

VILNIAUS UNIVERSITETAS

SIMONAS KUTANOVAS

TETRAMETILPIRAZINO SKAIDYMO *RHODOCOCCUS* SP. TMP1
BAKTERIJOSE TYRIMAS

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2013 metai

Disertacija rengta 2008–2012 metais Vilniaus universiteto Biochemijos institute, Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje.

Mokslinis vadovas:

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

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	5
ĮVADAS	6
Darbo uždaviniai.....	7
Mokslinis naujumas	7
Ginamieji disertacijos teiginiai	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1. Pirazinai	10
1.1.1. Pirazinai gamtoje	10
1.1.2. Pirazinai žmogaus veikloje.....	11
1.1.3. Pirazinių susidarymas	12
1.1.4. Pirazinių bioskaidymo tyrimų svarba	13
1.2. Alkilpirazinių metabolizmas bakterijose	15
1.2.1. Alkilpirazinių modifikacija mikroorganizmais.....	15
1.2.2. Bakterijos, skaidančios alkilpirazinus	17
1.2.3. Tetrametilpirazino fenomenas	19
1.3. <i>N</i> -heterociklinių junginių skaidymo fermentai	20
1.3.1. Aromatinius junginius skaidantys fermentai	20
1.3.2. Aromatinį žiedą hidroksilinantys fermentai	20
1.3.2.1. Molibdeninės dehidrogenazės	20
1.3.2.2. Aromatinių junginių dioksigenazės	22
1.3.2.3. Aromatinių junginių monooksigenazės	24
1.3.2.4. Flavinus naudojančios monooksigenazės	25
1.3.2.5. Citochromo P450 monooksigenazės.....	28
1.3.3. Aromatinį žiedą skeliantys fermentai	29
1.3.3.1. Katecholių dioksigenazės	29
1.3.3.2. Kofaktoriaus neturinčios dioksigenazės, išskiriančios CO.....	31
1.3.3.3. Žiedą skeliančios monooksigenazės	33
1.3.4. <i>N</i> -heterociklinių junginių skaidymas redukuojant.....	33
1.3.5. Pirazinus skaidantys fermentai	34
2 MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI	36
2.1 Medžiagos.....	36
2.1.1. Reagentai	36
2.1.2. Bakterijos.....	37
2.1.3. Plazmidės.....	38
2.1.4. RT-PGR pradmenys	40
2.1.5. PGR pradmenys	41
2.1.6. Terpės	41
2.2. Tyrimo metodai	42
2.2.1. Bakterijų auginimo sąlygos	42
2.2.2. Plazmidinės DNR skyrimas.....	43
2.2.3. Genominės DNR skyrimas	43
2.2.4. DNR dauginimas <i>in vitro</i>	44
2.2.5. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio.....	44
2.2.6. Nukleotidų sekoskaita.....	44
2.2.6.1. Plazmidinės DNR sekoskaita.....	44
2.2.6.2. Genomo sekoskaita	44
2.2.7. iRNR analizė.....	44
2.2.7.1. Bendrosios ląstelių RNR skyrimas	44

2.2.7.2. Radioaktyvus DNR pradmens žymėjimas	45
2.2.7.3. DNR nukleotidų sekoskaita dideksiterminacijos metodu.....	45
2.2.7.4. Transkripcijos pradžios taško nustatymas	45
2.2.8. DNR manipuliacijos	45
2.2.9. Kompetentinės <i>Rhodococcus</i> spp. ir <i>Arthrobacter</i> spp. bakterijos	46
2.2.10. Bakterijų transformacija elektroporuojant.....	46
2.2.11. Kokybinė ir kiekybinė AT-PGR analizė.....	47
2.2.12. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje	48
2.2.13. Analitiniai metodai	48
2.2.13.1. Plonasluoksnė chromatografija.....	48
2.2.13.2. Peptidų de novo sekoskaita MS/MS metodu	48
2.2.13.3. ¹ H BMR ir ¹³ C BMR analizė	49
2.2.13.4. Didelės skyros masių spektrometrija.....	49
2.2.13.5. Tandeminė skysčių chromatografija ir masių spektrometrija.....	49
2.2.13.6. Fluorescencijos matavimas	50
2.2.13.7. UV-Vis spektrofotometrija	51
2.2.14. Biokonversijų tyrimai naudojant sveikas ląsteles.....	51
2.2.15. OBNA ir BDNA biosintezė	51
2.2.16. OBNA biosintezė naudojant ¹⁸ O žymėtą vandenį	52
2.2.17. 3-hidroksi-2,4,6-trimetilpirazino biosintezė	53
2.2.18. Belastelinių ekstraktų ruošimas	53
2.2.19. TpdC gryninimas	53
2.2.20. TpdC fermentinio aktyvumo matavimas	54
2.2.21. NH ₄ ⁺ jonų nustatymas Neslerio reagentu	54
2.2.22. TpdE gryninimas	54
2.2.23. TpdE fermentinio aktyvumo matavimas	55
2.2.24. Kompiuteriniai analizės metodai	55
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	57
3.1. Tetrametilpirazino skaidymo genų sandraupos nustatymas.....	57
3.1.1. TTMP indukuojamo 40 kDa baltymo <i>de novo</i> sekoskaita	57
3.1.2. <i>R. jostii</i> TMP1 Illumina genų biblioteka	58
3.1.3. 40 kDa baltymą koduojančio geno nustatymas	58
3.2. <i>tpd</i> sandraupos genų sekų analizė	60
3.3. <i>tpd</i> genų sandraupos raiškos reguliacija.....	67
3.3.1. <i>tpdABC</i> genų operonas	67
3.3.2. TTMP indukuojamo promotoriaus klonavimas.....	69
3.3.3. Promotoriaus savybių tyrimas	71
3.3.4. <i>tpdABC</i> operono transkripcijos pradžios taško nustatymas.....	73
3.3.5. Regulatoriaus geno klonavimas ir veikimas <i>R. erythropolis</i> SQ1 ląstelėse.....	76
3.4. TTMP metabolinio kelio nustatymas.....	78
3.4.1. <i>tpdABC</i> genų koduojamas TTMP skaidymas	78
3.4.2. TpdAB katalizuojama TTMP oksidacija ¹⁸ O izotopu žymėtame vandenyje.....	83
3.4.3. TpdC katalizuojamos BDNA hidrolizės tyrimas <i>in vitro</i>	86
3.4.4. TpdE katalizuojama OBNA redukcija.....	90
3.4.5. <i>tpd</i> genų koduojamas TTMP katabolizmo kelias	91
3.5. <i>R. jostii</i> TMP1 bakterijų panaudojimas biokatalizei.....	92
3.6. Reziumė	99
IŠVADOS	101
PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA	102
LITERATŪROS SĄRAŠAS	104

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AT-PGR	atvirkštinės transkriptazės polimerazės grandininė reakcija
BDNA	(<i>Z</i>)- <i>N,N'</i> -(but-2-ene-2,3-diil)diacetamidas
BMR	branduolių magnetinis rezonansas
EGFP	sustiprintos fluorescencijos žaliai fluorescuojantis baltymas
IPTG	izopropil- β -D-galaktopiranozidas
MS	masių spektrometrija
NTF2	branduolio pernašos veiksnys 2
OBNA	<i>N</i> -(3-oksobutan-2-il)acetamidas
PGR	polimerazės grandininė reakcija
RFU	santykiniai fluorescencijos vienetai
SDR	trumpų grandinių dehidrogenazė / reduktazė
SMC	2,4,6-trimetilpiridinas
TTMP	2,3,5,6-tetrametilpirazinas

ĮVADAS

Pirazinai yra itin dažnai gamtoje aptinkami *N*-heterocikliniai aromatiniai junginiai, šešianariame žiede turintys du azoto atomus *para* padėtyse. Jie gali būti sintetinami tiek cheminiais, tiek biologiniais metodais, tačiau yra labai mažai žinoma apie šių junginių skaidymą. Nors buvo išskirtos ir aprašytos bakterijos, galinčios naudoti įvairius alkilintus pirazinus kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį (Kiener et al., 1993; Rappert et al., 2006; Rappert et al., 2007; Müller ir Rappert, 2010), beveik nieko nežinoma apie alkilpirazinų skaidymo kelius, taip pat ir tetrametilpirazino, kurio visi žiedo anglies atomai turi po pakaitą.

Aerobinėmis sąlygomis alkilintų pirazinų metabolizmas prasideda nuo oksidacinio skaidymo, kai aromatinis žiedas yra hidroksilinamas laisvoje padėtyje. Tokiu būdu vyksta ir 2,5-dimetilpirazino katabolizmas (Kiener et al., 1993). Tačiau šios biokonversijos aprašyme, nebuvo minimi fermentai, katalizuojantys hidroksilinimo reakciją (Kiener et al., 1993). Vėliau buvo nustatyta, kad 2,5-dimetilpirazinui hidroksilinti reikalingas indukuojamas fermentas (Rappert et al., 2007). Taip pat nustatyta, kad 2,5-dimetilpirazino skaidymas, skirtingai nei piridinų, nepriklauso nuo molibdeninių fermentų, kurie dažnai dalyvauja hidroksilint aromatinį piridino žiedą (Fetzner, 1998).

Trijose padėtyse pakeistų pirazinų skaidymo metaboliniai keliai yra panašūs į dviejose padėtyse pakeistų pirazinų (Rappert et al., 2006). Katabolizme dalyvauja indukuojami fermentai, o pradiniam etape susidaro hidroksilinti produktai (Rappert et al., 2006), tačiau fermentai, katalizuojantys šias reakcijas, taip pat nėra aprašyti.

Priešingai nei dalinai pakeisti pirazinai, tetrametilpirazinas (TTMP) negali būti skaidomas jį iš pradžių hidroksilinant iki hidroksipirazino, kadangi visi jo žiedo anglies atomai jau turi po pakaitą. Müller ir Rappert (2010) pasiūlė, kad pradiniam TTMP skaidymo etape galėtų būti skaidomas žiedas. Naudodami beląstinius ekstraktus iš *Rhodococcus opacus* bakterijų, galinčių naudoti TTMP kaip vienintelį anglies, azoto ir energijos šaltinį, jie nenustatė

jokių tarpinių junginių, kurie susidarytų TTMP skaidymo metu (Müller ir Rappert, 2010), tačiau šie preliminarūs rezultatai buvo pateikti apžvalgoje ir iki šiol nebuvo paremti mokslinėmis publikacijomis. Be to, *R. opacus* bakterijose nebuvo nustatyti nei fermentai, katalizuojantys TTMP skaidymą, nei identifikuoti juos koduojantys genai.

Siekiant išplėsti esamas fundamentines žinias apie *N*-heterociklinių junginių bakterinį skaidymą bei nustatyti fermentus, kurie ateityje galėtų būti pritaikyti atrankioms ir specifinėms biokonversijos reakcijoms, **šio darbo tikslas** buvo nustatyti genus, koduojančius bakterinio TTMP skaidymo fermentus, ir pirmą kartą aprašyti alkilpirazinių katabolinius kelius bakterijose.

Darbo uždaviniai

- Nustatyti *Rhodococcus jostii* TMP1 bakterijų genus, koduojančius tetrametilpirazino skaidymo fermentus.
- Ištirti *R. jostii* TMP1 bakterijų tetrametilpirazino skaidymo genų raiškos reguliaciją.
- Aprašyti *R. jostii* TMP1 bakterijų tetrametilpirazino katabolinį kelią.
- Įvertinti, ar *R. jostii* TMP1 bakterijos gali būti taikomos atrankioms ir specifinėms biokonversijos reakcijoms.

Mokslinis naujumas

Šio darbo metu buvo nustatytas ir aprašytas tetrametilpirazino (TTMP) katabolinis kelias anksčiau išskirtose *R. jostii* TMP1 bakterijose, kurios gali naudoti TTMP kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį. Pirmą kartą bakterijose buvo nustatyti genai, koduojantys alkilpirazinių skaidymo fermentus. Buvo nustatyta 13 kb DNR fragmento seka, kuri pavadinta tetrametilpirazino degradavimo (*tpd*) genų sandrauba. Analizuojant *tpd* genų sandraupos seką, nustatyti aštuoni atviri skaitymo rėmeliai (ORF), koduojantys septynis fermentus TpdA-E, Orf1 ir Orf2 bei transkripcijos reguliatorių TpdR. Taigi pirmą kartą buvo aprašyti bakterijų alkilpirazinių katabolizmo fermentai.

Klonavus *tpdABC* operono genus ir juos perkėlus į *Rhodococcus erythropolis* SQ1 bakterijas, buvo įvertinta atskirų Tpd baltymų funkcija skaidant TTMP. TTMP buvo metabolizuojamas SQ1 bakterijomis, transformuotomis *tpdABC* ir *tpdAB* genais, tačiau atskirų *tpdA*, *tpdB* ir *tpdC* genų TTMP konversijai nepakako. TpdABC ir TpdAB reakcijos produktai buvo išgryninti, o jų struktūros nustatytos ¹H BMR, ¹³C BMR ir MS analizės metodais. TpdAB metabolizavo TTMP iki (Z)-N,N'-(but-2-ene-2,3-diil)diacetamido (BDNA), o TpdC produktas buvo N-(3-oksobutan-2-il)acetamidas (OBNA). BDNA ir OBNA yra pirmieji kada nors nustatyti bakteriniai TTMP metabolitai.

Eksperimentais su ¹⁸O izotopu žymėtu vandeniu nustatyta, kad skaidydamas TTMP žiedą TpdAB kompleksas veikia kaip monooksigenazė, kuri oksiduoja ir skelia žiedą. Nors panašias reakcijas katalizuojančios A klasės flavininės monooksigenazės buvo aprašytos anksčiau, TpdAB priklauso C flavininių monooksigenazių klasei ir yra pirmasis nustatytas šios klasės fermentas, katalizuojantis aromatinių junginių skaidymą.

In vitro fermentine analize nustatyta, kad TpdC yra amidazė, specifiskai hidrolizuojanti BDNA iki OBNA, kuris toliau redukuojamas iki aminoalkoholio nuo NADPH priklausomos dehidrogenazės TpdE. Iki šiol *Rhodococcus* spp. bakterijų trumpų grandinių dehidrogenazių / reduktazių, tokių kaip TpdE, buvo išskirta nedaug, tad šio fermento identifikavimas ir išskyrimas padės išplėsti žinias apie tokių fermentų katalizuojamų reakcijų specifiskumą, atrankumą ir mechanizmus.

Nustačius TTMP skaidymo genus ir išskyrus tarpinius metabolitus, pirmą kartą buvo aprašytos aerobinio TTMP skaidymo reakcijos ir rekonstruota *R. jostii* TMP1 tetrametilpirazino katabolizmo seka – pirmasis patvirtintas alkilpirazinių skaidymo kelias bakterijose.

Tiriant šio katabolinio kelio reguliaciją, buvo nustatyta, kad *tpdABC* promotoriui aktyvuoti būtinas TpdR transkripcijos reguliatorius. Šis aktyvatorius specifiskai indukuoja *tpd* genų raišką terpėje esant TTMP. Pritaikius modelinę sistemą su reporteriniu EGFP genu, buvo nustatyta

minimali promotoriaus seka bei *tpdABC* operono transkripcijos pradžios taškas, o atlikus promotoriaus sekos analizę, aptiktos 15 bp pasikartojančios ir 7 bp invertuotos sekos, būtinos kad veiktų promotorius. *tpdABC* promotorius ir TpdR transkripcijos aktyvatorius yra pirmoji aprašyta alkilpirazinių skaidymo reguliacijos sistema.

Dėl pastaruoju metu didėjančio susidomėjimo biokatalize kaip nauju švelniu būdu sintetinti biologiškai ir farmakologiškai aktyvius junginius, buvo ištirta, ar TTMP skaidančios *R. jostii* TMP1 bakterijos galėtų būti naudojamos alkilpirazinių ir alkilpiridinių biokonversijai. Parodyta, kad *R. jostii* TMP1 bakterijas indukavus TTMP, jos naudoja arba modifikuoja ne tik kitus alkilpirazinus, bet ir alkilpiridinus. *R. jostii* TMP1 yra pirmosios nustatytos bakterijos, kurioms būdinga tokia kryžminė indukcija. Be to, buvo atskleista, kad indukuotos *R. jostii* TMP1 bakterijos galėtų būti taikomos hidroksipiridinių sintezei švelniomis sąlygomis: pirmą kartą atlikta 2,4,6-trimetilpiridin-3-olio, pasižyminčio antioksidantinėmis, stabdančiomis senėjimą ir saugančiomis nuo išemijos savybėmis, biokatalizinė sintezė.

Ginamieji disertacijos teiginiai

1. *Rhodococcus jostii* TMP1 bakterijų 13 kb ilgio DNR fragmentas koduoja tetrametilpiraziniui skaidyti reikalingus genus.
2. *tpdA*, *tpdB* ir *tpdC* atviri skaitymo rėmeliai sudaro *tpdABC* operoną.
3. *tpdABC* operono raišką reguliuoja TpdR transkripcijos aktyvatorius.
4. Monooksigenazė TpdA kartu su TpdB oksiduoja tetrametilpiraziną iki (Z)-N,N'-(but-2-ene-2,3-diil)diacetamido.
5. Amidazė TpdC hidrolizuoja (Z)-N,N'-(but-2-ene-2,3-diil)diacetamidą iki N-(3-oksobutan-2-il)acetamido.
6. Nuo NADPH priklausoma aminoalkoholio dehidrogenazė TpdE redukuoja N-(3-oksobutan-2-il)acetamidą.
7. *R. jostii* TMP1 bakterijos gali būti taikomos alkilpirazinių ir alkilpiridinių biokonversijai bei hidroksipiridinių biosintzei.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Pirazinai

Pirazinai yra *N*-heterocikliniai aromatiniai junginiai, šešianariame žiede turintys du azoto atomus *para* padėtyse. Dauguma jų yra lakūs junginiai, turintys stiprų specifinį kvapą. Pirazinai plačiai paplitę gamtoje ir aptinkami visuose gyvuose organizmuose – bakterijose, grybuose, augaluose ir gyvūnuose (Woolfson ir Rothschild, 1990). Sintetiniai (Kodimuthali et al., 2009) ir biologinės kilmės (Besson et al., 1997) pirazinai naudojami maisto pramonėje, žemės ūkyje ir medicinoje (Rajini et al., 2011; Ferreira ir Kaiser, 2012).

1.1.1. Pirazinai gamtoje

Pirazinai plačiai paplitę gamtoje ir aptinkami daugelyje organizmų, todėl tikėtina, kad jie atlieka svarbias funkcijas. Šiuo metu manoma, kad pirazinai veikia kaip vidurūšinės ir tarprūšinės gyvūnų signalinės molekulės. Nustatyta, kad kelioms *Odontomachus* genties skruzdėlių rūšims alkilpirazinai (2,5-dimetil-3-izopentilpirazinas ir 2,6-dimetil-3-pentilpirazinas) yra pavojaus signalo feromonai, taip pat gali būti naudojami kaip gynybiniai junginiai (Wheeler ir Blum, 1973). Panašūs pirazino dariniai aptikti ir kitų rūšių bendruomeninių vabzdžių organizme ir nustatyta, kad jie veikia kaip įvairūs vidurūšiniai signalai. Tuo tarpu kitų vabzdžių išskiriami pirazinai veikia kaip feromonai arba signalai, įspėjantys grobuonis, kad vabzdys nuodingas (Brophy, 1989; Moore et al., 1990; Woolfson ir Rothschild, 1990). Pavyzdžiui, drugiams meškutėms tas pats junginys yra ir lytinis feromonas, ir repelentas, atbaidantis plėšrūnus. Panašiai kaip ir vabzdžiuose, jūros organizme *Palythoa tuberculosa* aptikti pirazino dariniai, manoma, yra signalas, įspėjantis plėšrūnus apie šio gyvūno toksiškumą (Uemura et al., 1979). Pirazinus išskiria ir sausumos stuburiniai – jų aptikta kojotų šlapime, triušių patinų išmatose ir bebrų analinėse liaukose (Woolfson ir Rothschild, 1990).

Įdomu, kad, panašiai kaip ir vabzdžiai, kurie pirazino junginius naudoja tarpusavio ir tarprūšiniams signalams, jūros gyvūnai bioluminescencijai taip pat naudoja pirazino motyvą turinčius junginius. Daugumos liuminescuojančių žuvų, duobagyvių ir vėžiagyvių naudojami liuciferinai yra pirazino dariniai koelenterazinas ir vargulinas (Shimomura ir Johnson, 1975; Herring et al., 1990; Kato et al., 2006).

Nedidelės pirazinų, suteikiančių būdingą kvapą, koncentracijos nustatytos augaluose ir grybuose. Taip pat pastebėta, kad organizmuose, turinčiuose toksinių junginių (glikozidų, alkaloidų) ar kitų apsauginių savybių (kaip sužeidžiantys ar dirginantys spygliai), pirazinų koncentracija būna pastebimai didesnė. Todėl manoma, kad šiuose augaluose pirazinai atlieka įspėjamąją funkciją (Woolfson ir Rothschild, 1990). Kai kurie autoriai mano, kad pirazinai, panašiai kaip raudona spalva, yra universalus signalas, veikiantis kaip repelentas ar atraktantas priklausomai nuo aplinkybių (Moore et al., 1990; Woolfson ir Rothschild, 1990). Tiek augalų, tiek gyvūnų sintetinami apsauginiai toksinai yra labai įvairūs, tarpusavyje skiriasi kilme, struktūra ir veikimo mechanizmais, tačiau panašu, kad pirazinai, kurie patys nėra nei toksiški, nei naudingi, naudojami kaip universalus įspėjamasis signalas. Hipotezę paremia ir kai kurių žolėdžių nosies gleivinėje aptiktas pirazinus surišantis baltymas (Baldaccini et al., 1986), kuris, kaip manoma, galėtų dalyvauti gyvūnams iš kvapo atpažįstant nuodingus augalus (Woolfson ir Rothschild, 1990).

1.1.2. Pirazinai žmogaus veikloje

Tiek chemiškai susintetinti, tiek biologiniai pirazinai naudojami įvairioje žmogaus veikloje. Kadangi pirazino junginiai yra lakūs ir daugelis jų pasižymi stipriu kvapu su itin žema slenkstine koncentracija, jie plačiai naudojami maisto pramonėje kaip kvapiosios medžiagos (Rappert ir Müller, 2005). Pavyzdžiui, vos 1 ppm 2,5-dimetilpirazino vandenyje, yra atpažįstamas kaip bulvių kvapas (Buttery et al., 1971). Tipišką spragintų kukurūzų kvapą maistui suteikia 2-acetilpirazinas (> 5 ppm). Tetrametilpirazinas, aptinkamas

fermentuotos sojos produktuose, yra pagrindinė šių gaminių kvapo dalis, o jo slenkstinė koncentracija yra apie 10 ppm. Skrudintai kavai aromata suteikia joje aptinkami įvairūs metil- ir etilpirazinių junginiai (Maga ir Sizer, 1973). Kiti įvairūs alkilpiraziniai atpažįstami kaip kavos, keptų bulvių bei fermentuotų kakavos ar sojos produktų kvapai (Besson et al., 1997; Grosch, 2001).

Kita ir tikriausiai svarbesnė pirazinių taikymo sritis yra farmacija. Pastaruoju metu susidomėjimas biologiškai aktyviais pirazinais itin išaugo, įvairūs pirazinių dariniai buvo pritaikyti įvairiose medicinos srityse (Ferreira ir Kaiser, 2012). Aspergilo rūgštis naudojama kaip baktericidas (MacDonald, 1973), 2-(aliltio)pirazinas – kepenis apsaugantis preparatas (Kim et al., 1997). Pirazino rūgštis, pirazinamidas ir 5-pakeisti pirazinamido esteriai veikia kaip antibiotikai ir prieštuberkulioziniai preparatai (Zhang et al., 2003; Ngo et al., 2007). 5-(2-pirazinil)-4-metil-1,2-ditioil-3-tionas (taip pat žinomas Oltipraz pavadinimu) yra naudojamas trematodų sukeliama parazitinei ligai – šistosomozei – gydyti (Benson, 1993) bei yra potencialus priešvėžinis preparatas (Lee ir Surh, 2005). Hidroksilinta pirazino rūgštis naudojama kaip tarpinis junginys įvairių medikamentų sintezėje (Tinschert et al., 2000). Be to, keletas pirazino junginių yra patentuoti kaip insekticidai (Wilcox et al., 1970).

1.1.3. Pirazinių susidarymas

Gerai ištirtas alkilpirazinių susidarymas termiškai apdorojant maistą. Nustatyta, kad pirazino žiedas susidaro Maillardo reakcijos ir Streckerio degradacijos metu kondensuojantis aminorūgštims ir angliavandeniams (Hwang et al., 1994). Didžiausia pirazinių koncentracija gaunama 120–150 °C temperatūroje, o pirazinių pakaitų profilis priklauso nuo reakcijoje dalyvaujančių aminorūgščių (Van Lancker et al., 2012). Šio proceso metu susidaro didelė kvapų įvairovė, suteikianti skirtingiems maisto gaminiams tik jiems būdingą individualų kvapų rinkinį.

Kitas pirazinių susidarymo kelias – jų biosintezė mikroorganizmuose. Alkilpiraziniai fermentacijos metu sintetinami *Corynebacterium glutamicum* (Dickschat et al., 2010), *Paenibacillus polymyxa* (Beck et al., 2003), *Bacillus*

natto (Kosuge et al., 1962) ir *Bacillus subtilis* bakterijos (Besson et al., 1997). Miksobakterija *Chondromyces crocatus* išskiria keletą sudėtingos struktūros alkilmetoksipirazinų, tokių kaip 2,5-di(1-metiletil)pirazinas, 2-metoksi-3-(1-metiletil)-6-(2-metilpropil)pirazinas ir 2-metoksi-3-(1-metilpropil)-6-(2-metilpropil)pirazinas (Dickschat et al., 2005). Nors žinoma daug bakterijų, sintetinančių pirazinus, pirazino žiedo susidaryme dalyvaujantys fermentai nėra žinomi. Manoma, kad paprasti alkilpiraziniai susidaro vykstant nefermentinėms reakcijoms, kurioms yra pasiūlyta keletas mechanizmų. Vienas jų – tai aminorūgščių kondensacija ir ciklinio dipeptido susidarymas. Manoma, kad taip biosintetinami 2-metoksi-3-alkilpiraziniai (Gallois et al., 1988; Cheng et al., 1991). Kitas pasiūlytas kelias – per tarpinius aciloinus, kurie toliau amininami ir kondensuojasi, susidarant pirazinams. Šį kelią patvirtina tetrametilpirazino sintezės *Bacillus natto* bakterijose metu aptinkamas acetoinas (Kosuge et al., 1962). Dickschat et al. (2010) patvirtina, kad tokiu keliu gali susidaryti ir kiti paprasti alkilpiraziniai.

1.1.4. Pirazinių bioskaidymo tyrimų svarba

Aromatiniai *N*-heterocikliniai junginiai natūraliose biologinėse sistemose veikia kaip elektronų nešikliai, nukleotidai, energetinės molekulės, mikotoksinai, vitaminai ir alkaloidai. Antropogeninės kilmės heterocikliniai aromatiniai junginiai naudojami kaip pramoniniai tirpikliai, dažai, sprogmenys, pesticidai ir farmaciniai preparatai. Per pastaruosius 50 metų dėl susirūpinimo aplinkosauga aromatiniai junginiai sulaukė itin daug dėmesio, kadangi daugelis į aplinką patekusių aromatinių junginių yra teršalai. Svarbu pažymėti, kad heterocikliniai junginiai dėl didesnio nei kitų aromatinių angliavandenilių tirpumo vandenyje gali užteršti ir gruntinius vandenį (Hale ir Aneiro, 1997). Kai kurie aromatiniai *N*-heterocikliniai junginiai yra toksiški, pasižymi mutageninėmis ir kancerogeninėmis savybėmis (Fetzner, 1998). Dėl šių priežasčių intensyviai ieškoma bakterijų, skaidančių aromatinius junginius, ir tiriami skaidymo mechanizmai, siekiant tokius mikroorganizmus panaudoti teršalams utilizuoti. Todėl šiuo metu paprastų aromatinių junginių skaidymo

keliai, juose dalyvaujantys fermentai ir juos koduojantys genai yra gana gerai ištirti. Dėl šios priežasties neblogai ištirtas ir piridinių katabolizmas bakterijose. Piridinių, purinų ir pirimidinų skaidymo keliai tiriami ne tik taikomaisiais, bet ir fundamentiniais tikslais, kadangi šie heterociklai dalyvauja kertiniuose biocheminiuose procesuose.

Tuo tarpu apie pirazinų bakterinį skaidymą žinoma labai mažai. Toksikologiniai tyrimai rodo, kad pirazinais, ilgą laiką vartojami kaip kvapiosios maisto medžiagos, yra saugūs ir nepavojingi aplinkai (Adams et al., 2002). Dėl to pirazinų bakterinis bioskaidymas nebuvo tyrinėjamas taip plačiai, kaip artimos struktūros junginių – piridinių. Nors pirazinais plačiai paplitę gamtoje ir yra nemažai žinoma apie juos sintetinančius organizmus, tačiau gamtinėje aplinkoje pirazinais aptinkami itin mažais kiekiais, todėl jų metabolizmo tyrimai biologinėse sistemose yra sudėtingi. Pirazinų tyrimus apsunkina ir tinkamų metodų trūkumas (Rajini et al., 2011).

Susidomėjimas pirazinus skaidančiomis bakterijomis išaugo atsiradus galimybei jas pritaikyti valant maisto perdirbimo gamyklų išmetamąsias dujas, kurioms stiprų kvapą suteikia įvairūs pirazinų dariniai (Rappert ir Müller, 2005). Tikimasi pirazinus skaidančias bakterijas panaudoti šių dujų biovalymo įrenginiuose (Rappert et al., 2006; Rappert et al., 2007).

Pastaruoju metu susidomėjimas pirazinais ir jų dariniais sparčiai auga, tačiau patogių metodų chemiškai modifikuoti pirazino junginius nėra daug. Ypač sudėtinga pirazinų stereospecifinė enantiomeriškai grynų junginių sintezė. Tokiems taikymams labai naudingi biokataliziniai metodai, todėl pastaraisiais metais atsigręžta į pirazinų bioskaidymo tyrimus, kuriais būtų galima identifikuoti naujus pirazinus atpažįstančius fermentus. Be to, bakterijų pirazinų skaidymo keliuose potencialiai galėtų susidaryti įvairūs azotą turintys enantiomeriškai grynai tarpiniai metabolitai. Vis dėlto dėl negausių dabartinių žinių apie pirazino junginių skaidymą, sunku tiksliau prognozuoti tokiuose procesuose dalyvaujančių fermentų bei tarpinių metabolitų būsimą naudą ar reikšmę. Iki dabar nėra nuosekliai ištirtas nei vieno iš pirazinų metabolizmo kelias, nenustatytas nei vienas fermentas ir šiuo metu žinomi vos keli tarpiniai

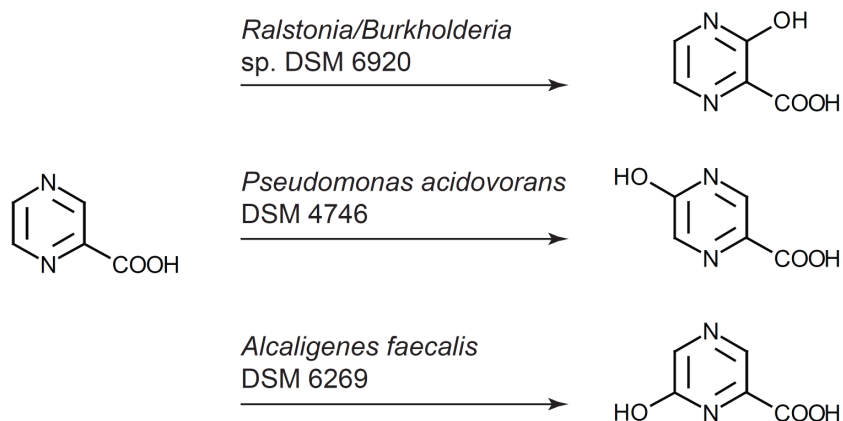
jų metabolitai. Tačiau remiantis struktūriškai panašių junginių – piridinių – analogija, galima tikėtis, kad bioskaidymo tyrimų metu bus aptinkami fermentai, tinkami chemiškai komplikuotoms, stereospecifinėms reakcijos vykdyti ir naujiems biologinės sintezės metodams kurti (Schmid et al., 2001).

1.2. Alkilpirazinių metabolizmas bakterijose

1.2.1. Alkilpirazinių modifikacija mikroorganizmais

Įvairius *N*-heterociklinius junginius skaidantys mikroorganizmai kelia didelį susidomėjimą, kadangi jų fermentai gali būti panaudoti biosintezės reakcijoms ir gauti junginius, kurių cheminė sintezė yra sudėtinga ir brangi. Tokiems procesams dažnai pasitelkiama mikrobinė modifikacija, kurios metu kitų junginių skaidymo fermentai atpažįsta į tikrąjį substratą struktūriškai panašius junginius ir katalizuoja jų transformaciją pagal sau būdingą mechanizmą. Kai kuriais atvejais biokatalizei galima panaudoti net ne išgrynintus fermentus, o pačias *N*-heterociklus skaidančias bakterijas. Šią galimybę suteikia bakterinių fermentų, katalizuojančių pradinės skaidymo reakcijas, platus substratinis specifiškumas. Dėl šios priežasties tokie fermentai be savo pagrindinio substrato atpažįsta ir kitus struktūriškai panašius junginius, o susidarę pirmos reakcijos produktai yra skaidomi lėtai arba visai nebeatpažįstami tolimesnių metabolinio kelio fermentų, todėl kaupiasi reakcijos terpėje ir gali būti iš jos išskirti kaip biosintezės produktai.

