvo nustatytas Asr1–Asr7 panašumas į žinomus bakterijų baltymus iš *Arthrobacter arilaitensis* Re117 ir *Micrococcus* sp., tačiau tik trys yra panašūs į žinomos funkcijos baltymus, kiti yra hipotetiniai. Asr8 ir Asr9 homologų rasti nepavyko (3.3 lentelė).

Lentelė 3.3 *Arthrobacter rhombi* VP3 plazmidės *asr* koduojamų baltymų analizė.

<i>asr</i>	Koduojamo baltymo dydis (ar.)	Homologas	Duomenų bazių prieigos nr.	E vertė	Literatūros šaltinis
<i>asr1</i>	186	rezolvazės baltymo domenas <i>Mycobacterium tusciae</i> JS617	ZP_09685077	2e-71	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr2</i>	80	hipotetinis baltymas AARI_30370 <i>Arthrobacter arilaitensis</i> Re117	YP_003918210	3e-07	Monnet ir kt., 2010
<i>asr3</i>	187	hipotetinis baltymas AARI_pII00110 <i>Arthrobacter arilaitensis</i> Re117	YP_003915171	5e-27	Monnet ir kt., 2010
<i>asr4</i>	120	hipotetinis baltymas Mlut_09640 <i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665	YP_002957037	4e-13	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr5</i>	156	hipotetinis baltymas AARI_10730 <i>Arthrobacter arilaitensis</i> Re117	YP_003916254	0,000 2	Monnet ir kt., 2010
<i>asr6</i>	210	mobilizacijos baltymas <i>Thiomonas intermedia</i> K12	YP_003643626	9e-08	Lucas ir kt., nepublikuota
<i>asr7</i>	246	mobilizacijos baltymas <i>Arthrobacter arilaitensis</i> Re117	YP_003915166	1e-73	Monnet ir kt., 2010
<i>asr8</i>	100	homologų nerasta			
<i>asr9</i>	62	homologų nerasta			

Atliekant į Asr1 panašių sekų paiešką duomenų bazėje, buvo nustatyti konservatyvūs serino rekombinazės ir PinR baltymo domenai. Abu šie baltymai priklauso rezolvazių/invertazių šeimai. PinR baltymas yra DNR

invertazė, Pin baltymo homologas. Minėtos šeimos baltymai dalyvauja konservatyvioje sekai specifinėje DNR rekombinacijoje. Rezolvazių/invertazių šeimos baltymai yra apie 200 aminorūgščių dydžio, turi konservatyvų NH₂ galą, kuris dalyvauja DNR grandinių mainuose (Johnson, 1991). *asr1* koduojamas baltymas yra panašiausias į rezolvazės baltymo domeną iš *Mycobacterium tusciae* JS617 (Lucas ir kt., nepublikuota), taip pat į rezolvazės iš *Arthrobacter* spp. bakterijų. Homologų sąrašė yra aptinkama ir rezolvazių, ir invertazių.

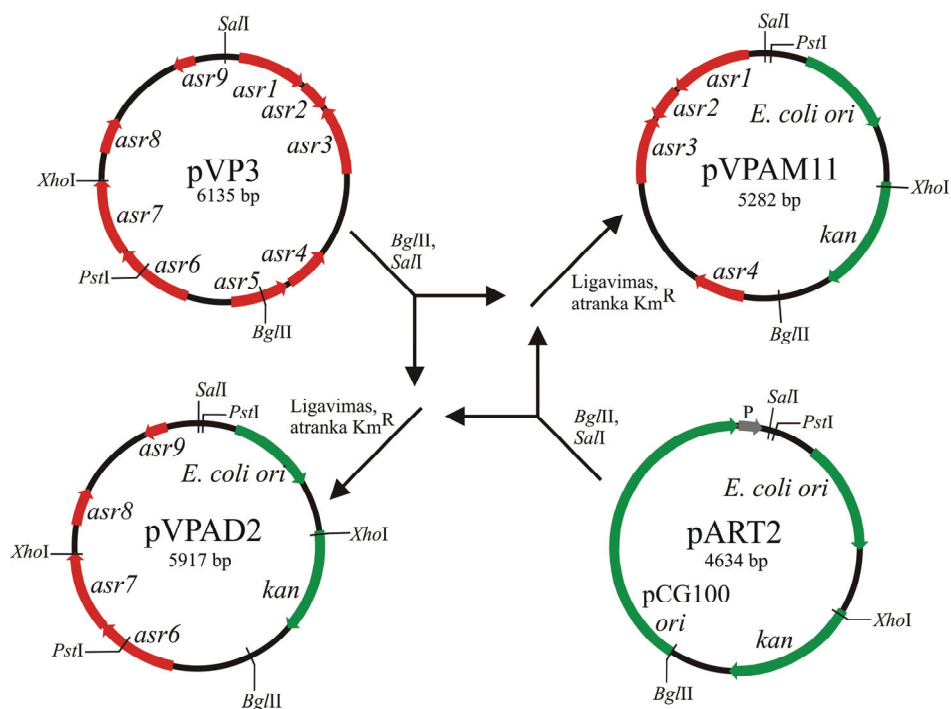
asr2, *asr3* ir *asr5* koduojamų baltymų aminorūgščių sekos yra panašiausios į hipotetinius *A. arilaitensis* Re117 baltymus (Monnet ir kt., 2010), o *Asr4* į hipotetinį baltymą Mlut_09640 iš *Micrococcus luteus* NCTC 2665 (Lucas ir kt., nepublikuota).

Nustatyta, kad *asr6* ir *asr7* koduoja mobilizacijos baltymus, jie yra panašiausi atitinkamai į baltymus iš *Thiomonas intermedia* K12 (Lucas ir kt., nepublikuota) ir iš *A. arilaitensis* Re117 (Monnet ir kt., 2010). Pirmojo baltymo sekoje aptiktas konservatyvus MobC baltymo domenai, o antrojo – relaksazės domenai. *Mob* regionai paprastai turi judriosios plazmidės. Šie regionai koduoja baltymus, įeinančius į relaksosomos sudėtį. Svarbus šios struktūros elementas yra relaksazė, kuri dalyvauja DNR pernašos pradžioje (Francia ir kt., 2004).

Kadangi pVP3 plazmidėje nėra atvirų skaitymo rėmelių, kurie koduotų replikacijos baltymus, todėl nustatyti jos replikacijos tipą yra sunkiau. Žinoma, kad Rep baltymų nekoduojama teta replikacijos tipo B klasės replikonai. Šio tipo plazmidės neturi ir tipiško *ori* regiono, jų replikacija yra inicijuojama nuo šeimininko RNR polimerazės susintetinto transkripto, kuris naudojamas kaip pirmaujančios grandinės sintezės pradmuo. Replikaciją inicijuoja Pol I, o vėliau tęsia replikacijos fermentų kompleksas (Bruand ir kt., 1993; Meijer ir kt., 1995). Nuo RNR priklauso plazmidės replikacija yra būdinga ColE1 ir su ja susijusioms plazmidėms iš *Enterobacteriaceae* (Del Solar ir kt., 1998). Neseniai buvo nustatyta, kad *Vibrio nigrisplachritudo* plazmidės pB1067, nekoduojančios Rep baltymų, replikacija priklauso nuo RNR (Le Roux ir kt.,

2011). Taigi, galima manyti, kad plazmidės pVP3 replikacija taip pat gali prasidėti nuo RNR pradmens. Norint tai įrodyti, reikia nustatyti minimalų plazmidės replikoną, kuriame būtų *ori*, ir koduojamus replikacijos RNR pradmenis.

Siekiant nustatyti kurioje plazmidės pVP3 dalyje yra replikacijos *ori*, plazmidinė DNR buvo hidrolizuojama *Bgl*III ir *Sal*I restrikcijos endonuklezėmis ir gauti du fragmentai buvo klonuoti į plazmidę pART2, hidrolizuotą tomis pačiomis endonukleazėmis (3.26 pav.). Gautomis plazmidėmis pVPAM11 ir pVPAD2 buvo transformuotos *Arthrobacter oxydans* PY21 ir *Rhodococcus erythropolis* SQ1 ląstelės ir auginamos ant atrankios terpės su kanamicinu.



3.26 pav. Plazmidžių pVPAD2 ir pVPAM11, naudotų plazmidės pVP3 replikacijos fragmento nustatymui, konstravimo schema. Plazmidės pVP3 atviri skaitymo rėmeliai pažymėti raudonai, plazmidės pART2 *kan* genas ir replikacijos sritis – žaliai.

Abiejų kamienų bakterijos, transformuotos sukonstruotomis plazmidėmis, formavo kolonijas, tačiau pastebėta, kad ląstelės, transformuotos

pVPAD2 plazmidė, dalijasi lėčiau nei transformuotos pVPAM11. Norint įsitikinti, kad bakterijos nėra kanamicinui atsparūs spontaniniai mutantai, buvo atrinkta po keletą *A. oxydans* PY21 ir *R. erythropolis* SQ1 klonų, iš kurių buvo skiriama DNR. Paskui bakterijų DNR buvo tiriama PGR metodu naudojant DP4 ir RP4 pradmenis, kurie yra komplementarūs kanamicino genui, esančiame abiejose tiriamose plazmidėse. PGR rezultatai parodė, kad abi hibridinės plazmidės yra *A. oxydans* PY21 ir *R. erythropolis* SQ1 ląstelėse. Tuomet *E. coli* DH5α ląstelės buvo transformuojamos plazmidėmis pVPAD2 ir pVPAM11, išskirtomis iš patikrintų abiejų kamienų bakterijų. Atranka buvo vykdoma pagal atsparumą kanamicinui. Plazmidinė DNR, išskirta iš atsparių *E. coli* bakterijų, buvo hidrolizuota *Bgl*II ir *Sal*I restrikcijos endonukleazėmis ir analizuojama horizontalios elektroforezės gelyje. Gauti fragmentai atitiko plazmidžių konstravimui naudotų fragmentų dydį. Taigi, galima teigti, kad abi plazmidės sėkmingai replikuoja *A. oxydans* PY21 ir *R. erythropolis* SQ1 bakterijose.

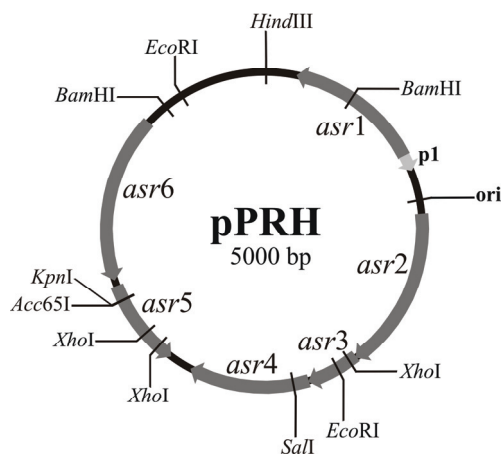
Remiantis gautais rezultatais, galima daryti prielaidą, kad plazmidė pVP3 turi kelis replikacijos *ori*, esančius skirtinguose tirtuose fragmentuose. Norint, tai patvirtinti šios plazmidės tyrimai bus vykdomi toliau.

3.2.3. *Arthrobacter rhombi* PRH1 plazmidė

Literatūrinėje dalyje buvo paminėta, kad kai kurie hibridiniai vektoriai *Arthrobacter* spp. bakterijoms buvo sukurti panaudojant giminingų bakterijų replikonus. Šio darbo tikslas buvo sukonstruoti vektorių, turintį *Arthrobacter* sp. replikoną. Kadangi plazmidės pVP3 sritis, atsakinga už replikaciją, nenustatyta, tai ši plazmidė nebuvo patogi vektoriaus kūrimui. Todėl, buvo tiriama *Arthrobacter rhombi* PRH1 kamieno maža natyvi plazmidė pPRH tikintis, kad jos replikoną bus galima panaudoti hibridinio vektoriaus konstravimui.