Pirazinus dažnai modifikuoja bakterijos, skaidančios piridinus. Paprastai pradiniai piridinių bioskaidymo kelio fermentai atpažįsta struktūrinius pirazino analogus. Kaip pavyzdį galima pateikti hidroksipirazino karboksirūgščių sintezę, panaudojant piridino rūgštis skaidančias bakterijas (1.1 pav.). *Pseudomonas acidovorans* DSM 4746 bakterijos, skaidančios nikotino rūgštį (piridin-3-karboksirūgštį) hidroksilina pirazinkarboksirūgštį iki 5-hidroksipirazin-2-karboksirūgšties (Kiener, 1993). 6-metilnikotino rūgštį skaidančios *Ralstonia/Burkholderia* sp. DSM 6920 bakterijos, indukuotos šiuo junginiu, oksiduoja pirazinkarboksirūgštį iki 3-hidroksipirazin-2-

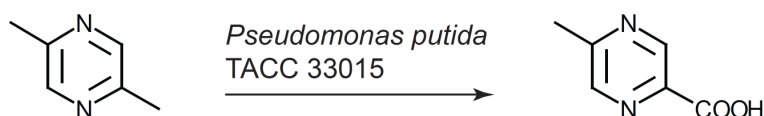


1.1 pav. Skirtingų hidroksipirazino karboksirūgščių sintezė iš pirazino karboksirūgšties, panaudojant piridino karboksirūgštis skaidančius mikroorganizmus. Virš rodyklių nurodytos atitinkamą reakciją katalizuojančios bakterijos.

karboksirūgšties, o šios biokonversijos išeiga siekia 70% (Kiener et al., 1994). *Alcaligenes faecalis* DSM 6269 bakterijos, auginamos terpėje su pikolino rūgštimi (piridin-2-karboksirūgštimi), hidroksilina pirazinkarboksirūgštį iki 6-hidroksipirazin-2-karboksirūgšties (Kiener, 1996).

Biotechnologinei alkilpirazinių modifikacijai naudojamos ir kitus aromatinčius junginius atpažįstančios bakterijos. *Pseudomonas putida* TACC 33015 bakterijos, skaidančios *p*-ksileną, katalizuoja 2,5-dimetilpirazino ir 2,3,6-trimetilpirazino vienos iš metilo grupių oksidaciją iki karboksirūgšties (Kiener, 1992) (1.2 pav.). Tokiu būdu biologinių produktų gamintojas „Lonza“ sintetina keletą tonų 5-metil-2-karboksipirazino per metus. Šis junginys naudojamas kaip pradinis junginys lipidų kiekį reguliuojančių vaistų sintezei (Schmid et al., 2001).

6-metilnikotino rūgštį vieninteliu anglies ir energijos šaltiniu panaudojančios *Ralstonia/Burkholderia* sp. DSM 6920 bakterijos taip pat gali būti panaudotos įvairių kitų hidroksilintų piridino ir pirazino rūgščių



1.2 pav. 5-Metil-2-karboksipirazino sintezė iš 2,5-dimetilpirazino, panaudojant *p*-ksileną skaidančias bakterijas *Pseudomonas putida* TACC 33015.

biosintezei. Indukuotos 6-metilnikotino rūgštimi jos regioselektyviai hidroksilina įvairius piridino rūgščių darinius C-2 padėtyje ir struktūrinius pirazino rūgšties analogus C-3 padėtyje. Šios bakterijos oksiduoja 5-metilpirazin-2-karboksirūgštį ir 5-chlorpirazin-2-karboksirūgštį iki 3-hidroksi-5-metilpirazin-2-karboksirūgšties ir atitinkamai 3-hidroksi-5-chlorpirazin-2-karboksirūgšties. Tokių biokonversijų bendra išeiga siekia 50–84 % (Tinschert et al., 2000).

1.2.2. Bakterijos, skaidančios alkilpirazinus

Šiuo metu nėra žinoma bakterijų, skaidančių mono pakeistus alkilpirazinus, tačiau išskirti bent du mikroorganizmai, kurie skaido 2,5-dimetilpiraziną. *Rhodococcus erythropolis* DSM 6138 panaudoja šį junginį kaip vienintelį anglies, azoto ir energijos šaltinį. Nustatyta, kad 2,5-dimetilpirazino metabolizmas vyksta susidarant 2-hidroksi-3,6-dimetilpirazino tarpiniam metabolitui. Parodyta, kad bakterijos, augintos su 2,5-dimetilpirazinu, gali hidroksilinti kitus alkilpirazinus (Kiener et al., 1993). *R. erythropolis* DSM 6138 bakterijomis modifikuojami pirazinais išvardyti 1.1 lentelėje.

Kitas 2,5-dimetilpiraziną skaidantis mikroorganizmas yra taip pat *R. erythropolis* rūšiai priklausančios bakterijos DP-45 (Rappert ir Müller, 2005). Kaip ir DSM 6138 bakterijų atveju, skaidymo metu susidaro 2-hidroksi-3,6-dimetilpirazinas. Kadangi kitų UV sugeriančių metabolitų nesusidaro, manoma, kad kitos reakcijos metu yra atidaromas pirazino žiedas. Deja, iš tolimesnių tarpinių metabolitų buvo nustatytas tik amoniakas (Rappert et al., 2007). Tiriant 2,5-dimetilpirazino metabolizmą parodyta, kad pirmoji 2,5-dimetilpirazino skaidymo stadija yra 2,5-dimetilpirazinu ir 2-hidroksi-3,6-dimetilpirazinu indukuojamas procesas. Tai nesiskiria nuo kitų žinomų *N*-heterociklinių junginių metabolizmo ypatybių, nes dauguma nustatytų degradacijos kelių yra indukuojami, kai aplinkoje atsiranda skaidomas junginys (Díaz ir Prieto, 2000). Tolimesnėje 2-hidroksi-3,6-dimetilpirazino žiedo skaidymo reakcijoje dalyvaujantys fermentai yra sintetinami

1.1 lentelė. 2,5-dimetilpiraziną skaidančių bakterijų modifikuojami arba skaidomi pirazino junginiai. Pabraukti junginiai, kuriuos bakterijos naudojo kaip vienintelį anglies šaltinį; pajuodinti junginiai buvo naudoti bakterijų atrankai.

<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 6138	<i>Rhodococcus erythropolis</i> DP-45
2-metilpirazinas	<u>2-metilpirazinas</u>
2-etilpirazinas	<u>2-etilpirazinas</u>
<u>2,5-dimetilpirazinas</u>	<u>2,3-dimetilpirazinas</u>
2,6-dimetilpirazinas	<u>2,5-dimetilpirazinas</u>
2,3,5-trimetilpirazinas	<u>2,6-dimetilpirazinas</u>
6-chlor-2,5-dimetilpirazinas	<u>2-etil-5(6)-metilpirazinas</u>
2-chlorpirazinas	2,3-dietilpirazinas
pirazin-2-metilchinoksalinas	<u>2,3,5-trimetilpirazinas</u>
	2,3-dietil-5-metilpirazinas
	pirazinas

konstitutyviai. Tiriant bakterijų galimybes skaidyti kitus pirazinus nustatyta, kad DP-45, kaip ir anksčiau aprašytas DSM 6138 mikroorganizmas, indukuotas 2,5-dimetilpirazinu, pasižymi plačiu substratų spektru ir gali skaidyti arba modifikuoti įvairius kitus alkilpirazinus (1.1 lentelė).

Literatūroje aprašyti du mikroorganizmai, gebantys skaidyti alkilpirazinus su trimis pakaitais: *Mycobacterium fortuitum* DM-8 ir *Mycobacterium* sp. DM-11 (Rappert ir Müller, 2005). Abu jie išskirti iš maisto perdirbimo gamyklų atliekų, kaip galintys panaudoti 2,3-dietil-5-metilpiraziną kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį. Be to, parodyta, kad DM-8 gali panaudoti 2-etil-5(6)-metilpiraziną kaip vienintelį anglies šaltinį, o auginant terpėje su 2,3-dietil-5-metilpirazinu taip pat skaido 2,3,5-trimetilpiraziną (Rappert ir Müller, 2005).

Nuosekliau buvo tirtos DM-11 bakterijos, kuriose 2,3-dietil-5-metilpirazino skaidymas prasideda pirazino žiedo hidroksiliniu laisvoje žiedo padėtyje, susidarant 5,6-dietil-2-hidroksi-3-metilpirazinui. Kito katabolizmo etapo metu, atidaromas susidariusio tarpinio junginio pirazino žiedas (Rappert et al., 2006). Deja, šios reakcijos produktas kol kas nenustatytas. Parodyta, kad žiedo hidroksilinimo ir atidarymo reakcijose dalyvaujančių fermentų raiška yra indukuojamas procesas. 2,3-Dietil-5-metilpirazino žiedo oksidavimo

1.2 lentelė. 2,3-dietil-5-metilpirazina skaidančių bakterijų substratinis specifiškumas. Pabraukti junginiai, kuriuos bakterijos naudojo kaip vienintelį anglies šaltinį; pajuodinti junginiai buvo naudoti bakterijų atrankai.

<i>Mycobacterium fortuitum</i> DM-8	<i>Mycobacterium</i> sp. DM-11
<u>2-etil-5(6)-metilpirazinas</u>	2-metilpirazinas
<u>2,3-dietil-5-metilpirazinas</u>	2-etilpirazinas
2,3,5-trimetilpirazinas	2,3-dimetilpirazinas
	2,5-dimetilpirazinas
	2,6-dimetilpirazinas
	<u>2-etil-5(6)-metilpirazinas</u>
	2,3-dietilpirazinas
	<u>2,3-dietil-5-metilpirazinas</u>
	<u>2,3,5-trimetilpirazinas</u>
	2-izobutil-3-metoksipirazinas
	acetilpirazinas

reakcijoms reikalingas molekulinis deguonis, o tolimesnėse skaidymo stadijose į terpę išsiskiria amonio jonai. Kaip ir kitų metilpirazinus skaidančių bakterijų atveju DM-11 bakterijos, indukuotos 2,3-dietil-5-metilpirazinu, gali skaidyti arba modifikuoti ir kitus pirazinus (1.2 lentelė) (Rappert et al., 2006).

1.2.3. Tetrametilpirazino fenomenas

Visos iki šiol žinomos alkilpirazinus skaidančios bakterijos, be savo pagrindinio substrato, gali skaidyti bent kelis kitus alkilpirazinus. Visų minėtų bakterijų atveju alkilpirazino metabolizmas prasideda pirazino žiedo hidroksiliniu laisvoje padėtyje, todėl nenuostabu, kad nei viena iš šių bakterijų negali modifikuoti tetrametilpirazino (TTMP) – alkilpirazino, kurio visos žiedo anglis turi po pakaitą. Literatūroje nėra aprašyta bakterijų, galinčių skaidyti tokio tipo alkilpirazinus. Muller ir Rappert (2010) pirazinų bioskaidymui skirtoje apžvalgoje paminėjo savo išskirtas *Rhodococcus opacus* bakterijas, galinčias panaudoti TTMP kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį, tačiau jokie TTMP metabolizmo šiose bakterijose tyrimo rezultatai iki šiol nebuvo publikuoti.

1.3. *N*-heterociklinių junginių skaidymo fermentai

1.3.1. Aromatinius junginius skaidantys fermentai

Aerobinį aromatinių junginių skaidymą bakterijose galima sąlyginai suskirstyti į dvi pakopas. Pirmiausia oksigenazės katalizuoja aromatinio junginio oksidaciją, kurios metu įvyksta viena ar kelios hidroksilinimo reakcijos ir susidaro dihidroksilinti aromatiniai metabolitai (Nam et al., 2001). Tuomet susidariusius junginius atakuoja žiedą skeliančios dioksinazės. Įjungdamos du deguonies atomus, jos suardo aromatinį žiedą, susidarant alifatiniams produktams. Šie tarpiniai alifatiniai junginiai skaidomi centriniais metaboliniais keliais iki glikolizės, pentozų fosfatų kelio ir Krebso ciklo metabolitų (Fetzner, 1998; Fetzner, 2002; Díaz, 2004).

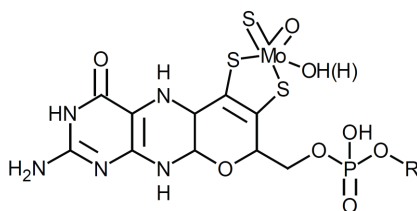
Daugumos *N*-heterociklinių junginių skaidymas bakterijose vyksta pagal tas pačias taisykles ir pradedamas hidroksilinant aromatinį žiedą laisvoje aromatinio žiedo pozicijoje (Fetzner, 1998). Šiuo metu žinomos vos kelios išimtys, kai aerobinis skaidymas pradedamas redukcijos reakcija (Kaiser et al., 1996; Rajini et al., 2010). Aromatinio žiedo hidroksilinimo reakcijas katalizuoja keletas katabolinių fermentų tipų. Molibdeną turinčios dehidrogenazės katalizuoja nukleofilinio pakeitimo reakciją, kurios metu vandens molekulės deguonis jungiasi prie dalinai teigiamai įkrautų *N*-heterociklinio junginio žiedo padėčių (Fetzner, 2000). Tuo tarpu elektrofilinio hidroksilinimo reakcijas katalizuoja mono oksigenazės ir dioksinazės, naudojančios molekulinį deguonį kaip substratą (Ferraro et al., 2005; van Berkel et al., 2006).

1.3.2. Aromatinį žiedą hidroksilinantys fermentai

1.3.2.1. Molibdeninės dehidrogenazės

Pradiniame *N*-heterociklinių junginių skaidymo etape dažnai dalyvauja molibdeninės dehidrogenazės. Žinoma, kad tokio tipo fermentai hidroksilina chinaldiną, chinoliną, izochinoliną, nikotiną, nikotino rūgštį, pikolino rūgštį ir ksantiną į aromatinio žiedo *orto* padėtį azoto atžvilgiu (Kaiser et al., 1996).

Molibdeninės dehidrogenazės pagal savo veikimo mechanizmą yra hidroksilazės: iš vandens molekulės į substratą įjungiamas deguonies atomas ir reakcijos metu susidaro redukuojantys ekvivalentai. Daugelyje molibdeninių dehidrogenazių vidinė elektronų pernašos grandinė, kuria keliauja elektronas nuo redukuojančio substrato (heterociklo) ant oksidatoriaus (elektronų akceptorius), susideda iš molibdeno jono, koordinuojamo organiniu kofaktoriumi, dviejų [2Fe-2S] centrų ir FAD kofaktoriaus (Kaiser et al., 1996). Tiesa, yra žinoma ir FAD neturinčių molibdeninių dehidrogenazių (Canne et al., 1999). Ksantino dehidrogenazės galutinis elektronų akceptorius yra NAD^+ , o ksantino oksidazė ir chinaldino oksidazė redukuoja molekulinį deguonį iki vandenilio peroksido (Hund et al., 1990; Stephan et al., 1996). Deja, daugelis bakterinių *N*-heterociklinių junginių skaidyme dalyvaujančių molibdeninių dehidrogenazių nei NAD^+ , nei O_2 panaudoti negali ir jų fiziologinis galutinis elektronų akceptorius nėra žinomas (Fetzner, 2000). Šio tipo monooksigenazių aktyviajame centre esantis molibdenas yra koordinuotas pterino kofaktoriaus. Molibdeno ir organinio kofaktoriaus komplekso (molibdopterino, 1.3 pav.) struktūra buvo nustatyta rentgeno struktūrine analize tiriant kofaktorių, ekstrahuotą iš *Desulfovibrio gigas* aldehido oksidoreduktazės (Romão et al., 1995) ir karvės pieno ksantino oksidazės (Okamoto et al., 2004). Šiame komplekse molibdeną koordinuoja du sieros atomai iš pterino, o kitos pozicijos yra užimtos okso ($\text{Mo}=\text{O}$), sulfido ($\text{Mo}=\text{S}$) ir vandens ($\text{Mo}-\text{OH}_2$) arba hidroksido ($\text{Mo}-\text{OH}$) ligandų. *N*-heterociklinių junginių skaidyme dalyvaujančių bakterinių dehidrogenazių kofaktorių yra molibdopterino citozino dinukleotidas (Sachelaru et al., 2006). Buvo pasiūlyta keletas molibdeninių dehidrogenazių katalizuojamo hidroksilinimo mechanizmų



1.3 pav. Molibdopterino struktūra – kofaktorių, esantis molibdeninių hidroksilazių aktyviajame centre. R = citozino monofosfatas.

(Hille, 1996; Lowe et al., 1997; Canne et al., 1999; Okamoto et al., 2004), tačiau naujausi tyrimai rodo, kad hidroksilinant substratą tiesiogiai dalyvauja Mo koordinuojamas H₂O arba OH ligandas. Svarbi yra ir Mo=S sulfido grupė, kuri reakcijos metu prisijungia protoną, ir fermento aktyviajame centre esanti glutamo rūgšties liekana (Okamoto et al., 2004). Molibdeninės dehidrogenazės pasižymi labai skirtingu atrankumu substratams. Pavyzdžiui, chinaldino oksidazė iš *Arthrobacter ilicis* Ru61a pasižymi itin didele hidroksilinaujamų substratų įvairove, o izochinolino 1-oksido-reduktazė iš *Brevundimonas diminuta* 7 savo substratui yra atrankesnė (Lehmann et al., 1994; Stephan et al., 1996). Šiuo metu manoma, kad atrankumas yra susijęs su fermento struktūra, lemiančia erdvinius substrato patekimo į aktyvųjį centrą apribojimus (Fetzner, 2000).

Bakterinę nuo molibdeno priklausomą dehidrogenazę koduojantys genai pirmą kartą nustatyti *Arthrobacter nicotinovorans* bakterijose, kurios skaido alkaloidą nikotiną (Grether-Beck et al., 1994). Pradinę nikotino skaidymo reakciją katalizuojančios nikotino dehidrogenazės genai yra 165 kb pAO1 megaplazmidėje. Nikotino dehidrogenazė yra tipiška molibdeninė dehidrogenazė, kaip kofaktorius turinti molibdopterino dinukleotidą, FAD ir du Fe-S centrus. Ji katalizuoja nikotino hidroksilinimą piridino žiedo C-6 pozicijoje, susidarant 6-hidroksinikotinui (Freudenberg et al., 1988). Tai heteroheksamerinis baltymas, sudarytas iš didžiojo 82 kDa, vidutinio 30 kDa ir mažojo 15 kDa subvieneto. Mažasis subvienetas, koduojamas *ndhS* geno, turi Fe-S centrą. Vidutinis subvienetas yra FAD surišantis baltymas, koduojamas *ndhM* geno. Didysis subvienetas su molibdopterino kofaktoriumi yra katalizinis. Sekų palyginimas rodo, kad šis *ndhL* geno koduojamas subvienetas panašus į eukariotinės ksantinų dehidrogenazės molibdopteriną surišantį domeną (Grether-Beck et al., 1994).

1.3.2.2. Aromatinių junginių dioksigenazės

Aromatinius žiedus hidroksilinantys fermentai, oksidacijai naudojantys molekulinę deguonį, pagal į substratą įjungiamų deguonies atomų skaičių yra

skirstomi į monooksigenazes ir dioksigenazes. Dioksigenazės katalizuoja abiejų molekulinio deguonies atomų įjungimą į substratą susidarant *cis*-dioliui. Šios oksigenazės substrato oksidacijos metu oksiduoja NAD(P)H (Ferraro et al., 2005).

Nuo oksidacijos, katalizuojamos žiedą hidroksilinančių dioksigenazių, dažniausiai prasideda aerobinis aromatinių angliavandenilių skaidymas bakterijose (Kweon et al., 2008; Peng et al., 2010). Bakterinės dioksigenazės aktyviajame centre turi neheminę geležį ir yra vadinamos Rieske tipo neheminėmis žiedą hidroksilinančiomis dioksigenazėmis (Kweon et al., 2008). Tai daugiakomponentiniai fermentai, sudaryti iš oksigenazės ir elektronų pernešimo grandinės. Oksigenazės komponentas yra homo (α_n) arba hetero ($\alpha_n\beta_n$) oligomeras, kuriame α subvienetas (dar vadinamas didžiuoju oksigenazės subvienetu) turi du konservatyvius regionus – Rieske [2Fe-2S] centrą ir neheminės geležies Fe centrą. Oksigenazės α subvienetas yra katalizinis komponentas, kuriame vyksta O₂ molekulės aktyvavimas ir organinio substrato oksidacija. Elektronų pernešimo grandinės komponentas, dalyvaujantis NAD(P)H oksidacijoje ir redukuojančių ekvivalentų perdavime oksigenazei, susideda iš flavino reduktazės arba flavino reduktazės ir feredoksino. Elektronų pernašos grandinės komponentus koduojantys genai genome dažnai išsidėstę atskirai nuo oksigenazės komponentų genų, be to pastebėta, kad kelios oksigenazės gali naudoti tuos pačius elektronų pernašos grandinės fermentus (Kweon et al., 2008; Peng et al., 2010).

Šiuo metu žinomos įvairius aromatinis junginius hidroksilinančios dioksigenazės pagal oksigenazės α subvieneto homologiją ir elektronų pernašos grandinės sudėtį yra suskirstytos į penkias grupes. Nepaisant ryškių struktūrinių skirtumų, visos dioksigenazės katalizuoja tokią pačią reakciją – naudodamos NAD(P)H į aromatinį žiedą įjungia O₂ molekulę, susidarant *cis*-hidroksilintam produktui (Kweon et al., 2008). Tipiškas dioksigenazių pavyzdys yra *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 bakterijų naftaleno 1,2-dioksigenazė (NDO), katalizuojanti naftaleno oksidaciją iki (1*R*,2*S*)-dihidroksi-1,2-dihidronaftaleno. Struktūriniais fermento tyrimais nustatyta, kad ši

oksigenazė yra $\alpha_3\beta_3$ struktūros heksameras. Fermento aktyviajame centre Fe joną koordinuoja dvi histidino ir viena asparto aminorūgščių liekanos. Atstumas tarp aktyviojo centro Fe ir [2Fe-2S] centro tame pačiame α subvienete yra 43,5 Å, tuo tarpu atstumas iki gretimo α subvieneto [2Fe-2S] centro heksamere yra 12 Å, todėl manoma, kad elektronai aktyviojo centro Fe jonui yra perduodami ne iš to paties, bet iš gretimo subvieneto [2Fe-2S] centro (Kauppi et al., 1998). Dėl šios priežasties ketvirtinė heksamerinė oksigenazės struktūra yra būtina fermentui veikti. Aktyviojo centro Fe jonas reakcijos metu koordinuoja O₂ molekulę per abu deguonies atomus ir ją orientuoja paraleliai substrato molekulei, todėl reakcijos metu susidaro *cis*-hidroksilintas produktas (Karlsson et al., 2003).

Nors žiedą hidroksilinančios dioksigenazės dažniausiai dalyvauja aromatinių angliavandenilių skaidymo reakcijose, tačiau yra parodyta, kad jos gali hidroksilinti ir *N*-heterociklinius junginius. Pavyzdžiui, įvairius indolo junginius gali hidroksilinti anksčiau aprašyta NDO bei tolueno dioksigenazė, oksiduojanti tolueną iki *cis*-toluen-2,3-dihidrodiolio (Kim et al., 2003).

1.3.2.3. Aromatinių junginių monooksigenazės

Monooksigenazės į substrato molekulę įjungia tik vieną molekulinio deguonies atomą, o antrasis deguonies atomas yra redukuojamas iki vandens (Harayama et al., 1992). Šie fermentai savo tiesioginio substrato oksidacijos metu oksiduoja ir antrąjį substratą – NAD(P)H, redukuotą flaviną, 2-oksoglutaratą, redukuotą pteriną arba redukuotą Fe-S baltymą. Pagal aktyviajame centre esančius kofaktorius, monooksigenazės skirstomos į keturias pagrindines klases: flavinus naudojančias monooksigenazes, citochromo P450 monooksigenazes, neheminės geležies monooksigenazes ir varį turinčias monooksigenazes (van Berkel et al., 2006).

Neheminės ir varį turinčios monooksigenazės paprastai nustatomos eukariotuose, todėl šioje apžvalgoje jos nebus detalios aptariamoms. Tipinis neheminės monooksigenazės pavyzdys yra žmogaus fenilalanino hidroksilazė. Tai Fe(II) aktyviame centre turintis ir pteriną kaip kofaktorių naudojantis

fermentas, katalizuojantis fenilalanino oksidaciją iki tirozino (Andersen et al., 2002). Varį turinčioms monooksigenazėms priskiriamos lakazės, turinčios daugiaatomį vario aktyvų centrą (Virk et al., 2012). Lakazės buvo aptiktos augaluose, plačiai paplitusios grybuose, žinoma keletas bakterinių lakazių, katalizuojančių įvairių fenolių oksidaciją (Virk et al., 2012).

1.3.2.4. Flavinus naudojančios monooksigenazės

Tiesioginė reakcija tarp O₂ molekulės ir organinio junginio C atomo yra negalima, tačiau fermentai O₂ molekulę aktyvuoja ir panaudoja organiniam junginiui oksiduoti. Tokiam aktyvavimui fermentuose dažnai naudojami aktyviajame centre esantys pereinamieji metalai, kurie gali būti laisvi arba įjungti į organinio kofaktoriaus molekulę (pvz., hemą citochromo P450 monooksigenazėse). Tuo tarpu flavinus naudojančios monooksigenazės oksidacijai panaudoja visiškai organinį kofaktorių – FMN arba FAD. Redukuotas flavino kofaktorių reaguoja su O₂ molekule ir susidaro C(4a)-hidroperoksiflavinai, kuris oksiduoja substratą, įjungdamas į jį vieną molekulinio deguonies atomą, o antrąjį redukuodamas iki vandens. Flavino redukavimui dauguma monooksigenazių, vadinamų išorinėmis, naudoja NAD(P)H. Kita vertus, vidinės monooksigenazės, tokios kaip laktato monooksigenazė, flaviną redukuoja pačiu oksiduojamu substratu, tačiau šio tipo fermentai yra itin reti (Sutton, 1957).

Flavininės monooksigenazės, oksiduojančios labai įvairius substratus, katalizuoja keletą tipų oksidacijos reakcijų: be hidrosilinio taip pat vykdo epoksidų susidarymo, Baeyer–Villiger oksidacijos, halogeninimo, organinės sieros, seleno, azoto ir boro oksidacijos reakcijas. Pagal aminorūgščių sekas ir tretines baltymo struktūras flavino monooksigenazės suskirstytos į šešias klases (A–F). Nustatyta, kad kiekvienai klasei priklausantys fermentai katalizuoja jiems specifinius reakcijų tipus, tad katalizuojamos reakcijos tipas bent jau iš dalies priklauso nuo baltymo tretinės struktūros. Aromatinių junginių skaidyme dalyvauja A ir D klasių flavino monooksigenazės (van Berkel et al., 2006; Crozier-Reabe ir Moran, 2012).

A klasės monooksigenazės koduoja vienas genas. Tai nuo NAD(P)H priklausomos monooksigenazės, kurių aktyviame centre yra tvirtai surištas FAD kofaktorius. Tretinėje struktūroje išskiriamas vienas dinukleotidus surišantis domenas (*Rossmann fold*), prijungiantis FAD. Šios klasės flavinų monooksigenazės dalyvauja amino arba hidroksi pakaitus turinčių aromatinių junginių skaidyme, katalizuodamos hidroksigrupės įjungimą *orto* arba *para* padėtyje esamo pakaito atžvilgiu (Moonen et al., 2002). Šie fermentai pasižymi siauru substratiniu specifiškumu. Tipiniai šios klasės fermentai yra 4-hidroksibenzoato-3-monooksigenazė iš *Pseudomonas* bakterijų (Entsch ir van Berkel, 1995; Entsch et al., 2005) ir fenolio-2-monooksigenazė iš mielių *Trichosporon cutaneum* (Neujahr ir Gaal, 1973). 4-Hidroksibenzoato-3-monooksigenazės ir fenolio-2-monooksigenazės tretinėse struktūrose yra aptikti du motyvai, kurie suriša FAD kofaktorių (Schreuder et al., 1989; Enroth et al., 1998), ir motyvas, prisijungiantis NADPH (Wang et al., 2002).

Fenolio monooksigenazės dalyvauja tolueno, ksileno, naftaleno ir kitų junginių bioskaidyme bei hidroksilina fenolį susidarant katecholiui (Shingler et al., 1992; Merimaa et al., 2006). Keletas A klasės monooksigenazių dalyvauja ir *N*-heterociklinių junginių oksidacijoje. Pavyzdžiui, 2,6-dihidroksipiridino-3-hidroksilazė iš *Arthrobacter nicotinovorans* bakterijų katalizuoja 2,6-dihidroksipiridino hidroksilinimą ir yra vienas iš alkaloido nikotino biodegradacijos fermentų (Brandsch, 2006). A klasei taip pat priskiriamos 2-metil-3-hidroksipiridin-5-karboksirūgšties oksigenazė (MHPCO) ir 5-piridinoksorūgšties oksigenazė (5PAO), dalyvaujančios bakteriniame vitamino B₆ skaidyme. Nors nustatyta, kad šie fermentai priklauso flavino monooksigenazių A klasei (Chaiyen, 2010), dėl unikalios jų katalizuojamos reakcijos šioje apžvalgoje jie detaliau aprašyti 1.3.3.3. skyriuje.

B klasės monooksigenazės taip pat yra koduojamos vieno geno, turi tvirtai surištą FAD kofaktorių ir yra priklausomos nuo NADPH. Šių fermentų struktūroje aptinkami du *Rossmann fold* domenai, vienas FAD surišantis ir vienas NADPH domenas. Šios klasės fermentai katalizuoja Baeyer–Villiger oksidacijos reakcijas ir azoto oksidaciją.

C klasės monooksigenazės sudarytos iš vieno arba dviejų oksigenazės ir vieno reduktazės komponentų, koduojamų atskirų genų. Fermento oksigenazės komponento tretinė struktūra sudaro TIM-statinaitę. Oksigenazė reakcijos metu naudoja redukuotą FMN, pateikiamą reduktazės, kuri FMN redukcijai gali panaudoti NADH ir / arba NADPH. Didžiausią C klasės monooksigenazių grupę sudaro bakterinės liuciferazės, kurios oksiduoja ilgų grandinų alifatinius aldehidus, reakcijos metu išskirdamos šviesą. Liuciferazės iš *Vibrio harveyi* tretinė struktūra parodė, kad abu oksigenazės subvienetai sudaro TIM-statinaitės struktūras (Baldwin et al., 1995), tačiau tik viename iš jų yra aktyvusis fermento centras. Šiai monooksigenazių klasei taip pat priklauso *Pseudomonas putida* ATCC 17453 monooksigenazės, katalizuojančios Baeyer–Villiger oksidacijos reakciją, kurios metu skaidomas terpenoidas kamparas (Taylor ir Trudgill, 1986), bei EDTA skaidyme dalyvaujanti nitrilotriacetato monooksigenazė (Xu et al., 1997).

D klasei priskiriamos monooksigenazės, sudarytos iš vieno oksidazės ir vieno reduktazės komponentų, kuriuos koduoja atskiri genai. Oksidazė kaip kofaktorių naudoja redukuotą FAD, kurį pateikia reduktazė. FAD redukcijai reduktazė gali panaudoti NADH ir / arba NADPH. Žinomos tik hidroksilinimo reakcijas katalizuojančios šiai klasei priklausančios monooksigenazės. Jos gali hidroksilinti įvairius aromatinius junginius, tokius kaip 4-hidroksifenilacetatas, fenolis, 4-nitrofenolis ir 2,4,5-trichlorfenolis (van Berkel et al., 2006).

Gerai ištirtas D klasės fermentas yra 4-hidroksifenilacetato (4HPA) 3-monooksigenazė, dalyvaujanti pradiniam 4HPA skaidymo etape daugelyje bakterijų, tokių kaip *E. coli* W (Galán et al., 2000), *Acinetobacter baumannii* (Chaiyen et al., 2001), *Thermus thermophilus*, *Pseudomonas putida* ar *Klebsiella pneumoniae* (Kim et al., 2007). Fermentas, sudarytas iš oksidazės (HpaB) ir reduktazės (HpaC), katalizuoja 4HPA hidroksilinimą, susidarant 3,4-dihidroksifenilacetatui. Buvo nustatyta iš *Thermus thermophilus* išskirto HpaB trijų būsenų tretinė struktūra: be substratų, komplekse su FAD bei komplekse su FAD ir 4HPA. Nustatyta, kad prisijungus FAD, keičiasi baltymo konformacija substratą surišančiame domene. Prijungus 4HPA, konformacija

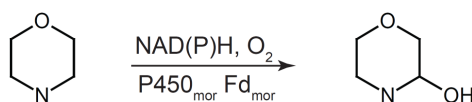
keičiasi toliau ir yra uždengiamas aktyvusis centras. Manoma, kad susidarant C(4a)-hidroperoksiflavinui ir jį stabilizuojant dalyvauja šalia hipotetinio deguonį surišančio centro esanti arginino liekana (Kim et al., 2007).

1.3.2.5. *Citochromo P450 monooksigenazės*

Citochromo P450 tipo fermentai – tai aktyviame centre hemą turinčios monooksigenazės, kurios naudojamos NAD(P)H katalizuoja labai įvairių substratų hidroksilinimo reakcijas. Bakterinės citochromo P450 monooksigenazės dažniausiai yra sudarytos iš trijų komponentų: P450 monooksigenazės, feredoksino ir FAD turinčios reduktazės (Roberts et al., 2002). FAD turinti reduktazė oksiduoja NAD(P)H ir perduoda elektronus per feredoksiną P450 monooksigenazės aktyviajame centre esančiam hemui. Redukuotas hemas aktyvuoja molekulinį deguonį ir vieną jo atomą įjungia į substratą, o kitą redukuoja iki vandens (Degtyarenko, 1995). Žinduolių citochromai P450 gali hidroksilinti įvairius aromatinius junginius (Danielson, 2002), o dauguma bakterinių P450 monooksigenazių dalyvauja antrinių metabolitų, pavyzdžiui, antibiotikų, sintezėje (Shafiee ir Hutchinson, 1988; Boddupalli et al., 1990). Kol kas nėra žinoma P450 monooksigenazių, hidroksilinančių aromatinius *N*-heterociklinius junginius.

Vis dėlto kai kurie autoriai mano, kad P450 monooksigenazės galėtų dalyvauti alkilpirazinų skaidyme (Rappert et al., 2006; Rappert et al., 2007; Müller ir Rappert, 2010). Taip pat šiuo metu yra žinomos iš *Mycobacterium* spp. išskirtos P450 monooksigenazės, dalyvaujančios skaidant nearomatinius heterociklinius junginius, tokius kaip morfolinas, tiomorfolinas, piperidinas ir pirolinas (Combourieu et al., 1998; Poupin et al., 1998; Sielaff et al., 2001).

Mycobacterium sp. HE5 gali panaudoti morfoliną kaip vienintelį anglies, azoto ir energijos šaltinį (Sielaff et al., 2001). Nustatyta, kad bakterijoms



1.4 pav. Citochromo P450 monooksigenazės katalizuojama morfolino hidroksilinimo reakcija (Poupin et al., 1998; Sielaff et al., 2001).

naudojant morfoliną, indukuojama citochromo P450_{mor} ir feredoksino Fd_{mor} sintezė. Pradiniame morfolino skaidymo etape citochromo P450 monooksigenė hidroksilina jį iki 2-hidroksimorfolino (1.4 pav.) (Poupin et al., 1998; Poupin et al., 1999; Sielaff et al., 2001).

Mycobacterium smegmatis mc²155 bakterijos gali skaidyti piperidiną ir pirolidiną. Nustatyta, kad šių heterociklų skaidyme dalyvauja *pipA* geno koduojama citochromo P450 monooksigenazė (Poupin et al., 1999).

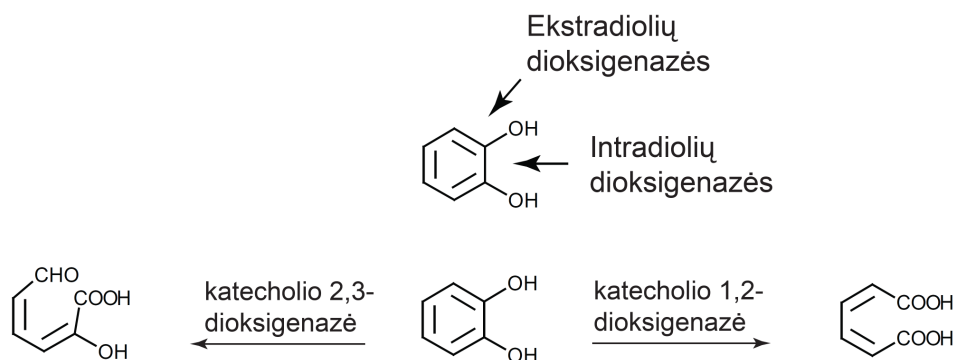
1.3.3. Aromatinį žiedą skeliantys fermentai

1.3.3.1. Katecholių dioksigenazės

Pradinėse aromatinių junginių skaidymo reakcijose, veikiant molibdeninėms dehidrogenazėms, monooksigenazėms ar žiedą hidroksilinančioms dioksigenazėms susidaro di- ar trihidroksilinti metabolitai, kuriuos toliau atpažįsta aromatinį žiedą atidarantys fermentai.

Gerai ištirtos aromatinį žiedą atidaranti dioksigenazės, kurios dalyvauja benzeno, stireno ir kitų aromatinių junginių bioskaidyme. Dauguma aromatinių angliavandenilių, nepaisant jų skirtingos struktūros, yra skaidomi susidarant vienam iš trijų dihidroksilintų tarpinių metabolitų – katecholio (1,2-dihidroksibenzenas), protokatechuato (3,4-dihidroksibenzoatas) arba gentizato (2,5-dihidroksibenzoatas). Šiuos junginius atpažįsta žiedą atidaranti dioksigenazės, dalyvaujančios paskutiniame aromatinių junginių skaidymo etape. Jos katalizuoja oksidacinį dvigubo ryšio skėlimą dihidroksilintame aromatiname junginyje, įjungdamos abu deguonies atomus iš O₂ molekulės. Atsižvelgiant į tai, kuri ryšį hidroksigrupių atžvilgiu skelia, šios dioksigenazės skirstomos į intradiolių ir ekstradiolių dioksigenazes (1.5 pav.).

Intradiolinės dioksigenazės, kurioms priklauso katecholio 1,2-dioksigenazė, žiedą skelia tarp dviejų šalia esančių hidroksigrupių, susidarant bespalviams *cis,cis*-mukono rūgšties dariniams (Hirano et al., 2007). Ekstradiolinės dioksigenazės, kurioms priklauso katecholio 2,3-dioksigenazė, žiedą skelia šalia hidroksigrupių, susidarant geltonos spalvos hidroksimukono pusiau aldehydams (Hirano et al., 2007).



1.5 pav. Ekstradiolių ir intradiolių dioksigenazių katalizuojamos reakcijos. Ekstradiolinės dioksigenazės (pvz., katecholio 2,3-dioksigenazė) skelia žiedą šalia vienos iš hidroksigupių, o intradiolinės dioksigenazės (pvz., katecholio 1,2-dioksigenazė) skelia žiedą tarp hidroksigrupių.

Tiek intradiolinės, tiek ekstradiolinės dioksigenazės yra neheminės Fe oksigenazės, tačiau jų aktyvieji centrai yra skirtingi. Intradiolių dioksigenazių aktyviajame centre Fe(III) joną kompleksuoja dvi histidino ir dvi tirozino aminorūgščių liekanos, tuo tarpu ekstradiolių dioksigenazėse metalo joną kompleksuoja du histidiniai ir viena asparto arba glutamo rūgšties liekana. Be to, ekstradiolių dioksigenazėse kartais aptinkamas ne Fe(II), o Mn jonas. Skiriasi ir šių tipų dioksigenazių aktyviajame centre vykstantys oksidacijos iniciacijos mechanizmai. Intradiolių dioksigenazėse prie aktyviojo centro Fe(III) jungiasi substratas, kuris yra aktyvuojamas ir elektrofiliškai atakuoja O₂ molekulę. Ekstradiolių dioksigenazėse, prisijungus organiniam substratui, Fe jonas prisijungia O₂ molekulę, susidarant superoksido tarpininkui, kuris nukleofiliškai atakuoja katecholį (Costas et al.; Vaillancourt et al., 2006).

Katecholių dioksigenazės, dalyvaujančios organinių junginių bakteriniame skaidyme, yra detaliai ištirtos – žinomi jas koduojantys genai, nustatytos tretinės baltymų struktūros, išanalizuoti veikimo mechanizmai. Tuo tarpu *N*-heterociklinių junginių žiedą atidaranti dioksigenazė ištirta menkai. Daugelio piridino junginių skaidymo metu susidaro 2,5-dihidroksipiridinas, kuris toliau skaidomas 2,5-dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazės iki *N*-formilmaleamo rūgšties. 2,5-Dihidroksipiridinas kaip tarpinis metabolitas *N*-heterociklinių junginių metabolizme yra gana dažnas. Jis susidaro bakterijoms skaidant 2-hidroksipiridiną, 2-karboksipiridiną, 3-

karboksipiridiną, nikotiną, piridin-2-karboksamidą ar 5-hidroksipikolino rūgštį (Kaiser et al., 1996; Fetzner, 1998; Karvelis et al., 2013) ir beveik visais atvejais tolesnį jo skaidymą vykdo 2,5-dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazė.

2,5-Dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazė iš *Pseudomonas putida* N9 yra heksamerinis 240 kDa baltymas (sudarytas iš 39 kDa monomerų), kuris kiekvienam monomerui turi po Fe atomą (Gauthier ir Rittenberg, 1971a, b). Nors šis fermentas buvo nustatytas gana seniai (Behrman ir Stanier, 1957) ir yra detaliam aprašytas, ilgai nebuvo duomenų apie jį koduojantį geną. 2008 m. 2,5-dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazės genas *nicX* nustatytas nikotino rūgštį (piridin-3-karboksirūgštį) skaidančiose *Pseudomonas putida* KT2440 bakterijose (Jiménez et al., 2008). Nustatyta, kad NicX neturi sekos panašumų su žinomomis katecholių dioksigenazėmis ir atstovauja visiškai naujai dioksigenazių klasei. NicX aminorūgščių seka yra homologiška metalopeptidazėms, priklausančioms MQ šeimai. Pagal homologus sudarytas tretinės struktūros modelis atskleidė, kad C-galiniame domene yra potencialus Fe(II) surišimo centras sudarytas iš His265, His318, ir Asp320 aminorūgščių liekanų. Toks Fe(II) surišantis motyvas yra būdingas ekstradiolių žiedą skeliančioms dioksigenazėms. Dėl savo struktūros 2,5-dihidroksipiridinas gali turėti kelias tautometines formas, o būdamas keto-enolinėje formoje yra panašus į natūralų peptidazių substratą (Jiménez et al., 2008). Neseniai NicX baltymą pavyko iškristalinti (Jiménez et al., 2010), todėl tikėtina, kad artimiausiu metu 2,5-dihidroksipiridino 5,6-dioksigenazės katalizuojamos reakcijos mechanizmas bus išnagrinėtas dar detaliau.

1.3.3.2. Kofaktoriaus neturinčios dioksigenazės, išskiriančios CO

Anglies monoksidą išskiriančios 2,4-dioksigenazės, skirtingai nei katecholių dioksigenazės, kurios deguonies aktyvavimui ir substrato oksidacijai naudoja Fe joną, neturi nei metalo jonų, nei organinių kofaktorių. Tačiau jos taip pat katalizuoja heterociklinio žiedo skaidymą, į substratą įjungdamos abu molekulinio deguonies atomus. Žiedas atidaromas įjungiant deguonies molekulę į C-2 ir C-4 padėtis, taip suskaidant du C-C ryšius ir

išsiskiriant anglies monoksidui (Bauer et al., 1994; Bauer et al., 1996). Šiuo metu yra žinomi du šios fermentų klasės baltymai.

Arthrobacter nitroguajacolicus Rū61a bakterijose 2-metilchinolino (chinaldino) metabolinio kelio 1*H*-3-hidroksi-4-oksochinaldino 2,4-dioksigenazė (Hod) oksiduoja 2-metil-3-hidroksi-4(1*H*)-chinoloną, išsiskiriant CO ir susidarant *N*-acetilantranilatui (Hund et al., 1990; Bauer et al., 1994).

Iš 4(1*H*)-chinoloną skaidančių *Pseudomonas putida* 33/1 bakterijų išskirta 2,4-dioksigenazė Qdo (Bott et al., 1990) yra homologiška Hod (37 % identiškų aminorūgščių (Max et al., 1999)) ir katalizuoja 3-hidroksi-4(1*H*)-chinolono skaidymą iki CO ir *N*-formilantranilato. Hod (32 kDa) ir Qdo (30 kDa) yra monomeriniai baltymai, nepanašūs į jokias kitas žinomas oksigenazes, ir priklauso α/β hidrolazių superšeimai (Fischer ir Fetzner, 2000). Šie baltymai struktūriškai yra labai panašūs, jų struktūroje išskiriami šerdies ir kepurės domenai. Hod Ser101, His251 ir Asp126 bei Qdo Ser95, His244 ir Asp120 aminorūgščių liekanos, išsidėsčiusios tarp šerdies ir kepurės domenu, sudaro aktyviojo centro nukleofilo/histidino/rūgšties katalizinę triadą, būdingą α/β hidrolazėms (Steiner et al., 2010). Skirtingai nei lipazėms ar serino proteazėms, Hod ir Qdo serino liekana nėra absoliučiai būtina fermento veikimui ir manoma, kad ji dalyvauja surišant substratą arba stabilizuojant tarpinius reakcijos produktus (Steiner et al., 2010).

Struktūriniai ir kinetiniai duomenys rodo, kad 2,4-dioksigenazėse vyksta ne nukleofilinė serino ataka, o bazės inicijuojama katalizė. Pasiūlytas mechanizmas, pagal kurį His ir Asp liekanos prisijungia substrato protoną, taip susidarant substrato anijonui. Tuomet laisvas substrato elektronas tiesiogiai perduodamas deguonies molekulei ir susidaro [3,4-dioksi-2-metilchinolino radikalo–superoksido anijono] radikalų pora, kuri persigrupuoja susidarant C2- (arba C4-) peroksido anijonui. Po vidumolekulinės atakos susidaro endoperoksidas, kuris toliau skyla į galutinius produktus (Fetzner ir Steiner, 2010). Priešingai nei Fe ar flavinus aktyviajame centre turintys fermentai, oksidacijos reakcijos metu aktyvuojantys molekulinį deguonį, 2,4-dioksigenazės katalizuodamos žiedo skėlimo reakciją aktyvuoja savo substratą.

1.3.3.3. Žiedą skeliančios monooksigenazės

2-Metil-3-hidroksipiridino-5-karboksilinės rūgšties oksigenazė (MHPCO) ir 5-piridoksirūgšties oksigenazė (5PAO) sudaro išskirtinę aromatinį žiedą skeliančių monooksigenazių grupę. Šios flavinus naudojančios monooksigenazės dalyvauja *N*-heterociklinių žiedų skaidyme, prijungdamos prie substrato du deguonies atomus. Dėl reakcijos produkto struktūros iš pradžių šie fermentai buvo priskirti dioksigenazėms, bet MHPCO sekos analizė ir tretinė struktūra rodo, kad fermentas priklauso flavino monooksigenazėms. Tiriant veikimo mechanizmą ir naudojant sunkiuoju izotopu žymėtą O₂ nustatyta, kad abu fermentai katalizuoja vieno deguonies atomo iš O₂ molekulės įjungimą į substratą, o antrasis deguonies atomas įjungiamas, kai vandens molekulė atakuoja vieną iš pereinamojo būvio tarpininkų aktyviajame fermento centre (Chaiyen, 2010).

1.3.4. *N*-heterociklinių junginių skaidymas redukuojant

Šiuo metu žinomi vos keli atvejai, kai aerobinis *N*-heterociklinių junginių skaidymas prasideda ne hidroksilinant žiedą, o jį redukuojant. Manoma, kad būtent tokiu keliu vyksta piridino skaidymas *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia* genčių bakterijose bei 2-metilpiridino skaidymas *Arthrobacter* bakterijose (Fetzner, 1998). Tačiau, nors piridinių skaidymas tyrinėjamas jau beveik 40 metų, fermentai, dalyvaujantys piridinių redukcijoje, vis dar nenustatyti.

Rajini su kolegomis išskirtos *Stenotrophomonas* sp. HCU1 bakterijos skaido pirazin-2-karboksirūgštį ir gali naudoti ją kaip vienintelį azoto šaltinį (Rajini et al., 2010). Pradinis pirazin-2-karboksirūgšties katabolizmo etapas yra redukcijos reakcija, po kurios seka žiedo atidarymas susidarant 2-amino-2-hidroksi-3-(metilamino)propiono rūgščiai. Pirazin-2-karboksirūgšties redukcijos reakciją katalizuoja 65 kDa heterodimerinis baltymas, sudarytas iš 43 kDa ir 22 kDa subvienetų. Šis fermentas redukuoja pirazin-2-karboksirūgštį, kofaktoriumi naudodamas NADPH, susidarant redukuotam produktui – 1,2,5,6-tetrahidropirazin-2-karboksilatui. Fermentas veikia

optimaliai, esant pH 7,4 ir 30 °C temperatūrai, nustatyta K_m 0,475 mM ir V_{max} 18,2 mAU/ μ g min⁻¹. Ši reduktazė taip pat geba redukuoti piraziną, nikotino rūgštį, guaniną, uracilą bei imidazolą. Kol kas nedaug žinoma apie pirazino rūgšties reduktazės panašumą į kitus fermentus. *De novo* MS/MS sekoskaitos būdu buvo gautos 5 peptidų sekos, iš kurių keturios turi panašumų su 2-metiltioadenilato sintaze, aromatinių aminorūgščių aminotransferaze, hipotetine oksidoreduktaze ir piridino nukleotidų transhidrogenaze (Rajini et al., 2010). Deja, šie trumpi sekos fragmentai suteikia nedaug informacijos apie visą aminorūgščių seką, todėl šio fermento panašumas su kitomis reduktazėmis ar hipotetinis veikimo mechanizmas kol kas lieka neaiškus. Belieka laukti naujų duomenų apie šį unikalią reakciją katalizuojantį fermentą.

1.3.5. Pirazinus skaidantys fermentai

Žinios apie pirazinų skaidyme dalyvaujančius fermentus yra itin menkos. Išskirtų ir charakterizuotų pirazino metabolizmo fermentų kol kas nėra. Žinoma, kad 2,5-dimetilpirazino ir 2,3-dietil-5-metilpirazino skaidymas vyksta tik aerobinėmis sąlygomis. Parodyta, kad ir hidroksilinimo reakcijai, ir po jos vykstančiai pirazino žiedo atidarymo reakcijai reikalingas molekulinis deguonis, todėl manoma, kad dalyvaujantys fermentai yra oksigenazės (Rappert et al., 2006; Rappert et al., 2007). Tiriant 2,5-dimetilpirazino skaidymą *Rhodococcus erythropolis* DP-45 bakterijose, buvo tikrinta slopiklių įtaka substrato skaidymui (Rappert et al., 2007). Buvo naudoti slopikliai, veikiantys žinomas *N*-heterociklinių junginių skaidyme dalyvaujančių fermentų grupes. Remiantis šio tyrimo rezultatais, buvo nuspręsta, kad 2,5-dimetilpirazino hidroksilinimą vykdo flavininė monooksigenazė arba nuo citochromo P450 priklausanti monooksigenazė ir atmesta galimybė, kad reakciją galėtų katalizuoti nuo molibdeno priklausantys fermentai, dažnai dalyvaujantys kitų *N*-heterociklinių junginių hidroksilinimo reakcijose (Fetzner, 2000, 2002). Buvo pasiūlytas mechanizmas, pagal kurį tolimesnėje žiedo atidarymo reakcijoje dalyvauja citochromo P450 šeimos fermentas, kadangi flavininių ir molibdeninių fermentų slopikliai neturėjo įtakos šiam

skaidymo etapui. Mažai tikėtina, kad pirazino žiedą skaidytų 2,4-dioksigenazės, dalyvaujančios piridino žiedo skaidyme (Bauer et al., 1996; Fischer ir Fetzner, 2000), kadangi pirazinuose 4-oje žiedo padėtyje yra azotas, o jo hidroksilinimas yra mažai tikėtinas (Müller ir Rappert, 2010). Analogiško slopiklių tyrimo *Mycobacterium* sp. DM-11 bakterijose, skaidančiose 2,3-dietil-5-metilpiraziną, rezultatai buvo identiški aprašytiems 2,5-dimetilpirazino atveju (Rappert et al., 2006).

Apibendrinant literatūros duomenis, akivaizdu, kad šiuo metu pirazinų, ypač TTMP, skaidymas ir jo metaboliniai keliai yra itin menkai ištirti. Pastaruoju metu greitai besivystantys didelės apimties sekoskaitos ir proteominės analizės metodai suteikia naujų galimybių užpildyti žinių spragas apie bakterinio skaidymo biocheminius mechanizmus, dalyvaujančius fermentus ir juos koduojančius genus. Nustatyti TTMP bakterinio metabolizmo mechanizmai atskleistų naujus metabolinius kelius, kurių fermentai potencialiai galėtų būti taikomi į TTMP panašių junginių biokonversijoms. Tarpiniai *N*-heterociklinių junginių metabolitai yra naudingas stereospecifinių cheminės sintezės komponentų šaltinis ir gali būti pritaikyti sintetinant įvairias biologiškai ir farmakologiškai aktyvias chemines medžiagas (Fetzner, 1998). Dėl pateiktų priežasčių šiame darbe buvo ištirtas bakterinis TTMP skaidymas ir nustatytas jo metabolinis kelias.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

Reagentai	Gamintojas
5-brom-4-chlor-indolil-β-D-galaktopiranozidas (X-gal), izopropil-β-D-galaktopiranozidas (IPTG), restrikcijos endonukleazės ir jų buferiniai tirpalai, T4 ligazė, CIAP, FastAP, T4 polinukleotidkinazė, proteinazė K, DNazė I, RNazė A, DNR išskyrimo iš gelio rinkinys, <i>Gene Ruler DNA ladder Mix</i> ir <i>MassRuler High Range DNA Ladder</i> DNR molekulinės masės žymenys, <i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i> baltymų molekulinės masės žymenys, <i>Maxima Hot Start Green PCR Master Mix</i> , <i>Pfu DNA Polymerase</i> , <i>Long PCR Enzyme Mix</i> , <i>InsT/Aclone</i> PGR produktų klonavimo rinkinys, <i>Verso 1-step QRT-PCR mix</i> RT-PGR rinkinys, DNR sekos nustatymo rinkinys su Taq Reader DNR polimeraze.	Fermentas – Thermo Fisher Scientific, Lietuva
<i>ZYMO Plasmid PREP</i> plazmidinės DNR skyrimo rinkinys, <i>ZR Soil/Fecal RNA MicroPrep</i> RNR skyrimo rinkinys.	Zymo Research Corp., JAV
PGR pradmenys.	Metabion, Vokietija
Mielių ekstraktas, NA (<i>nutrient agar</i>), NB (<i>nutrient broth</i>), BHI (<i>brain-heart infusion broth</i>).	Oxoid, Anglija
Tetrametilpirazinas, 2,3,5-trimetilpirazinas, 2,3-dimetilpirazinas, 2,5-dimetilpirazinas, 2,6-dimetilpirazinas, 5,6-dimetil-2,3-pirazindikarbonitrilas, pirazinas, 2,3-dietil-5-metilpirazinas, 2-metilpiridinas, 3-metilpiridinas, 4-metilpiridinas, 2,6-dikarboksipiridinas, 3-metilpiridazinas, 2,3-dihidro-7-azaindolas, 3,5-dimetilpiridin-2-karbonitrilas, 3-metilpiridin-2-karbonitrilas, 4-metilpiridin-2-karbonitrilas, 2,4-piridindikarbonitrilas, 2-metil-6-cianopiridinas, 2,6-piridindikarbonitrilas, 6-amino-3-metilpiridinas, 2-amino-3-metilpiridinas, 2-amino-4,6-metilpiridinas, 2-amino-4-metilpiridinas, 2,3-ciklopentenopiridinas, 2,4,6-trimetilpiridinas, 2,3,5-trimetilpiridinas, 3,5-dimetilpiridinas, 3,4-dimetilpiridinas, 2,6-dimetilpiridinas, 2,5-dimetilpiridinas, 2,4-dimetilpiridinas, 2,3-dimetilpiridinas, 2-etilpiridinas, ¹⁸ O žymėtas vanduo, plonasluoksnės chromatografijos plokštelės, acetonitrilas, natrio dodecilsulfatas, Neslerio reagentas, lizocimas, tiostreptonas.	Sigma-Aldrich, Vokietija
Agaras, dimetilformamidas, nikotinas, p-nitroanilinas.	Merck, Vokietija

Reagentai	Gamintojas
Bromfenolio m̄elis, Na ₂ CO ₃ , Na ₂ HPO ₄ , NaOH, natrio acetatas, amonio acetatas, kalio acetatas, gliukozė, glicerolis, β-merkaptioetanolis, chinolino rūgštis, dimetildichlorsilanas, ampicilinas, tetraciklinas.	Fluka, Vokietija
NaCl, KCl, NH ₄ Cl, CaCl ₂ ×2H ₂ O, MgCl ₂ , K ₃ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ ×7H ₂ O, FeSO ₄ ×7H ₂ O, MnSO ₄ ×4H ₂ O, (NH ₄) ₂ SO ₄ , NaNO ₂ , ftalio rūgštis, gintaro rūgštis, piridinas, chloroformas.	Reachim, Rusija
Akrilamidas, etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA), fenolio-chloroformo mišinys, stiklo rutuliukai 0,1 mm.	Roth, Vokietija
Agarozė, etidžio bromidas, chloramfenikolis.	Serva, Vokietija
Kanamicinas, tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris).	AppliChem, Vokietija
Acto rūgštis.	Chempur, Lenkija
Etanolis.	Vilniaus degtinė, Lietuva
[γ- ³² P]ATF.	Amersham Biosciences, JAV

2.1.2. Bakterijos

Bakterijos	Genotipas, savybės	Šaltinis
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_K⁻</i> , <i>m_K⁺</i>) <i>phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i> .	Pharmacia, JAV
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3); bakterijos baltymų raiškai.	Avidis, Prancūzija
<i>Escherichia coli</i> Rosetta (DE3)	Cm ^r , koduoja šešias retas tRNR; pagerina genų su <i>E. coli</i> bakterijoms nebūdingais kodonais raišką.	Novagen, Vokietija
<i>Rhodococcus jostii</i> TMP1	Tetrametilpiraziną skaidančios bakterijos.	(Kutanovas, 2008)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> SQ1	Lengviau transformuojamas ATCC4277-1 bakterijų mutantas.	(Quan ir Dabbs, 1993)
<i>Arthrobacter globiformis</i>	NRRL B-2979.	ARS culture collection, JAV
<i>Arthrobacter citreus</i>	Laukinio tipo bakterijos	ARS culture collection, JAV
<i>Arthrobacter</i> sp. PY21	2-hidroksipiridiną skaidančios bakterijos	(Semėnaitė et al., 2003)
<i>Arthrobacter</i> sp. 68b	2-metilpiridiną skaidančios bakterijos	(Stanislauskienė et al., 2012)
<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> 25DOT1	2,5-dimetilpiraziną skaidančios bakterijos	(Kutanovas, 2008)

2.1.3. Plazmidės

Plazmidė	Savybės/klonavimo schema	Šaltinis
pUC19	Ap ^r , oriColE1, lacZα; klonavimo vektorius.	(Sambrook ir Russell, 2001)
pTZ57R/T	Ap ^r , oriColE1, lacZα; PGR produktų klonavimui.	Fermentas, Lietuva
pET-21b(+)	Ap ^r , T7 promotorius; poli-His seka baltymo C gale.	Novagen, Vokietija
pART2	Km ^r , <i>E. coli</i> – <i>A. nicotinovorans</i> hibridinis vektorius; nuolatinei raiškai <i>Arthrobacter</i> spp. bakterijose.	(Sandu et al., 2005)
pART3- <i>gfp</i>	Km ^r , <i>E. coli</i> – <i>A. nicotinovorans</i> hibridinis vektorius; nikotinu indukuojamai EGFP raiškai <i>Arthrobacter</i> spp. bakterijose.	(Sandu et al., 2005)
pART2- <i>gfp</i>	Km ^r , <i>E. coli</i> – <i>A. nicotinovorans</i> hibridinis vektorius, nuolatinei EGFP raiškai <i>Arthrobacter</i> spp. bakterijose.	(Sandu et al., 2005)
pTip-QC1	Cm ^r , poli-His sekos baltymo C ir N galuose; tiostreptonu valdomai rekombinantinių baltymų raiškai <i>Rhodococcus</i> spp. bakterijose.	(Nakashima ir Tamura, 2004a)
pTip-QC2	Cm ^r , poli-His sekos baltymo C ir N galuose; tiostreptonu valdomai rekombinantinių baltymų raiškai <i>Rhodococcus</i> spp. bakterijose.	(Nakashima ir Tamura, 2004a)
pUC19-H1	7 kb <i>R. jostii</i> TMP1 geno HindIII fragmentas su <i>tpdABC</i> genais klonuotas į pUC19 vektorių, per HindIII restrikcijos endonukleazės atpažinimo seką.	Šis darbas
pART3-5'UTR- <i>gfp</i>	267 bp prieš <i>tpdA</i> geną esantis fragmentas padaugintas PGR būdu naudojant 5'UTR_F ir 5'UTR_R pradmenis ir klonuotas per BamHI restrikcijos endonukleazės atpažinimo seką į pART3- <i>gfp</i> vektorių.	Šis darbas
pART3-UTR247- <i>gfp</i>	Pradmenys UTR247 ir 5'UTR_R; fragmentas 247 bp; konstruota kaip pART3-5'UTR- <i>gfp</i> .	Šis darbas
pART3-UTR227- <i>gfp</i>	Pradmenys UTR227 ir 5'UTR_R; fragmentas 227 bp; konstruota kaip pART3-5'UTR- <i>gfp</i> .	Šis darbas
pART3-UTR207- <i>gfp</i>	Pradmenys UTR207 ir 5'UTR_R; fragmentas 207 bp; konstruota kaip pART3-5'UTR- <i>gfp</i> .	Šis darbas
pART3-UTR187- <i>gfp</i>	Pradmenys UTR187 ir 5'UTR_R; fragmentas 187 bp; konstruota kaip pART3-5'UTR- <i>gfp</i> .	Šis darbas
pART3-UTR157- <i>gfp</i>	Pradmenys UTR157 ir 5'UTR_R; fragmentas 157 bp; konstruota kaip pART3-5'UTR- <i>gfp</i> .	Šis darbas

Plazmidė	Savybės/klonavimo schema	Šaltinis
pART3-UTR138- <i>gfp</i>	Pradmenys UTR138 ir 5'UTR_R; fragmentas 138 bp; konstruota kaip pART3-5'UTR- <i>gfp</i> .	Šis darbas
pART3-UTR110- <i>gfp</i>	Pradmenys UTR110 ir 5'UTR_R; fragmentas 110 bp; konstruota kaip pART3-5'UTR- <i>gfp</i> .	Šis darbas
pART3-5'UTR- <i>gfp</i> -R	<i>tpdR</i> genas su priešgenine sritimi pagaugintas PGR būdu naudojant <i>tpdR_F</i> ir <i>tpdR_R</i> pradmenis ir klonuotas į pTZ57R/T vektorių. 3 kb XbaI fragmentas perklonuotas į pART-UTR187- <i>gfp</i> vektorių per XbaI restrikcijos endonukleazės atpažinimo seką.	Šis darbas
pART2- <i>tpdA</i>	<i>tpdA</i> genas padaugintas PGR būdu naudojant <i>tpdA_F</i> ir <i>tpdA_R</i> pradmenis ir klonuotas per BamHI restrikcijos endonukleazės atpažinimo seką į pART2 vektorių.	Šis darbas
pART2- <i>tpdB</i>	<i>tpdB</i> genas padaugintas PGR būdu naudojant <i>tpdB_F</i> ir <i>tpdB_R</i> pradmenis ir klonuotas per BamHI restrikcijos endonukleazės atpažinimo seką į pART2 vektorių.	Šis darbas
pART2- <i>tpdC</i>	<i>tpdC</i> genas padaugintas PGR būdu naudojant <i>tpdC_F</i> ir <i>tpdC_R</i> pradmenis, hidrolizuotas BglII ir KpnI ir klonuotas per BamHI ir KpnI restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekas į pART2 vektorių.	Šis darbas
pART2- <i>tpdAB</i>	<i>tpdAB</i> fragmentas padaugintas PGR būdu naudojant <i>tpdA_F</i> ir <i>tpdB_R</i> pradmenis ir klonuotas per BamHI restrikcijos endonukleazės atpažinimo seką į pART2 vektorių.	Šis darbas
pART2- <i>tpdBC</i>	<i>tpdBC</i> fragmentas padaugintas PGR būdu naudojant <i>tpdB_F</i> ir <i>tpdC_R</i> pradmenis ir klonuotas per EcoRV ir KpnI restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekas į pART2 vektorių.	Šis darbas
pART2- <i>tpdABC</i>	<i>tpdBC</i> fragmentas padaugintas PGR būdu naudojant <i>tpdB_F</i> ir <i>tpdC_R</i> pradmenis ir klonuotas per EcoRV ir KpnI restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekas į pART2- <i>tpdAB</i> konstrukta.	Šis darbas
pET- <i>tpdE</i>	<i>tpdE</i> genas padaugintas PGR būdu naudojant <i>tpdE_F</i> ir <i>tpdE_R</i> pradmenis ir klonuotas per NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekas į pET-21b(+) vektorių.	Šis darbas

Plazmidė	Savybės/klonavimo schema	Šaltinis
pET- <i>tpdC</i>	<i>tpdC</i> genas padaugintas PGR būdu naudojant <i>tpdC_F2</i> ir <i>tpdC_R2</i> pradmenis ir klonuotas per NdeI ir EcoRI restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekas į pET-21b(+) vektorių.	Šis darbas
pET- <i>tpdC</i> -His ₆	<i>tpdC</i> genas padaugintas PGR būdu naudojant <i>tpdC_F2</i> ir <i>tpdC_R3</i> pradmenis ir klonuotas per NdeI ir HindIII restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekas į pET-21b(+) vektorių.	Šis darbas
pART2- <i>tpdC</i> -His ₈	<i>tpdC</i> genas padaugintas PGR būdu naudojant <i>tpdC_F</i> ir <i>tpdC_R4</i> pradmenis, hidrolizuotas BglII ir XbaI ir klonuotas per BamHI ir XbaI restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekas į pART2 vektorių.	Šis darbas
pTipQC- <i>tpdC</i>	<i>tpdC</i> genas padaugintas PGR būdu naudojant <i>tpdC_F2</i> ir <i>tpdC_R2</i> pradmenis ir klonuotas per NdeI ir EcoRI restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekas į pTip-QC2 vektorių.	Šis darbas
pTipQC-His ₆ - <i>tpdC</i>	<i>tpdC</i> genas padaugintas PGR būdu naudojant <i>tpdC_F2</i> ir <i>tpdC_R2</i> pradmenis ir klonuotas per NdeI ir EcoRI restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekas į pTip-QC1 vektorių.	Šis darbas

2.1.4. RT-PGR pradmenys

Pradmuo	Seka 5'–3'	Taikinys
A_F	ATCGTCGGTACTTCGACATG	<i>tpdA</i>
A_R	CGTTCCGAGCTCGATACG	<i>tpdA</i>
B_F	CCATTCAGGAGACCTGAGC	<i>tpdB</i>
B_R	CTTCGATGGAGAAGTTCTCG	<i>tpdB</i>
C_F	GTCACGACTCACTACTCATG	<i>tpdC</i>
C_R	CACGAGTCCGGTATGACAG	<i>tpdC</i>
D_F	GGAATGGTCAATGTCTGTCG	<i>tpdD</i>
D_R	GTGCCTACTGACGTGTGC	<i>tpdD</i>
E_F	ACGGAACCTTCTACTGCAC	<i>tpdE</i>
E_R	GTATCGATGCGTCGTACATC	<i>tpdE</i>
AB_F	GTCGCTACGTCATTCCGTAC	<i>tpdAB</i> tarpgeninė sritis
AB_R	GCACCATCGTCGGTGTAC	<i>tpdAB</i> tarpgeninė sritis
BC_F	CTCATCGTCCACAAGCGAC	<i>tpdBC</i> tarpgeninė sritis
BC_R	CGATTCGAGAGGCTCGTC	<i>tpdBC</i> tarpgeninė sritis
Woo1	AGAGTTTGATCMTGGCTC	16S rRNR (Godon et al., 1997)
Woo2	GNTACCTTGTTACGACTT	16S rRNR (Godon et al., 1997)

2.1.5. PGR pradmenys

Pradmuo	Seka 5'–3'
seq1_F	TGAGGTCGATGAGCCAGACA
seq1_R	CCGGTGGAAAGATCGTCAAC
seq2_F	GGAGGCCACTCACGGATGCAAT
seq2_R	AAGAGGTGCTCGTTGCTGCGGA
seq3_F	GTACATGTCGGCGGAGAATC
seq3_R	ATGTACCAGGGTGAACGTCC
seq4_F	CATTCATGAGGTGTCCATTC
seq4_R	GAAAGATGAGTGCGAGAAAG
5'UTR_R	CACATGGATCCATCAAGATGAATCGC
5'UTR_F	TACGTGGATCCGTCAAGGAC
UTR247	GATGGATCCGTGGTGGTCTTCGACC
UTR227	GATGGATCCAGTGATGATGGTTCCGG
UTR207	GATGGATCCTGGGTGCGTCCGACTC
UTR187	GATGGATCCGCTGCAAAACGGAATC
UTR157	GATGGATCCTCGGAGTTTGCGTACG
UTR138	GATGGATCCATACGAAGCGACTTGAAAC
UTR110	GATGGATCCAGTATCGGCTAGGTACA
GFP_R	GGTGAACAGCTCCTCG
tpdA_F	ACTGGATCCGCGATTCATCTTGATGTCTG
tpdA_R	GCGGATCCTAGGCATTCCTGACAC
tpdB_F	ATGGATCCATTCAGGAGACCTGAG
tpdB_R	GTTGGATCCTCAGACGAGTACTCTTCG
tpdC_F	CAGATCTGAGCGTCGAAGAGTAC
tpdC_R	CATGGTACCGACGTCGATTACGAC
tpdE_F	TGACATATGGGTACGAGATTAGATC
tpdE_R	GTCTCGAGGCCGACCTGGACAGGTG
tpdC_F2	GTACATATGCTGAGCGTCGAAG
tpdC_R2	GACGAATTCATGTATCCCTCCCA
tpdC_R3	GTAAGCTTTGTATCCCTCCCAATATTC
tpdC_R4	CATCTAGATGTATCCCTCCCAATATTC
tpdR_F	TGTGTTGGATCCGCCAAAACG
tpdR_R	GTCTAGATCACAAACCAGTTCGC

2.1.6. Terpės

Mineralinė terpė: NaCl – 5 g/l, NH₄H₂PO₄ – 1 g/l, K₂HPO₄ – 1 g/l, MgSO₄ – 0,2 g/l, pH 7,2. MgSO₄ (10 % tirpalas) pridedamas po autoklavavimo.