Plazmidės pPRH DNR restrikcinė analizė parodė, kad *Hind*III hidrolizuoja plazmidę vienoje vietoje ir gaunamas apie 5 kb dydžio fragmentas, kuris sėkmingai buvo klonuotas į pTZ57R vektorių, hidrolizuotą minėta restrikcijos endonukleaze, ir gauta plazmidė pPRHHind4. Nustatyta, kad plazmidinio vektoriaus promotorius P_{Lac} veikia *Hind*III-*Sal*I-*Kpn*I kryptimi. Siekiant sudaryti plazmidės pPRHHind4 restrikcinę kartogramą, jos DNR buvo hidrolizuojama įvairiomis restrikcijos endonukleazėmis ir jų deriniais. Taip pat buvo konstruojami deleciniai variantai, kurie buvo naudojami plazmidės nukleotidų sekos nustatymui.

Nustatyta plazmidės pPRH seka buvo užregistruota Genų banke, jos prieigos numeris HQ624979. Tiriama plazmidė yra 5000 bp dydžio, GC sudaro 66 %. Abiejų tirtų mažų plazmidžių GC reikšmės įeina į reikšmių, būdingų *Arthrobacter* sp. chromosominei DNR, intervalą, kuris yra 59–66 % (Jones ir Keddie, 2006). Atlikus kompiuterinę analizę buvo nustatyti 6 atviri skaitymo rėmeliai, ilgesni nei 200 bp (3.27 pav.). Homologai buvo nustatyti visų atvirų skaitymo rėmelių, išskyrus *asr*1, koduojamiems baltymams (3.4 lentelė).



3.27 pav. *Arthrobacter rhombi* PRH1 plazmidė pPRH. Nurodytos kai kurių restrikcijos endonukleazių hidrolizės vietos bei galimi atviri skaitymo rėmeliai (*asr*).

*asr*4 ir *asr*5 koduoja hipotetinius baltymus. *Asr*4 seka yra labiausiai panaši į baltymą AARI_pII00110 iš *Arthrobacter arilaitensis* Re117 mažosios plazmidės pRE117-2 (Monnet ir kt., 2010), o *Asr*5 į chromosominį baltymą TERTU_4246 iš *Teredinibacter turnerae* T7901 (Yang ir kt., 2009).

asr6 koduojamo baltymo aminorūgščių sekoje, kaip ir VP3 plazmidės *Asr1* atveju, nustatyti konservatyvūs serino rekombinazės ir PinR baltymo domenai. Baltymas yra panašiausias į galimą rezolvazę (ar. panašumas 75 %) iš *Arthrobacter arilaitensis* Re117 plazmidės pRE117-2 (Monnet ir kt., 2010).

Lentelė 3.4 *Arthrobacter rhombi* PRH1 plazmidės *asr* koduojamų baltymų analizė.

<i>asr</i>	Koduojamo baltymo dydis (a.a.)	Homologas	Duomenų bazių prieigos nr.	E vertė	Literatūros šaltinis
<i>asr1</i>	234	homologų nerasta			
<i>asr2</i>	280	replikacijos baltymas RepA <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	YP_001019181	9e-59	Matsui ir kt., 2007
<i>asr3</i>	89	prie DNR prisijungiantis baltymas <i>Rhodococcus ruber</i>	BAE06129	2e-11	Matsui ir kt., 2006
<i>asr4</i>	204	hipotetinis baltymas AARI_pII00110 <i>Arthrobacter arilaitensis</i> Re117	YP_003915171	3e-33	Monnet ir kt., 2010
<i>asr5</i>	152	hipotetinis baltymas TERTU_4246 <i>Teredinibacter turnerae</i> T7901	YP_003075508	2e-21	Yang ir kt., 2009
<i>asr6</i>	275	galima rezolvazė <i>Arthrobacter arilaitensis</i> Re117	YP_003915172	2e-78	Monnet ir kt., 2010

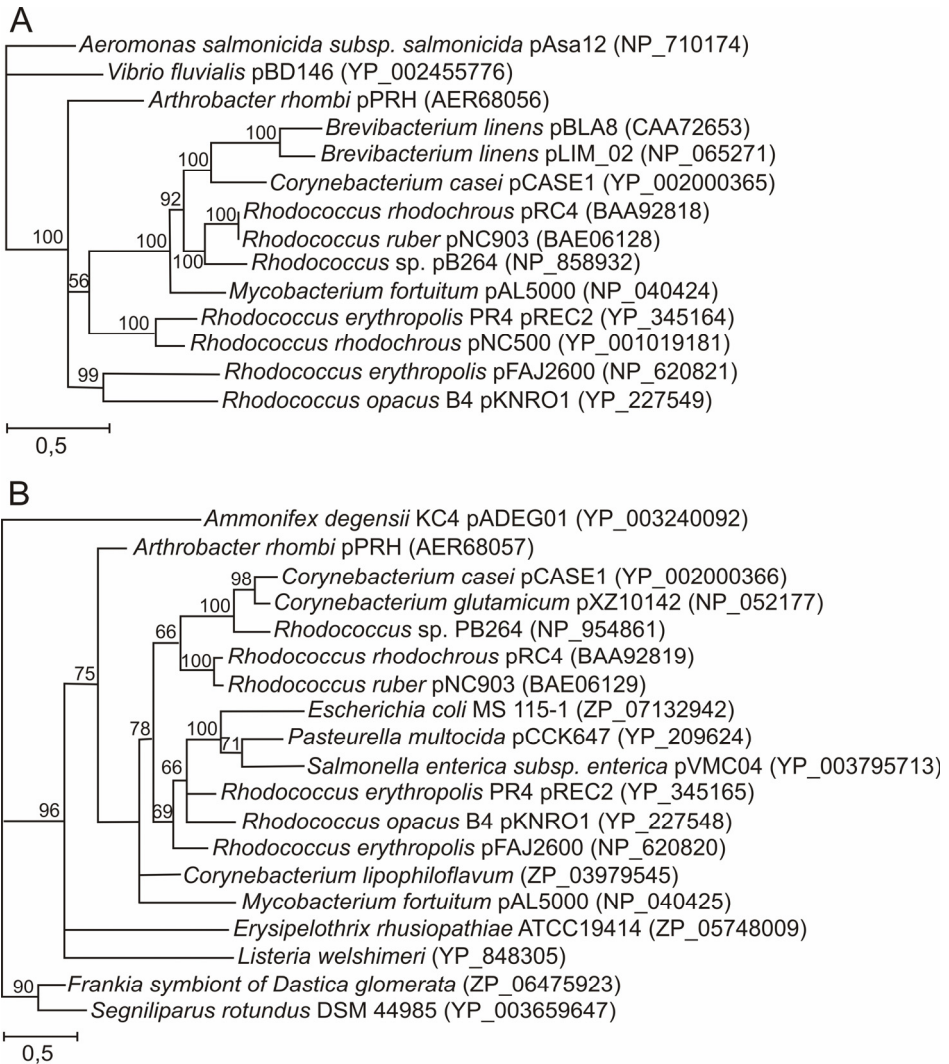
Atliekant homologų paiešką duomenų bazėse, buvo nustatyta, kad *asr2* ir *asr3* koduoja potencialius replikacijos baltymus atitinkamai RepA ir RepB. *Asr2* aminorūgščių sekoje buvo nustatyti du konservatyvūs domenai. N-gale esanti sritis (27–159 ar.) yra homologiška replikazės domeniui, kuris paprastai yra aptinkamas bakterinių plazmidžių DNR replikacijos baltymuose. Struktūriniai požymiai, būdingi praimazių C-galui, buvo nustatyti baltymo 166–242 ar. srityje. *Asr2* seka yra labiausiai panaši į RepA baltymą iš *Rhodococcus* sp. plazmidžių pNC500 (Matsui ir kt., 2007) (ar. panašumas 61 %). Tarp RepA homologų buvo aptikti *Rhodococcus* sp. plazmidžių pNC500 (Matsui ir kt., 2007), pREC2 (Sekine ir kt., 2006), pNC903 (Matsui ir

kt., 2006), pRC4 (Hirasawa ir kt., 2001) ir pFAJ2600 (De Mot ir kt., 1997) bei plazmidžių pAL5000 (*Mycobacterium fortuitum*) (Rauzier ir kt., 1988), pRBL1, pBLA8 (*Brevibacterium linens*) (Ankri ir kt., 1996; Leret ir kt., 1998), pMB1 (*Bifidobacterium longum*) (Rossi ir kt., 1996) replikacijos baltymai.

Baltymas, kurį koduoja *asr3*, yra panašiausias į *Rhodococcus ruber* prie DNR prisirišantį baltymą (ar. panašumas 60 %) iš pNC903 plazmidės (Matsui ir kt., 2006), tarp šio baltymo homologų aptinkama RepB baltymų iš įvairių anksčiau minėtų *Rhodococcus* sp. plazmidžių bei plazmidės pAL5000. Šio baltymo C-galas (37–83 ar.) yra panašus į sigma-70 panašių sigma faktorių 4 regioną, kuris jungiasi su promotoriaus –35 elementu (Campbell ir kt., 2002). Nustatyta, kad plazmidės pAL5000 RepB baltymas jungiasi prie DNR netoli *ori* srities (Stolt ir Stoker, 1996b). Galima teigti, kad tai būdinga ir pPRH *asr3* koduojamam baltymui.

Remiantis nustatytais panašumais, Asr2 ir Asr3 buvo suteikti atitinkamai RepA ir RepB pavadinimai bei priskirtos replikacijos baltymų funkcijos. Filogenetinė šių baltymų analizė buvo atlikta naudojant Mr. Bayes-3.1.2 programą. Abu baltymai filogenetiniame medyje sudaro atskiras šakas, tai rodo jų išskirtinumą tarp homologinių baltymų (3.28 pav.). Iš gautų duomenų galima teigti, kad plazmidė pPRH yra naujos grupės atstovė.

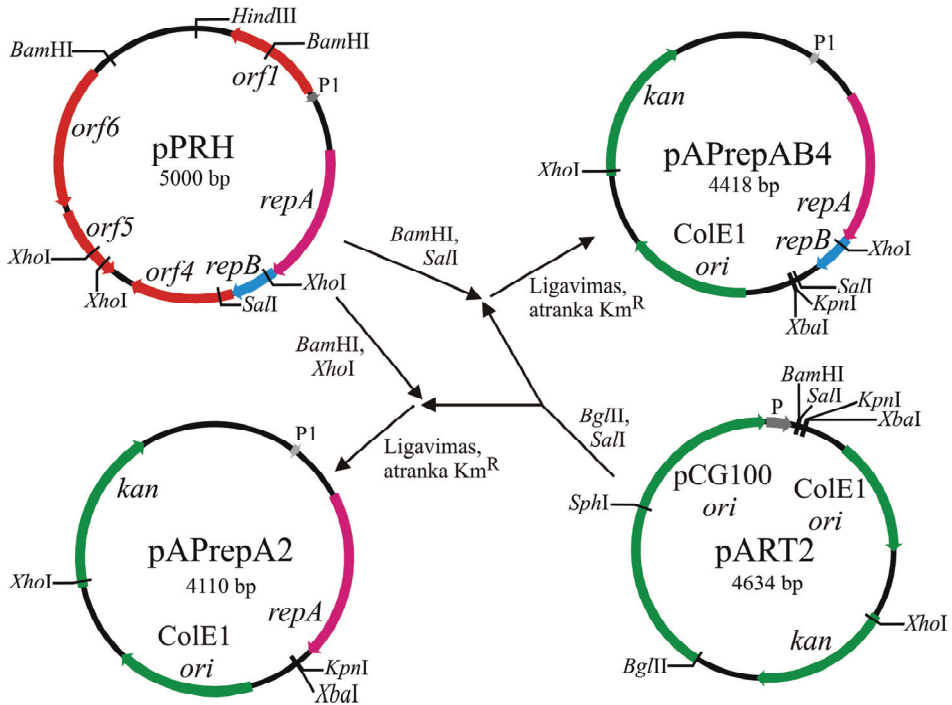
Daugelis plazmidės pPRH RepA ir RepB baltymų homologų yra replikacijos baltymai plazmidžių, kurios priklauso teta replikacijos tipo plazmidžių ColE2 šeimos pAL5000 pošeimiui (De Mot ir kt., 1997, Leret ir kt., 1998, Hirasawa ir kt., 2001, Matsui ir kt., 2006). Taigi, buvo iškelta hipotezė, kad plazmidė pPRH replikuojasi teta būdu.