Mineralinė agarizuota terpė: NaCl – 5 g/l, NH₄H₂PO₄ – 1 g/l, K₂HPO₄ – 1 g/l, MgSO₄ – 0,2 g/l, agaras – 15 g/l, pH 7,2. MgSO₄ (10 % tirpalas) pridedamas po autoklavavimo.

Nutrient broth (NB), nutrient agar (NA) ir brain-heart infusion (BHI) terpės buvo paruoštos pagal gamintojo (Oxoid) nurodymus.

Visos terpės buvo autoklavuojamos 20 min. 121 °C temperatūroje.

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. Bakterijų auginimo sąlygos

E. coli bakterijos ant agarizuotų terpių buvo auginamos 37 °C, o *Rhodococcus* spp. ir *Arthrobacter* spp. bakterijos – 30 °C temperatūroje. Skystose terpėse visos bakterijos buvo auginamos 30 °C temperatūroje aeruojant (180 aps./min.).

Auginant *E. coli* bakterijas, transformuotas plazmidėmis, atrankai buvo naudojamas ampicilinas (50 µg/ml) arba kanamicinas (40 µg/ml). *R. jostii* TMP1 bakterijos, transformuotos pART tipo plazmidėmis, buvo auginamos su kanamicinu (40 µg/ml). *R. erythropolis* SQ1 bakterijos, transformuotos pART tipo plazmidėmis, buvo auginamos terpėje su kanamicinu (60 µg/ml), o transformuotos pTip tipo plazmidėmis – su chloramfenikoliu (30 µg/ml).

R. jostii TMP1 bakterijos biokonversijoms buvo auginamos dvi paras 250 ml minimalios terpės su 0,05 % TTMP ir 0,02 % mielių ekstrakto. Ląstelės surinktos centrifuguojant (10 min., 3000×g), tris kartus praplautos 10 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu (pH 7,2) ir suspenduotos 50 ml to paties buferinio tirpalo. Gauta ląstelių suspensija naudota biokonversijoms.

R. erythropolis SQ1 bakterijos, transformuotos pART plazmide su reikiamu *tpd* genu ar jų kombinacija, buvo auginamos 250 ml NB terpės su kanamicinu, kol A₆₀₀ pasiekia 1,6–2,0. Ląstelės surinktos centrifuguojant

(10 min., 3000×g), tris kartus praplautos 10 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu (pH 7,2) ir suspenduotos keturis kartus mažesniame to paties buferinio tirpalo tūryje. Gauta ląstelių suspensija naudota biokonversijoms.

2.2.2. Plazmidinės DNR skyrimas

Plazmidinė DNR iš *E. coli* bakterijų buvo skiriama naudojant *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* rinkinį (Thermo Scientific) arba *ZR Plasmid Miniprep™* rinkinį (Zymo research), vadovaujantis gamintojo pateiktomis rekomendacijomis.

Skiriant plazmidinę DNR iš *Rhodococcus* spp. bakterijų, skiriant didesnius DNR kiekius bei eksperimentams, kuriems nebūtina ypač gryna DNR, buvo naudojamas šarminės denatūracijos metodas (Sambrook ir Russell, 2001).

2.2.3. Genominės DNR skyrimas

Genominė *R. jostii* TMP1 DNR buvo skiriama pagal modifikuotą Woo *et al.* metodiką (Woo *et al.*, 1992). Bakterijos buvo parą augintos 200 ml NB terpės. Ląstelės surinktos centrifuguojant (10 min., 3000×g). Nupylus supernatantą, ląstelės buvo suspenduotos 5 ml TNE buferinio tirpalo (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl ir 10 mM EDTA, pH 8,0) ir vėl surinktos centrifuguojant. Bakterijos buvo suspenduotos 2 ml TNE buferinio tirpalo, tuomet papildomai pridėta 2 ml TNE buferinio tirpalo su 2 % tritono X-100. Pridėjus sauso lizocimo (10 mg/ml), bakterijų suspensija buvo inkubuota 30 min. 37 °C temperatūroje. Pridėjus 100 µl proteinazės K, suspensija sumaišyta 3–5 kartus apverčiant mėgintuvėlį ir inkubuota 2 val. 65 °C temperatūroje. Gautas tirpalas nucentrifuguotas (20 min., 3000×g), supernatantas surinktas į naują mėgintuvėlį ir DNR išgryninta fenolio–chloroformo ekstrakcijos būdu (Sambrook ir Russell, 2001). Išsodinus etanoliumi, chromosominė DNR ištirpinta 500 µl distiliuoto vandens.

Tokiu būdu gauta DNR buvo naudojama genomo sekoskaitai, PGR reakcijoms ir genominei bibliotekai konstruoti.

2.2.4. DNR dauginimas *in vitro*

DNR buvo padauginta atliekant polimerazinę grandininę reakciją (PGR) (Saiki et al., 1988). Kaip matrica buvo naudota chromosominė *R. jostii* TMP1 DNR. Fragmentai dauginti naudojant $2\times$ PCR Master Mix rinkinį (Fermentas). Klonavimui skirtiems fragmentams padauginti naudota Pfu DNR polimerazė arba Long PCR Enzyme Mix rinkinys (Fermentas). Reakcijos mišiniai paruošti ir taikomos PGR programos parinktos laikantis gamintojo rekomendacijų.

2.2.5. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio

DNR fragmentai buvo išskirti iš agarozės gelio, naudojant DNR skyrimo rinkinį (Fermentas), vadovaujantis gamintojo pateiktomis rekomendacijomis.

2.2.6. Nukleotidų sekoskaita

2.2.6.1. Plazmidinės DNR sekoskaita

Klonuotų DNR fragmentų nukleotidų sekos buvo nustatytos MacroGen (Vokietija) BigDye™ grandinės terminacijos metodu.

2.2.6.2. Genomo sekoskaita

R. jostii TMP1 genomo sekai nustatyti DNR buvo išskirta, kaip aprašyta 2.2.3 skyriuje. Genomo nukleotidų sekos buvo nustatytos MacroGen (Pietų Korėja), naudojant Illumina technologiją. Gauti Illumina sekoskaitos duomenys buvo apdoroti ir fragmentai į gretinius surinkti naudojant CLC-Genomics Workbench programinę įrangą.

2.2.7. iRNR analizė

2.2.7.1. Bendrosios ląstelių RNR skyrimas

R. jostii TMP1 bakterijos buvo transformuotos pART3-UTR187-*gfp* plazmide ir augintos indukcinėmis sąlygomis mineralinėje terpėje su TTMP (0,05 %), kol optinis tankis (A_{600}) pasiekė 0,5. Biomasė iš 1 ml terpės surinkta centrifuguojant (10 min., $3000\times g$). Iš taip paruoštų bakterijų išskirta bendra

RNR, naudojant *ZR Soil/Fecal RNA MicroPrep*TM (Zymo Research Corporation) RNR skyrimo rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. Gauta RNR buvo naudojama pradmens ilginimo reakcijai.

2.2.7.2. Radioaktyvus DNR pradmens žymėjimas

Pradmens DNR 5' galinis nukleotidas buvo pažymėtas naudojant [γ -³²P]-ATF (Amersham Biosciences) ir T4 polinukleotidkinazę (Fermentas), laikantis gamintojo rekomendacijų.

2.2.7.3. DNR nukleotidų sekoskaita dideoksiterminacijos metodu

Pradmens ilginimo reakcijai palyginamoji DNR nukleotidų seka buvo gauta kaip matricą naudojant pART3-UTR187-*gfp* plazmidę. DNR seka buvo nustatyta dideoksiterminacijos metodu (Sanger et al., 1977). Reakcijai buvo naudotas 5' gale su ³²P pažymėtas DNR pradmuo ir DNR sekos nustatymo rinkinys su *Taq Reader* DNR polimeraze (Fermentas), laikantis gamintojo rekomendacijų.

2.2.7.4. Transkripcijos pradžios taško nustatymas

tpdABC operono transkripcijos pradžios taškas buvo nustatytas naudojant pradmens ilginimo reakciją. Reakcijai naudota bendra *R. jostii* TMP1 bakterijų RNR (išskirta kaip aprašyta 2.2.7.1 skyriuje), AMV atvirkštinė transkriptazė ir 5' gale su ³²P pažymėtas DNR pradmuo (žr. 2.2.7.2 skyrių). Atvirkštinės transkriptazės reakcija atlikta laikantis fermento gamintojo rekomendacijų. Palyginamoji DNR nukleotidų seka buvo gauta kaip aprašyta 2.2.7.3 skyriuje, naudojant tą patį pradmenį. Reakcijos produktai frakcionuoti 6 % poliakrilamido ir 8 M šlapalo gelyje, denatūruojančiomis sąlygomis. Gelio vaizdinimas atliktas naudojant Fujifilm FLA-5000 sistemą.

2.2.8. DNR manipuliacijos

DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis, 5' galinių fosfatų pašalinimas FastAPTM šarmine fosfataze, DNR fragmentų ligavimas T4 DNR ligaze, kompetentinių *E. coli* bakterijų paruošimas, *E. coli* ląstelių

transformacija plazmidėmis elektroporuoiant, transformantų atranka, plazmidinės DNR išskyrimas šarminės denatūracijos būdu bei elektroforezė agarozės gelyje buvo atliekami pagal plačiai paplitusias metodikas (Sambrook ir Russell, 2001) bei vadovaujantis fermentų gamintojų pateikiamomis rekomendacijomis.

DNR koncentracija buvo nustatoma atliekant elektroforezę agarozės gelyje, naudojant *Mass Ruler™ DNA Ladder (High Range)* molekulinės masės ir DNR kiekio žymenis (Fermentas).

2.2.9. Kompetentinės *Rhodococcus* spp. ir *Arthrobacter* spp. bakterijos

Kompetentinės bakterijos paruoštos taikant Gartemann ir Eichenlaub metodą (Gartemann ir Eichenlaub, 2001). *Rhodococcus* spp. ar *Arthrobacter* spp. bakterijos buvo sėjamos iš naktinės kultūros į 20 ml NB terpės ir auginamos 30 °C temperatūroje aeruojant (180 aps./min.), kol optinis tankis (A_{600}) pasiekia 0,5. Ląstelės buvo surinktos centrifuguojant (10 min., 3000×g) ir suspenduotos 10 ml 10 % glicerolio tirpalo. Įdėjus 100 µl lizocimo tirpalo (4 mg/ml), bakterijų suspensija inkubuota 30 min. 30 °C temperatūroje. Ląstelės vėl surinktos centrifuguojant ir du kartus praplautos šaltu 10 % glicerolio tirpalu. Tuomet ląstelės suspenduotos 1 ml šalto 10 % glicerolio tirpalo, išpilstytos į mėgintuvėlius po 100 µl ir saugomos užšaldytos -80 °C temperatūroje. Taip paruoštos kompetentinės bakterijos buvo naudojamos elektroporacijai.

2.2.10. Bakterijų transformacija elektroporuoiant

Elektroporacija atlikta naudojant 100 µl talpos Eppendorf elektroporavimo kiuvetes su 1 mm tarpu ir Eppendorf 2510 elektroporatorių. Į 100 µl kompetentinių ląstelių įdėta iki 1 µg plazmidinės DNR ir mišinys paveiktas 2,5 kV/cm impulsu. Po elektroporacijos reakcijos mišinys buvo nedelsiant perkeltas į 1 ml NB terpės ir inkubuotas 30 min (*E. coli*) arba 2 val. (*Rhodococcus* spp. ir *Arthrobacter* spp.) 30 °C temperatūroje. Tuomet ląstelės buvo išsėtos į atrankią terpę.

2.2.11. Kokybinė ir kiekybinė AT-PGR analizė

R. jostii TMP1 bakterijos buvo augintos mineralinėje terpėje su TTMP (0,05 %), gliukoze (0,1 %), arba piridinu (0,05 %) kaip vieninteliu anglies šaltiniu, kol optinis tankis (A_{600}) pasiekė 0,5. Biomasė iš 1 ml terpės buvo surinkta centrifuguojant (10 min., 3000×g). Naudojant *ZR Soil/Fecal RNA MicroPrep*[™] RNR skyrimo rinkinį (Zymo Research Corporation) pagal gamintojo rekomendacijas, iš surinktų bakterijų buvo išskirta bendra RNR. Iš mėginio DNR buvo pašalinta naudojant DNazę I (Thermo Scientific). Gauta RNR buvo naudojama tikro laiko ir įprastai atvirkštinės transkriptazės (AT) PGR analizei.

Tikro laiko AT-PGR atlikta Rotor-Gene Q5-plex HRM (Qiagen) prietaisu. Reakcija vykdyta 15 µl reakcijos mišinio, sudaryto iš: 1,5 µM *Syto9*, 7,5 µl *Verso 1-step QRT-PCR mix*, 0,15 µl *Verso* fermento, 0,75 µl *RT enhancer* (visos sudedamosios dalys iš *Verso 1-step QRT-PCR* rinkinio, Thermo Scientific), po 200 nM pradmenų ir 1 µl išskirtos RNA.

Analizei taikytos tokios AT-PGR programos:

- *tpdA-E* transkriptų ir tarpgeninių sričių taikiniams:
1 ciklas: 50 °C 15min., 95 °C 15min.
45 ciklai: 95 °C 15 s, 58 °C 1 min., 72 °C 10 s.
- 16S rRNR sekos taikiniui:
1 ciklas: 50 °C 15min., 95 °C 15min.
35 ciklai: 95 °C 20 s, 50 °C 1 min., 72 °C 1 min.

Atliekant tikro laiko AT-PGR, fluorescensija buvo matuojama po pradmenų prilydymo žingsnio. Slenkstinis ciklas (C_T) buvo nustatytas iš amplifikavimo kreivių Rotor-Gene Q Series 2.1.0 (Build 9) programa, naudojant slenkstinę vertę 0,05. Tiriamos RNR santykinis kiekis buvo išreikštas kaip santykis su 16S rRNR kiekiu tame pavyzdyje, apskaičiavus C_T reikšmių skirtumą tarp taikinio C_T ir 16S rRNR C_T reikšmių ir taikant algoritmą 2^{-dC_T} . Visos tikro laiko AT-PGR reakcijos buvo pakartotos du

kartus. RNR grynumas ir DNR priemaišų nebuvimas buvo patvirtintas atliekant identišką reakciją be atvirkštinės transkriptazės žingsnio.

Kokybinei AT-PGR analizei susidarę produktai buvo vertinami atliekant elektroforezę 1% agarozės gelyje.

2.2.12. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje

Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje buvo atlikta pagal standartines metodikas (Laemmli, 1970), naudojant 4,5 % koncentruojantį ir 14 % skirstomąjį gelius. Baltymai buvo nudažyti Coomassie Brilliant Blue R-250 dažu. Po dažymo gelis išblukintas 7 % acto rūgštimi.

2.2.13. Analitiniai metodai

2.2.13.1. Plonasluoksnė chromatografija

Plonasluoksnei chromatografijai buvo naudojamos silikageliu dengtos ploštelės su fluorescenciniu dažu, kurio sužadavimo bangos ilgis lygus 254 nm. Kaip nešiklis buvo naudotas chloroformo ir metanolio mišinys santykiu 9:1. Ploštelės analizuotos 254 nm UV šviesoje.

2.2.13.2. Peptidų de novo sekoskaita MS/MS metodu

Mėginys buvo paruoštas taikant šiek tiek modifikuotą Hellman *et al.* metodą (Hellman *et al.*, 1995). Tiriamo baltymo juostelė buvo išpjauta iš poliakrilamidinio gelio ir susmulkinta į maždaug 1×1×1 mm kubelius. Gelio gabalėliai buvo išblukinti 50 % acetonitrilo tirpale su 25 mM amonio bikarbonato, redukuoti ditionitritoliu, alkilinti jodoacetamidu ir dehidratuoti. Dehidratuotas gelis išmirkytas 25 mM amonio bikarbonato tirpale su 100 ng tripsino. Baltymas proteolizuotas tripsinu 37 °C temperatūroje per naktį. Tuomet peptidai buvo ekstrahuoti su 5 % trifluoroacto rūgštimi (TFA), liofilizuoti ir ištirpinti 10 µl 0,1 % TFA tirpale. Šis tirpalas buvo leidžiamas per ZipTip kolonėlę (Millipore), peptidus išplaunant 4 µl 50 % acetonitrilo tirpalo su 0,1 % TFA, laikantis gamintojo rekomendacijų. Ant 384 pozicijų MALDI

plokštelės buvo užnešta po 0,5 µl mėginio ir 0,5 µl užpildo (4 mg/ml α-ciano-4-hidroksicinamono rūgšties 50 % acetonitrilo tirpale su 0,1 % TFA).

Peptidų masių spektrai buvo gauti naudojant Applied Biosystems/MDS SCIEX 4800 MALDI TOF/TOF masių spektrometrą (VU Biochemijos institutas, Proteomikos centras). Tiriamųjų peptidų masių spektrai gauti taikant *MS reflector positive* režimą. Kiekviename spektre dominuojantys pikai buvo fragmentuojami *MS/MS* režimu.

Naudojant gautus masių spektrus, GPS Explorer™ De Novo Explorer programa buvo nustatytos tiriamųjų peptidų sekos. Masių spektroskopijos eksperimentus atliko dr. Marija Ger (VU Biochemijos institutas, Proteomikos centras).

2.2.13.3. ¹H BMR ir ¹³C BMR analizė

Metabolitų struktūroms nustatyti buvo užrašyti ¹H ir ¹³C BMR spektrai, naudojant Varian Unity INOVA 300 spektrometrą (atitinkamai 300 ir 75 MHz). TTMP biokonversijos *R. erythopolis* SQ1 bakterijomis, transformuotomis *tpdABC* genais, produkto spektras užrašytas DMSO-d₆ tirpale. TTMP biokonversijos *R. erythopolis* SQ1 bakterijomis, transformuotomis *tpdAB* genais, bei 2,4,6-trimetilpirazino konversijos *R. jostii* TMP1 bakterijomis produktų spektrai užrašyti CDCl₃ tirpale. Spektrai kalibruoti pagal būdingus tirpiklio signalus (CDCl₃: ¹H δ = 7.26; ¹³C δ = 77.2; DMSO-d₆: ¹H δ = 2.50; ¹³C δ = 39.5).

2.2.13.4. Didelės skyros masių spektrometrija

Didelės skyros masių spektroskopija (HRMS) atlikta Dual-ESI Q-TOF 6520 masių spektrometru (Agilent Technologies).

2.2.13.5. Tandeminė skysčių chromatografija ir masių spektrometrija

Tandeminė skysčių chromatografija ir masių spektrometrija (HPLC-MS) buvo atlikta naudojant sistemą iš CBM-20A valdymo bloko, dviejų LC-2020AD pompų, SIL-30AC automatinio bandinių ėmiklio ir CTO-20AC kolonų termostato (Shimadzu, Japonija), kaip detektorių naudojant SPD-M20A

fotodiodų gardelę (Shimadzu) ir LCMS-2020 masių spektrometrą su ESI šaltiniu (Shimadzu).

Chromatografinis frakcionavimas atliktas naudojant YMC – Pack Pro C18, 150×3 mm kolonėlę (YMC, Japonija), 40 °C temperatūroje, mobili fazė buvo sudaryta iš vandeninio 0,1 % acto rūgšties tirpalo (A tirpiklis) ir acetonitrilo (B tirpiklis). Gradientinis eliuavimas atliktas 0,6 ml min⁻¹ greičiu, taikant tokią programą: 0–0,5 min, 5 % B; 0,5–3 min, 60 % B; 3–3,1 min, 60 % B; 3,1–3,2 min, 5 % B, 3,2–10 min, 5 % B.

Masių spektrai buvo užrašyti nuo m/z 10 iki m/z 500, 350 °C temperatūroje, ±4,500 V įtampoje (neutrali DL/Qarray įtampa), naudojant N₂ kaip purškiamąsias ir džiovinamąsias dujas. Masių spektrometrijos analizė buvo atlikta taikant tiek teigiamos, tiek neigiamos jonizacijos režimą. Duomenys analizuoti naudojant LabSolutions LCMS programinę įrangą.

2.2.13.6. Fluorescencijos matavimas

R. jostii TMP1 bakterijos buvo transformuotos atitinkama plazmide ir augintos 25 ml mineralinės terpės su 0,05 % TTMP, 0,05 % piridino arba 0,1 % gliukozės. Optimaliai TTMP koncentracijai nustatyti bakterijos augintos 20 ml NB terpės su skirtingomis TTMP koncentracijomis. Abiem atvejais bakterijos augintos dvi paras, surinktos centrifuguojant (10 min., 3000×g), tris kartus praplautos 10 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu (pH 7,2) ir suspenduotos tame pačiame buferiniame tirpale, kad suspensijos optinis tankis (A₆₀₀) būtų lygus 10. Į juodos Costar™ 96 šulinėlių plokštelės šulinėlį įdėta 200 μl šios bakterijų suspensijos ir išmatuota fluorescencija FlexStationII³⁸⁴ fluorimetru (Molecular Devices), naudojant 485 nm žadinimo bangos ilgį ir matuojant emisiją ties 510 nm bangos ilgiu. Atlikti trijų nepriklausomų eksperimentų matavimai, kiekvieno pavyzdžio matavimas atliktas tris kartus.

Pateikiamos fluorescuojančių bakterijų nuotraukos, gautos su Canon Eos 500D kamera, bakterijas eksponuojant UV šviesoje, naudojant UVT-28 ME transiliuminatorių (Herolab GmbH Laborgeraete). Gauti RGB vaizdai

išskirstyti į atskirus kanalus naudojant Digital Photo Professional 3.8 programinę įrangą, nuotraukose pateikiamas tik žalias kanalas.

2.2.13.7. UV-Vis spektrofotometrija

UV-Vis spektrofotometriniai matavimai buvo atliekami naudojant Helios Gamma spektrofotometrą (Thermo Corporation) arba PowerWave™ XS plokštelių skaitytuvą (BioTek Instruments, Inc.). Matuojant plokštelių skaitytuvu, kiekvienas pavyzdys buvo matuojamas tris kartus.

2.2.14. Biokonversijų tyrimai naudojant sveikas ląsteles

Biokonversijos buvo atliekamos naudojant *R. jostii* TMP1 bakterijas, augintas mineralinėje terpėje su TTMP (0,05 %), kaip aprašyta anksčiau (žr. 2.2.1 skyrių), arba reikiama plazmide su *tpd* srities genais transformuotas *R. erythropolis* SQ1 bakterijas, augintas, kaip aprašyta anksčiau. Po 5–7 ml gautos ląstelių suspensijos buvo perkelta į du 50 ml talpos mėgintuvėlius. Į vieną mėgintuvėlį pridėta reikiamo substrato iki 0,1 mM galutinės koncentracijos, kitas mėgintuvėlis buvo naudojamas kaip kontrolė. Įdėjus substratą, iš karto iš abiejų mėgintuvėlių buvo paimami pavyzdžiai, bakterijos pašalintos centrifuguojant (1 min., 16000×g) ir užrašytas pradinis reakcijos mišinio sugerties spektras (200–320 nm intervale). Mėgintuvėliai buvo toliau inkubuojami 30 °C temperatūroje maišant 180 aps/min. Pasirinktais laiko intervalais buvo paimami pavyzdžiai, bakterijos pašalinamos ir užrašomi sugerties spektrai. Siekiant parodyti tik tiriamo substrato sugerties spektro pokyčius ir eliminuoti spektro pokyčius, atsirandančius dėl medžiagų patekimo į terpę iš bakterijų, paveiksluose pateikiami spektrai, gauti iš tiriamojo reakcijos mišinio spektro atėmus kontrolinio bandymo spektrą.

2.2.15. OBNA ir BDNA biosintezė

OBNA arba BDNA biosintezėi iš TTMP buvo naudojamos *R. erythropolis* SQ1 bakterijos, transformuotos atitinkamai pART2-*tpdABC* arba pART2-*tpdAB* plazmide. Bakterijos buvo auginamos ir paruošiamos, kaip aprašyta anksčiau (žr. 2.2.1 skyrių). Biokonversijos reakcijai 250 ml ląstelių

suspensijos buvo inkubuojama 1 l talpos kolboje, 30 °C temperatūroje, aeruojant (180 aps./min. termostatuojamoje kratyklėje). Į reakcijos mišinį porcijomis buvo dedama po 20 mg TTMP ir 125 mg gliukozės. Reakcijos eiga buvo stebima spektrofotometriškai, matuojant sugerties spektrų pokytį 200–320 nm intervale. Reakcija vykdyta 6 paras. Po reakcijos bakterijos pašalintos centrifuguojant (20 min., 3000×g). Konversijos su *tpdABC* genais atveju, reakcijos mišinys vakuuminio garintuvu buvo sukonzentruotas iki 10 ml ir TTMP konversijos produktas buvo išgrynintas ekstrahuojant chloroformu. Konversijos su *tpdAB* genais atveju reakcijos mišinys buvo sausai nugarintas vakuuminio garintuvu ir TTMP produktas išgrynintas perkristalinant iš acetonitrilo, o tuomet iš chloroformo. Gautų produktų struktūros buvo nustatytos ¹H BMR, ¹³C BMR ir MS analizės metodais (žr. 2.2.13 skyrių).

2.2.16. OBNA biosintezė naudojant ¹⁸O žymėtą vandenį

R. erythropolis SQ1 bakterijos, transformuotos pART2-*tpdAB* plazmide, užaugintos NB terpėje, kol optinis tankis (A_{600}) pasiekė 2,0. Biomasa surinkta centrifuguojant (10 min., 3000×g), tris kartus perplauta 10 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu (pH 7,2) ir suspenduota tame pačiame buferiniame tirpale, kad suspensijos optinis tankis (A_{600}) būtų lygus 10. Gauta ląstelių suspensija buvo naudota biokonversijoms. Reakcijai imta 500 µl suspensijos, buferinis tirpalas pašalintas centrifuguojant, bakterijos suspenduotos 493 µl H₂O arba H₂¹⁸O ir pridėta 5 µl 1 M kalio fosfato buferinio tirpalo su 5 % gliukozės (pH 7,6). Reakcija buvo vykdoma 15 ml talpos mėgintuvėliuose, 30 °C temperatūroje, termostatuojamoje kratyklėje (180 aps./min.). Po valandos inkubavimo buvo pridėta 2,5 µl 100 mM tetrametilpirazino tirpalo etanolyje. Reakcija buvo vykdoma apie 16 val. Reakcijos eiga buvo stebima spektrofotometriškai matuojant reakcijos mišinio sugerties spektro pokytį 200–320 nm intervale. Pasibaigus substratui (išnykus sugerties smailei 290 nm srityje), bakterijos pašalintos centrifuguojant (20 min., 3000×g), reakcijos produktai sukonzentruoti liofilizuojant ir ištirpinti 100 µl acetonitrilo. Gauti produktai

analizuoti tandemine skysčių chromatografija ir masių spektrometrija (žr. 2.2.13.5 skyrių).

2.2.17. 3-hidroksi-2,4,6-trimetilpirazino biosintezė

3-hidroksi-2,4,6-trimetilpirazino biosintezei iš 2,4,6-trimetilpiridino (SMC) buvo naudojamos *R. jostii* TMP1 bakterijos, augintos ir paruoštos kaip aprašyta anksčiau (žr. 2.2.1 skyrelį). Biokonversijos reakcijai 200 ml ląstelių suspensijos buvo inkubuojama 1 l talpos kolboje, 30 °C temperatūroje, aeruojant (180 aps./min. termostatuojamoje kratyklėje). Į reakcijos mišinį porcijomis buvo dedama po 20 mg SMC ir 125 mg gliukozės. Reakcijos eiga buvo stebima spektrofotometriškai, matuojant sugerties pokytį 200–400 nm intervale. Reakcija vykdyta 5 paras. Po reakcijos bakterijos pašalintos centrifuguojant (20 min., 3000×g). Reakcijos mišinys buvo sausai nugarintas vakuuminiu garintuvu ir SMC biokonversijos produktas išgrynintas perkristalinant iš acetonitrilo, o tuomet iš chloroformo. Gauto produkto struktūra buvo nustatyta ¹H BMR, ¹³C BMR ir MS analizės metodais.

2.2.18. Beląstelių ekstraktų ruošimas

Beląsteliniai bakterijų ekstraktai buvo ruošiami surinktas bakterijas suspenduojant reikalingame buferyje ir suardant ultragarsu VC750 (Sonics & Materials, Inc.) dezintegratoriumi. Ardant *Rhodococcus* spp. bakterijas, papildomai buvo įdėta 0,5 g/ml 0,1 mm skersmens stiklo rutuliukų. Ląstelių nuolaužos buvo pašalintos centrifuguojant (10 min., 16000×g).

2.2.19. TpdC gryninimas

R. erythropolis SQ1 bakterijos buvo transformuotos pTipQC-His₆-*tpdC* plazmide ir augintos 200 ml NB terpės su chloramfenikoliu 1 l kolbose, 30 °C temperatūroje, aeruojant (180 aps./min., termostatuojamoje kratyklėje). Kultūrai pasiekus optinį tankį (A_{600}), lygų 0,4, rekombinantinio baltymo raiška buvo indukuota pridėdant 1 μg/ml tiostreptono ir bakterijos toliau augintos 17 val. Biomase iš 800 ml terpės surinkta centrifuguojant, praplauta 25 mM

kalio fosfato buferiniu tirpalu (pH 7,2), suspenduota 9 ml 25 mM kalio fosfato buferiniame tirpale su 100 mM NaCl ir 5 mM imidazolo (pH 7,2) ir suardyta ultragarsu (žr. 2.2.18 skyrių). Belastelinis ekstraktas užneštas ant HiTrap IMAC FF, 1 ml nikelio kolonėlės (GE Healthcare), polihistidininę uodegą turintys baltymai nuplauti 25 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu su 100 mM NaCl ir 1 M imidazolo (pH 7.2). TpdC baltymo grynumas patikrintas atlikus baltymų elektroforezę poliakrilamidiniame gelyje.

2.2.20. TpdC fermentinio aktyvumo matavimas

TpdC BDNA amidazės fermentinis aktyvumas buvo matuojamas 20 °C temperatūroje, pagal hidrolizuotą BDNA kiekį, vertinamą spektrofotometriškai ties 226 nm bangos ilgiu ($\epsilon_{226} = 7100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Reakcijos mišinys buvo sudarytas iš 50 mM kalio fosfato buferinio tirpalo (pH 7,5), 0,1 mM BDNA ir atitinkamo fermento kiekio. Optimalus TpdC veikimo pH nustatytas matuojant fermento aktyvumą pH intervale nuo 6,2 iki 9,0 kalio fosfato ir Tris-HCl buferiniuose tirpaluose. Vienas TpdC aktyvumo vienetas buvo apibrėžtas kaip fermento kiekis, kuris per 1 minutę 20 °C temperatūroje hidrolizuoja 1 μmol BDNA.

2.2.21. NH_4^+ jonų nustatymas Neslerio reagentu

Reakcijos mišinys buvo sudarytas iš 700 μl 10 mM kalio fosfato buferinio tirpalo (pH 7,5), 100 μl Neslerio reagento (0,09 mol/l kalio tetrajodomerkurato (II) ir 2,5 mol/l kalio hidroksido tirpalo) ir 200 μl tiriamo pavyzdžio. Reakcijos produkto sugertis buvo matuojama ties 490 nm bangos ilgiu, NH_4^+ koncentracija apskaičiuota iš kalibracinės kreivės. Kalibracinė kreivė gauta reakciją atliekant su 0,1–1,0 mM NH_4Cl standartiniais tirpalais.

2.2.22. TpdE gryninimas

E. coli BL21(DE3) bakterijos buvo transformuotos pET21-*tpdE* plazmide ir augintos 200 ml BHI terpės su 50 mg/ml ampicilino 1 l kolbose, 30 °C temperatūroje, aeruojant (180 aps./min., termostatuojamoje kratyklėje).

Kultūrai pasiekus optinį tankį (A_{600}), lygų 1,2, rekombinantinio baltymo raiška buvo indukuota pridodant 0,5 mM IPTG ir bakterijos toliau augintos 4 val. Biomassė surinkta centrifuguojant (10 min., $3000\times g$), praplauta 50 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu (pH 7,2), suspenduota 8 ml to paties buferinio tirpalo ir suardyta ultragarsu (žr. 2.2.18 skyrių). Beląstelinis ekstraktas buvo užneštas ant HiTrap IMAC FF, 5 ml nikelio kolonėlės (GE Healthcare), neprikibę baltymai išplauti 50 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu (pH 7,2), polihistidininę uodegą turintys baltymai išplauti 50 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu su 1 M imidazolo (pH 7.2). TpdE baltymo grynumas patikrintas atlikus baltymų elektroforezę poliakrilamidiniame gelyje.

2.2.23. TpdE fermentinio aktyvumo matavimas

Nuo NADPH priklausomas TpdE ketoreduktazės fermentinis aktyvumas buvo matuojamas 30 °C temperatūroje pagal sunaudotą NADPH kiekį, vertinamą spektrofotometriškai ties 340 nm bangos ilgiu ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Reakcijos mišinys buvo sudarytas iš 50 mM kalio fosfato buferinio tirpalo, 0,2 mM NADPH, 5 μM OBNA ir atitinkamo TpdE kiekio. Optimalus fermento veikimo pH buvo nustatytas matuojant TpdE aktyvumą pH intervale nuo 6,0 iki 8,5 kalio fosfato ir Tris-HCl buferiniame tirpale. Vienas TpdE aktyvumo vienetas buvo apibrėžtas kaip fermento kiekis, kuris per 1 minutę 30 °C temperatūroje oksiduoja 1 μmol NADPH. TpdE K_m ir k_{kat} vertės NADPH ir OBNA substratams buvo nustatytos parinkus fiksuotą vieno iš substrato koncentraciją, o kito substrato koncentraciją keičiant 50–500 μM (NADPH) ir 0,1–10 μM (OBNA) intervaluose. Atlikti mažiausiai trys nepriklausomi matavimai. K_m ir k_{kat} nustatyti naudota GraFit (Erithacus Software Ltd.) programinė įranga.

2.2.24. Kompiuteriniai analizės metodai

DNR sekų analizei buvo naudota Vector NTI 9.0 (Life Technologies) bei CLC Sequence Viewer 6 (CLC bio) programinė įranga. Genomo Illumina sekoskaitos rezultatai apdoroti naudojant CLC Genomics Workbench

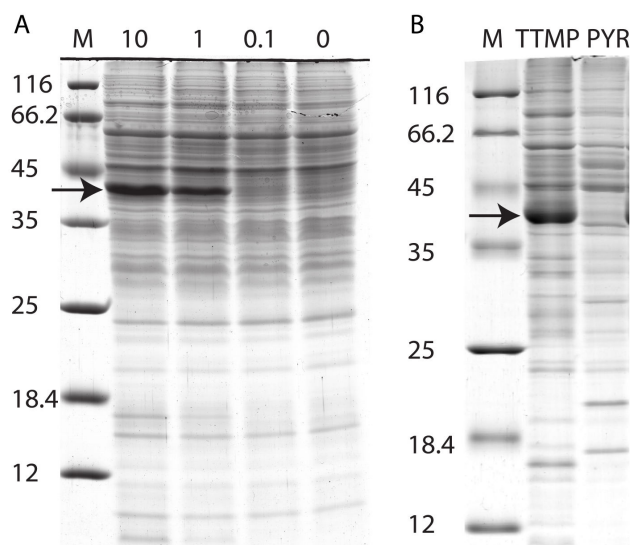
programinę įrangą (CLC bio). Sekoskaitos chromatogramoms naudota Chromas lite 2.1 programa (<http://technelysium.com.au>). DNR ir baltymų sekoms palyginti bei homologų paieškai naudota NCBI BLAST programa ir duomenų bazė (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Baltymų funkcinei anotacijai naudota NCBI CCD konservatyvių domenų paieška ir duomenų bazė (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (Marchler-Bauer et al., 2011).

Evoliucinė kilmės analizė buvo atlikta artimiausių grupių sujungimo metodu (Saitou ir Nei, 1987). Filogenetinei analizei naudota Mega 5.0 programinė įranga (Tamura et al., 2011).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Tetrametilpirazino skaidymo genų sandaros nustatymas

Tetrametilpiraziną (TTMP) skaidantis mikroorganizmas buvo išskirtas ir identifikuotas ankstesnio darbo metu (Kutanovas, 2008). 16S rRNR sekų palyginimo būdu buvo nustatyta, kad bakterijos priklauso *Rhodococcus jostii* rūšiai ir jos buvo pavadintos *Rhodococcus jostii* TMP1. Taip pat buvo parodyta, kad tetrametilpirazino skaidymas minėtose bakterijose yra indukuojamas procesas. Bakterijas auginant su TTMP kaip vieninteliu anglies šaltiniu, specifiskai indukuojamas apie 40 kDa dydžio baltymas (3.1A pav.). Bakterijoms augant terpėje su kitais anglies šaltiniais, pavyzdžiui, su *N*-heterocikliniu junginiu – piridinu, minėto baltymo sintezė nėra indukuojama (3.1B pav.).



3.1 pav. Tetrametilpirazinu indukuojamo baltymo sintezė *R. jostii* TMP1 bakterijose. *A*, bakterijos augintos NB terpėje su skirtinga TTMP koncentracija (0,1–10 mM). *B*, bakterijos augintos mineralinėje terpėje su 0,05 % TTMP arba 0,05 % piridino (*PYR*). Rodykle pažymėta indukuojamo 40 kDa baltymo juostelė. *M* – molekulinės masės žymuo (kDa)

3.1.1. TTMP indukuojamo 40 kDa baltymo *de novo* sekoskaita

Šio darbo metu minėtas 40 kDa baltymas buvo pasirinktas tolesnei analizei, kadangi labai tikėtina, kad specifiskai TTMP indukuojamas baltymas dalyvauja TTMP skaidymo procese. Baltymo juostelė buvo išpjauta iš baltymų elektroforezės gelio ir pateikta *de novo* peptidų sekoms nustatyti masių

spektrometrijos (MS/MS) metodu Biochemijos instituto Proteomikos centre. Po peptidų *de novo* sekoskaitos buvo gautos potencialių 40 kDa baltymo peptidų sekos, kurios pateikiamos priedo lentelėje P1. Atlikus šių peptidų sekų homologų paiešką genų banke taikant BLAST įrankį, nebuvo identifikuota *N*-heterociklinių junginių degradacijos fermentų, todėl buvo nuspręsta atlikti *R. jostii* TMP1 genomo sekos analizę.

3.1.2. *R. jostii* TMP1 Illumina genų biblioteka

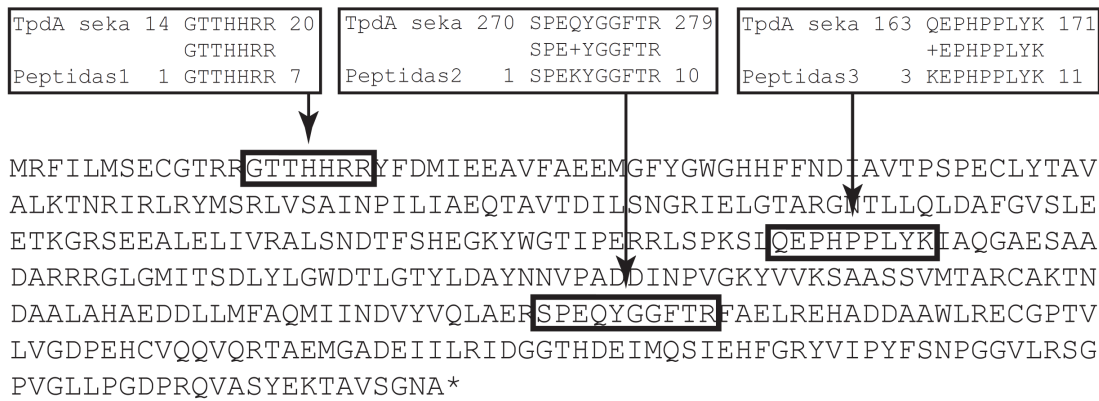
Norint nustatyti *R. jostii* TMP1 bakterijų genomo nukleotidų seką, buvo išskirta genomine bakterijų DNR ir pateikta *de novo* sekoskaitai Illumina technologija (Macrogen). Gauti duomenys buvo apdoroti ir surinkti į DNR fragmentų gretinius naudojant CLC-Genomics Workbench programą. Iš viso gauta 6,12 Mbp genomo sekų 982 gretiniuose, kurių trumpiausios sekos ilgis buvo 204 bp, ilgiausios – 114,4 kbp, o vidutinis gretinio ilgis buvo 6,2 kbp.

3.1.3. 40 kDa baltymą koduojančio geno nustatymas

Tetrametilpirazinu indukuojamą 40 kDa baltymą koduojančiam genui nustatyti buvo panaudotos baltymo *de novo* sekoskaitos metu gautos potencialių 40 kDa baltymo peptidų sekos. Šias peptidų sekas turinčio baltymo buvo ieškoma taikant BLAST įrankį *R. jostii* TMP1 genomo fragmentų koduojamų baltymų sekose. Tokiu būdu buvo nustatytas genas, koduojantis baltymą, kurio sekoje rasti trys peptidai, homologiški peptidams, gautiems *de novo* sekoskaitos metu (3.2 pav., 3.1 lentelė).

3.1 lentelė. *De novo* sekoskaita nustatytų peptidų sutapimas su 40 kDa TTMP indukuojamo baltymo seka. Peptidų ir baltymo sekos buvo lyginamos BLAST įrankiu.

Peptidas	Sekos padengimas	E reikšmė	Identiškumas
GTTHHR	100%	0.001	100%
EAKEPHPLYK	82%	4e-05	89%
SPEKYGGFTR	100%	3e-05	90%



3.2 pav. *De novo* sekoskaita nustatytų peptidų sutapimo vietos 40 kDa TTMP indukuojamo baltymo sekoje. Peptidų ir baltymo sekos buvo lyginamos BLAST įrankiu.

Tokiu būdu buvo atrinktas *R. jostii* TMP1 genomo sekų gretinys iš Illumina genomines bibliotekos, kuriame yra 40 kDa tetrametilpirazinu indukuojamo baltymo genas. Šio DNR fragmento nukleotidų seka buvo patikrinta atlikus sekoskaitą grandinės terminacijos metodu. Šiuo tikslu buvo sukonstruota *R. jostii* TMP1 HindIII genomine biblioteka pUC19 vektoriuje ir sukurti pradmenys 40 kDa baltymą koduojančiam genui. PGR būdu buvo atrinktas klonas pUC19-H1, turintis 7 kb dydžio DNR fragmentą su ieškamu 40 kDa baltymo genu (3.3 pav.). Tuomet šio DNR fragmento nukleotidų seka analizuota jį skaldant įvairiomis restrikcijos endonukleazėmis, fragmentus klonuojant į pUC19 vektorių ir nustatant šių fragmentų nukleotidų sekas. Siekiant patikrinti likusį gretinį, pagal gretinio nukleotidų seką buvo sukurti pradmenys, kuriuos naudojant PGR būdu buvo padauginėti persiklojantys DNR fragmentai ir nustatytos jų sekos (3.3 pav.). Tokiu būdu buvo patikrinta dar 6 kb DNR fragmento seka. Patikrinto 13 kb fragmento nukleotidų seka sutapo su Illumina metodu gauta seka. Šio *R. jostii* TMP1 genomo fragmento nukleotidų seka buvo pateikta genų bankui, jai suteiktas numeris HF544504.

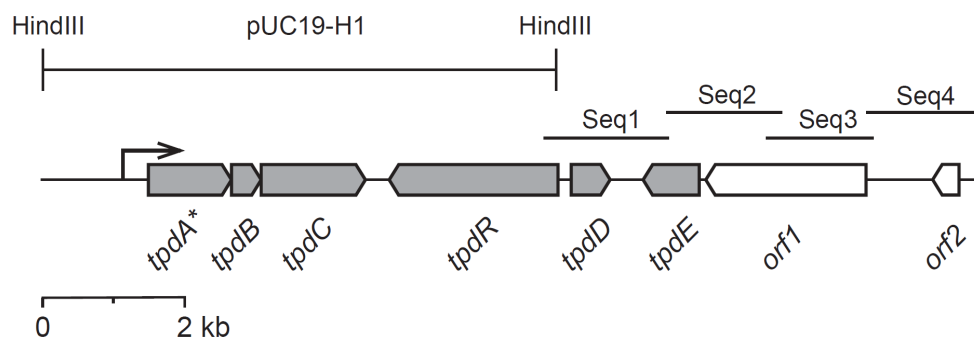
3.2. *tpd* sankaupos genų sekų analizė

Nustatyta *R. jostii* TMP1 geno fragmente buvo aptikti 8 atviri skaitymo rėmeliai. Remiantis atvirų skaitymo rėmelių analize buvo sudarytas genolapis, o sritis, kuriai priklauso 40 kDa indukuojamą baltymą koduojantis genas, buvo pavadinta *tpd* (tetrametilpirazino skaidymo, angl. *tetramethylpyrazine degradation*) genų sankaupa. Pirmasis *tpd* genų sankaupos genas, pavadintas *tpdA*, koduoja 40 kDa baltymą. Kiti atviri skaitymo rėmeliai buvo pavadinti *tpdB*, *tpdC*, *tpdD*, *tpdE*, *tpdR*, *orf1* ir *orf2* (3.3 pav.).

Siekiant nustatyti potencialią šių *tpd* sankaupos genų koduojamų baltymų funkciją, buvo atlikta homologiškų baltymų ir konservatyvių domenų paieška genų banke. Analizės rezultatai pateikiami 3.2 ir 3.3 lentelėse.

Pagal sekų analizę artimiausi TpdA homologai yra į liuciferazės panašios monooksigenazės (3.2 lentelė, 3.4 pav.). Tačiau visi artimiausi TpdA homologai yra grupė hipotetinių baltymų, kurių tiksli funkcija nėra žinoma, todėl vien iš homologų paieškos buvo neįmanoma prognozuoti tikslios TpdA funkcijos.

Atlikus konservatyvių domenų paiešką, buvo nustatyta, kad TpdA sekoje yra flavinus naudojančių monooksigenazių superšeimai (cl07892) būdingos sekos, taip pat aptikti nuo kofaktoriaus F-420 priklausomų flavino oksidoreduktazių domenai. Apibendrinant sekų analizės rezultatus, galima teigti, kad TpdA priklauso flavinus naudojančioms monooksigenazėms.



3.3 pav. *R. jostii* TMP1 geno fragmentas su tetrametilpirazino skaidymo genais. Viršuje pažymėta pUC19-H1 plazmidėje klonuota DNR sritis ir persidengiantys PGR produktai (Seq1–4), naudoti nukleotidų sekos patikrinimui. * pažymėtas TTMP indukuojamo 40 kDa baltymo genas.

3.2 lentelė. Tetrametilpirazino skaidymo genų sandauroje koduojamų baltymų palyginimas su genų banko sekomis. Homologų paieškai naudotas BLAST įrankis NCBI duomenų bazėje.

Baltymas	Homologas					
	Funkcija	Organizmas	E-reikšmė	Sutapimas	Prieigos numeris	
TpdA	Į liuciferazės panaši monoooksigenazė	<i>Pseudomonas putida</i> S16	2e-69	39%	YP_004701828.1	
	Į liuciferazės panaši monoooksigenazė	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> AK37	8e-64	38%	ZP_09310356.1	
	Nepavadinintas baltymas	<i>Hyphomicrobium</i> sp. MC1	1e-52	37%	YP_004677381.1	
TpdB	Branduolio pernašos veiksnys 2	<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3	3e-10	36%	YP_001777522.1	
	Hipotetinis baltymas	<i>Burkholderia cenocepacia</i> PC184	1e-09	36%	ZP_04942323.1	
	Nepavadinintas baltymas	<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054	2e-09	36%	YP_624576.1	
TpdC	Amidazė	<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152	2e-128	46%	YP_119043.1	
	Omega-oktalaiktamų hidrolazė	<i>Rhodococcus</i> sp. Oct1	1e-127	46%	BAI44731.1	
	Hipotetinis baltymas	<i>Streptomyces</i> sp. AA4	1e-122	48%	ZP_07279978.1	
TpdR	LuxR transkripcijos reguliatorius	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	1e-118	35%	YP_702638.1	
	LuxR transkripcijos reguliatorius	<i>Rhodococcus opacus</i> M213	6e-124	35%	EIM49643.1	
	LuxR transkripcijos reguliatorius	<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113	1e-121	35%	YP_004813994.1	
TpdD	Flavinių reduktazės domena turintis FMN surišantis baltymas	<i>Segniliparus rotundus</i> DSM 44985	2e-33	48%	YP_003660118.1	
	Flavinių reduktazės domena turintis baltymas	<i>Arthrobacter aureus</i> TC1	2e-32	49%	YP_950284.1	

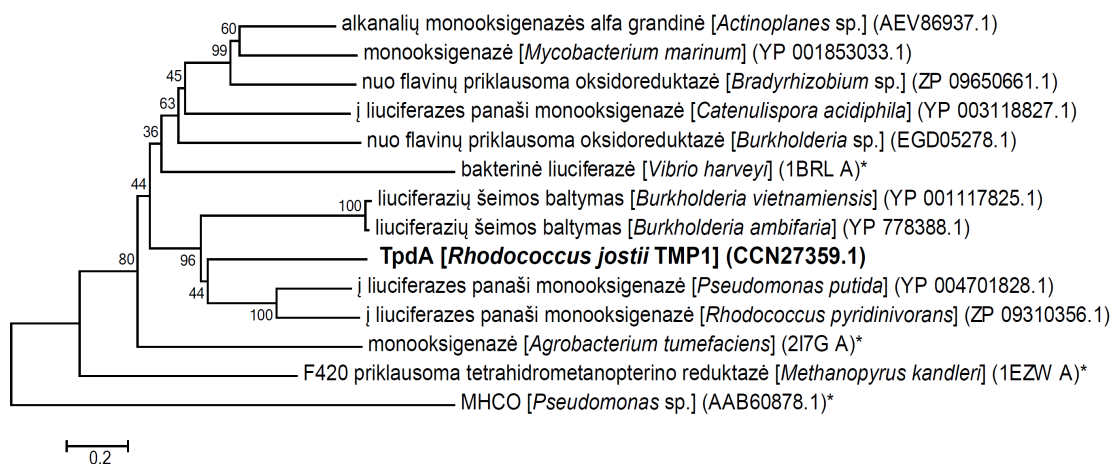
3.2 lentelė. (Tęsinys)

Baltymas	Homologas						
	Funkcija	Organizmas	E-reikšmė	Sutapimas	Prieigos numeris		
TpdD	Flavinių reduktazės domena turintis baltymas	<i>Segniliparus rugosus</i> ATCC BAA-974	7e-32	46%	ZP_07966836.1		
TpdE	3-oksoacil-[acil]-pernešantis baltymas] reduktazė	<i>Gordonia alkanivorans</i> NBRC 16433	2e-116	66%	ZP_08764571.1		
	3-oksoacil-[acil]-pernešantis baltymas] reduktazė	<i>Rhodococcus erythropolis</i> SK121	5e-100	59%	ZP_04386318.1		
	Hipotetinis baltymas	<i>Listeriaceae bacterium</i> TTU M1-001	8e-55	41%	ZP_09892129.1		
Orf1	Didysis N,N-dimetilformamidazės subvienetas	<i>Frankia</i> sp. EAN1pec	4e-125	37%	YP_001511296.1		
	Didysis N,N-dimetilformamidazės subvienetas	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> C454	2e-113	35%	ZP_09675084.1		
	Hipotetinis baltymas	<i>Mycobacterium vaccae</i> ATCC 25954	1e-111	34%	ZP_11012569.1		
Orf2	Peptidazių C26 šeimos baltymas	<i>Gordonia namibiensis</i> NBRC 108229	2e-15	43%	ZP_10962559.1		
	Glutamino amidotransferazių šeimos baltymas	<i>Bryantella formatexigens</i> DSM 14469	1e-10	39%	ZP_05347906.1		
	Peptidazė C26	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> DSM 446	1e-10	45%	YP_003183809.1		

3.3 lentelė. *tpd* sankaupos genų koduojamų baltymų funkcinė anotacija. Potencialios koduojamų baltymų funkcijos nustatytos analizuojant sekas Conserved Domain Database duomenų bazėje (Marchler-Bauer et al., 2011), NCBI puslapyje.

Baltymas	Teorinis dydis, a.r./kDa	Spėjama funkcija	Baltymo superšeimos priskyrimas		
			Superšeima	E-reikšmė	Konservatyvus domenas
TpdA	387/42.9	Flavinas naudojanti monoooksigenazė	Flavinas naudojanti monoooksigenazių (cl07892)	5,3e-16	Neapibūdintas
TpdB	136/15.2	Nežinoma	NTF2 like (cl09109)	7,4e-09	Neapibūdintas
TpdC	484/51.4	Amidazė	Amidazių (cl11426)	2,3e-63	Neapibūdintas
TpdR	787/86.2	LuxR šeimos transkripcijos reguliatorius	LuxR_C-like (cl17315)	1,4e-14	Sekai specifiškas DNR surišantis domenas
TpdD	179/19.3	Flavino reduktazė	AAA* (cl17189)	1,2e-4	Konservatyvus nukleotidų fosfatus surišantis motyvas
TpdE	260/26.9	Trumpų grandinių dehidrogenazė / reduktazė	Flavinių reduktazių (cl00801)	5,7e-26	FMN-surišantis domenas randamas NAD(P)H-flavinių oksidoreduktazėse
Orf1	747/81.2	Didysis <i>N,N</i> -dimetil-formamidazės subvienetas	NADB_Rossmann (cl09931)	2,4e-73	<i>Rossmann fold</i> NAD(P)H/NAD(P) ⁺ surišantis (NADB) domenas
Orf2	123/13.6	Peptidazė	GAT_1 (cl00020)	8,9e-16	Neapibūdintas

* AAA, su įvairiomis funkcijomis susijusių ATPazių superšeima.



3.4 pav. TpdA baltymo filogenetinis medis. Medis sudarytas artimiausių grupių sujungimo metodu, naudojant 10 artimiausių homologų sekas (iš BLAST analizės) ir tris homologiškas sekas, koduojančias žinomos struktūros baltymus. Šalia atsišakojimų nurodyta procentinė įkėlos sutapimo su tiriamuoju baltymu išraiška. Mastelis atitinka pakeistų aminorūgščių skaičių, tenkantį vienai pozicijai. Sekų genų banko prieigos numeriai pateikti skliaustuose. Nustatytos tretinės struktūros homologai pažymėti žvaigždute (*).

Kadangi šiuo metu nėra žinoma nė vieno pirazinų metabolizme dalyvaujančio fermento, nebuvo įmanoma TpdA analizės rezultatų palyginti su kitų pirazinų metabolizme dalyvaujančiais baltymais.

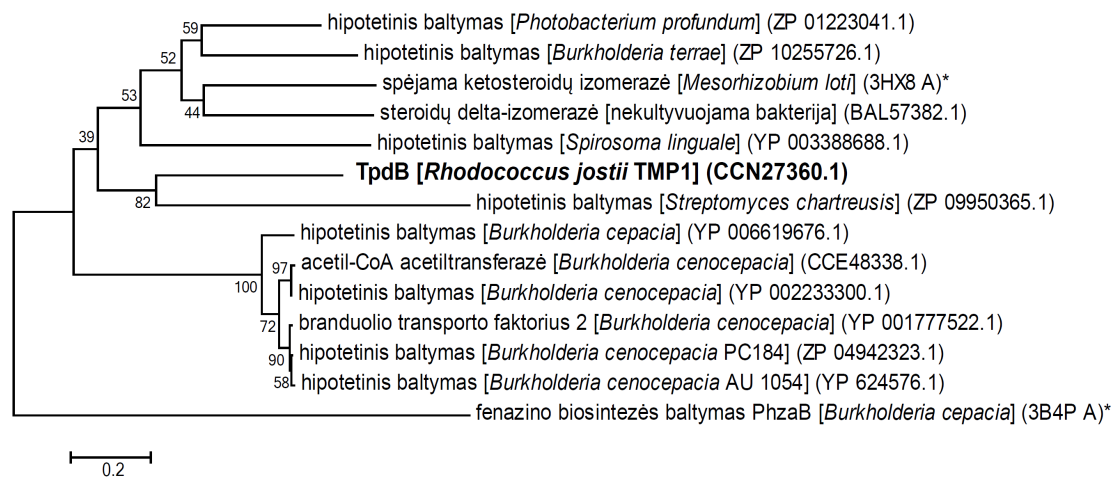
Atsižvelgiant į tai, kad TpdA baltymas sintetinamas tik bakterijoms augant su TTMP, bei žinant, kad dvi flavinus naudojančios monooksigenazės, atpažįsta ir skaido *N*-heterociklinius junginius (Chaiyen, 2010; Ellis, 2010), buvo iškelta hipotezė, kad *tpdA* geno koduojama hipotetinė monooksigenazė gali dalyvauti pradiniam TTMP metabolizmo žingsnyje. Artimiausi TpdA homologai yra monooksigenazės, panašios į bakterines liuciferazes, kurios yra sudarytos iš dviejų subvienetų – α ir β . Abu šie subvienetai yra reikalingi liuciferazių oksidazės funkcijai atlikti. Tačiau *tpd* genų sandauroje liuciferazės β subvienetams homologišką baltymą koduojančio geno nebuvo aptikta, todėl sunku vertinti, ar TpdA galėtų dalyvauti TTMP skaidyme, veikdamas kaip į liuciferazes panaši monooksigenazė.

Flavinus naudojančios monooksigenazės, į kurias panašus TpdA baltymas, aktyviajame centre turi redukuotą flaviną, prisijungiantį deguonies molekulę ir taip ją aktyvuojantį substratams oksiduoti (van Berkel et al., 2006).

Šios monooksigenazės veikia kaip dvikomponentės sistemos, sudarytos iš oksidazės ir flavino reduktazės, kuri palaiko monooksigenazės aktyvumą redukuodama aktyviojo centro flaviną (van Berkel et al., 2006). *tpd* genų sandaupoje flavino reduktazę koduoja *tpdD* genas (3.2 ir 3.3 lentelės), todėl tikėtina, kad TpdD galėtų būti TpdA reikalinga flavinų reduktazė.

Artimiausi TpdB homologai yra hipotetiniai baltymai (3.2 lentelė, 3.5 pav.), o konservatyvių domenų paieška rodo, kad TpdB priklauso *NTF2-like* baltymų superšeimai (3.3 lentelė), kuriai priklauso branduolio pernašos veiksnio 2 šeima, skitalono dehidratazės, Δ^5 -3-ketosteroidų izomerazės ir žiedą hidroksilinančių dioksigenazių beta subvienetų šeima (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=245009>). Iš sekos analizės sunku prognozuoti, kokią funkciją TTMP katabolizme galėtų atlikti TpdB baltymas, kadangi *NTF2-like* baltymų superšeimą sudaro baltymai, pasižymintys struktūriniu panašumu, tačiau atliekantys labai skirtingas funkcijas.

Sekos analizės rodo, kad TpdC baltymas yra panašus į amidazes (3.2 ir 3.3 lentelės), o artimo jo homologo (46% identiškų aminorūgščių) – omega



3.5 pav. TpdB baltymo filogenetinis medis. Medis sudarytas artimiausių grupių sujungimo metodu, naudojant 11 artimiausių homologų sekas (iš BLAST analizės) ir dvi homologiškas sekas, koduojančias žinomos struktūros baltymus. Šalia atsišakojimų nurodyta procentinė įkėlos sutapimo su tiriamuoju baltymu išraiška. Mastelis atitinka pakeistų aminorūgščių skaičių, tenkantį vienai pozicijai. Sekų genų banko prieigos numeriai pateikti skliaustuose. Nustatytos tretinės struktūros homologai pažymėti žvaigždute (*).

oktalaktamų hidrolazės iš *Rhodococcus* sp. Oct1 bakterijų – funkcija pademonstruota *in vitro* (Fukuta et al., 2010). Tai leidžia manyti, kad *tpdC* koduojamas baltymas yra amidazė.

Homologų paieška ir konservatyvių domenų analizė parodė, kad *tpdR* koduoja galimą transkripcijos reguliatorių (3.2 ir 3.3 lentelės). TpdR baltymo sekoje aptiktas domenas (cl17315), turintis HTH DNR surišanti motyvą ir domenas (cl17189), būdingas ATPazėms ir turintis konservatyvų nukleotidų fosfatus surišanti motyvą. Abu šie domenai būdingi LuxR šeimos transkripcijos reguliatoriams, todėl TpdR galėtų būti *tpd* sankaupos genų raišką reguliuojantis baltymas.

TpdE sekos analizė rodo, kad šis baltymas patikimai priskiriamas klasikinėms trumpų grandinių dehidrogenazėms / reduktazėms (SDR, angl. *short-chain dehydrogenase/reductase*), kurios turi *Rossmann fold* NAD(P)H/NAD(P)⁺ surišimo domeną (3.2 ir 3.3 lentelės). Dauguma bakterinių SDR yra oksidoreduktazės, katalizuojančios nuo NAD(P)H priklausomą hidroksi-keto grupių oksidacijos-redukcijos reakciją (Kavanagh et al., 2008). SDR atpažįsta įvairius substratus, tokius kaip alifatiniai alkoholiai, steroidai, prostaglandinai ir angliavandeniai (Jörnvall et al., 1995; Oppermann et al., 2003).

Toliau sekoje už *tpdE* geno aptiktas atviras skaitymo rėmelis *orf1* koduoja didžiajam *N,N*-dimetilformamidazės subvienetui homologišką baltymą (3.2 ir 3.3 lentelės). *orf2* koduojamas baltymas yra homologiškas peptidazėms (3.2 ir 3.3 lentelės). Tiek *orf1*, tiek *orf2* koduojamų baltymų homologai atpažįsta amidinį ryšį ir katalizuoja šio ryšio hidrolizės reakcijas. Pagal analogiją su piridino junginių skaidymo keliais tikėtina, kad po žiedo atidarymo gali susidaryti alifatiniai junginiai, turintys amidinių grupių. Todėl spėjame, kad Orf1 ir Orf2 taip pat gali būti susiję su tolimesniais TTMP skaidymo etapais.

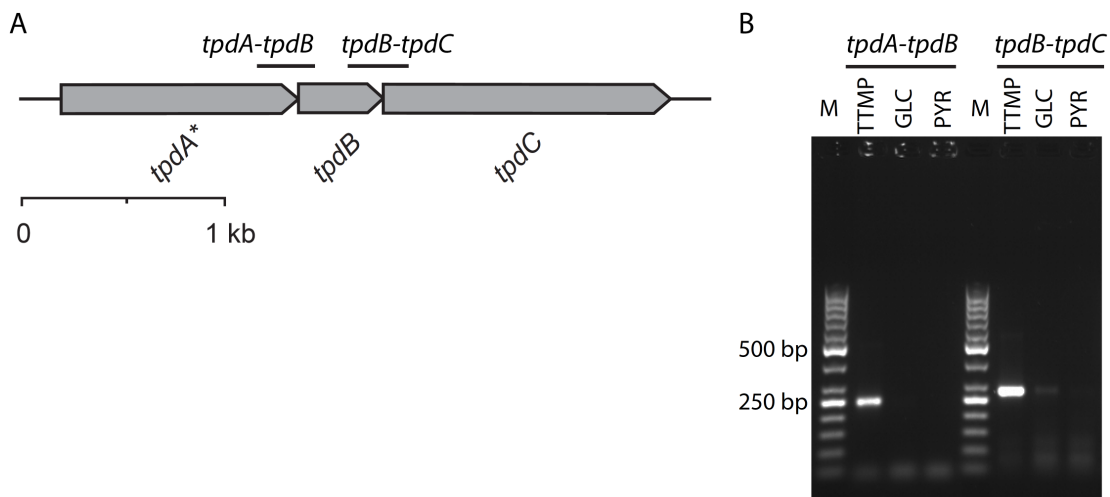
3.3. *tpd* genų sankaupos raiškos reguliacija

3.3.1. *tpdABC* genų operonas

R. jostii TMP1 *tpd* genų sankaupoje nustatčius atvirų skaitymo rėmelių vietas, pastebėta, kad *tpdA*, *tpdB* ir *tpdC* genai yra išsidėstę viena kryptimi ir arti vienas kito: *tpdA* ir *tpdB* atviro skaitymo rėmelius skiria tik 2 bp, o *tpdB* geno pabaiga ir *tpdC* geno pradžia persikloja per 1 bp. Dėl šios priežasties tikėtina, kad šie trys genai sudaro operoną. Patikrinti šiai prielaidai buvo sukurti pradmenys tarpgeninėms spėjamo operono sritims (AB_F ir AB_R skirti *tpdA* ir *tpdB* genų jungčiai ir BC_F ir BC_R skirti *tpdB* ir *tpdC* genų jungčiai, 3.6A pav.). Kadangi *tpdA* geno koduojamo baltymo sintezė yra indukuojama TTMP (3.1 pav.), *tpdABC* genų raiška tirta bakterijose, augintose su ir be TTMP.

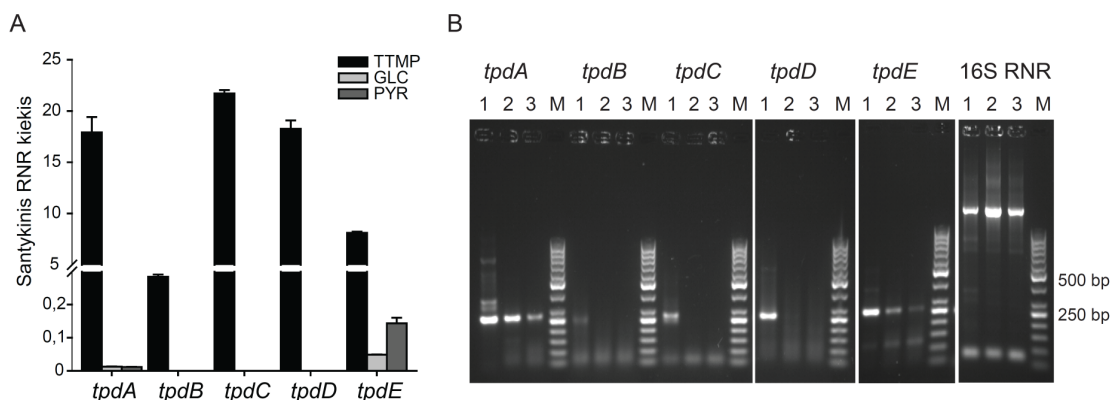
Bakterijos buvo auginamos terpėje su TTMP, gliukoze arba piridinu kaip vieninteliu anglies ir energijos šaltiniu. Iš skirtingomis sąlygomis augintų bakterijų išskirta RNR ir atliktas AT-PGR eksperimentas. AT-PGR produktų analizė parodė, kad *tpdA*, *tpdB* ir *tpdC* genai yra nuskaityti kaip vienas transkriptas, ir, kaip prognozuota, jų transkripcija stebima bakterijoms augant tik su TTMP, bet ne su gliukoze ar piridinu (3.6B pav.). Gauti rezultatai taip pat leidžia daryti prielaidą, kad *tpdB* bei *tpdC* genai yra susiję su TTMP metabolizmu *R. jostii* TMP1 bakterijose.