3.28 pav. *Arthrobacter rhombi* PRH1 kamieno plazmidės pPRH RepA (A) ir RepB (B) baltymų ir jų homologų aminorūgščių filogenetinė analizė, atlikta naudojant Mr. Bayes-3.1.2 programą.

Nustatyta, kad pAL5000 pošeimio plazmidėse *repA* ir *repB* genai persidengia ir sudaro operoną, todėl replikacijai reikia abiejų genų produktų (De Mot ir kt., 1997, Leret ir kt., 1998, Hirasawa ir kt., 2001, Matsui ir kt., 2006). Nors plazmidėje pPRH geno *repB* pradžios kodonas persidengia vienu nukleotidu su *repA* geno stop kodonu, buvo tikrinama, ar minimalus šios plazmidės replikonas yra *repA* ar *repAB*. Tuo tikslu buvo sukonstruotos

plasmidės pAPrepAB4 ir pAPrepA2 (žr. sk. 2.20), kurios skyrėsi tik *repB* genu (3.29 pav.).



3.29 pav. Plazmidžių pAPrepAB4 ir pAPrepA2, naudotų minimalaus plazmidės pPRH replikono nustatymui, konstravimo schema. Plazmidės pART2 *kan* genas ir replikacijos sritys pažymėtos žaliai; pPRH *orf*, nekoduojantys replikacijos baltymų, raudonai; pPRH *repA* genas pažymėtas rožine spalva, pPRH *repB* genas – žydra.

A. oxydans PY21 ir *A. rhombi* VP3 bakterijos buvo transformuotos plazmide pAPrepAB4 ir išsėtos ant agarizuotos terpės su kanamicinu. Iš keleto atrinktų išaugusių klonų buvo skiriama ir analizuojama plazmidinė DNR. Atlikus horizontalią elektroforezę, buvo nustatyta, kad visi atrinkti klonai turi hibridinę plazmidę. Tuomet *E. coli* ląstelės buvo transformuotos patikrintų klonų DNR ir jų klonai buvo atrenkami pagal atsparumą kanamicinui. Iš atsparių *E. coli* bakterijų buvo išskirta plazmidinė DNR ir atlikta jos restrikcinė analizė. Po to DNR buvo frakcionuojama horizontalios elektroforezės gelyje.

Gauti rezultatai įrodė, kad plazmidė pAPrepAB4 sėkmingai replikuoja *Arthrobacter* spp. PY21 ir VP3 bakterijose.

Bakterijų transformacija plazmide pAPrepA2 buvo nesėkminga tiek į *A. oxydans* PY21, tiek į *A. rhombi* VP3 ląsteles. Tris kartus buvo bandoma transformuoti abiejų kamienų bakterijas, tačiau nei vienu atveju kolonijos ant atrankios terpės neišaugo. Taigi, galima teigti, kad plazmidė pAPrepA2 negali replikuotis *Arthrobacter* spp. bakterijose, todėl padaryta išvada, kad minimalus pPRH plazmidės replikonas yra *repAB*. Šie rezultatai patvirtina, kad tiriamą plazmidę priklauso teta tipo replikacijos pAL5000 pošeimiui, kadangi kitose šio pošeimio plazmidėse pAL5000, pFAJ2600, pBLA8 ir pCASE1 nustatytas minimalus replikacijos operonas yra *repAB* (Stolt ir Stoker, 1996a; De Mot ir kt., 1997; Leret ir kt., 1998; Tsuchida ir kt., 2009).

pXZ10142	5' -CGTAACCAAG TCAGAT GTTTCCGGG-3'	[65 bp]	ATG
pMB1	5' -GGGAACCAAG TCAGAT ATTTTCAGCC-3'	[26 bp]	ATG
pAL5000	5' -GAGCTCCAAG TCAGAT ATTTTCGCTG-3'	[45 bp]	GTG
pFAJ2600	5' -AGTCAGGTAG TCGAAT TTTTGGAGC-3'	[89 bp]	ATG
pBLA8	5' -GAAAGCAATAT TCAGAT GGTTCGGC-3'	[68 bp]	ATG
pRBL1	5' -GAAAGCAATAT TCAGAT GGTTCCTGC-3'	[68 bp]	ATG
pJD1	5' -ATAACCATAAT TCAGATA ACAGCCG-3'	[106 bp]	ATG
pPRH	5' -CACACCCTTAT TCAGAT ATTGGTGGT-3'	[45 bp]	ATG
Cole2	3' -ATAAGCCTTAT TCAGATA ACAGCGCC-5'		
	** **		

3.30 pav. pPRH, pAL5000 giminingų plazmidžių ir Cole2 *ori* sekos. Paryškinta *ori* šerdis, žvaigždutėmis pažymėti konservatyvūs šerdies nukleotidai. Nurodytas atstumas (skaičiuojamas nuo pirmojo geno nukleotido iki tiesioginės grandinės 5' galo (Leret ir kt., 1998)) iki *repA* geno pradžios.

Norint įsitikinti, kad pPRH priklauso teta replikacijos tipo plazmidėms, buvo nuspręsta paieškoti Cole2 šeimos plazmidėms būdingos *ori* sekos (3.30 pav.). Taigi, komplementarioje grandinėje –45 nt atstumu nuo *repA* geno pirmojo nukleotido buvo aptikta į Cole2 *ori* panaši seka (homologija 60 %). Joje nustatyta konservatyvi šerdis (TCAGAT), būdinga tiek pAL5000 giminingoms plazmidėms, tiek ir Cole2. Tik pFAJ2600 viduriniai nukleotidai yra pakitę (TCGAAT). pAL5000 pošeimio plazmidžių *ori* yra aptinkama prieš replikacijos genus, todėl replikacijos šakutė juda priešinga kryptimi nei vyksta

rep genų transkripcija. Cole2 pošeimio plazmidėse *ori* seka yra išsidėsčiusi už replikacijos genų, taigi, replikacinė šakutė juda ta pačia kryptimi, kuria vyksta genų transkripcija (Leret ir kt., 1998).

Remiantis gautais rezultatais: pirma, pPRH plazmidės RepA ir RepB baltymai yra homologiški teta replikacijos tipo plazmidžių baltymams; antra, plazmidės minimalus replikonas yra *repAB*; trečia, plazmidės *ori* yra panaši į Cole2 *ori* seką bei turi šerđį, būdingą pAL5000 giminingoms plazmidėms; galime daryti išvadą, kad pPRH plazmidė priklauso teta tipo replikacijos C klasės plazmidžių Cole2 šeimos pAL5000 pošeimui.

3.3. Vektorių, turinčių pPRH replikoną, konstravimas

3.3.1. *Escherichia coli*–*Arthrobacter rhombi* hibridinių vektorių konstravimas

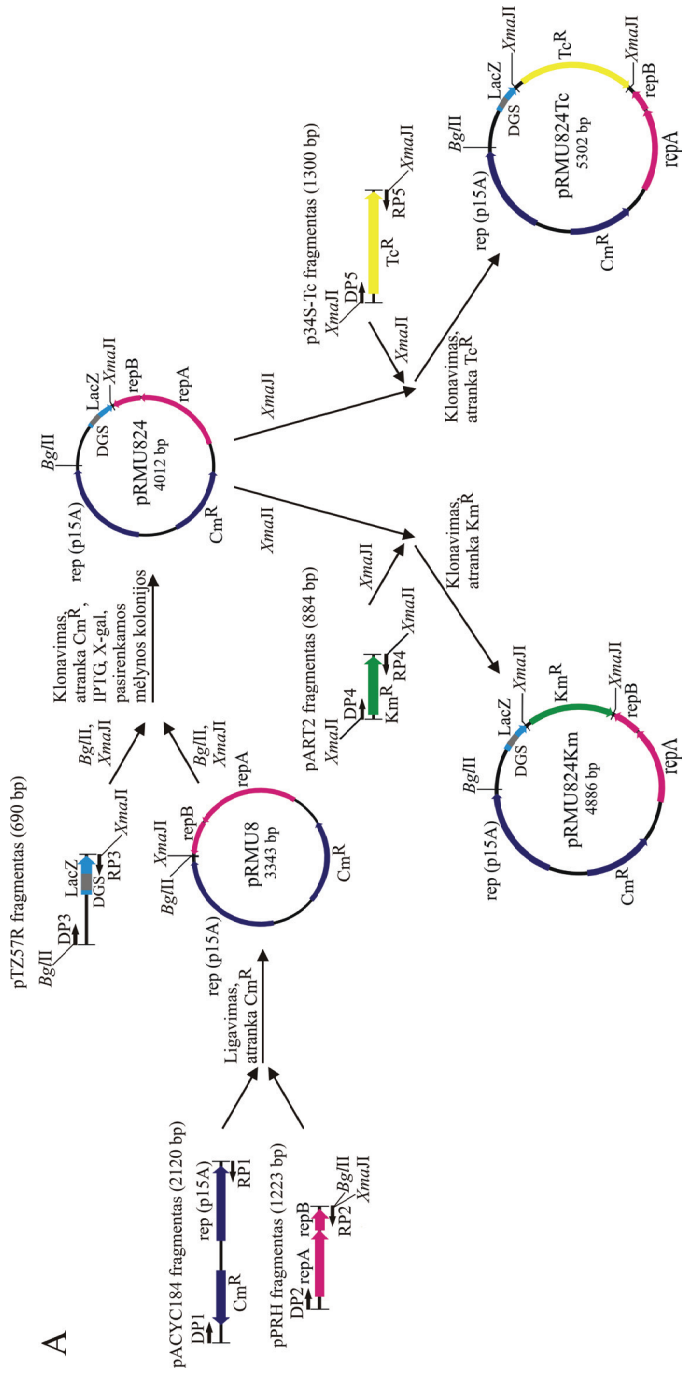
Ištyrus *Arthrobacter rhombi* VP3 ir PRH1 mažas plazmidės, buvo nustatyta, kad replikacijos baltymus koduoja tik *A. rhombi* PRH1 bakterijų plazmidė. Atlikus tyrimus, buvo padaryta išvada, kad ji replikuoja teta būdu. *A. rhombi* VP3 bakterijų plazmidės, nekoduojančios replikacijos baltymų, DNR sintezės tipas kol kas lieka neaiškus. Hibridinio vektoriaus konstravimui buvo pasirinkta *A. rhombi* PRH1 bakterijų plazmidė pPRH, nes šiam tikslui galima panaudoti tik jos minimalų replikoną, o ne visą plazmidę, kaip būtų pVP3 atveju. Be to, hibridinio vektoriaus, turinčio pPRH replikacijos baltymus, DNR sintezė mažiau priklausytų nuo ląstelės šeimininkės baltymų nei turinčio pVP3 replikoną. Todėl sukonstruota plazmidė galėtų patikimai veikti platesniame šeimininkų rate.

Arthrobacter sp. replikoną turintis hibridinis pRMU824 vektorius buvo sukurtas pagal 3.31 A paveiksle pateiktą schemą. Pirmiausia, PGR būdu padaugintas ir fosforilintas *A. rhombi* pPRH fragmentas, turintis minimalų replikoną, buvo sujungtas su padaugintu pACYC184 fragmentu, kuriame yra *E. coli* replikonas ir atsparumo chloramfenikoliui genas (*cat*). *E. coli*

transformantai buvo atrinkti pagal atsparumą chloramfenikoliui. Gauta plazmidė buvo pavadinta pRMU8. Norint sukurti vektorių, kuris turėtų fenotipinę atrankos sistemą, buvo klonuota *lacZ* operono dalis su daugybinio klonavimo sritimi. Tuo tikslu plazmidė pRMU8 ir padaugintas pTZ57R fragmentas buvo hidrolizuoti restrikcijos endonukleazėmis *Bgl*III ir *Xma*II, be to, pirmoji plazmidė buvo paveikta fosfataze CIAP. Tuomet, fragmentai buvo sujungti liguojant. Po elektroporacijos ląstelės buvo išsėtos ant NA terpės su chloramfenikoliu pridėdant IPTG ir X-Gal. Ieškant reikiamos struktūros plazmidės, buvo tiriamos mėlynos spalvos kolonijų bakterijos. Atrinkta hibridinė plazmidė buvo pavadinta pRMU824.