Siekiant patikrinti, ar ir *tpdD* bei *tpdE* genai yra susiję su TTMP katabolizmu, buvo ištirta šių genų raiška *R. jostii* TMP1 bakterijose, augintose su TTMP ir kontroliniais substratais – gliukoze ir piridinu. Šiuo tikslu buvo sukurti pradmenys *tpdD* ir *tpdE* genams bei pradmenys *tpdABC* operono genams, kurie naudoti kaip teigiama kontrolė. RNR buvo išskirta iš bakterijų, užaugintų su skirtingais substratais, ir atlikta kiekybinė AT-PGR analizė. Iš gautų rezultatų matoma, kad *tpdE* bei *tpdD* genų transkripcija specifiškai vyksta bakterijoms naudojant TTMP ir yra panašaus stiprumo kaip *tpdABC* operono genų nuskaitymas (3.7A pav.). *tpdE* geno atveju silpna iRNR sintezė stebima ir bakterijoms naudojant ne tik TTMP, bet ir kitus substratus.



3.6 pav. *tpdABC* operono tyrimas. *A*, genomo fragmento su *tpdABC* genais schema. Viršuje pažymėti AT-PGR taikiniai. *B*, AT-PGR produktų analizė elektroforezės agarozės gelyje metodu. *R. jostii* TMP1 RNR išskirta iš bakterijų, augintų su skirtingais anglies šaltiniais: 0,05 % TTMP, 0,1 % gliukozės (*GLC*) arba 0,05 % piridino (*PYR*). *M* – DNR molekulinės masės žymuo.

Be to, *tpdE* genas buvo stipriau nuskaitomas bakterijose, augintose su piridinu nei su gliukoze (3.7A pav.). Tai galėtų reikšti, kad *tpdE* geno raiška nėra visiškai specifinė TTMP ir gali būti indukuojama ir kitų *N*-heterociklinių junginių skaidymo metu.

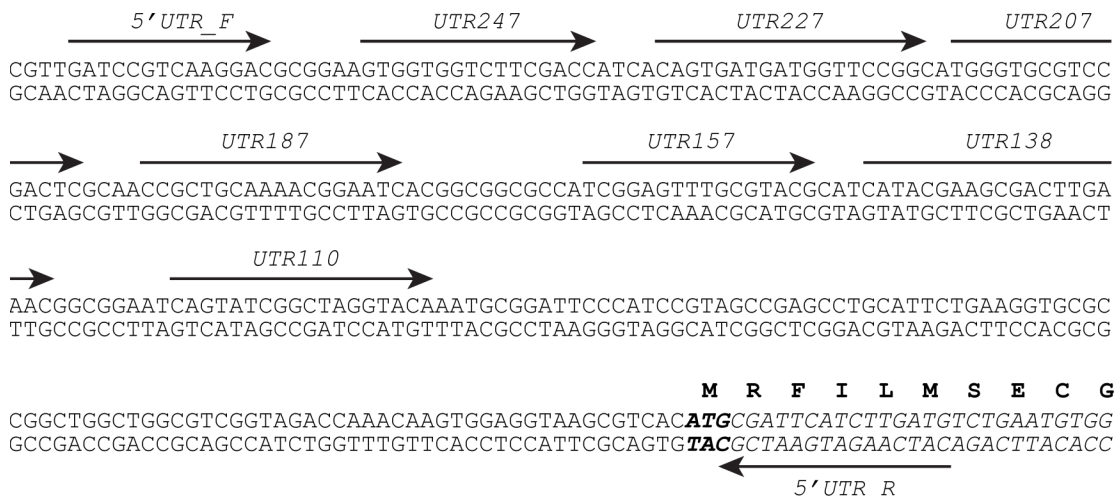


3.7 pav. *R. jostii* TMP1 *tpdA-E* genų raiškos tyrimas. *A*, Kiekybinė AT-PGR analizė atlikta naudojant RNR, išskirtą iš bakterijų, augintų su skirtingais anglies šaltiniais: 0,05 % TTMP, 0,1 % gliukozės (*GLC*) arba 0,05 % piridino (*PYR*). Rezultatai pateikti kaip santykinis RNR kiekis, apskaičiuotas iš slenkstinio ciklo reikšmės (C_T), normalizuotas naudojant 16S rRNR C_T . Pateiktas dviejų pakartojimų vidurkis \pm standartinis nuokrypis. *B*, AT-PGR analizės produktų elektroforezė. RNR buvo skiriama iš bakterijų, augintų su TTMP (1), gliukoze (2) arba piridinu (3); *M* – DNR molekulinės masės žymuo.

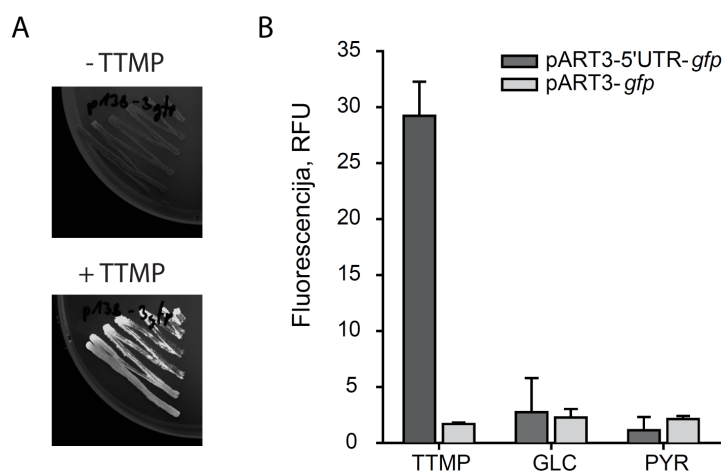
Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad TpdE ir TpdD fermentai taip pat reikalingi TTMP skaidyti. Kadangi ir *tpdA*, ir *tpdD* genų raiška yra indukuojama bakterijoms naudojant TTMP, tai sustiprina prielaidą, kad TpdD yra monooksigenazei TpdA reikalinga flavinų reduktazė, ir šie fermentai veikia kartu.

3.3.2. TTMP indukuojamo promotoriaus nustatymas

Kadangi *tpdA* geno koduojamo 40 kDa baltymo sintezė vyksta tik terpėje esant TTMP (3.1 pav.), šis genas turėtų būti valdomas TTMP arba jo metabolitais. Siekiant patikrinti šią prielaidą, prieš *tpdA* geną esanti DNR sritis buvo klonuota į pART3-*gfp* vektoriaus, kuris gali būti naudojamas promotorių paieškai (Sandu et al., 2005), sritį prieš sustiprintos fluorescencijos žaliai fluorescuojančio baltymo (EGFP) geną. Šiuo tikslu buvo padauginta prieš *tpdA* esanti seka ir *tpdA* geno pradžia ir šis fragmentas įterptas į vektorių taip, kad prieš geną esanti sritis ir *tpdA* geno dalis būtų sulieti su EGFP genu pART3-*gfp* plazmidėje (3.8 pav.). Tokiu būdu buvo gauta pART3-5'UTR-*gfp* plazmidė. Šia plazmide transformavus *R. jostii* TMP1 bakterijas ir jas auginant NB terpėje su 0,05 % TTMP, UV šviesoje buvo stebima bakterijų



3.8 pav. *tpdABC* minimalios promotoriaus sekos klonavimo schema. Pateikti pradmenys, naudoti klonuojant skirtingo ilgio *tpdABC* 5'UTR srities fragmentus. Padauginti fragmentai buvo sulieti su pART3-*gfp* plazmidės reporteriniu EGFP genu.



3.9 pav. EGFP raiška, valdoma TTMP indukuojamu promotoriumi. *A*, Prieš *tpdA* geną esančią DNR sritį įkėlus į pART3-*gfp* vektorių kaip promotorių, gauta plazmide transformuotos *R. jostii* TMP1 bakterijos, auginamos NB terpėje su 0,05 % TTMP, fluorescuoja. *B*, EGFP raiška specifiskai atsiranda pART3-5'UTR-*gfp* plazmide transformuotoms TMP1 bakterijoms augant mineralinėje terpėje su 0,05 % TTMP, bet ne su 0,1 % gliukozės (GLC) ar 0,05 % piridino (PYR). Bakterijų fluorescencija matuota plokštelių skaitytuvu ($\lambda_{\text{ex}} = 485\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 510\text{ nm}$); duomenys pateikti kaip trijų matavimų vidurkis \pm standartinis nuokrypis.

fluorescencija (3.9A pav.). Bakterijos, transformuotos tuščia pART3-*gfp* plazmide, augintos su TTMP, nefluorescavo. Terpėje be TTMP nebuvo stebima nei tuščia pART3-*gfp* plazmide, nei pART3-5'UTR-*gfp* plazmide transformuotų bakterijų fluorescencija.

Siekiant nustatyti minimalią promotoriaus seką buvo sukurti pradmenys skirti klonuoti trumpesnes priešgenines sritis (3.8 pav.). Taip seką trumpinant po 20 nukleotidų buvo nustatyta, kad TTMP indukuojamas promotorius yra 138 nukleotidų sekoje prieš *tpdA* geną. Trumpesni DNR fragmentai nebuvo pakankami indukuoti EGFP raiškai, bakterijas auginant su TTMP.

Siekiant išsiaiškinti, ar TTMP promotorius yra reguliuojamas represoriaus, ar aktyvatoriaus, pART3-5'UTR-*gfp* konstruktu buvo transformuotos *Arthrobacter globiformis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter* sp. PY21, *Arthrobacter* sp. 68b ir *Rhodococcus erythropolis* SQ1 bakterijos. Jeigu TTMP promotorių reguliuotų represorius, tikėtina, kad jį perkėlus į giminingą šeimininką būtų gaunama konstitutyvi EGFP raiška. Transformavus minėtas bakterijas paaiškėjo, kad jose šis promotorius neveikia ir bakterijos

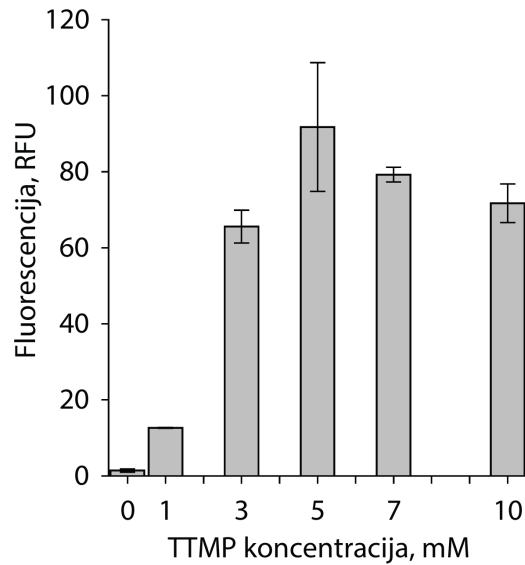
nefluorescuoja, netgi jei jos augintos su TTMP. Tai nėra labai netikėta, žinant, kad aromatinių junginių skaidyme dalyvaujantys reguliatoriai dažniau veikia kaip transkripcijos aktyvatoriai (Díaz ir Prieto, 2000). Gauti rezultatai leido padaryti prielaidą, kad *tpd* genų sankaupoje aptiktas potencialaus LuxR tipo reguliatorius TpdR gali dalyvauti TTMP indukuojamoje raiškoje ir veikti kaip *tpd* genų transkripcijos aktyvatorius.

3.3.3. Promotoriaus savybių tyrimas

TTMP indukuojamo promotoriaus savybės toliau buvo tiriamos *R. jostii* TMP1 bakterijose. Sistema buvo sudaryta iš plazmidės pART3-5'UTR-*gfp*, kurioje yra tik indukuojamas promotorius ir jo valdomas reporterinis EGFP genas, o promotoriaus reguliatorius / aktyvatorius, reikalingas promotoriui veikti, yra pačiose bakterijose. Kontrolei naudota pART3-*gfp* plazmidė (Sandu et al., 2005), turinti EGFP geną be TTMP reguliuojamo promotoriaus. Promotoriaus veikimas buvo vertinamas matuojant bakterijų fluorescencijos intensyvumą. Kaip matoma iš rezultatų, pateiktų 3.9B pav., *tpdABC* promotoriaus valdoma EGFP fluorescencija yra indukuojama tik su TTMP, ir kaip buvo galima numanyti iš ankstesnių bandymų, nėra aptinkama bakterijoms augant su gliukoze ar piridinu kaip vieninteliu anglies šaltiniu.

Kadangi buvo žinoma, kad TTMP indukuoja baltymų raišką ir bakterijoms augant turtingoje NB terpėje (3.1 pav.), pasinaudojant šia sistema buvo įvertinta optimali ir minimali TTMP koncentracija, reikalinga promotoriui veikti. Nustatyta, kad terpėje esant vos 1 mM TTMP koncentracijai jau yra indukuojama EGFP raiška, o maksimalus promotoriaus veikimas pasiekiamas terpėje esant apie 5 mM TTMP (3.10 pav.).

Siekiant tokią TTMP reguliuojamą sistemą pritaikyti valdomiems raiškos vektoriams kurti gali atrodyti, kad šių vektorių veikimui būtų reikalingos labai didelės induktoriaus koncentracijos (5 mM), tačiau svarbu atkreipti dėmesį, kad aprašytuose eksperimentuose buvo naudotos laukinio tipo

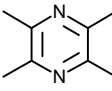
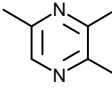
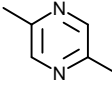
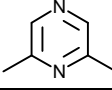

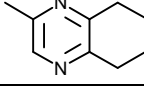



3.10 pav. EGFP fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo TTMP koncentracijos terpėje. pART3-5'UTR-gfp plazmide transformuotos *R. jostii* TMP1 bakterijos augintos NB terpėje esant skirtingoms TTMP koncentracijoms. Bakterijų fluorescencija matuota plokštelių skaitytuvu ($\lambda_{\text{ex}} = 485\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 510\text{ nm}$); duomenys pateikti kaip trijų matavimų vidurkis \pm standartinis nuokrypis.

R. jostii TMP1 bakterijos, kurios skaido TTMP, todėl reali TTMP koncentracija, esanti terpėje bei ląstelėse, buvo mažesnė nei pridėtoji. Svarbu, kad šis promotorius jau veikia esant vos 1 mM induktoriaus koncentracijai, todėl naudojant TTMP reguliuojamus vektorius galėtų būtų taikoma žymiai mažesnė, nei nustatyta optimali induktoriaus koncentracija.

Siekiant ištirti *tpdABC* promotoriaus specifiškumą, *R. jostii* TMP1 bakterijos buvo transformuotos pART3-5'UTR-gfp plazmide ir augintos NA terpėje su skirtingais *N*-heterocikliniais substratais. Promotoriaus aktyvumas buvo pusiau kiekybiškai įvertintas pagal EGFP fluorescenciją (3.4 lentelė). Gauti rezultatai rodo, kad *tpdABC* promotoriaus aktyvatorius, nors yra jautriausias TTMP, taip pat aktyvuoja genų raišką bakterijose, auginamose su kitais metilintais pirazinais, ypač su 2,3,5-trimetilpirazinu. Deja, tirtų junginių nepakako nustatyti regulatoriaus atpažįstamam alkilpirazinų struktūros motyvui. Buvo netikėta, kad EGFP sintetinamas bakterijose, augintose ir su 2,5-dimetilpirazinu, ir su 2,6-dimetilpirazinu, tačiau su 2,3-dimetilpirazinu ir 2,3-dietil-5-metilpirazinu augintos bakterijos nefluorescavo.

3.4 lentelė. TTMP indukuojamo promotoriaus specifiškumas. pART3-5'UTR-gfp plazmide transformuotos *R. jostii* TMP1 bakterijos augintos NA terpėje su 0,05 % skirtingų N-heterociklinių substratų. EGFP fluorescencija UV šviesoje įvertinta vizualiai, nurodomas fluorescencijos intensyvumas (+ < ++ < +++).

Substratas	Struktūra	Fluorescencijos intensyvumas
TTMP		+++
2,3,5-trimetilpirazinas		++
2,5-dimetilpirazinas		+
2,6-dimetilpirazinas		+
2,3-dimetilpirazinas		–
2,3-dietil-5-metilpirazinas		–
Piridinas		–
Kontrolė	–	–

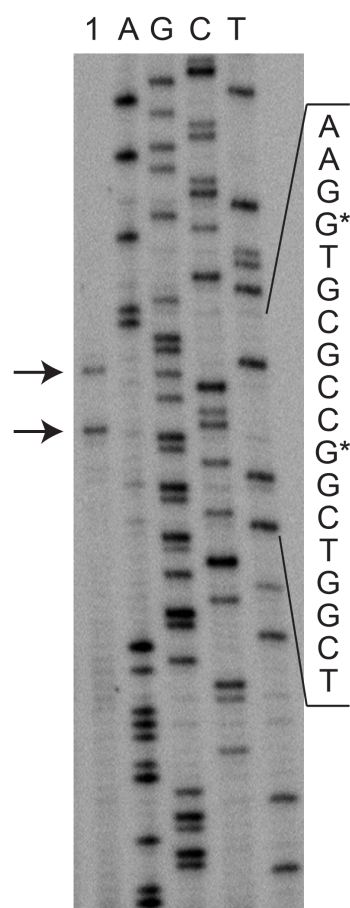
3.3.4. *tpdABC* operono transkripcijos pradžios taško nustatymas

TTMP indukuojamo operono transkripcijos pradžios taško nustatymui buvo naudota pradmens ilginimo reakcija (3.11 pav.). Bendra *R. jostii* TMP1 bakterijų RNR buvo išskirta iš indukcinėmis sąlygomis (0,05 % TTMP) augintų bakterijų. Analizė atlikta naudojant pradmenį, prasidedantį 20 nukleotidų žemiau *tpdA* geno translacijos iniciacijos kodono ATG. ³²P žymėtas atvirkštinės transkriptazės produktas buvo analizuojamas poliakrilamidiniame gelyje kartu su DNR sekoskaitos produktais, gautais naudojant tą patį pradmenį (3.11 pav.).

Analizės metu buvo gauti du signalai: vienas atitinka G, esantį už 52 nukleotidų nuo translacijos iniciacijos kodono ATG, kitas G yra 45-tas

nukleotidas nuo ATG. G, esantis už 52 nukleotidų nuo ATG, yra laikomas transkripcijos pradžios tašku 1. Antrasis signalas gali būti atsiradęs dėl iRNR hidrolizės endonukleazėmis. Nustačius transkripcijos pradžios tašką, galima prognozuoti svarbias promotoriaus sritis, t. y. RNR polimerazės σ faktoriaus rišimosi vietą (–10 regioną) ir –35 regioną (3.12 pav.). Tačiau *Rhodococcus* genties bakterijų promotoriai nėra taip gerai ištirti, kaip *E. coli* bakterijų promotoriai, todėl nėra išskirtų ir aprašytų kanoninių jų promotorių sekų. Dėl šios priežasties –10 ir –35 regionai šioje sekoje buvo pažymėti tik pagal padėtį nuo transkripcijos pradžios taško.

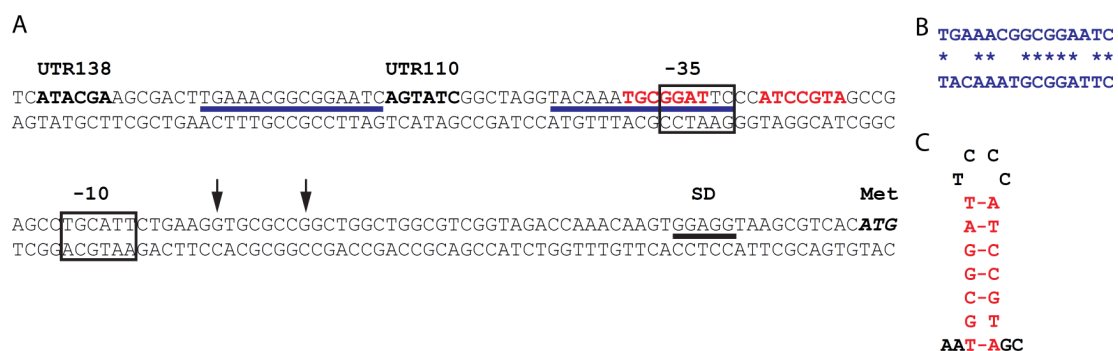
Iš literatūros duomenų yra žinoma, kad promotorių sekos, prie kurių jungiasi LuxR superšeimos transkripcijos reguliatoriai, pasižymi panašia struktūra. Pavyzdžiui, LuxR dimeras jungiasi prie dviejų 20 bp invertuotų



3.11 pav. TTMP indukuojamo operono transkripcijos pradžios taško nustatymas pradmens ilginimo metodu. 1 takelis – pradmens ilginimo reakcijos produktas; A, G, C, T – DNR sekoskaitos reakcijos produktai. Rodyklėmis pažymėti transkriptų pradžios taškų signalai. Dešinėje pateikta genomo seka bei žvaigždutėmis pažymėti transkriptų pradžios taškai.

pasikartojančių sekų (Stevens et al., 1994). GerE dimeras jungiasi prie dviejų 12 bp invertuotų sekų (Ducros et al., 2001), o NarL dimeras atpažįsta du 7 bp invertuotų sekų pasikartojimus (Darwin et al., 1996). *R. Jostii* TMP1 *tpdABC* operono reguliacinėje sekoje šalia -35 pozicijos buvo aptiktas panašus sekų pasikartojimas (3.12 pav.: *A* – mėlynai pabrauktos sekos; *B* – sekų palyginimas). Kitaip nei kitų bakterijų reguliatorių atpažįstamos sekos šios 15 bp sekos nėra invertuotos. Tačiau klonavus reguliacinį DNR regioną be pirmojo iš šių pasikartojimų (naudojant pradmenį UTR110), ji nebeturėjo promotoriaus savybių. Šie rezultatai leidžia spėti, kad šios pasikartojančios sekos gali būti svarbios reguliatoriui veikti.

Antroji iš pasikartojančių 15 bp sekų persidengia su -35 regionu (3.12A pav.), be to, jos pabaigoje yra trumpa 7 bp seka, kuri yra komplementari kitai 7 bp invertuotai sekai, esančiai už įsiterpusių 4 nukleotidų (3.12A pav., raudonai pažymėtos sekos). Dėl savo komplementarumo šios sekos galėtų suformuoti plaukų segtuko struktūrą (3.12C pav.), ribojančią transkripcijos veiksmų prisijungimą prie -35 regiono. Regulatoriui atpažinus ir prisijungus prie pasikartojančių 15 bp sekų, ši struktūra būtų išardyta ir būtų inicijuojama *tpdABC* operono transkripcija. Detaliau reguliacijos mechanizmui iširti reikalingi papildomi tyrimai.

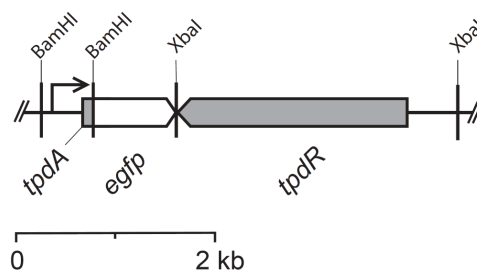


3.12 pav. Tetrametilpirazinu indukuojamo promotoriaus sritis. *A*, Met – translacijos iniciacijos kodonas; SD – ribosomos atpažinimo vieta; rodyklėmis pažymėti transkriptų pradžios taškai; raudonai pažymėtos invertuotos komplementarios 7 bp sekos, kurių panašumas parodytas *C* struktūroje; mėlynai pabrauktos 15 bp ilgio panašios sekos, jų panašumas pateiktas *B* struktūroje. UTR138 ir UTR110 žymi sekų 5' galus gaunamus su pradmenimis dauginant promotoriaus regioną ir klonuojant jį į pART3-*gfp* vektorių.

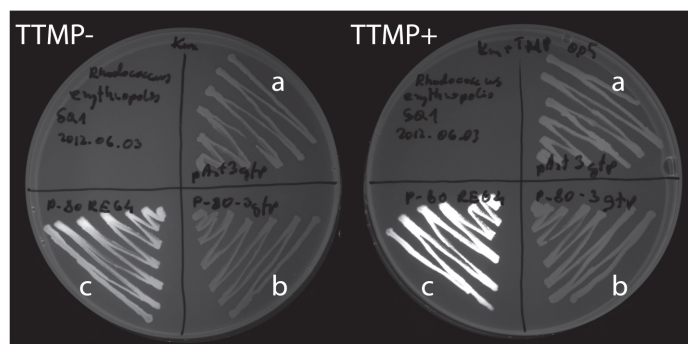
3.3.5. Regulatoriaus geno klonavimas ir veikimas *R. erythropolis* SQ1 ląstelėse

tpd sankaupos genų koduojamų baltymų sekų analizės metu nustatyta, kad TpdR yra hipotetinis LuxR superšeimai priklausantis transkripcijos veiksnys. Paprastai transkripcijos reguliatorių genai aptinkami šalia jų reguliuojamų genų, todėl buvo padaryta prielaida, kad TpdR galėtų dalyvauti *tpdABC* operono valdyme. Anksčiau aprašyti TTMP indukuojamo promotoriaus tyrimai leidžia manyti, kad šį promotorių valdo transkripcijos aktyvatorius. Dėl šių priežasčių buvo nuspręsta patikrinti, ar *tpdR* koduojamas reguliatorius yra reikalingas TTMP indukuojamam promotoriui valdyti. Patikrinti šiai hipotezei *tpdR* genas su priešgenine DNR sritimi buvo padaugintas PGR būdu ir klonuotas į plazmidę, kurioje jau buvo TTMP indukuojamas promotorius ir jo valdomas EGFP genas. Tokiu būdu gauta plazmidė pART3-5'UTR-*gfp*-R (3.13 pav.). Šia plazmide transformuotos *R. erythropolis* SQ1 bakterijos buvo auginamos NB terpėje su (0,05 %) ir be TTMP.

Nustatyta, kad bakterijas transformavus plazmide, turinčia *tpdR* geną, TTMP indukuojamas promotorius iš *R. jostii* TMP1 veikia ir *R. erythropolis* SQ1 bakterijose, kurias auginant terpėje su TTMP buvo stebima bakterijų fluorescencija (3.14 pav.). Nors pART3-5'UTR-*gfp*-R transformuotos *R. erythropolis* SQ1 bakterijos šiek tiek fluorescuoja ir terpėje be TTMP, tačiau fluorescencija pastebimai sustiprėja terpėje su TTMP. Gauti rezultatai patvirtino, kad *tpdR* koduojamas reguliatorius dalyvauja *tpd* operono reguliacijoje ir veikia kaip transkripcijos aktyvatorius.



3.13 pav. pART3-5'UTR-*gfp*-R klonavimo schema. *tpdA* priešgeninė sritis ir geno pradžia sulieta su *egfp* genu, įterptas *tpdR* genas.



3.14 pav. TpdR veikia kaip TTMP indukuojamą promotorių atpažįstantis transkripcijos aktyvatorius. *R. erythropolis* SQ1 bakterijos, transformuotos pART3-gfp (a), pART3-5'UTR-gfp (b) ir pART3-5'UTR-gfp-R (c) plazmidėmis, augintos NB terpėje su 0,05 % TTMP (TTMP+) ir be TTMP (TTMP-). Petri lėkštelės vaizdintos UV šviesoje.

Aprašyta promotoriaus ir jo reguliatoriaus sistema galėtų būti pritaikyta *Rhodococcus* spp. bakterijų baltymų raiškos sistemoms kurti. Šiuo metu yra sukurtos vos kelios raiškos sistemos, skirtos šios genties bakterijoms, o kaip rodo ir šiame darbe patirti sunkumai gaunant *Rhodococcus* baltymus *E. coli* bakterijose (žr. 3.4 skyrių), tokių sistemų poreikis tikrai yra aktualus. Dabar naudojamuose *Rhodococcus* baltymų raiškos vektoriuose genų raiškai reguliuoti yra naudojamos ksenobiotikų skaidymo reguliavimo sistemos. Pavyzdžiui, vienoje iš *Rhodococcus* spp. bakterijoms tinkamų raiškos sistemų – pART grupės vektoriuose panaudotas 6-D-hidroksinikotino oksidazės geno promotorius ir operatorius iš *Arthrobacter nicotinovorans*, skaidančio nikotiną (Sandu et al., 2005).

Nors TTMP indukuojamo promotoriaus reguliuojamos raiškos efektyvumas tyrinėtas tik dviejų rūšių *Rhodococcus* bakterijose, tačiau stipri TpdA raiška, auginant *R. jostii* TMP1 bakterijas su TTMP (3.1 pav.), bei intensyvi EGFP fluorescencija *R. erythropolis* SQ1 bakterijose, transformuotose plazmide su *tpdABC* promotoriumi ir *tpdR* (3.14 pav.), rodo šios sistemos potencialą. Be to, nedidelė TTMP kaina suteikia šiai sistemai rimtą pranašumą prieš kitais induktoriais valdomas baltymų raiškos sistemas. Pavyzdžiui, TTMP šiuo metu yra bent dviem eilėmis pigesnis už tiostreptoną, kuris naudojamas indukcijai pTip tipo plazmidėse (Nakashima ir Tamura, 2004a).

3.4. TTMP metabolinio kelio nustatymas

3.4.1. *tpdABC* genų koduojamas TTMP skaidymas

Nustačius TTMP indukuojamo baltymo geną *tpdA* bei parodžius, kad genai *tpdA*, *tpdB* ir *tpdC* yra nuskaitomi kaip vienas transkriptas bei iš TpdA homologų analizės padarius prielaidą, kad šis baltymas galėtų dalyvauti pradinėje TTMP skaidymo reakcijoje, buvo nuspręsta nustatyti *tpdABC* operono funkciją TTMP skaidymo procese. Tam tikslui visas *tpdABC* operonas, atskiri jo genai bei genų *tpdAB* ir *tpdBC* kombinacijos buvo klonuotos į pART2 raiškos vektorių ir perkeltos į giminingą šeimininką – *R. erythropolis* SQ1 bakterijas.

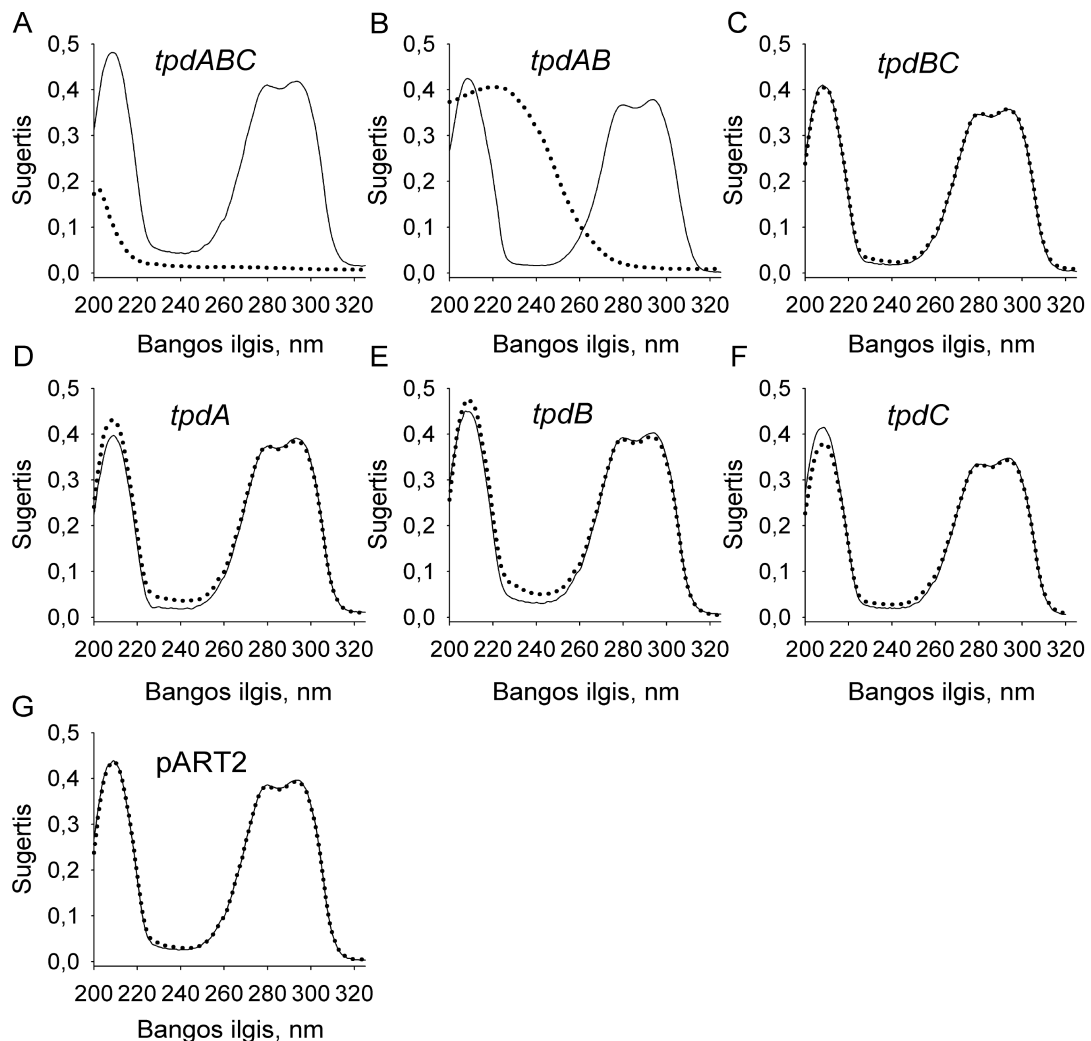
R. erythropolis SQ1 bakterijos šeimininku pasirinktos dėl kelių priežasčių. Rekombinantinių baltymų raiškai pasirinkus klasikinį šeimininką – *E. coli* bakterijas – tirpių ar funkcionalių TpdABC baltymų gauti nepavyko. Naudojant pET21 raiškos sistemą ir išbandžius keletą skirtingų *E. coli* bakterinių kamienų bei indukcijos sąlygų, buvo gauti tik netirpūs rekombinantiniai baltymai intarpiniuose kūneliuose.

Šis reiškinys, kai Gram teigiamųjų bakterijų su GC turtingu genomu baltymai *E. coli* bakterijose sintetinami neaktyvūs, yra gerai žinomas, tačiau tikslios jo priežastys nėra aiškios. Manoma, kad įtakos gali turėti *E. coli* ir *Rhodococcus* spp. bakterijų viduląstelinės aplinkos skirtumai, tokie kaip baltymų sintezės greitis, baltymų struktūros formavime dalyvaujantys baltymai, osmosinis slėgis ar redokso būseną (Nakashima ir Tamura, 2004b). Be to, žinoma, kad Gram teigiamųjų bakterijų baltymai gali nebūti sintetinami *E. coli* bakterijose, kadangi kai kurie aktinomicetų kodonai yra retai naudojami *E. coli* genome (Nakashima ir Tamura, 2004b). Galiausiai, *Rhodococcus* bakterijos naudoja kai kuriuos kofaktorius, kurių *E. coli* nesintetina.

Šių baltymų raiškos problemų galima išvengti raiškai naudojant giminingą šeimininką, todėl buvo pasirinktos tetrametilpirazino neskaidančios *R. erythropolis* SQ1 bakterijos. Šios bakterijos yra lengvai transformuojamos pART tipo vektoriais, be to, jose gerai veikia pART promotorius: *R.*

erythropolis SQ1 bakterijų transformacija pART2-*gfp* plazmide lemia efektyvią EGFP baltymo sintezę, dėl kurios stebima bakterijų fluorescensija.

R. erythropolis SQ1 bakterijos buvo transformuotos skirtingais konstruktais, koduojančiais *tpdABC* operono genus ir jų kombinacijas, ir buvo tikrinamas gautų transformantų gebėjimas katabolizuoti TTMP. TTMP biokonversija *R. erythropolis* SQ1 transformantuose buvo stebima spektrofotometriškai – matuojant reakcijos mišinio UV sugerties spektro pokyčius.



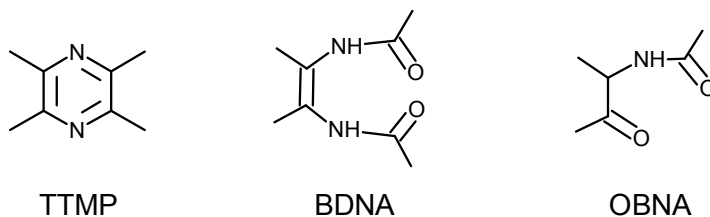
3.15 pav. TTMP biokonversija panaudojant *R. erythropolis* SQ1 bakterijas, transformuotas plazmidėmis su skirtingais *tpdABC* operono genais. Bakterijos auginamos NB terpėje. Biokonversijos vykdytos 20 °C temperatūroje, 10 mM kalio fosfato buferiniame tirpale (pH 7,2), esant 0,1 mM pradinei TTMP koncentracijai. Biokonversija vyko 17 val. Spektrai užrašyti bakterijas pašalinus centrifuguojant (1 min., 16000×g). Ištisine linija vaizduojamas pradinis sugerties spektras, taškais vaizduojamas biokonversijos reakcijos produkto sugerties spektras.

Nustatyta, kad TTMP skaidė *R. erythropolis* SQ1 bakterijos, transformuotos plazmidėmis su *tpdABC* ir *tpdAB* genais, o atskirų *tpdA*, *tpdB* ir *tpdC* genų TTMP skaidymui nepakako (3.15 pav.). Per 6 paras *R. erythropolis* SQ1 bakterijos su pART2-*tpdABC* plazmide transformavo 240 mg TTMP, o pART2-*tpdAB* – 140 mg TTMP.

Gautuose sugerties spektruose matomi pokyčiai rodo, kad TTMP skaidant bakterijoms su *tpdABC* ir su *tpdAB* genais susidaro skirtingi produktai (3.15A, B pav.). Kaip ir buvo galima tikėtis, susidariusių produktų sugerties spektruose nebuvo stebimas sugerties padidėjimas 320–350 nm srityje, būdingas hidroksilintiems *N*-heterocikliniams junginiams (Taylor ir King, 1987), kurie susidaro iki šiol žinomų alkilpirazinų pradinėse skaidymo reakcijose (Müller ir Rappert, 2010; Rajini et al., 2011). Skaidant TTMP tokie junginiai susidaryti negali dėl šio junginio struktūros, kurioje visi aromatinio žiedo anglies atomai turi po metilo pakaitą.

TTMP biokonversijos metu susidarę produktai buvo išskirti iš reakcijos mišinio ir jų struktūros buvo nustatytos ¹H BMR, ¹³C BMR ir MS analizės metodais. *R. erythropolis* SQ1 bakterijų, transformuotų plazmide su *tpdABC* genais, produkto ¹H BMR spektre buvo matomos penkios smailės: δ 6.37 (br s, 1H, NH), 4.58 (p, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH), 2.21 (s, 3H, COCH₃), 1.99 (s, 3H, NHCOCH₃), 1.36 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃); o ¹³C BMR spektre nustatytos šešios smailės: δ 207.1, 169.7, 54.8, 26.8, 23.4, 17.8. Taip nustatyta, kad bakterijos, turinčios visus tris *tpdABC* genus, metabolizavo TTMP iki *N*-(3-oksobutan-2-il)acetamido (OBNA). OBNA ¹H BMR ir ¹³C BMR spektrai visiškai atitiko anksčiau publikuotus duomenis (Peach et al., 2006).

Tuo tarpu *R. erythropolis* SQ1 bakterijų, transformuotų plazmide su *tpdAB* genais, produkto ¹H BMR spektras turėjo tris smailes: δ 8.67 (s, 1H, NH), 1.88 (s, 3H, CH₃) ir 1.82 (s, 3H, CH₃). *tpdAB* produkto ¹³C BMR spektre nustatytos keturios smailės: δ 167.7, 121.2, 23.2, 16.4. Didelės skyros MS analizė patvirtino, kad šio junginio molekulinė formulė buvo C₈H₁₅N₂O₂ (apskaičiuota [M+H]⁺ molekulinė masė buvo 171.11335, nustatyta masė – 171.1134). Naudojant šiuos duomenis nustatyta, kad TpdAB oksidavo TTMP



3.16 pav. Tetrametilpirazino (*TTMP*), (*Z*)-*N,N'*-(but-2-ene-2,3-diil) diacetamido (*BDNA*) ir *N*-(3-oksobutan-2-il)acetamido (*OBNA*) struktūrinės formulės.

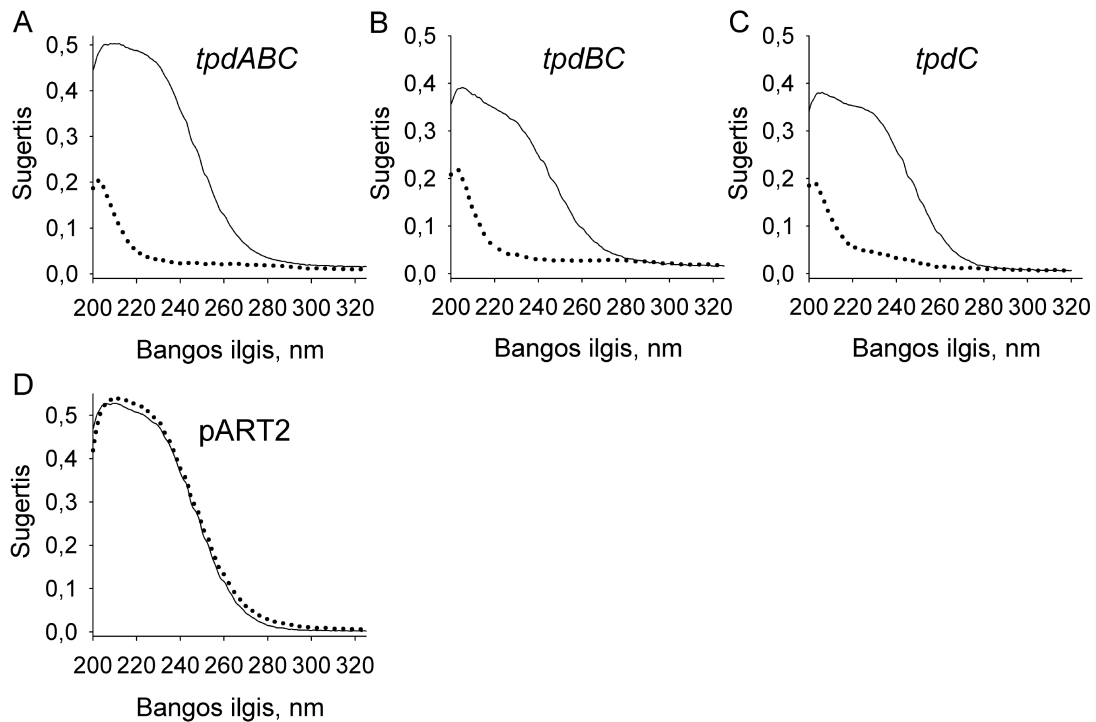
iki (*Z*)-*N,N'*-(but-2-ene-2,3-diil)diacetamido (*BDNA*). Substrato ir tarpinių metabolitų struktūros pateiktos 3.16 pav.

Siekiant nustatyti, kurie *tpdABC* operono genai yra reikalingi tarpiniam metabolitui *BDNA* hidrolizuoti iki *OBNA*, buvo atliktos biokonversijos reakcijos, transformuotoms *R. erythropolis* SQ1 bakterijoms kaip substratą pateikiant išgrynintą *BDNA*. Nustatyta, kad *BDNA* hidrolizę vykdydė bakterijos, turinčios plazmidės su *tpdABC*, *tpdBC* ir *tpdC* genais (3.17 pav.). Šie duomenys atskleidė, kad *BDNA* skaidymą katalizuoja vienas *TpdC* fermentas, kurio aktyvumui nereikalingi kartu veikiantys *TpdA* ar *TpdB* baltymai.

3.5 lentelė. *R. erythropolis* SQ1 biokonversijų produktai, gauti su skirtingais rekombinantiniais *tpdABC* operono genais. Transformuotų bakterijų suspensijos buvo inkubuotos su 0,1 mM *TTMP* arba 0,1 mM *BDNA*. Substrato skaidymas nustatytas matuojant UV sugerties spektro pokyčius. *TTMP* biokonversijos reakcijų produktai nustatyti ¹H BMR, ¹³C BMR ir MS analizės metodais. *BDNA* biokonversijos produktai identifikuoti pagal UV sugerties spektrus ir plonasluoksnės chromatografijos analizę.

Plazmidė	<i>tpd</i> genas(-ai)	Substratas	
		<i>TTMP</i>	<i>BDNA</i>
pART2	-	–	–
pART2- <i>tpdA</i>	<i>tpdA</i>	–	<i>n</i>
pART2- <i>tpdB</i>	<i>tpdB</i>	–	<i>n</i>
pART2- <i>tpdC</i>	<i>tpdC</i>	–	OBNA
pART2- <i>tpdAB</i>	<i>tpdA</i> , <i>tpdB</i>	BDNA	<i>n</i>
pART2- <i>tpdBC</i>	<i>tpdB</i> , <i>tpdC</i>	–	OBNA
pART2- <i>tpdABC</i>	<i>tpdA</i> , <i>tpdB</i> , <i>tpdC</i>	OBNA	OBNA

„–“ – biokonversija nevyksta; *n* – biokonversija netirta.



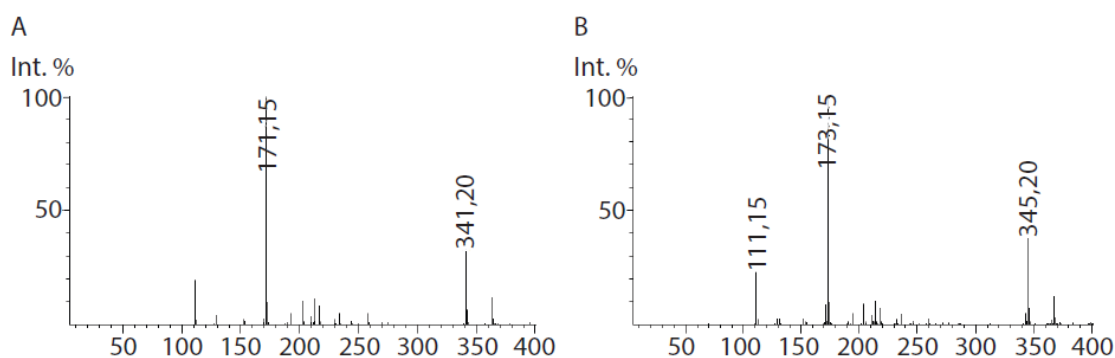
3.17 pav. (Z)-N,N'-(but-2-ene-2,3-diil)diacetamido (BDNA) biokonversija *R. erythropolis* SQ1 bakterijomis, transformuotomis plazmidėmis su skirtingais *tpdABC* operono genais. Bakterijos auginamos NB terpėje. Biokonversijos vykdytos 20 °C temperatūroje, 10 mM kalio fosfato buferiniame tirpale (pH 7,2), esant 0,1 mM pradinei BDNA koncentracijai. Biokonversija vyko 1 val. Spektrai užrašyti bakterijas pašalinus centrifuguojant (1 min., 16000×g). Ištinė linija vaizduojamas pradinis sugerties spektras, taškais vaizduojamas biokonversijos reakcijos produkto sugerties spektras.

Biokonversijos bandymų rezultatai rodo, kad TTMP metabolizmas, koduojamas *tpdABC* genų, yra kelių pakopų procesas. TTMP žiedo oksidacinio atidarymo reakciją katalizuoja TpdAB ir šios reakcijos metu susidaro BDNA, kuris toliau hidrolizuojamas TpdC fermento iki OBNA. Visų tirtų *tpdABC* operono genų įtaka *R. erythropolis* SQ1 bakterijų gebėjimui metabolizuoti TTMP ir BDNA pateikta apibendrinančioje 3.5 lentelėje.

3.4.2. TpdAB katalizuojama TTMP oksidacija ^{18}O izotopu žymėtame vandenyje

Pradiniame TTMP skaidymo žingsnyje TpdAB kompleksas vykdo oksidacinę aromatinio žiedo atidarymo reakciją, susidarant BDNA. Nors šios reakcijos metu į TTMP molekulę yra įjungiami du deguonies atomai ir susidaręs produktas yra panašus į dioksigenazinės reakcijos produktą, sekų analizė rodo, kad TpdA yra homologiška monooksigenazėms. Yra žinoma atvejų, kai flavino monooksigenazės katalizuoja piridinių žiedo oksidacinį atidarymą, susidarant panašios struktūros produktams (Nelson ir Snell, 1986). Siekiant nustatyti TpdAB oksigenazės katalizuojamo TTMP žiedo oksidacijos mechanizmą, TTMP biokonversija iki BDNA buvo atliekama ^{18}O izotopu žymėtame vandenyje, naudojant pART2-*tpdAB* plazmide transformuotas *R. erythropolis* SQ1 bakterijas.

Atlikus TTMP biokonversiją iki BDNA ^{18}O izotopu žymėtame vandenyje ir paprastame vandenyje, susidarę produktai buvo iširti taikant tandeminę skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos analizę. Nustatyta, kad ^{18}O izotopu žymėtame vandenyje susidariusio BDNA molekulinė masė yra 172 (nustayta $[\text{M}+\text{H}]^+$ masė – 173,15) ir dviem vienetais skiriasi nuo BDNA masės, gautos paprastame vandenyje ($[\text{M}+\text{H}]^+$ masė – 171,15) (3.18 pav.). Šie rezultatai atskleidė, kad TpdAB oksigenazė



3.18 pav. TTMP biokonversijos *R. erythropolis* SQ1 bakterijose, transformuotose *tpdAB* genais, produkto HPLC-MS analizė. Pateikti teigiamos jonizacijos masių spektrai, gauti analizuojant BDNA gautą vandenyje (A) arba ^{18}O izotopu žymėtame vandenyje (B).

oksidacinio žiedo atidarymo metu į TTMP molekulę įjungia vieną nežymėtą O atomą iš molekulinio deguonies, o antrasis, žymėtas deguonies atomas yra įjungiamas iš vandens molekulės.

Paprastai du deguonies atomus į oksiduojamą substratą įjungia dioksigenazės (Ferraro et al., 2005). Tačiau dioksigenazės abu deguonies atomus į substratą įjungia iš molekulinio deguonies, todėl dioksigenazės reakcijos produkto, gauto sunkiuoju deguonimi žymėtame vandenyje, molekulinė masė neturėtų skirtis nuo produkto, gauto įprastame vandenyje. Kita vertus, kai kurios flavino monooksigenazės taip pat oksiduoja substratus, įjungdamos du deguonies atomus. Pavyzdžiui, tokiu būdu vyksta 2-metil-3-hidroksipiridino-5-karboksirūgšties monooksigenazės (MHCO) katalizuojama 2-metil-3-hidroksipiridino-5-karboksirūgšties oksidacinio žiedo atidarymo reakcija (Chaiyen et al., 1997). Skirtingai nei dioksigenazės, monooksigenazės į substratą įjungia vieną molekulinio deguonies atomą, o antrojo deguonies atomo šaltinis yra vanduo. Todėl sunkiuoju deguonimi žymėtame vandenyje atlikus monooksigenazės katalizuojamą oksidaciją, susidaręs produktas turėtų turėti vieną ^{18}O atomą ir savo masę skirtis nuo produkto, gauto nežymėtame vandenyje. Kadangi TpdAB katalizuojamos TTMP oksidacijos metu ^{18}O izotopu žymėtame vandenyje susidarė BDNA, sunkesnis nei gautasis paprastame vandenyje, įrodyta, jog TpdAB veikia kaip TTMP monooksigenazė.

Taigi tiriant TTMP metabolizmą nustatyta, kad pradiniam TTMP skaidymo žingsniui reikalingi du genai – *tpdA* ir *tpdB*. Šių genų koduojami baltymai sudaro TpdAB kompleksą, veikiantį kaip TTMP monooksigenazė. Sekų analizė atskleidė, kad artimiausi TpdA homologai yra į liuciferazės panašios monooksigenazės. Panašiai kaip TpdA aktyvumui yra reikalingas TpdB baltymas, bakterinės liuciferazės veikia kaip kompleksai iš α ir β subvienetų. Tačiau liuciferazių subvienetai pasižymi sekų tarpusavio panašumu (Ellis, 2010), o TpdB nėra homologiškas liuciferazėms. Be to, TpdB yra gerokai mažesnis (teorinė masė 15,2 kDa) už tipišką liuciferazės β subvienetą (35 kDa) (Baldwin et al., 1995).

TpdB sekos analizė parodė, kad baltymas priklauso branduolio transporto faktoriaus 2 (*NTF2-like*) superšeimai, kuriai priklausančių baltymų funkcijos labai skiriasi, nepaisant struktūrinių panašumų. Tarp šiai superšeimai priklausančių baltymų šeimų yra ir ketosteroidų izomerazių šeima, kuriai priklausančys baltymai teoriškai galėtų dalyvauti TpdAB komplekso katalizuojamoje skaidymo reakcijoje. Ketosteroidų izomerazės katalizuoja dvigubųjų ryšių persigrupavimą steroiduose (Kuliopulos et al., 1991) ir taip veikdamas TpdB galėtų destabilizuoti aromatinę TTMP struktūrą. Kita vertus, *NTF2-like* baltymų superšeimai taip pat priklauso mažas dimerinis baltymas – PhzA/B, kuris dalyvauja dviejų aminoketono molekulių kondensacijos reakcijoje (Ahuja et al., 2008). Įvykus aminoketonų kondensacijai, PhzA/B katalizuoja dvigubųjų ryšių persigrupavimą, kurio metu susidaro fenazino biosintezės tarpinis metabolitas, kuris yra struktūriškai panašus į piraziną, turintį po pakaitą prie kiekvieno aromatinio žiedo anglies atomo. Panašūs TpdB katalizuojami dvigubųjų ryšių pergrupavimai TTMP molekulėje galėtų destabilizuoti substratą ir taip dalyvauti TpdAB katalizuojamoje oksidacijoje.

Flavinus naudojančios monooksigenazės, tokios kaip TpdA, veikia kaip dvikomponentė sistema, sudaryta iš didžiojo komponento (oksidazės), kuris hidroksilina substratą naudodamas redukuotus flavino nukleotidus, ir mažojo komponento (flavinų reduktazės), kuris naudoja NAD(P)H ir redukuoja FAD arba FMN (Ellis, 2010). Tokio tipo flavinų reduktazę *tpd* genų sancaupoje koduoja *tpdD* genas, tačiau TTMP biokonversijai *R. erythopolis* SQ1 bakterijose užteko *tpdA* ir *tpdB* genų, o *tpdD* genas nebuvo būtinas (3.15 pav.). Genų raiškos tyrimais buvo nustatyta, kad *tpdD* geno raiška aktyvuojama bakterijoms skaidant TTMP (3.7 pav.), todėl tikėtina, kad *R. jostii* TMP1 bakterijose TpdD veikia kartu su TpdAB kompleksu. Kadangi *Rhodococcus* spp. bakterijos koduoja daug flavino reduktazių (kaip matoma publikuotuose genomuose (McLeod et al., 2006; Sekine et al., 2006)), biokonversijos reakcijas atliekant *R. erythopolis* SQ1 bakterijose, TpdD galėjo pakeisti viena iš SQ1 flavino reduktazių.

3.4.3. TpdC katalizuojamos BDNA hidrolizės tyrimas *in vitro*

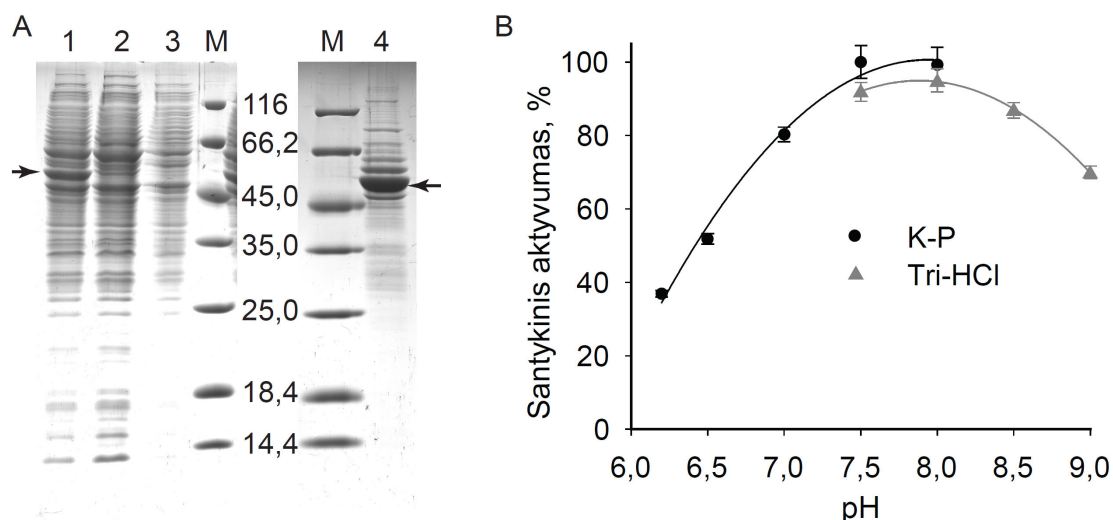
Tiriant TTMP metabolizmą *in vivo* buvo pademonstruota, kad po TTMP oksidacijos, katalizuojamos TpdAB komplekso, susidaręs BDNA yra toliau hidrolizuojamas TpdC (3.17C pav.). Siekiant patvirtinti, kad TpdC yra BDNA hidrolazė, fermentas buvo išgrynintas ir jo funkcija buvo ištirta *in vitro*.

Siekiant efektyviai išgryninti TpdC, buvo pasirinkta prie baltymo prisiūti poli-His uodegą. Rekombinantinio baltymo raiškai buvo pasirinkta standartinė pET baltymų raiškos sistema *E. coli* bakterijose. *tpdC* genas buvo klonuotas į pET21b(+) vektorių, sukuriant du konstruktus: pET-*tpdC*, koduojantį natyvų TpdC, ir pET-*tpdC*-His₆, koduojantį TpdC su šešių histidino liekanų uodega C-gale. Deja, išbandžius keletą skirtingų *E. coli* bakterijų ir indukcijos sąlygų nepavyko gauti aktyvių baltymų.

Nepavykus TpdC baltymo susintetinti *E. coli* ląstelėse ir žinant, kad šis fermentas yra aktyvus *R. erythropolis* SQ1 bakterijose naudojant pART2 raiškos vektorių (pART2-*tpdC*, 3.17C pav.), pART2 raiškos vektoriuje buvo sukurtas konstruktas pART2-*tpdC*-His₈, koduojantis TpdC baltymą su aštuonių histidino liekanų uodega C-gale. Šiuo konstruktu transformavus *R. erythropolis* SQ1 bakterijas, buvo nustatyta, kad TpdC, turintis poli-His uodegą C-gale, yra neaktyvus.

Tuomet TpdC raiškai buvo pasirinkta *Rhodococcus* spp. bakterijose veikianti pTip baltymų raiškos sistema. pTip-QC1 vektoriuje sukurti konstruktai, koduojantys natyvų TpdC (pTipQC-*tpdC*) ir N-gale šešių histidino liekanų uodegą turintį TpdC (pTipQC-His₆-*tpdC*). Šiomis plazmidėmis transformavus *R. erythropolis* SQ1 bakterijas ir indukavus baltymų raišką tiostreptonu, buvo gauti aktyvūs TpdC ir His₆-TpdC fermentai.

His₆-TpdC buvo dalinai išgrynintas naudojant nikelio chelatinę kolonėlę (3.19A pav.). TpdC fermentinis aktyvumas buvo nustatytas spektrofotometriškai, matuojant sugerties mažėjimą ties 223 nm bangos ilgiu, atsirandantį dėl BDNA hidrolizės. Nustatyta, kad fermentas optimaliai veikia esant pH reikšmėms 7,5–8,0. Šie *in vitro* tyrimai patvirtino, kad TpdC veikia kaip BDNA hidrolazė.

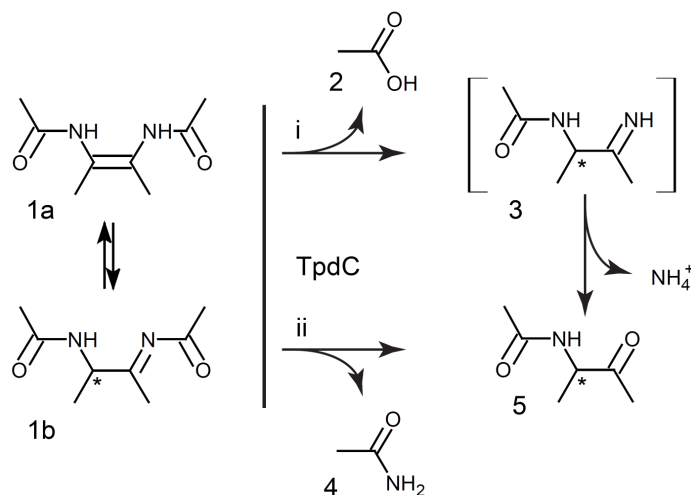


3.19 pav. Rekombinantinio His₆-TpdC baltymo gryninimas ir optimalaus veikimo pH nustatymas. *A*, TpdC baltymo sintezė *R. erythropolis* SQ1 bakterijose, transformuotose pTipQC-*tpdC* (1) pTipQC-His₆-*tpdC* (2) ir tuščia pTipQC plazmide (3) buvo indukuota 17 valandų inkubuojant su 1 μg/ml tiostreptono. TpdC (~50 kDa) buvo išgrynintas iš beląstelių ekstraktų, naudojant nikelio chelatinę kolonėlę (4). SDS-PAGE gelis nudažytas Coomassie Blue. *M* – baltymų molekulinės masės žymuo. *B*, Optimalus TpdC veikimo pH nustatytas matuojant fermento aktyvumą pH intervale nuo 6,2 iki 9,0 kalio fosfato ir Tris-HCl buferiniuose tirpaluose, pridėjus 0,1 mM BDNA. Atlikti mažiausiai trys nepriklausomi matavimai.

TpdC katalizuojamos BDNA hidrolizės metu susidaro optiškai aktyvus produktas OBNA, kurio specifinis poliarizuotos 586 nm bangos ilgio šviesos sukimo kampas 20 °C temperatūroje $[a]_D^{20} = +102^\circ$ (1.16 g/100 ml CHCl₃). Tai rodo, kad TpdC katalizuojama reakcija vyksta stereospecifiškai. ¹H BMR (CDCl₃ tirpiklyje) analize buvo nustatyta, kad BDNA gali egzistuoti keliomis tautomerinėmis formomis (duomenys nepateikti). Kadangi TpdC katalizuojamos hidrolizės metu susidaro optiškai aktyvus produktas, tikėtina, kad tikrasis TpdC substratas yra vienas iš imino formos BDNA (3.20 pav., *Ib*) enantiomerų, o ne amino formos BDNA (3.20 pav., *Ia*), kuris neturi chiralinių centrų.

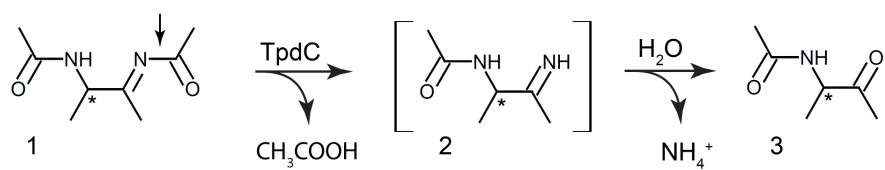
TpdC priklauso amidazių superšeimai ir yra labai artima omega-oktalaktamų hidrolazei iš *Rhodococcus* sp. Oct1, kurios funkcija yra patvirtinta *in vitro* (Fukuta et al., 2010), todėl tikėtina, kad TpdC veikia kaip BDNA amidazė. Tačiau pagal TpdC produkto OBNA struktūrą neįmanoma nustatyti reakcijos eigos, tai yra, kuris ryšys BDNA molekulėje yra hidrolizuojamas

(3.20 pav.). Jeigu TpdC veikia kaip amidazė ir BDNA molekulėje hidrolizuoja amidinį ryšį, turėtų išsiskirti acto rūgštis (3.20 pav., 2) ir susidaryti tarpinis enaminas (3.20 pav., 3), kuris toliau spontaniškai hidrolizuotųsi, išsiskiriant amoniakui ir susidarant OBNA (3.20 pav., 5). Kita vertus, OBNA iš BDNA galėtų susidaryti ir TpdC hidrolizuojant imino ryšį ir atskeliant acetamidą (3.20 pav., 4).



3.20 pav. Hipotetiniai (*Z*)-*N,N'*-(but-2-ene-2,3-diil)diacetamido (BDNA) hidrolizės TpdC hidrolaze keliai. Galimos BDNA tautomerinės formos – amino (*1a*) ir imino (*1b*). Kelias *i* – amidinio ryšio (*i*) hidrolizė susidarant acto rūgščiai (2) ir tarpiniam iminui (3), kuris toliau hidrolizuojasi, išsiskiriant amonio jonams ir *N*-(3-oksobutan-2-il)acetamidui (OBNA) (5). Kelias *ii* – enamino arba imino hidrolizė (*ii*), susidarant acetamidui (4) ir OBNA (5).

Siekiant nustatyti, kurią BDNA ryšį hidrolizuoja TpdC, reakcija buvo vykdyta *in vitro* ir reakcijos mišinys buvo paveiktas Neslerio reagentu, kuris specifiskai nustato amonio jonus (Burns et al., 1970). Teigiama Neslerio reakcija pademonstravo, kad TpdC hidrolizuojant BDNA iki OBNA išsiskiria amonio jonai, kaip kad prognozuota amidinio ryšio hidrolizės atveju (3.20 pav., *i*). Svarbu pažymėti, kad spėjamo enamino / imino hidrolizės produkto acetamido (3.20 pav., *ii*) TpdC nehidrolizuoja – Neslerio reakcija buvo neigiama. Taigi šie rezultatai patvirtino, kad TpdC yra BDNA amidazė ir hidrolizuoja amidinį ryšį BDNA molekulėje. Kadangi TpdC hidrolizuojant BDNA susidaro amonio jonai ir optiskai aktyvus OBNA, galima pasiūlyti apibendrintą šios reakcijos eigą, pateiktą 3.21 pav.

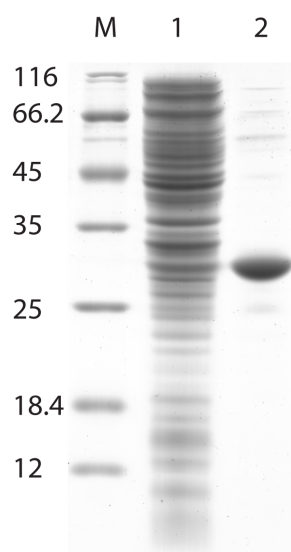


3.21 pav. (*Z*)-*N,N'*-(but-2-ene-2,3-diil)diacetamido (BDNA) amidazės TpdC katalizuojama BDNA (1) hidrolizė iki *N*-(3-oksobutan-2-il)acetamido (OBNA) (3). TpdC hidrolizuoja amidinį ryšį (pažymėtas rodykle) tautomerine imino forma esančioje BDNA (1) molekulėje. Reakcijos metu susidaręs tarpinis imino junginys (2) spontaniškai hidrolizuojasi išsiskiriant amonio jonams ir galutiniam produktui OBNA (3). * pažymėtas chiralinis centras.

3.4.4. TpdE katalizuojama OBNA redukcija

Anksčiau aprašyta sekos analizė parodė, kad TpdE baltymas patikimai priskiriamas klasikinėms trumpų grandinių dehidrogenazėms / reduktazėms (SDR), kurios turi *Rossmann fold* NAD(P)H/NAD(P)⁺ surišimo domeną (3.2 ir 3.3 lentelės). Kadangi yra žinoma, jog dauguma bakterinių SDR yra oksidoreduktazės, katalizuojančios nuo NAD(P)H priklausomą hidroksi-keto grupių oksidacijos-redukcijos reakciją (Kavanagh et al., 2008), buvo iškelta hipotezė, kad TpdE galėtų dalyvauti vėlesniuose TTMP metabolizmo žingsniuose ir redukuoti OBNA, kuris turi keto grupę ir todėl yra potencialus SDR substratas.