Ja buvo transformuotos *Arthrobacter* spp. 68b ir PY21 kamienų bakterijos, kurių atranka buvo vykdoma naudojant terpę su chloramfenikoliu. Bakterijų kolonijos pasirodė praėjus 3–5 dienoms po transformacijos, be to, išaugusių klonų buvo nedaug. Transformacijos efektyvumas ir bakterijų augimo greitis nuvylė, nors, patikrinus atrinktus klonus tokiu pat principu kaip plazmidės pAPrepAB4 atveju, buvo nustatyta, kad tirtose bakterijose hibridinis vektorius pRMU824 sėkmingai replikuoja. Todėl buvo nuspręsta klonuoti antrą genetinį žymenį, kuris būtų skirtas atrankai *Actinomycetales* bakterijose ir išplėstų antibiotiko pasirinkimo galimybes.

Taigi, plazmidė pRMU824, padauginti pART2 ir p34S-Tc fragmentai, kuriuose atitinkamai yra *kan* ir *tet* genai, buvo hidrolizuoti naudojant *Xma*II. Tuomet genai buvo atskirai klonuoti į plazmidę pRMU824. Po elektroporacijos transformantai buvo atrenkami pagal atsparumą kanamicinui arba tetraciklinui. Tokiu būdu buvo gauti dar du vektoriai: pRMU824Km ir pRMU824Tc. Jais buvo transformuotos įvairių *Arthrobacter* spp. ir *Rhodococcus* spp. kamienų bakterijos. Nustatyta, kad hibridiniai vektoriai pRMU824Km ir pRMU824Tc sėkmingai replikuoja *Arthrobacter* sp. 68b, 83, 85, *A. oxydans* PY21, *A. globiformis*, *Rhodococcus* sp. TMP1 ir *R. erythropolis* SQ1 bei *E. coli* DH5α kamienų ląstelėse.



3.31 pav. Hibridinių vektorių kūrimo schema (A) ir vieninės restrikcijos endonukleazų hidrolizės vietos jų daugybines klonavimo srityse (B). DGS – daugybinio klonavimo sritis.

B

pRMU824	Acc65I KpnI	Mph11031	Eco32I	BamHI	SmaI	Bsp120I	SalI	PstI	Eco147I	PaeI	HindIII
pRMU824Km	Acc65I KpnI		Eco32I	BamHI	SmaI	Bsp120I	SalI	PstI	Eco147I	PaeI	HindIII
pRMU824Tc	Acc65I KpnI	Mph11031		BamHI	SmaI	Bsp120I	SalI	PstI	Eco147I	PaeI	HindIII

Sukonstruotų plazmidžių pRMU824, pRMU824Km, pRMU824Tc nukleotidų sekos buvo nustatytos naudojant pradmenis: M13/pUC F, M13/pUC R, DP1, RP1, repB F, rep R, Cm F (žr. skyr. 2.3.); ir užregistruotos Genų banke, joms buvo suteikti atitinkamai HQ624980, HQ624981, HQ624982 prieigos numeriai. Hibridinių vektorių daugybinės klonavimo sritys yra pateiktos 3.31 B paveiksle.

Žinoma, kad 2-hidroksipiridino skaidymo metu susidaro 2,3,6-trihidroksipiridinas, kuris gali spontaniškai oksiduotis ir dimerizuotis iki mėlynos spalvos pigmento (4,5,4',5'-tetrahidroksi-3,3'-diazodifenochoinono-(2,2')) (Kolenbrander ir Weinberger, 1977). Tiriant sukonstruotų plazmidžių funkcionalumą, 6 kb dydžio *hpy* fragmentas, kuriame yra 2-hidroksipiridino skaidymo baltymus koduojantys genai, buvo klonuotas į pasirinktą hibridinį vektorių pRMU824Km ir gauta plazmidė pHYP1. Ja buvo transformuotos *R. erythropolis* SQ1 bakterijos, kurios neskaido 2-hidroksipiridino. Jos buvo išsėtos ant NA terpės su 2-hidroksipiridinu ir kanamicinu. Visi išaugę klonai gamino užląstelinį pigmentą, tad sukurtas vektorius yra tinkamas vykdyti funkcinei genų atrankai.

Taigi, šio darbo metu pasisekė sukonstruoti hibridinius vektorius, turinčius *Arthrobacter* sp. replikacijos operoną ir pritaikomus funkcinei genų atrankai. Kaip buvo minėta, pirmasis tokio tipo vektorius yra plazmidė pSVJ21 (Miteva ir kt., 2008), tačiau jo panaudojimo galimybės nėra iširtos.

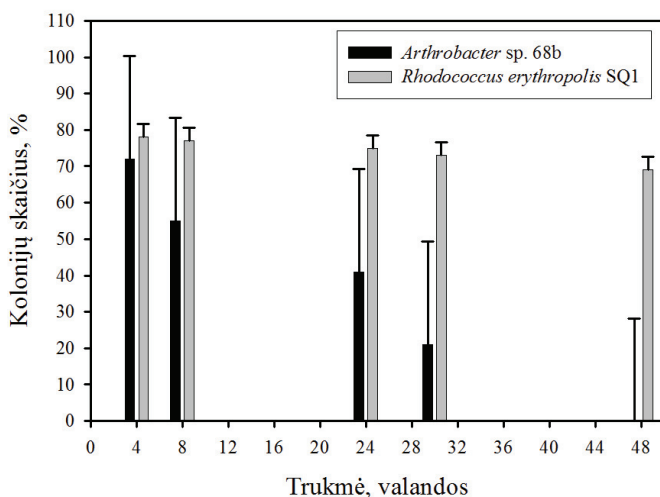
3.3.2. Hibridinių vektorių savybės

Sukonstravus hibridinius vektorius, buvo tiriamos jų savybės: kopijų skaičius šeimininko ląstelėje, stabilumas ir suderinamumas. Jos lemia vektoriaus patikimumą ir panaudojimo galimybes.

Kopijų skaičiaus nustatymui buvo pasirinktas vektorius pRMU824Km. Šia plazmide buvo transformuotos *Arthrobacter* sp. 68b kamieno ląstelės. Tuomet suminė DNR iš minėto kamieno bakterijų (panaudota kaip neigiama

kontrolė) ir to paties kamieno bakterijų, turinčių plazmidę pRMU824Km, buvo išskirta metodu, aprašytu 2.6 skyrelyje. Plazmidės kopijų skaičius buvo nustatomas kPGR metodu (žr. skyr. 2.19). Glicino oksidazės genas (pradmenys GlyOX68F ir GlyOX68R) buvo chromosominės DNR taikynys. Plazmidės *repAB* genų fragmentas (pradmenys DP2 ir RP2) buvo sukonstruoto vektoriaus taikynys. Minėtų fragmentų padauginimo efektyvumas atitinkamai buvo 1,12 ir 1,06. Nustatyta, kad *Arthrobacter* sp. 68b kamiene chromosomai tenka apie 9 plazmidinio vektoriaus pRMU824Km kopijas. Literatūroje duomenų apie kitų vektorių, skirtų *Arthrobacter* spp. bakterijoms, kopijų skaičių ląstelėje nėra.

Stabilumas yra svarbus veiksnys plazmidės turinčių bakterijų auginimui neatrankioje terpėje, kadangi tokioje aplinkoje dominuoja neturinčios plazmidžių ląstelės, nes plazmidė teikia ląstelei šeiminingai papildomą metabolinę naštą (Moo-Young ir kt., 1996). Plazmidė pRMU824Km vėl buvo pasirinkta sukonstruotų vektorių stabilumo tyrimui, kuris buvo atliekamas pagal metodiką, nurodytą 2.23 skyrelyje. *Arthrobacter* sp. 68b ir *Rhodococcus erythropolis* SQ1 bakterijos, transformuotos minėta plazmide, buvo naudojamos tyrime. Nustatyta, kad per 24 valandas abiejų kamienų bakterijos pasidalino maždaug 10 kartų. Stabilumo tyrimo rezultatai (3.32 pav.) rodo, kad po 4 valandų auginimo neatrankioje terpėje bakterijų, turinčių plazmidę, kiekis abiejuose kamienuose yra panašus: *Arthrobacter* sp. 68b 72 %, *R. erythropolis* SQ1 78 %. Tačiau po 24 valandų augimo terpėje be antibiotiko tik 41 % *Arthrobacter* genties bakterijų turėjo plazmidę, o *Rhodococcus* genties – 74 %. Po dviejų parų auginimo *Arthrobacter* sp. 68b bakterijų, turinčių plazmidę nebuvo, tačiau 69 % *R. erythropolis* SQ1 bakterijų ją vis dar turėjo.



3.32 pav. Vektoriaus pRMU824Km stabilumas *Arthrobacter* sp. 68b ir *Rhodococcus erythropolis* SQ1 kamienuose. Mėginiai buvo paimti po 4, 8, 24, 30 ir 48 auginimo valandų.

Žinoma, kad plazmidžių stabilumui įtakos turi nevienodas jų kopijų paskirstymas dukterinėms ląstelėms dalijimosi metu (Zhang ir kt., 1996). Miteva ir kt. (2008), tyrė hibridinio vektoriaus pSVJ21 stabilumą psichrofiliniuose *Arthrobacter sulfonivorans* SO3-7w ir *A. globiformis* SO3-8 kamienuose, augintuose 25 °C ir 5 °C temperatūroje, padarė išvadą, kad plazmidės stabilumas, esant neatrakoms sąlygoms, priklauso nuo kultivavimo temperatūros ir šeimininko (Miteva et al., 2008). pRMU824Km plazmidės stabilumo tyrimas taip pat įrodo, kad stabilumui įtakos turi šeimininkas. Tirtas hibridinis vektorius yra stabilesnis *R. erythropolis* SQ1 bakterijose.

Plazmidžių nesuderinamumą lemia funkciškai vienodi replikacijos vienetai, kurių ląstelės šeimininkės replikacijos ir kopijų padalijimo mechanizmai neatskiria (Petersen, 2011). Suderinamos plazmidės yra puikus genetinis įrankis genų funkcijų tyrimams toje pačioje ląstelėje.

Hibridinio vektoriaus suderinamumo su plazmide pART2gfp, turinčia atsparumo kanamicinui geną, tyrimams buvo pasirinkta plazmidė pRMU824Tc, kurioje yra atsparumo tetraciklinui genas. Tyrimas buvo

vykdomas *Arthrobacter oxydans* PY21 bakterijose kaip aprašyta 2.24 skyrelyje. Klonus, atsparius ir kanamicinui, ir tetraciklinui bei sintetinančius žaliai fluorescuojantį baltymą, buvo lengva aptikti. Abiejų plazmidžių DNR, išskirta iš *A. oxydans* PY21, buvo matoma agarozės gelyje po elektroforezės. *E. coli* ląstelės buvo transformuotos abiejų plazmidžių DNR mišiniu. Bakterijų atranka buvo vykdoma atskirai, kadangi minėtos plazmidės šiame kamiene yra nesuderinamos. DNR, išskirta iš *E. coli* bakterijų, buvo hidrolizuojama restrikcijos endonukleazėmis ir analizuojama horizontalios elektroforezės būdu. Gauti rezultatai įrodė, kad plazmidės pRMU824Tc ir pART2gfp yra suderinamos ir abi sėkmingai replikuojasi *A. oxydans* PY21 kamiene. Taigi, šios plazmidės gali būti panaudotos genetinio bei funkcinio suderinamumo tyrimuose *Arthrobacter* ir *Rhodococcus* genties bakterijose.

3.4. Apibendrinimas

Plazmidės yra savarankiškos dvigrandinės DNR molekulės (Couturier ir kt., 1988, Dennis, 2005), kurios bakterijai arba nesuteikia jokių pastebimų fenotipinių požymių (mažos kriptinės plazmidės), arba suteikia savybių, kurios padeda prisitaikyti ir išgyventi pavojuose ar pakitusioje aplinkoje (didelės katabolinės plazmidės) (Hayes, 2003). Šio darbo metu buvo tiriamos *Arthrobacter* sp. 68b bakterijų katabolinės plazmidės, *Arthrobacter rhombi* PRH1 ir VP3 kamienų bakterijų didelės molekulinės masės ir mažos plazmidės.

Nustatyta, kad *Arthrobacter* sp. 68b kamieno bakterijos, sugebančios skaidyti 2-metilpiridiną, piridiną, ftalio rūgštį ir nikotiną, turi bent dvi didelės molekulinės masės plazmidės. Tyrimai parodė, kad mažesnė plazmidė lemia 2-metilpiridino, piridino ir ftalio rūgšties degradacijos fenotipą, o didesnė – nikotino skaidymą. Dalinai nustačius šių bakterijų genomo sekas, buvo gauta beveik 113 kb plazmidė, kurios GC 61 %, joje nustatyti 93 atviri skaitymo rėmeliai. Jie koduoja ftalio rūgšties ir numanomus 2-metilpiridino bei piridino skaidymo fermentus, transpozazes, invertazes, taip pat replikacijoje, konjugacijoje ir rekombinacijoje dalyvaujančius baltymus. Po sekoskaitos taip pat buvo gautas didesnės katabolinės plazmidės fragmentas, kuriame nustatyti nikotino skaidymo baltymus koduojantys genai. Šio fragmento seka yra labai panaši į pAO1 plazmidės, lemiančios nikotino skaidymą (Igloi ir Brandsch, 2003), seką.

Tiriant ftalio rūgšties skaidymą *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose, nustatyta, kad šio junginio skaidymas yra indukuojamas procesas. Ląstelės, kultivuotos terpėje su ftalatu, galėjo panaudoti ir chinolino rūgštį. Ji, remiantis biokonversijos spektro pokyčiais, yra hidroksilinama. *Arthrobacter* sp. 68b bakterijų ftalio rūgšties skaidymo baltymų ir regulatoriausių genai yra išsidėstę tokia pačia tvarka kaip analogiški *Arthrobacter keyseri* genai. Tiriamų bakterijų atveju į *pht* operoną yra įsiterpęs papildomas genas, koduojantis

nežinomos funkcijos baltymą. Analizuojant ftalio rūgšties skaidymo fermentų aminorūgščių sekas, nustatyta, kad jie yra panašiausi ir giminingiausi kitiems *Arthrobacter* spp. baltymams. Homologų paieškos ir reakcijos su diazotintu *p*-nitroanilinu rezultatai, leidžia daryti išvadą, kad šiose bakterijose ftalio rūgštis yra skaidoma 3,4-dioksigenazės keliu, kuris yra būdingas Gram-teigiamoms bakterijoms.

Arthrobacter sp. 68b bakterijose 2-metilpiridino ir piridino skaidymas taip pat yra indukuojamas procesas. Tyrimais nustatyta, kad ląstelės, augintos su minėtais junginiais, gali panaudoti abu substratus. Gauti rezultatai leidžia manyti, kad tie patys fermentai gali dalyvauti piridino ir jo darinio skaidyme. Nustatyta, kad tiek 2-metilpiridinas, tiek piridinas iš tiesų indukuoja hipotetinę monooksigenazę. Ją koduojantis genas buvo aptiktas plazmidėje p2MP. Analizuojant greta esančius atviro skaitymo rėmelius, buvo nustatyti genai, kurių produktai taip pat galėtų dalyvauti minėtų substratų skaidyme.

Remiantis atliktų tyrimų ir analizų rezultatais, buvo pasiūlytas galimas 2-metilpiridino ir piridino skaidymo kelias. Pirmiausia, veikiant monooksigenazei, greičiausiai ir flavino reduktazei, yra skeliamas piridino žiedas tarp antro ir trečio anglies atomų. Vėlesnių reakcijų metu, katalizuojant amidohidrolazei, susidaro gintaro rūgšties dialdehididas. Veikiant gintaro rūgšties dialdehido dehidrogenazei, susidaro gintaro rūgšties pusiau aldehididas. Šis verčiamas gintaro rūgštimi, kai reakcijoje dalyvauja gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazė. Tuomet susidaręs minėtas produktas yra naudojamas trikarboksirūgščių cikle.

Arthrobacter rhombi PRH1 ir VP3 bakterijų DNR tyrimai parodė, kad abiejų kamienų ląstelėse yra po didelės molekulinės masės plazmidę ir po mažą (<10 kb) plazmidę. Minėtos bakterijos sugeba panaudoti 2-hidroksipiridiną kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį. Skaidymo metu yra išskiriamas žalios spalvos užląstelinis pigmentas. *A. rhombi* PRH1 bakterijos spontaniškai praranda gebėjimą išskirti pigmentą. Tyrimais buvo nustatyta, kad šiose bakterijose 2-hidroksipiridino skaidymo baltymus koduojantys genai yra didelės molekulinės masės plazmidėje. *A. rhombi* VP3

bakterijos nepraranda gebėjimo išskirti pigmentą nei spontaniškai, nei gydant ląsteles nuo plazmidžių. Taigi, galima daryti prielaidą, kad šiose bakterijose analogiški genai yra chromosomoje.

Arthrobacter rhombi PRH1 ir VP3 buvo tiriamos ir mažosios natyvios plazmidės, pavadintos atitinkamai pPRH ir pVP3. Nuskaičius plazmidės, buvo nustatytas, kad plazmidės pVP3 dydis yra 6135 bp, GC sudaro 64,6 %, o plazmidė pPRH yra 5000 bp dydžio, jos GC 66 %. Abiejų plazmidžių GC reikšmės patenka į *Arthrobacter* sp. chromosominei DNR būdingą reikšmių intervalą. Plazmidėje pVP3 nustatyti 9 atviri skaitymo rėmeliai, dviejų *asr* koduojamiems baltymams homologų rasti nepavyko. Vienas *asr* koduoja rezolvazę, du – mobilizacijos baltymus, o likusieji – hipotetinius baltymus. Plazmidėje pPRH buvo nustatyti 6 atviri skaitymo rėmeliai. *asr2* ir *asr3* koduoja replikacijos baltymus, atitinkamai RepA ir RepB. *asr6* produktas yra rezolvazė, du atviri skaitymo rėmeliai koduoja hipotetinius baltymus. Vieno *asr* produktas nėra panašus į žinomus bakterijų baltymus.

Taigi, atlikus plazmidžių atvirų skaitymo rėmelių ir jų koduojamų baltymų analizę, buvo nustatyta, kad plazmidė pVP3 neturi genų, koduojančių replikacijos baltymus, todėl yra sudėtingiau nusakyti šios plazmidės replikacijos tipą. Žinoma, kad Rep baltymų nekoduoja teta replikacijos tipo B klasės replikonai, kurių DNR sintezė prasideda nuo RNR transkripto ir joje dalyvauja ląstelės šeimininkės baltymai (Bruand ir kt., 1993; Meijer ir kt., 1995). Iškelta hipotezė, kad plazmidės pVP3 replikacija galėtų prasidėti nuo RNR pradmens. Norint tai patvirtinti, šios plazmidės tyrimai bus vykdomi toliau.

Kaip minėta, plazmidė pPRH koduoja replikacijos baltymus. Jie yra panašiausi į atitinkamus baltymus iš *Actinomycetales* teta replikacijos tipo plazmidžių, priklausančių Cole2 šeimos pAL5000 pošeimiui. Tyrimais nustatyta, kad plazmidės pPRH minimalus replikonas yra *repAB*. Joje taip pat buvo aptikta *ori* seka, būdinga Cole2 šeimos plazmidėms. Remiantis gautais rezultatais, galima daryti išvadą, kad plazmidė pPRH priklauso teta tipo replikacijos C klasės plazmidžių Cole2 šeimos pAL5000 pošeimiui.

Panaudojant plazmidės pPRH minimalų replikoną buvo sukonstruoti trys hibridiniai vektoriai: pRMU824, pRMU824Km, pRMU824Tc, skirti genų funkcinei atrankai. Šios plazmidės sėkmingai replikuoja *Arthrobacter* spp., *Rhodococcus* spp. ir *Escherichia coli* bakterijose. Nustatyta, kad hibridinių vektorių segregacinis stabilumas priklauso nuo bakterijų, kuriose replikuoja. Taip pat buvo įrodyta, kad jie yra suderinami su pART grupės vektoriais, todėl gali būti panaudoti genetinio bei funkcinio suderinamumo tyrimuose.

IŠVADOS

- *Arthrobacter* sp. 68b bakterijos turi bent dvi didelės molekulinės masės plazmidės. 2-Metilpiridino, piridino ir ftalio rūgšties skaidymo genai yra vienoje 112864 kb žiedinėje plazmidėje, nikotino genai – kitoje katabolinėje plazmidėje.
- *Arthrobacter* sp. 68b bakterijos skaido ftalio rūgštį 3,4-dioksigenazės keliu.
- *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose 2-metilpiridinas ir piridinas indukuoja hipotetinės monooksigenazės sintezę.
- *Arthrobacter rhombi* PRH1 2-hidroksipiridino skaidymo genai yra išsidėstę katabolinėje plazmidėje.
- Nuskaitytos *A. rhombi* pPRH ir pVP3 plazmidės, kurių dydis atitinkamai yra 5000 bp ir 6135 bp. Plazmidės pPRH minimalus replikonas yra *repAB*, ji priklauso teta replikacijos tipo C klasės ColE2 šeimos pAL5000 pošeimiui.
- Panaudojant pPRH minimalų replikoną, sukonstruoti hibridiniai vektoriai pRMU824, pRMU824Km ir pRMU824Tc sėkmingai replikuoja *Arthrobacter* spp., *Rhodococcus* spp. ir *Escherichia coli* DH5α bakterijose.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui dr. Rolandui Meškiui už suteiktą galimybę atlikti šį darbą, už konsultacijas, vertingus patarimus, kantrybę ir paramą.

Taip pat dėkoju visiems Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus darbuotojams bei studentams už patarimus, diskusijas ir gražų kolegišką bendravimą. Ypač esu dėkinga dr. Rasai Rutkienei, dr. Renatai Gasparavičiūtei, dr. Laurai Kalinienei ir dr. Jauniui Urbonavičiui už disertacijos redagavimą.

Noriu nuoširdžiai padėkoti recenzentėms: dr. Elenai Servienei ir dr. Lidijai Truncaitei, už pastabas ir vertingus patarimus.

Dėkoju dr. Laurai Kalinienei už pagalbą atliekant pulsinio lauko DNR elektroforezę, Maksim Bratčikov už pagalbą atliekant kiekybinę PGR.

Taip pat norėčiau padėkoti dr. Virginijai Bukelskienei už pagalbą ruošiant disertacijos gynimo dokumentus.

Esu labai dėkinga savo mamai už paramą, tikėjimą manimi ir milžinišką kasdienę pagalbą. Dėkoju savo vyrui už palaikymą ir supratimą, savo dukrytei, kuri augo ruošiant disertaciją. Taip pat dėkoju brolienei ir broliui už pagalbą, artimiesiems ir draugams už rūpestį ir palaikymą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Agapova SR, Andreeva AL, Starovoitov II, Vorobeva LI, Terentev PB. (1992) Plasmids for biodegradation of 2,6-dimethylpyridine, 2,4-dimethylpyridine, and pyridine in strains of *Arthrobacter*. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* 5–6: 10–13.
2. Aislabie J., Bej A.K., Ryburn J., Lloyd N., Wilkins A. (2005) Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil New Zealand. *FEMS Microbiol Ecol* 52: 279–286.
3. Ankri S, Bouvier I, Reyes O, Predali F, Leblon G. (1996) A *Brevibacterium linens* pRBL1 replicon functional in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid* 36: 36–41.
4. Bahl MI, Hansen LH, Sørensen SJ. (2009) Persistence mechanisms of conjugative plasmids. In *Horizontal Gene Transfer: Genomes in Flux*, vol. 532, edited by MB Gogarten, JP Gogarten, L Olendzenski. Humana Press, NY.
5. Batt CA, Shanabruch WS, Sinskey AJ. (1985) Expression of pAM α 1 tetracycline resistance gene in *Corynebacterium glutamicum*: segregation of antibiotic resistance due to intramolecular recombination. *Biotechnol Lett* 7: 717–722.
6. Benckiser G, Ottow JCG. (1982) Metabolism of the plasticizer dinormal-butylphthalate by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* under anaerobic conditions, with nitrate as the only electron-acceptor. *Appl Environ Microbiol* 44: 576–578.
7. Bieszkiewicz E, Boszczyk-Maleszak H, Kaczorowska B, Mycielski R. (1995) Isolation and identification of bacteria from activated sludge purifying petroleum wastewaters. *Acta Microbiol Pol* 44: 171–179.
8. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95–113.
9. Bondareva A., Marcinkevičienė L., Bachmatova I., Semėnaitė R., Meškienė R., Meškys R. (2000) Plasmid-mediated degradation of 2-hydroxypyridine by a gram-positive bacterium. *Biologija* 1: 22–24.
10. Bouet J-Y, Nordström K, Lane D. (2007) Plasmid partition and incompatibility – the focus shifts. *Mol Microbiol* 65: 1405–1414.
11. Bowman JP, McCammon SA, Brown MV, Nichols DS, McMeekin TA. (1997) Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl Environ Microbiol* 63: 3068–3078.

12. Brandsch R, Faller W, Schneider K. (1986) Plasmid pAO1 of *Arthrobacter oxidans* encodes 6-hydroxy-D-nicotine oxidase: cloning and expression of the gene in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 202: 96–101.
13. Brown TA. (2002) Genome replication. Genomes. 2nd edition. Oxford: Wiley-Liss.
14. Bruand C, Le Chatelier E, Ehrlich SD, Janni re L. (1993) A fourth class of theta-replicating plasmids: The pAM β 1 family from Gram-positive bacteria. *PNAS* 90: 11668–11672.
15. Campbell EA, Muzzin O, Chlenov M, Sun JL, Olson CA, Weinman O, Trester-Zedlitz ML, Darst SA. (2002) Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell* 9: 527–539.
16. Campbell NA, Reece JB. (2008) The cell cycle. Biology (8th Edition). San Francisco: Benjamin Cummings.
17. Chang ACY, Cohen SN. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134: 1141–1156.
18. Chang BV, Liao CS, Yuan SY. (2005) Anaerobic degradation of diethyl phthalate, di-n-butyl phthalate, and di-(2-ethylhexyl) phthalate from river sediment in Taiwan. *Chemosphere* 58: 1601–1607.
19. Chatterjee S, Dutta TK. (2008) Complete degradation of butyl benzyl phthalate by a defined bacterial consortium: role of individual isolates in the assimilation pathway. *Chemosphere* 70: 933–941.
20. Chatterjee S, Karlovsky P. (2010) Removal of the endocrine disrupter butyl benzyl phthalate from the environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 61–73.
21. Chauhan A, Chakraborti AK, Jain RK. (2000) Plasmid-encoded degradation of *p*-nitrophenol and 4-nitrocatechol by *Arthrobacter protophormiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 733–740.
22. Chauhan A, Jain RK. (2000) Degradation of *o*-nitrobenzoate via anthranilic acid (*o*-aminobenzoate) by *Arthrobacter protophormiae*: a plasmid-encoded new pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 236–244.
23. Cheung JKH, Lam RKW, Shi MY, Gu JD. (2007) Environmental fate of endocrine-disrupting dimethyl phthalate esters (DMPE) under sulfate-reducing condition. *Sci Total Environ* 381: 126–133.
24. Choi KY, Kim D, Chae J-C, Zylstra GJ, Kim E. (2007) Requirement of duplicated operons for maximal metabolism of phthalate by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 766–771.

25. Choi KY, Kim D, Sul WJ, Chae JC, Zylstra GJ, Kim YM, Kim E. (2005) Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *FEMS Microbiol Lett* 252: 207–213.
26. Coleman NV, Wilson NL, Barry K, Brettin TS, Bruce DC, Copeland A, Dalin E, Detter JC, Del Rio TG, Goodwin LA, Hammon NM, Han S, Hauser LJ, Israni S, Kim E, Kyrpides N, Land ML, Lapidus A, Larimer FW, Lucas S, Pitluck S, Richardson P, Schmutz J, Tapia R, Thompson S, Tice HN, Spain JC, Gossett JG, Mattes TE. (2011) Genome Sequence of the ethene- and vinyl chloride-oxidizing actinomycete *Nocardioides* sp. strain JS614. *J Bacteriol* 193: 3399–3400.
27. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. (1988) Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev* 52: 375–395.
28. Cullington JE, Walker A. (1999) Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biol Biochem*, 31: 677–686.
29. De Mot R, Nagy I, De Schrijver A, Pattanapitpaisal P, Schoofs G, Vanderleyden J. (1997) Structural analysis of the 6 kb cryptic plasmid pFAJ2600 from *Rhodococcus erythropolis* NI86/21 and construction of *Escherichia coli*-*Rhodococcus* shuttle vectors. *Microbiology* 143: 3137–3147.
30. Del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, Espinosa M, Diaz-Orejas R. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 434–464.
31. Denis-Larose C, Labbe D, Bergeron H, Jones AM, Greer CW, al-Hawari J, Grossman MJ, Sankey BM, Lau PC. (1997) Conservation of plasmid-encoded dibenzothiophene desulfurization genes in several rhodococci. *Appl Environ Microbiol* 63: 2915–2919.
32. Dennis JJ, Zylstra GJ. (1998) Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of Gram-negative bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol* 64: 2710–2715.
33. Dennis JJ. (2005) The evolution of IncP catabolic plasmids. *Curr Opin Biotechnol* 16: 291–298.
34. Doroghazi JR, Ju KS, Brown DW, Labeda DP, Deng Z, Metcalf WW, Chen W, Price NP. (2011) Genome sequences of three tunicamycin-producing *Streptomyces* Strains, *S. chartreusis* NRRL 12338, *S. chartreusis* NRRL 3882, and *S. lysosuperificus* ATCC 31396. *J Bacteriol* 193: 7021–7022.
35. Eaton RW. (2001) Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. *J Bacteriol* 183: 3689–3703.

36. Ebersbach G, Gerdes K. (2005) Plasmid segregation mechanisms. *Annu Rev Genet* 39: 453–479.
37. Espinosa M, del Solar G, Rojo F, Alonso JC. (1995) Plasmid rolling circle replication and its control. *FEMS Microbiol Lett* 130: 111–120.
38. Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
39. Fetzner S. (1998) Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 237–250.
40. Francia MV, Varsaki A, Garcillán-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, de la Cruz F. (2004) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* 28: 79–100.
41. Funke G, Hutson RA, Bernard KA, Pfyffer GE, Wauters G, Collins MD. (1996) Isolation of *Arthrobacter* spp. from clinical specimens and description of *Arthrobacter cumminsii* sp. nov. and *Arthrobacter woluwensis* sp. nov. *J Clin Microbiol* 34: 2356–2363.
42. Ganas P, Igloi GL, Brandsch R. (2009) The megaplasmid pAO1 of *Arthrobacter nicotinovorans* and nicotine catabolism. In *Microbial megaplasms*, edited by E Schwartz. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
43. Gartemann K-H, Eichenlaub R. (2001) Isolation and Characterization of IS 1409, an Insertion Element of 4-Chlorobenzoate – Degrading *Arthrobacter* sp. Strain TM1, and Development of a System for Transposon Mutagenesis. *J Bacteriol* 183: 3729-3736.
44. Gasparavičiūtė R. (2008) Piridino ir piridinolių katabolizmą koduojančių genų tyrimas. Daktaro disertacija. Vilniaus universitetas, Vilnius.
45. Ghosh S, Mahapatra NR, Ramamurthy T, Banerjee PC. (2000) Plasmid curing from an acidophilic bacterium of the genus *Acidocella*. *FEMS Microbiol Lett* 183: 271–274.
46. Gorelenkov V, Antipov A, Lejnine S, Daraselia N, Yuryev A. (2001) Set of novel tools for PCR primer design. *Biotechniques* 31: 1326–1330.
47. Gounot AM. (1967) Biologic role of *Arthrobacter* in subterranean soils. *Ann Inst Pasteur* 113: 923-945.
48. Grether-Beck S, Igloi GL, Pust S, Schilz E, Decker K, Brandsch R. (1994) Structural analysis and molybdenum-dependent expression of the pAO1-encoded nicotine dehydrogenase genes of *Arthrobacter nicotinovorans*. *Mol Microbiol* 13: 929–936.

49. Grosse C. (1993) Thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
50. Habe H, Miyakoshi M, Chung J, Kasuga K, Yoshida T, Nojiri H, Omori T. (2003) Phthalate catabolic gene cluster is linked to the angular dioxygenase gene in *Terrabacter* sp. strain DBF63. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 44–54.
51. Hayatsu M, Hirado M, Nagata T. (1999) Involvement of two plasmids in the degradation of carbaryl by *Arthrobacter* sp. strain RC100. *Appl Environ Microbiol* 65: 1015–1019.
52. Hayes F. (2003) The function and organization of plasmids. In *Methods in Molecular Biology*, Vol. 235: *E. coli* plasmid vectors, edited by N Casali, A Preston. Humana Press, New Jersey.
53. Hall TA. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95–98.
54. Hanne LF, Kirk LL, Appel SM, Narayan AD, Bains KK. (1993) Degradation and induction specificity in *Actinomycetes* that degrade *p*-nitrophenol. *Appl Environ Microbiol* 59: 3505–3508.
55. Hinsä-Leasure SM, Bhavaraju L, Rodrigues JL, Bakermans C, Gilichinsky DA, Tiedje JM. (2010) Characterization of a bacterial community from a Northeast Siberian seacoast permafrost sample. *FEMS Microbiol Ecol* 74: 103–113.
56. Hirasawa K, Ishii Y, Kobayashi M, Koizumi K. (2001) Improvement of desulfurization activity in *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by genetic engineering. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 239–246.
57. Holder JW, Ulrich JC, DeBono AC, Godfrey PA, Desjardins CA, Zucker J, Zeng Q, Leach AL, Ghiviriga I, Dancel C, Abeel T, Gevers D, Kodira CD, Desany B, Affourtit JP, Birren BW, Sinskey AJ. (2011) Comparative and functional genomics of *Rhodococcus opacus* PD630 for biofuels development. *PLoS Genet* 7: e1002219.
58. Hooper DC, Wolfson JS, McHugh GL, Swartz MD, Tung C, Swartz MN. (1984) Elimination of plasmid pMG110 from *Escherichia coli* by novobiocin and other inhibitors of DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 25: 586–590.
59. Huang Y, Zhao N, He L, Wang L, Liu Z, You M, Guan F. (2005) *Arthrobacter scleromae* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 43: 1451–1455.
60. Huelsenbeck JP, Ronquist F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.

61. Igloi GL, Brandsch R. (2003) Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system. *J Bacteriol* 185: 1976–1986.
62. Yang JC, Madupu R, Durkin AS, Ekborg NA, Pedomallu CS, Hostetler JB, Radune D, Toms BS, Henrissat B, Coutinho PM, Schwarz S, Field L, Trindade-Silva AE, Soares CA, Elshahawi S, Hanora A, Schmidt EW, Haygood MG, Posfai J, Benner J, Madinger C, Nove J, Anton B, Chaudhary K, Foster J, Holman A, Kumar S, Lessard PA, Luyten YA, Slatko B, Wood N, Wu B, Teplitski M, Mougous JD, Ward N, Eisen JA, Badger JH, Distel DL. (2009) The complete genome of *Teredinibacter turnerae* T7901: an intracellular endosymbiont of marine wood-boring bivalves (shipworms). *PLoS One* 4: e6085.
63. Yoon JH, Lee JJ, Kang SS, Takeuchi M, Shin YK, Lee ST, Kang KH, Park YH. (2000) *Gordonia nitida* sp. nov., a bacterium that degrades 3-ethylpyridine and 3-methylpyridine. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1203–1210.
64. Jerke K, Nakatsu CH, Beasley F, Konopka A. (2008) Comparative analysis of eight *Arthrobacter* plasmids. *Plasmid* 59: 73–85.
65. Johnson RC. (1991) Mechanism of site-specific DNA inversion in bacteria. *Curr Opin Genet Dev* 1: 404–411.
66. Jones D, Keddie RM. (2006) The genus *Arthrobacter*. In *The Prokaryotes*, 3rd edition. Edited by Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E. Volume III, Springer, New York.
67. Kaiser JP, Feng Y, Bollag JM. (1996) Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiol Rev* 60: 483–498.
68. Kaiser J-P, Minard RD, Bollag J-M. (1993) Transformation of 3- and 4-picoline under sulfate-reducing conditions. *Appl Environ Microbiol* 59: 701–705.
69. Kallimanis A, Labutti KM, Lapidus A, Clum A, Lykidis A, Mavromatis K, Pagani I, Liolios K, Ivanova N, Goodwin L, Pitluck S, Chen A, Palaniappan K, Markowitz V, Bristow J, Velentzas AD, Perisynakis A, Ouzounis CC, Kyrpides NC, Koukkou AI, Drinas C. (2011) Complete genome sequence of *Arthrobacter phenanthrenivorans* type strain (Sphe3). *Stand Genomic Sci* 4: 123–130.
70. Kampfer P, Erhart R, Beimfohr C, Bohringer J, Wagner M, Amann R. (1996) Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus *in situ* identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microb Ecol* 32: 101–121.

71. Keyser P. (1974) Aerobic metabolism of the phthalates by selected pseudomonads. M.S. dissertation. Miami, Fla: University of Miami.
72. Khan SA. (1997) Rolling-Circle Replication of Bacterial Plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 442–455.
73. Khasaeva F, Vasilyuk N, Terentyev P, Troshina M, Lebedev AT. (2011a) A novel soil bacteria strain degrading pyridines. *Environ Chem Lett* 9: 439–445.
74. Khasaeva FM, Vasilyuk NV, Lebedev AT. (2011b) Study of initial stages of 2-methylpyridine catabolism by *Arthrobacter* sp. strain KM-2MP. *Microbiology* 80: 341–349.
75. Kim KK, Lee KC, Oh HM, Kim MJ, Eom MK, Lee JS. (2008) *Arthrobacter defluvii* sp. nov., 4-chlorophenol-degrading bacteria isolated from sewage. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1916–1921.
76. Kleerebezem R, Hulshoff Pol LW, Lettinga G. (1999) Anaerobic biodegradability of phthalic acid isomers and related compounds. *Biodegradation* 10: 63–73.
77. Kolenbrander PE, Weinberger M. (1977) 2-hydroxypyridine metabolism and pigment formation in three *Arthrobacter* species. *J Bacteriol* 132: 51–59.
78. Kolkenbrock S, Fetzner S. (2010) Identification and in vitro deoxynucleotidylation of the terminal protein of the linear plasmid pAL1 of *Arthrobacter nitroguajacolicus* Rū61a. *FEMS Microbiol Lett* 304: 169–176.
79. Korosteleva LA, Kost AN, Vorobeva LI, Modyanova LV, Terentev PB, Kulikov NS. (1981) Microbiological degradation of pyridine and 3-methylpyridine. *Appl Biochem Microbiol* 17: 276–283.
80. Kriszt B, Tánicsics A, Cserháti M, Tóth Á, Nagy I, Horváth B, Nagy I, Tamura T, Kukolya J, Szoboszlai S. (2012) *De novo* genome project for the aromatic degrader *Rhodococcus pyridinivorans* strain AK37. *J Bacteriol* 194: 1247–1248.
81. Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
82. LaVallie ER, McCoy JM. (1995) Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 6: 501–506.
83. Le Roux F, Davis BM, Waldor MK. (2011) Conserved small RNAs govern replication and incompatibility of a diverse new plasmid family from marine bacteria. *Nucleic Acids Res* 39: 1004–1013.
84. Lee YM, Kim SY, Jung J, Kim EH, Cho KH, Schinner F, Margesin R, Hong SG, Lee HK. (2011) Cultured bacterial diversity and human impact on alpine glacier cryoconite. *J Microbiol* 49: 355–362.

85. Lee JJ, Yoon JH, Yang SY, Lee ST. (2006) Aerobic biodegradation of 4-methylpyridine and 4-ethylpyridine by newly isolated *Pseudonocardia* sp. strain M43. *FEMS Microbiol Lett* 254: 95–100.
86. Lee JJ, Rhee SK, Lee ST. (2001) Degradation of 3-methylpyridine and 3-ethylpyridine by *Gordonia nitida* LE31. *Appl Environ Microbiol* 67: 4342–4345.
87. Leret V, Trautwetter A, Rince A, Blanco C. (1998) pBLA8, from *Brevibacterium Linens*, belongs to a Gram-positive subfamily of ColE2-related plasmids. *Microbiology* 144: 2827–2736.
88. Li YY, Zhou B, Li W, Peng X, Zhang JS, Yan YC. (2008) Mineralization of p-nitrophenol by a new isolate *Arthrobacter* sp. Y1. *J Environ Sci Health B* 43:692–697.
89. Liang D-W, Zhang T, Fang HHP, He J. (2008) Phthalates biodegradation in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 80: 183–198.
90. Lonhienne T, Mavromatis K, Vorgias CE, Buchon L, Gerday C, Bouriotis V. (2001) Cloning, sequences, and characterization of two chitinase genes from the Antarctic *Arthrobacter* sp. strain TAD20: isolation and partial characterization of the enzymes. *J Bacteriol* 183: 1773–1779.
91. Loviny-Anderton T, Shaw PC, Shin MK, Hartley BS. (1991) D-Xylose (D-glucose) isomerase from *Arthrobacter* strain N.R.R.L. B3728. Gene cloning, sequence and expression. *Biochem J* 277: 263–271.
92. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
93. Mages IS, Frodl R, Bernard KA, Funke G. (2008) Identities of *Arthrobacter* spp. and *Arthrobacter*-like bacteria encountered in human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 46: 2980–2986.
94. Maina CV, Riggs PD, Grandea AG 3rd, Slatko BE, Moran LS, Tagliamonte JA, McReynolds LA, Guan CD. (1988) An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* 74: 365–373.
95. Margesin R, Schumann P, Spröer C, Gounot AM. (2004) *Arthrobacter psychrophenicus* sp. nov., isolated from an alpine ice cave. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 2067–2072.
96. Martin JF, Santamaria R, Sandoval H, Del Real G, Mateos LM, Gil JA, Aguilar A. (1987) Cloning systems in amino acid-producing corynebacteria. *Biotechnology*, 5: 137–146.

97. Matsui T, Saeki H, Shinzato N, Matsuda H. (2006) Characterization of *Rhodococcus-E. coli* shuttle vector pNC9501 constructed from the cryptic plasmid of a propene-degrading bacterium. *Curr Microbiol* 52: 445–448.
98. Matsui T, Saeki H, Shinzato N, Matsuda H. (2007) Analysis of the 7.6-kb cryptic plasmid pNC500 from *Rhodococcus rhodochrous* B-276 and construction of *Rhodococcus-E. coli* shuttle vector. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 169–175.
99. McLeod MP, Warren RL, Hsiao WW, Araki N, Myhre M, Fernandes C, Miyazawa D, Wong W, Lillquist AL, Wang D, Dosanjh M, Hara H, Petrescu A, Morin RD, Yang G, Stott JM, Schein JE, Shin H, Smailus D, Siddiqui AS, Marra MA, Jones SJ, Holt R, Brinkman FS, Miyauchi K, Fukuda M, Davies JE, Mohn WW, Eltis LD. (2006) The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15582–15587.
100. Mead DA, Szczesna-Skorupa E, Kemper B. (1986) Single-stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Eng* 1: 67–74.
101. Meijer WJJ, Boer AJ, Van Torgeren S, Venema G, Bron S. (1995) Characterization of the replication region of the *Bacillus subtilis* plasmid pLS20: a novel type of replicon. *Nucleic Acids Res* 23: 3214–3223.
102. Miljkovic-Selimovic B, Babic T, Kocic B, Stojanovic P, Ristic L, Dinic M. (2007) Bacterial plasmids. *Acta Medica Medianae* 46: 61–65.
103. Miteva V, Lantz S, Brenchley J. (2008) Characterization of a cryptic plasmid from a Greenland ice core *Arthrobacter* isolate and construction of a shuttle vector that replicates in psychrophilic high G+C Gram-positive recipients. *Extremophiles* 12: 441–449.
104. Mohan SV, Sistla S, Guru RK, Prasad KK, Kumar CS, Ramakrishna SV, Sarma PN. (2003) Microbial degradation of pyridine using *Pseudomonas* sp. and isolation of plasmid responsible for degradation. *Waste Management* 23: 167–171.
105. Molokwane PE, Meli KC, Nkhambayausi-Chirwa EM. (2008) Chromium (VI) reduction in activated sludge bacteria exposed to high chromium loading: Brits culture (South Africa). *Water Res* 42: 4538–4548.
106. Mongodin EF, Shapir N, Daugherty SC, DeBoy RT, Emerson JB, Shvartzbeyn A, Radune D, Vamathevan J, Riggs F, Grinberg V, Khouri H, Wackett LP, Nelson KE, Sadowsky MJ. (2006) Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. *PLoS Genet* 2: e214.
107. Monnet C, Loux V, Gibrat J-F, Spinnler E, Barbe V, Vacherie B, Gavory F, Gourbeyre E, Siguier P, Chandler M, Elleuch R, Irlinger F, Vallaeys T. (2010) The

- Arthrobacter arilaitensis* Re117 genome sequence reveals its genetic adaptation to the surface of cheese. *PLoS ONE* 5: e15489.
108. Moo-Young M, Chisti Y, Zhang Z, Garrido F, Banerjee U, Vlach D. (1996) Bioprocessing with genetically modified and other organisms: case studies in processing constraints. *N Y Acad Sci* 782, 391–401.
 109. Morikawa M, Daido H, Pongpobpibool S, Imanaka T. (1994) Construction of a new host-vector system in *Arthrobacter* sp. and cloning of the lipase gene. *Appl Microbiol Biotechnol* 42: 300–303.
 110. Nojiri H, Kamakura M, Urata M, Tanaka T, Chung JS, Takemura T, Yoshida T, Habe H, Omori T. (2002) Dioxin catabolic genes are dispersed on the *Terrabacter* sp. DBF63 genome. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 233–240.
 111. Nomura Y, Harashima S, Oshima Y. (1989) A simple method for detection of enzyme activities involved in the initial step of phthalate degradation in microorganisms. *J Ferment Bioeng* 67: 291–296.
 112. Novick RP. (1987) Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev* 51: 381–395.
 113. Novy R, Yaeger K, Held D, Mierendorf R. (2002) Coexpression of multiple target proteins in *E. coli*. *inNovations* 15: 2–6.
 114. Oliynyk M, Samborsky M, Lester JB, Mironenko T, Scott N, Dickens S, Haydock SF, Leadlay PF. (2007) Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat Biotechnol* 25: 447–453.
 115. O'Loughlin EJ, Sims GK, Traina SJ. (1999) Biodegradation of 2-methyl, 2-ethyl, and 2-hydroxypyridine by an *Arthrobacter* sp. isolated from subsurface sediment. *Biodegradation* 10: 93–104.
 116. Osorio CR, Barja JL, Hutson RA, Collins MD. (1999) *Arthrobacter rhombi* sp. nov., isolated from Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *Int J Syst Bacteriol* 49: 1217–1220.
 117. Overhage J, Sielker S, Homburg S, Parschat K, Fetzner S. (2005) Identification of large linear plasmids in *Arthrobacter* spp. encoding the degradation of quinaldine to anthranilate. *Microbiology* 151: 491–500.
 118. Padoley KV, Mudliar SN, Pandey RA. (2009) Microbial degradation of pyridine and α -picoline using a strain of the genera *Pseudomonas* and *Nocardia* sp. *Bioprocess Biosyst Eng* 32: 501–510.
 119. Pan Y, Yang X, Li J, Zhang R, Hu Y, Zhou Y, Wang J, Zhu B. (2011) Genome sequence of the Spinosyns-producing bacterium *Saccharopolyspora spinosa* NRRL 18395. *J Bacteriol* 193:3150–3151.

120. Parschat K, Overhage J, Strittmatter AW, Henne A, Gottschalk G, Fetzner S. (2007) Complete nucleotide sequence of the 113-kilobase linear catabolic plasmid pAL1 of *Arthrobacter nitroguajacolicus* Rü61a and transcriptional analysis of genes involved in quinaldine degradation. *J Bacteriol* 189: 3855–3867.
121. Patrauchan MA, Florizone C, Dosanjh M, Molm WW, Davies J, Eltis LD. (2005) Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: redundancies and convergence. *J Bacteriol* 187: 4050–4063.
122. Petersen J. (2011) Phylogeny and compatibility: plasmid classification in the genomics era. *Arch Microbiol* 193: 313–321.
123. Picardeau M, Le Dantec C, Vincent V. (2000) Analysis of the internal replication region of a mycobacterial linear plasmid. *Microbiology* 146: 305–313.
124. Pohlenz HD, Boidol W, Schüttke I, Streber WR. (1992) Purification and properties of an *Arthrobacter oxydans* P52 carbamate hydrolase specific for the herbicide phenmedipham and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J Bacteriol* 174: 6600–6607.
125. Qiu YL, Sekiguchi Y, Hanada S, Imachi H, Tseng IC, Cheng SS, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y. (2006) *Pelotomaculum terephthalicum* sp. nov. and *Pelotomaculum isophthalicum* sp. nov.: two anaerobic bacteria that degrade phthalate isomers in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens. *Archives Microbiol* 185: 172–182.
126. Quan S, Dabbs ER. (1993) Nocardioform arsenic resistance plasmid characterization and improved *Rhodococcus* cloning vectors. *Plasmid* 29: 74–75.
127. Rauzier J, Moniz-Pereira J, Gicquel-Sanzey B. (1988) Complete nucleotide sequence of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*. *Gene* 71: 315–321.
128. Rhee SK, Lee GM, Yoon JH, Park YH, Bae HS, Lee ST. (1997) Anaerobic and aerobic degradation of pyridine by a newly isolated denitrifying bacterium. *Appl Environ Microbiol* 63: 2578–2585.
129. Rocha EPC. (2004) The replication-related organization of bacterial genomes. *Microbiology* 150: 1609–1627.
130. Rose RE. (1988) The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res* 16: 355.
131. Rossi M, Brigidi P, Gonzalez V, Rodriguez A, Matteuzzi D. (1996) Characterization of the plasmid pMB1 from *Bifidobacterium longum* and its use for shuttle vector construction. *Res in Microbiol* 147: 133–143.

132. Rousseaux S, Soulas G, Hartmann A. (2002) Plasmid localisation of atramine-degrading genes in newly described *Chelatobacter* and *Arthrobacter* strains. *FEMS Microbiol Ecol* 41: 69–75.
133. Saitou N, Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
134. Sajjaphan K, Shapir N, Wackett LP, Palmer M, Blackmon B, Tomkins J, Sadowsky MJ. (2004) *Arthrobacter aurescens* TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB* and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 70: 4402–4407.
135. Sales CM, Mahendra S, Grostern A, Parales RE, Goodwin LA, Woyke T, Nolan M, Lapidus A, Chertkov O, Ovchinnikova G, Sczyrba A, Alvarez-Cohen L. (2011) Genome sequence of the 1,4-dioxane-degrading *Pseudonocardia dioxanivorans* strain CB1190. *J Bacteriol* 193: 4549–4550.
136. Salwan R, Gulati A, Kasana RC. (2010) Phylogenetic diversity of alkaline protease-producing psychrotrophic bacteria from glacier and cold environments of Lahaul and Spiti, India. *J Basic Microbiol* 50: 150–159.
137. Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. (1989) Molecular cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
138. Sandu C, Chiribau C-B, Sachelaru P, Brandsch R. (2005) Plasmids for Nicotine-Dependent and –Independent Gene Expression in *Arthrobacter nicotinovorans* and Other *Arthrobacter* Species. *Appl Environ Microbiol* 71: 8920–8924.
139. Scherzinger E, Haring V, Lurz R, Otto S. (1991) Plasmid RSF1010 DNA replication in vitro promoted by purified RSF1010 RepA, RepB and RepC proteins. *Nucleic Acids Res* 19: 1203–1211.
140. Sekine M, Tanikawa S, Omata S, Saito M, Fujisawa T, Tsukatani N, Tajima T, Sekigawa T, Kosugi H, Matsuo Y, Nishiko R, Imamura K, Ito M, Narita H, Tago S, Fujita N, Harayama S. (2006) Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4. *Environ Microbiol* 8: 334–346.
141. Semėnaitė R, Gasparavičiūtė R, Duran R, Precigou S, Marcinkevičienė L, Bachmatova I, Meškys R. (2003) Genetic diversity of 2-hydroxypyridine-degrading soil bacteria. *Biologija* 2, 27–30.
142. Semėnaitė R. (2003) Piridino ir 2-hidroksipiridino biodegradacijos bakterijose tyrimas. Daktaro disertacija. Vilniaus universitetas, Vilnius.
143. Sharma RC, Schimke RT. (1996) Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques* 20: 42–44.

144. Shaw PC, Hartley BS. (1988) A host-vector system for an *Arthrobacter* species. *J Gen Microbiol* 134: 903–911.
145. Shukla OP, Kaul SM. (1974) A constitutive pyridine degrading system in *Corynebacterium* sp. *Indian J Biochem Biophys* 11: 201–207.
146. Shukla OP, Kaul SM. (1975) Succinate semialdehyde, an intermediate in the degradation of pyridine by *Brevibacterium* sp. *Indian J Biochem Biophys* 12: 326–330.
147. Shukla OP, Kaul SM. (1986) Microbiological transformation of pyridine N-oxide and pyridine by *Nocardia* sp. *Can J Microbiol* 32: 330–341.
148. Shukla OP. (1973) Microbial decomposition of pyridine. *Indian J Exp Biol* 11: 463–465.
149. Shukla OP. (1974) Microbial decomposition of α -picoline. *Indian J Biochem Biophys* 11: 192–200.
150. Sims GK, O'Loughlin EJ. (1989) Degradation of pyridines in the environment. *Crit Rev Environ Control* 19: 309–340.
151. Sims GK, Sommers LE, Konopka A. (1986) Degradation of pyridine by *Micrococcus luteus* isolated from soil. *Appl Environ Microbiol* 51: 963–968.
152. Stackebrandt E, Schumann P. (2006) Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria. In *The Prokaryotes*, 3rd edition. Edited by Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E. Volume III, Springer, New York.
153. Staples CA, Peterson DR, Parkerton TF, Adams WJ. (1997) The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere* 35: 667–749.
154. Stingley RL, Brezna B, Khan AA, Cerniglia CE. (2004) Novel organization of genes in a phthalate degradation operon of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Microbiology* 150: 3749–3761.
155. Stolt P, Stoker NG. (1996a) Protein-DNA interactions in the *ori* region of the *Mycobacterium fortuitum* plasmid pAL500. *J Bacteriol* 178: 6693–6700.
156. Stolt P, Stoker NG. (1996b) Functional definition of regions necessary for replication and incompatibility in the *Mycobacterium fortuitum* plasmid pAL5000. *Microbiology* 142: 2795–2802.
157. Strong LC, Rosendahl C, Johnson G, Sadowsky MJ, Wackett LP. (2002) *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. *Appl Environ Microbiol* 68: 5973–5980.
158. Sun H, Lapidus A, Nolan M, Lucas S, Del Rio TG, Tice H, Cheng JF, Tapia R, Han C, Goodwin L, Pitluck S, Pagani I, Ivanova N, Mavromatis K, Mikhailova N, Pati A, Chen A, Palaniappan K, Land M, Hauser L, Chang YJ, Jeffries CD, Djao

- OD, Rohde M, Sikorski J, Göker M, Woyke T, Bristow J, Eisen JA, Markowitz V, Hugenholtz P, Kyrpides NC, Klenk HP. (2010) Complete genome sequence of *Nocardiopsis dassonvillei* type strain (IMRU 509). *Stand Genomic Sci* 3: 325–336.
159. Taylor BF, King CA. (1987) Phthalic acid and pyridine dicarboxylic acids as catabolic analogs. *FEMS Microbiol Lett* 44: 401–405.
160. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 10: 2731–2739.
161. Tice H, Mayilraj S, Sims D, Lapidus A, Nolan M, Lucas S, Glavina Del Rio T, Copeland A, Cheng JF, Meincke L, Bruce D, Goodwin L, Pitluck S, Ivanova N, Mavromatis K, Ovchinnikova G, Pati A, Chen A, Palaniappan K, Land M, Hauser L, Chang YJ, Jeffries CD, Detter JC, Brettin T, Rohde M, Göker M, Bristow J, Eisen JA, Markowitz V, Hugenholtz P, Kyrpides NC, Klenk HP, Chen F. (2010) Complete genome sequence of *Nakamurella multipartita* type strain (Y-104). *Stand Genomic Sci* 2: 168–175.
162. Tomás-Gallardo L, Canosa I, Santero E, Camafeita E, Calvo E, López JA, Floriano B. (2006) Proteomic and transcriptional characterization of aromatic degradation pathways in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Proteomics* 6: 119–32.
163. Tsuchida Y, Kimura S, Suzuki N, Inui M, Yukawa H. (2009) Characterization of a new 2.4-kb plasmid of *Corynebacterium casei* and development of stable corynebacterial cloning vector. *Appl Microbiol Biotechnol* 81: 1107–1115.
164. Turnbull GA, Ousley M, Walker A, Shaw E, Morgan JAW. (2001) Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and characterization of a plasmid-associated hydrolase gene, *puhA*. *Appl Environ Microbiol* 67: 2270–2275.
165. Vamsee-Krishna C, Phale PS. (2008) Bacterial degradation of phthalate isomers and their esters. *Indian J Microbiol* 48: 19–34.
166. Vedler E. (2009) Megaplastids and the degradation of aromatic compounds by soil bacteria. In *Microbial megaplastids*, edited by E Schwartz, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
167. Watson GK, Cain RB. (1975) Microbial metabolism of the pyridine ring. *Biochem J* 146: 157–172.
168. Wauters G, Charlier J, Janssens M, Delmée M. (2000) Identification of *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteolus* sp. nov., and *Arthrobacter albus* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 38: 2412–2415.

169. Weinberger M, Kolenbrander PE. (1979) Plasmid-determined 2-hydroxypyridine utilization by *Arthrobacter crystallopoietes*. *Can J Microbiol* 25: 329–334.
170. Woo TH, Cheng AF & Ling JM. (1992) An application of a simple method for the preparation of bacterial DNA. *BioTechniques* 13: 696–698.
171. Wu DL, Mahmood Q, Zheng P, Hassan MJ. (2007) Isolation and physiology of a dimethyl phthalate degrading bacterial strain YZ2. *Environ Prog* 26: 384–390.
172. Wu X, Liang R, Dai Q, Jin D, Wang Y, Chao W. (2010) Complete degradation of di-n-octyl phthalate by biochemical cooperation between *Gordonia* sp. strain JDC-2 and *Arthrobacter* sp. strain JDC-32 isolated from activated sludge. *J Hazard Mater* 176: 262–268.
173. Zefirov NS, Agapova SR, Terentiev PB, Bulakhova IM, Vasyukova NI, Modyanova LV. (1994) Degradation of pyridine by *Arthrobacter crystallopoietes* and *Rhodococcus opacus* strains. *FEMS Microbiol Lett* 118: 71–74.
174. Zhang Z, Moo-Young M, Chisti Y. (1996) Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Adv* 14: 401–435.
175. Zhao W, Zhong Y, Yuan H, Wang J, Zheng H, Wang Y, Cen X, Xu F, Bai J, Han X, Lu G, Zhu Y, Shao Z, Yan H, Li C, Peng N, Zhang Z, Zhang Y, Lin W, Fan Y, Qin Z, Hu Y, Zhu B, Wang S, Ding X, Zhao GP. (2010) Complete genome sequence of the rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32 revealed its genetic characteristics in phylogeny and metabolism. *Cell Res* 20: 1096–1108.
176. Zhi X-Y, Li W-J, Stackebrandt E. (2009) An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 589–608.
177. Zucjerkandl E, Pauling L. (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. In *Evolving Genes and proteins*, edited by V Bryson and HJ Vogel. Academic Press, New York.