Siekiant patikrinti šią hipotezę, *tpdE* genas buvo klonuotas į pET21b(+) vektorių ir C-gale sulietas su šešių histidino liekanų uodega. Gautu pET21-*tpdE* konstruktu transformuotos *E. coli* BL21(DE3) bakterijos ir gauta *tpdE* raiška. TpdE-His₆ buvo dalinai išgrynintas naudojant nikelio chelatinę chromatografiją (3.22 pav.). Fermentinis TpdE aktyvumas buvo išmatuotas naudojant OBNA kaip substratą ir NADPH kaip kofaktorių. Nustatyta, kad kofaktoriumi naudojant NADH OBNA redukcija nevyksta. Fermentiniam aktyvumui optimalus pH yra 7,5. Nustatyta fermento menamoji K_m reikšmė substratui OBNA yra 5,2±1,5 μM, esant 500 μM NADPH, o menamoji K_m reikšmė NADPH yra 379±73 μM, esant 6 μM OBNA. Menamoji k_{kat} reikšmė yra 2,5±0,1 s⁻¹.

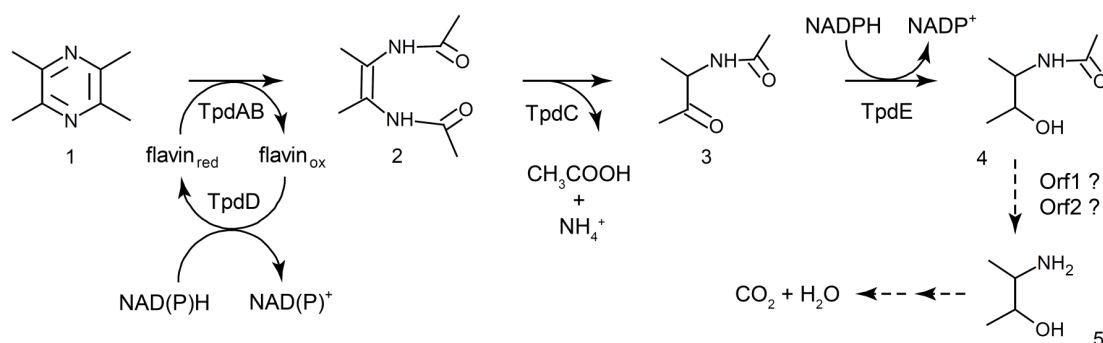


3.22 pav. Rekombinantinio TpdE-His₆ baltymo gryninimas. TpdE baltymo su His₆ uodega sintezė *E. coli* bakterijose, transformuotose pET21-*tpdE* plazmide, buvo indukuota 4 valandas inkubuojant su 0,5 mM IPTG. TpdE buvo gryninamas iš beląstelinio ekstrakto, naudojant nikelio chelatinę kolonėlę. SDS-PAGE gelis nudažytas Coomassie Blue. 1 takelis – beląstelinis ekstraktas, 2 takelis – TpdE-His₆ polipeptidas (~30 kDa) po gryninimo, M – baltymų molekulinės masės žymenys.

Šie rezultatai rodo, kad TpdE yra nuo NADPH priklausoma aminoalkoholio dehidrogenazė, kuri TTMP skaidymo metu redukuoja tarpinį metabolitą OBNA.

3.4.5. *tpd* genų koduojamas TTMP katabolizmo kelias

Apibendrinant 3.4 skyriuje pateiktus rezultatus, buvo rekonstruotas TTMP skaidymo *R. jostii* TMP1 bakterijose kelias, pateiktas 3.23 pav. Pademonstruota, kad TTMP skaidymas yra daugiapakopis procesas, kurio metu aromatinis TTMP žiedas yra oksiduojamas TpdA ir TpdB komplekso, gautas tarpinis metabolitas BDNA yra hidrolizuojamas amidazės TpdC, o susidariusio OBNA redukcija yra katalizuojama aminoalkoholio dehidrogenazės TpdE. TpdE naudoja NADPH kaip elektronų donorą ir galimai verčia OBNA į aminoalkoholį. Tolesniuose TTMP katabolizmo etapuose galėtų dalyvauti fermentai, koduojami atvirų skaitymo rėmelių *orf1* ir *orf2*. Tiek Orf1 (spėjamas didysis *N,N*-dimetilformamidazės subvienetas, 3.3 lentelė), tiek Orf2 (spėjama peptidazė, 3.3 lentelė) galėtų atpažinti OBNA amidinį ryšį ir hidrolizuoti jį susidarant 3-amino-2-butanoliui. Detaliau OBNA skaidymo mechanizmui nustatyti reikalingi papildomi tyrimai.



3.23 pav. Apibendrintas TTMP katabolizmo kelias *R. jostii* TMP1 bakterijose. TTMP (1), (*Z*)-*N,N'*-(but-2-ene-2,3-diil)diacetamidas (2), *N*-(3-oksobutan-2-il)acetamidas (3), *N*-(3-hidroksibutan-2-il)acetamidas (4), 3-amino-2-butanolis (5). Punktyrinės rodyklės žymi hipotetines reakcijas.

3.5. *R. jostii* TMP1 bakterijų panaudojimas biokatalizei

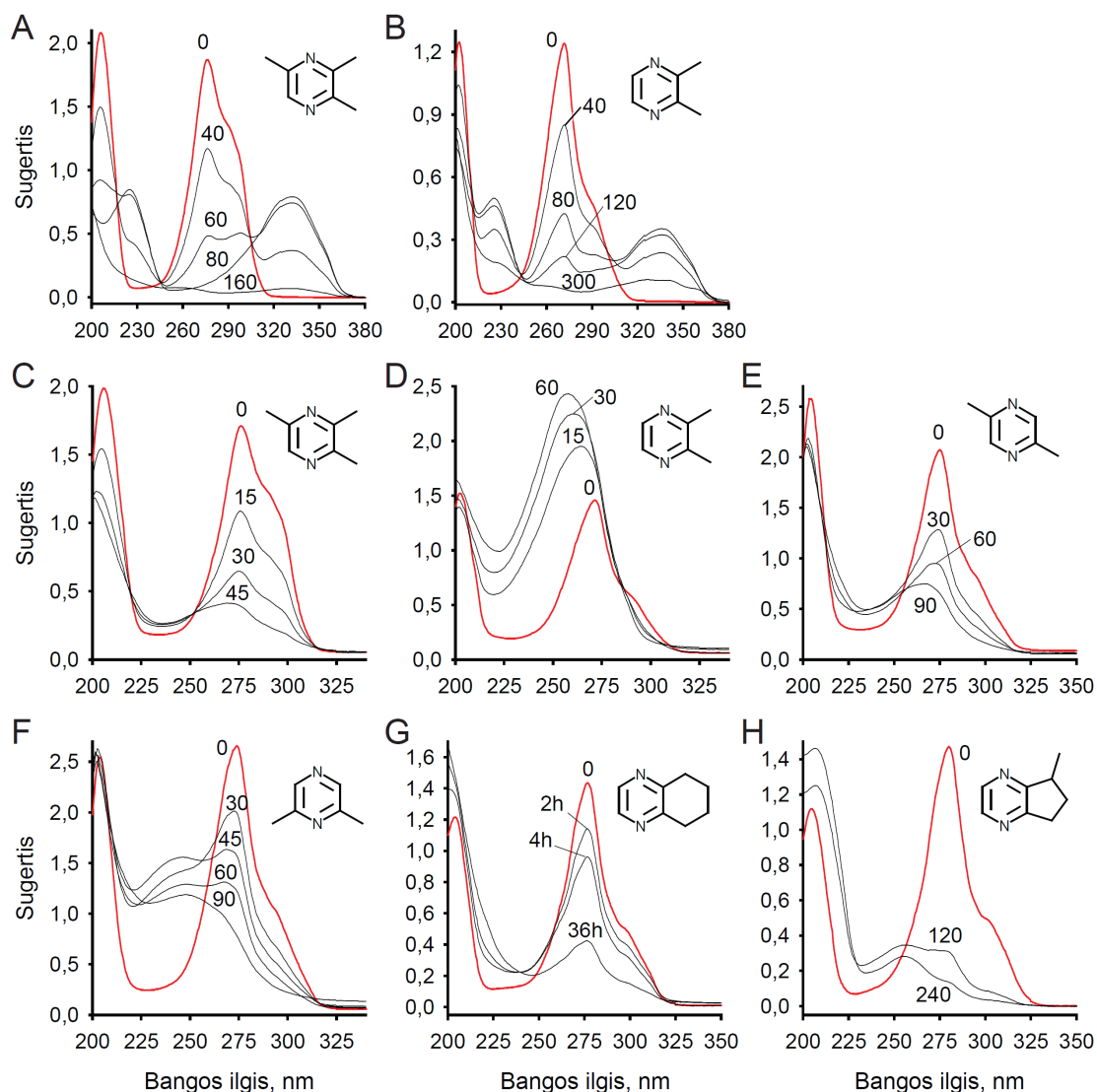
Norint išbandyti *R. jostii* TMP1 bakterijų gebėjimą kaip anglies ir energijos šaltinį panaudoti kitus nei TTMP *N*-heterociklinius junginius, jos buvo auginamos mineralinėje terpėje su tiriamuoju junginiu kaip vieninteliu anglies ir energijos šaltiniu. Visas tirtų junginių sąrašas pateiktas 3.6 lentelėje. Nustatyta, kad *R. jostii* TMP1 bakterijos, be TTMP ir piridino, kitų tirtų junginių panaudoti kaip vienintelio anglies šaltinio negali. Tuomet buvo ištirtas *R. jostii* TMP1 bakterijų, indukuotų TTMP, gebėjimas modifikuoti įvairius junginius. Buvo nustatyta, kad indukuotos bakterijos skaido ar modifikuoja visus tirtus alkilpirazinus (3.24 pav.).

Kaip buvo aptarta literatūros apžvalgoje, iki šiol nustatytose alkilpirazinus metabolizuojančiose bakterijose pirmasis skaidymo etapas yra aromatinio žiedo hidroksilinimas laisvoje padėtyje. Tokios biokonversijos metu susidarantys hidroksinti metabolitai gali būti nustatomi pagal UV sugerties spektre atsirandantį naują maksimumą 330–340 nm srityje (Taylor ir King, 1987). Pavyzdžiui, tokiu būdu 2,5-dimetilpiraziną skaidančios *Arthrobacter nitroguajacolicus* 25DOT1 bakterijos modifikuoja 2,3,5-trimetilpiraziną ir 2,3-dimetilpiraziną, kurių biokonversijos metu yra matomi tipiniai spektrų pokyčiai, būdingi žiedo hidroksilinimo reakcijoms (3.24 pav., A ir B).

Tuo tarpu tuos pačius alkilpirazinus modifikuojant *R. jostii* TMP1 bakterijoms, naujų sugerties maksimumų 320–350 nm srityje neatsiranda, o produktų sugerties smailės maksimumas slenkasi į trumpesnių bangų pusę (3.24 pav., C ir D). Analogiškas sugerties spektrų pokytis buvo matomas TTMP biokonversijos iki BDNA metu, naudojant *R. erythropolis* SQ1, transformuotą rekombinantiniais *tpdA* ir *tpdB* genais (3.15 pav. B). Kaip nustatyta ištyrus TTMP skaidymo mechanizmą, šios TpdAB katalizuojamos reakcijos metu buvo iškart atidarytas aromatinis TTMP žiedas ir susidarė alifatinis produktas (3.16 pav.). Todėl galima daryti prielaidą, kad biotransformuojant ir kitus alkilpirazinus yra oksiduojamas ir atidaromas

3.6 lentelė. *R. jostii* TMP1 bakterijų gebėjimas panaudoti įvairius *N*-heterociklinius junginius kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį bei juos modifikuoti, indukavus TTMP (*n* – netirta).

Junginys	Vienintelis anglies šaltinis	Modifikavimas
Pirazinai		
tetrametilpirazinas	+	+
2,3,5-trimetilpirazinas	–	+
2,3-dimetilpirazinas	–	+
2,5-dimetilpirazinas	–	+
2,6-dimetilpirazinas	–	+
pirazinas	<i>n</i>	–
5-metil-6,7-dihydro-5 <i>H</i> -ciklopenta(b)pirazinas	<i>n</i>	+
5,6,7,8-tetrahydrochinoksalinas (2,4-cikloheksapirazinas)	<i>n</i>	+
5,6-dimetil-2,3-pirazindikarbonitrilas	–	–
Piridinai		
piridinas	+	–
2-metilpiridinas	–	+
3-metilpiridinas	–	+
4-metilpiridinas	–	–
2-etilpiridinas	–	+
2,3-dimetilpiridinas	–	+
2,4-dimetilpiridinas	–	+
2,5-dimetilpiridinas	–	+
2,6-dimetilpiridinas	–	+
3,4-dimetilpiridinas	–	–
3,5-dimetilpiridinas	–	+
2,3,5-trimetilpiridinas	–	+
2,4,6-trimetilpiridinas	<i>n</i>	+
2,3-ciklopentenopiridinas	<i>n</i>	+
2-amino-4-metilpiridinas	<i>n</i>	–
2-amino-4,6-metilpiridinas	<i>n</i>	–
2-amino-3-metilpiridinas	<i>n</i>	–
6-amino-3-metilpiridinas	<i>n</i>	–
2,6-piridindikarbonitrilas	<i>n</i>	–
2-metil-6-cianopiridinas	<i>n</i>	–
2,4-piridindikarbonitrilas	<i>n</i>	–
4-metilpiridin-2-karbonitrilas	<i>n</i>	–
3-metilpiridin-2-karbonitrilas	<i>n</i>	–
3,5-dimetilpiridin-2-karbonitrilas	<i>n</i>	–
2,3-dihidro-7-azaindolas	<i>n</i>	–
3-metilpiridazinas	<i>n</i>	–
2,6-dikarboksipiridinas	–	–

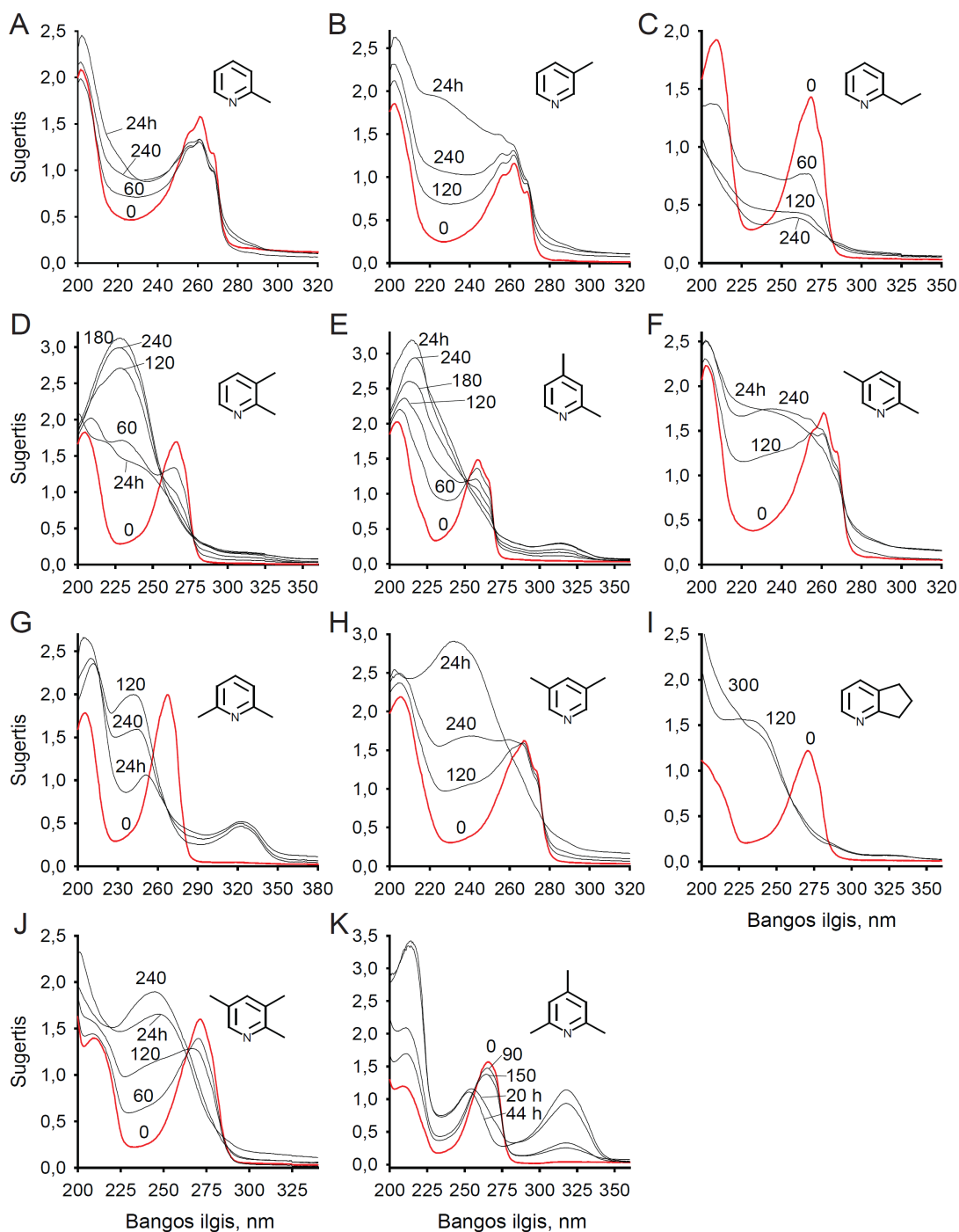


3.24 pav. Sugerties spektrų pokyčiai *Arthrobacter nitroguajacolicus* 25DOT1 (A, B) ir *R. jostii* TMP1 (C–H) bakterijoms transformuojant įvairius alkilpirazinus. *A. nitroguajacolicus* 25DOT1 bakterijos ir *R. jostii* TMP1 bakterijos užaugintos mineralinėje terpėje su atitinkamai 2,5-dimetilpirazinu (0,05 %) arba TTMP (0,05 %). Biokonversijos vykdytos 20 °C temperatūroje, 50 mM kalio fosfato buferiniame tirpale (pH 7,2), esant 0,2 mM pradinei junginio koncentracijai. Spektrai užrašyti bakterijas pašalinus centrifuguojant (1 min., 16000×g). Skaičiai šalia kreivių nurodo inkubacijos trukmę minutėmis arba valandomis (h). A,C – 2,3,5-trimetilpirazinas; B,D – 2,3-dimetilpirazinas; E – 2,5-dimetilpirazinas; F – 2,6-dimetilpirazinas; G – 5,6,7,8-tetrahydrochinoksalinas (2,4-cikloheksapirazinas); H – 5-metil-6,7-dihidro-5H-ciklopenta(b)pirazinas.

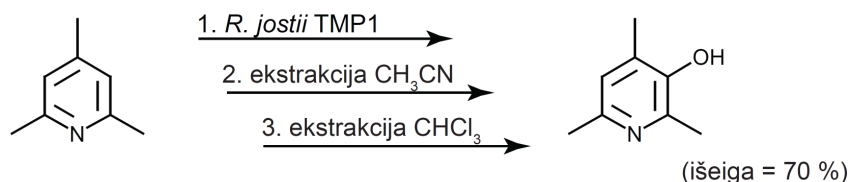
pirazino žiedas, nesusidarant hidroksilintiems metabolitams. Kadangi neindukuotos *R. jostii* TMP1 bakterijos (užaugintos terpėje su gintaro rūgštimi) tų pačių alkilpirazinių nemodifikuoja, tikėtina, kad tokių junginių modifikavimo reakcijas katalizuoja *tpd* genų sankaupos koduojami fermentai.

Iki šiol literatūroje nebuvo aprašyta atvejų, kad pirazinus skaidančios bakterijos modifikuotų ir piridino junginius, tačiau *R. jostii* TMP1 bakterijos, indukuotos TTMP, gebėjo modifikuoti daugelį iš tirtų alkilpiridino junginių (3.25 pav.). Kaip ir alkilpirazinių transformavimo reakcijų metu, modifikuojant alkilpiridinus, daugeliu atvejų hidroksilinti produktai nesusidaro ir yra tikėtinas piridino žiedo atidarymas (3.25 pav., *A–D, F, H, I* ir *J*). Vis dėlto iš sugerties spektrų matoma, kad 2,4-dimetilpiridino (3.25 pav., *E*), 2,6-dimetilpiridino (3.25 pav., *G*) ir 2,4,6-trimetilpiridino (3.25 pav., *K*) biokonversijos metu 330–350 nm srityje atsiranda sugerties pikas, rodantis hidroksilintų metabolitų susidarymą.

Hidroksilinamo 2,4,6-trimetilpiridino biotransformacijos *R. jostii* TMP1 bakterijomis metu turėtų susidaryti 3-padėtyje hidroksilintas piridinas. Neseniai buvo nustatyta, kad 3-piridinoliai yra efektyvūs antioksidantai, atsparesni oro oksidacijai nei šiuo metu naudojami atitinkamai pakeisti fenoliai (Wijtmans et al., 2004). Tiriant, koks junginys susidaro *R. jostii* TMP1 bakterijoms metabolizuojant 2,4,6-trimetilpiridiną, nustatyta, kad produkto ¹H BMR (CDCl₃, 300 MHz) spektre yra penkios smailės: δ 6.90 (br s, 1H, OH), 6.78 (s, 1H, CH), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.21 (s, 3H, CH₃); o ¹³C BMR spektre matomos aštuonios smailės: (CDCl₃, 75 MHz) spektre : δ 148.6, 147.4, 144.7, 135.8, 123.9, 22.5, 18.6, 16.3. Masių spektroskopinės analizės rezultatai patvirtino junginio formulę C₈H₁₁NO (teorinė [M+H]⁺ molekulinė masė – 138,08, MS analize nustatyta masė – 138,15). Taigi buvo nustatyta, kad 2,4,6-trimetilpiridino biokonversijos *R. jostii* TMP1 bakterijomis metu susidaro 2,4,6-trimetilpiridin-3-olis (3.26 pav.). TTMP indukuotoms *R. jostii* TMP1 bakterijoms metabolizavus 200 mg 2,4,6-trimetilpiridino, po konversijos ir gryninimo procedūrų buvo gauta 159 mg produkto ir pasiekta bendra biokonversijos išeiga – 70 %.



3.25 pav. Sugerties spektrų pokyčiai *R. jostii* TMP1 bakterijoms transformuojant įvairius alkilpiridinus. Bakterijos buvo užaugintos mineralinėje terpėje su TTMP (0,05 %). Biokonversijos vykdytos 20 °C temperatūroje, 50 mM kalio fosfato buferiniame tirpale (pH 7,2), esant 0,2 mM pradinei junginio koncentracijai. Spektrai užrašyti bakterijas pašalinus centrifuguojant (1 min., 16000×g). Skaičiai šalia kreivių nurodo inkubacijos trukmę minutėmis arba valandomis (h). A – 2-metilpiridinas; B – 3-metilpiridinas; C – 2-etilpiridinas; D – 2,3-dimetilpiridinas; E – 2,4-dimetilpiridinas; F – 2,5-dimetilpiridinas; G – 2,6-dimetilpiridinas; H – 3,5-dimetilpiridinas; I – 2,3-ciklopentenopiridinas; J – 2,3,5-trimetilpiridinas; K – 2,4,6-trimetilpiridinas.



3.26 pav. 2,4,6-trimetilpiridin-3-olio biosintezė iš 2,4,6-trimetilpiridino, panaudojant TTMP indukuotas *R. jostii* TMP1 bakterijas.

Pastaruoju metu 2,4,6-trimetilpiridin-3-olis kelia didelį susidomėjimą kaip farmacinis preparatas, kadangi be minėtų antioksidacinių savybių jis taip pat stabdo senėjimą ir apsaugo nuo išemijos (Vyas et al., 2011). Yra žinomi vos keli cheminiai metodai, kuriais galima į piridino žiedą įvesti hidroksigrupę (Behrman ir Pitt, 1958). 2,4,6-Trimetilpiridin-3-olio sintezė yra daugiapakopis procesas, kuriam naudojami brangūs reagentai ir/ar reakcijos vykdomos ekstremaliomis sąlygomis. Pavyzdžiui, klasikiniu metodu 2,4,6-trimetilpiridinas yra nitrinamas, o tuomet redukuojamas (H_2 , Pd/C, 50 bar) (Plazek, 1939). Alkil(aril)-3-hidroksipiridinus taip pat galima sintetinti iš 2-acilfuranų ir amoniako esant dideliame slėgiui ir aukštai temperatūrai (Smirnov et al., 1962), tačiau pakeistus furil alkil ketonus gauti sudėtinga. Neseniai buvo pasiūlyta pakeistus 3-piridinolius sintetinti iš 3-brompiridinų, žemoje temperatūroje atliekant bromido/ličio pakeitimą ir tuomet veikiant nitrobenzenu (Wijtmans et al., 2004). Kadangi būdų chemiškai tiesiogiai hidroksilinti alkilintų piridinų žiedą nėra daug, biokatalizinis metodas, ypač panaudojant pačias bakterijas, o ne išgrynintus fermentus, galėtų sudaryti galimybes atlikti efektyvią 3-piridinolių sintezę.

Taigi buvo pademonstruota, kad *R. jostii* TMP1 bakterijos gali būti taikomos 2,4,6-trimetilpiridin-3-olio biokatalizinei konversijai iš 2,4,6-trimetilpiridino ir potencialiai gali būti panaudotos 2,4-dimetilpiridinui ir 2,6-dimetilpiridinui hidroksilinti bei daugelio alkilpirazinų ir alkilpiridinų oksidaciniam žiedo atidarymui. Gauti rezultatai patvirtina, kad *R. jostii* TMP1 TTMP skaidymo fermentai gali atpažinti junginius, kurie yra ksenobiotinės kilmės, bet struktūriškai panašūs į jų natūralius substratus. Be to, buvo parodyta, kaip sunkiai cheminiais būdais gaunamų 3-piridinolių sintezė gali

būti pakeista paprastesne biokatalize. Nors biokataliziniai metodai susiduria su kai kuriomis technologinėmis problemomis ir savo mastu vis dar gerokai nusileidžia tradicinei cheminei sintezei, biotechnologija jau ilgą laiką yra rimta alternatyva sintetinant sudėtingus junginius (Whitesides, 1985; Yamada ir Shimizu, 1988; Schoemaker et al., 2003).

3.6. Reziomė

Šiame darbe siekiant ištirti TTMP metabolizmo kelią *R. jostii* TMP1 bakterijose, buvo išskirti ir identifikuoti TTMP skaidymo genai. Nustačius TTMP indukuojamo baltymo peptidų sekas, pavyko aptikti TTMP katabolizmo genų sankaupą ir nustatyti bei charakterizuoti TTMP skaidyme dalyvaujančius genus.

Parodyta, kad TTMP skaidymas vyksta keliomis stadijomis: pirmiausia TpdA ir TpdB kompleksas katalizuoja oksidacinę aromatinio žiedo atidarymo reakciją, susidariusį produktą hidrolizuoja TpdC, o TpdE redukuoja susidariusio metabolito keto grupę (3.23 pav.). Fermentų sekų analizė parodė, kad TpdA priklauso flavinus naudojančioms monooksigenazėms, kurios dalyvauja ir kai kurių *N*-heterociklinių junginių skaidyme. Tačiau vieno TpdA fermento nepakanka TTMP metabolizmui – žiedo oksidavimui reikia kartu veikiančio TpdB baltymo. Nors TTMP oksidacijos produkto struktūra yra panaši į dioksigenazės reakcijos produktus, naudojant ^{18}O žymėtą vandenį buvo įrodyta, kad TTMP žiedo atidarymo reakciją katalizuojantis TpdAB kompleksas yra monooksigenazė. Kol kas lieka neaišku, kokią funkciją komplekse atlieka TpdB bei koks detalus TTMP žiedo oksidavimo ir atidarymo reakcijos mechanizmas. Tolimesni tyrimai, ypač TpdAB komplekso, susijungusio su TTMP, struktūros nustatymas galėtų padėti atskleisti, kaip vyksta ši unikali fermentinė reakcija.

Po TTMP oksidacijos susidaręs BDNA yra toliau hidrolizuojamas TpdC amidazės. Išgryninus TpdC, *in vitro* buvo pademonstruota, kad TpdC hidrolizuoja amidinį BDNA ryšį (3.21 pav.), o hidrolizuojantis tarpiniam iminui išsiskiria amonio jonai ir susidaro OBNA. Kadangi TpdC katalizuojamos hidrolizės reakcijos metu susidaro optiškai aktyvus produktas, TpdC būtų galima panaudoti stereospecifinei į BDNA panašių junginių biokonversijai.

OBNA redukciją *R. jostii* TMP1 bakterijose atlieka aminoalkoholio dehidrogenazė TpdE, priklausanti trumpų grandinių dehidrogenazių /

reduktazių šeimai. Šios šeimos fermentai pasižymi plačiu atpažįstamų substratų spektru, todėl TpdE galėtų būti pritaikytas įvairiai pakeistų aminoalkoholių biosintezei.

TTMP skaidymo genų raiška yra reguliuojama transkripcijos aktyvatoriaus TpdR, priklausančio LuxR transkripcijos reguliatorių superšeimai. Šiame darbe nustatytas *tpdABC* operono promotoriaus regionas, kuriame aptiktos potencialiai TpdR atpažįstamos DNR sekos. Atlikus nukleazės S1 testą būtų galima tiksliai nustatyti šias sekas ir gautus rezultatus panaudoti tiriant *tpd* genų reguliacijos mechanizmą.

Tiriant *R. jostii* TMP1 kaip biokatalizinių bakterijų potencialą buvo nustatyta, kad su TTMP indukuotos TMP1 bakterijos naudoja ar konvertuoja įvairius alkilpirazinus ir alkilpiridinus. Be to, pirmą kartą buvo pademonstruota 2,4,6-trimetilpiridin-3-olio, pasižyminčio antioksidantinėmis, senėjimą stabdančiomis ir nuo išemijos saugančiomis savybėmis, biokatalizinė sintezė. Nors kai kuriais pakeistų *N*-heterociklų biovirusų atvejais tarpiniai metabolitai *R. jostii* TMP1 bakterijose yra skaidomi toliau ir negalėtų būti išskiriami iš reakcijos terpės, tokie modifikuoti junginiai galėtų būti gaunami biokatalizei panaudojant *R. erythropolis* SQ1 bakterijas, transformuotas *tpd* genais. Biotransformacijoms galėtų būti naudojami ir išgryninti Tpd fermentai, tačiau tokių taikymų galimybėms įvertinti reikia papildomų tyrimų.

Apibendrinant, šiame darbe pirmą kartą identifikuota bakterijų genų sandauga, susijusi su alkilpirazinių skaidymu. Pirmą kartą nustatyti pradiniuose pirazinių skaidymo etapuose dalyvaujantys fermentai, iširtos jų katalizuojamos reakcijos ir nustatyti jų tarpiniai metabolitai. TTMP katabolinio kelio rekonstravimas išplečia esamas fundamentines žinias apie *N*-heterociklinių junginių bioskaidymą ir leido identifikuoti įvairius fermentus, kurie ateityje galėtų būti pritaikyti atrankioms ir specifinėms biokonversijos reakcijoms.

IŠVADOS

1. *Rhodococcus jostii* TMP1 bakterijų 13 kb ilgio DNR fragmentas koduoja tetrametilpirazino skaidymui reikalingus genus.
2. *tpdA*, *tpdB* ir *tpdC* atviri skaitymo rėmeliai yra organizuoti į *tpdABC* operoną.
3. *tpdABC* operono raiška yra reguliuojama TpdR transkripcijos aktyvatoriaus.
4. Monooksigenazė TpdA veikia kartu su TpdB ir oksiduoja tetrametilpiraziną į (Z)-N,N'-(but-2-ene-2,3-diil)diacetamidą.
5. Amidazė TpdC hidrolizuoja (Z)-N,N'-(but-2-ene-2,3-diil)diacetamidą į N-(3-oksobutan-2-il)acetamidą.
6. Nuo NADPH priklausanti aminoalkoholio dehidrogenazė TpdE redukuoja N-(3-oksobutan-2-il)acetamidą.
7. *Rhodococcus jostii* TMP1 bakterijos gali būti naudojamos atliekant alkilpirazinų ir alkilpiridinų biokonversijos reakcijas bei hidrosipiridinų biosintezei.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

Straipsniai

- **Kutanovas S**, Stankeviciute J, Urbelis G, Tauraitė D, Rutkiene R, Meskys R. Identification and characterization of tetramethylpyrazine catabolic pathway in *R. jostii* TMP1. (2013). *Appl Environ Microbiol*. doi:10.1128/AEM.00011-13.
- **Kutanovas S**, Rutkienė R, Urbelis G, Tauraitė D, Stankevičiūtė J, Meškys R. (2013) Bioconversion of methylpyrazines and pyridines using novel pyrazines-degrading microorganisms. *Chemija* 24, 67-73.

Stendiniai konferencijų pranešimai

- Stankevičiūtė J, **Kutanovas S**, Rutkienė R, Meškys R. (2012) Purification and characterization of alcohol dehydrogenase from *R. jostii* TMP1. Lietuvos biochemikų draugijos XII-oji konferencija, Tolieja, Lietuva.
- **Kutanovas S**, Karvelis L, Michailova K, Časaitė V, Stankevičiūtė J, Meškys R. (2010) Biodegradation of carboxypyridines and carboxypyrazines. COST Action CM0701 „Cascade Chemoenzymatic Processes – New Synergies Between Chemistry and Biochemistry“ (CASCAT), Vilnius, Lietuva.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti savo darbo vadovui dr. Rolandui Meškiui už suteiktą galimybę atlikti šį darbą ir už visokeriopą pagalbą mano doktorantūros studijų metu. Taip pat esu dėkingas visiems Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus darbuotojams ir studentams. Ypač norėčiau padėkoti Jonitai Stankevičiūtei ir dr. Rasai Rutkienei už pagalbą tyrinėjant TpdE baltymą bei dr. Daivai Tauraitėi, padėjusiai išskirti tetrametilpirazino skaidymo metabolitus. Dėkoju Gintarui Urbeliui už pagalbą analizuojant BMR spektrus ir nustatant metabolitų struktūras, dr. Marijai Ger už atliktą MS/MS analizę bei Maksim Bratchikov, atlikusiam kiekybinę AT-PGR analizę.

Atskirai norėčiau padėkoti Urtei Neniškytei, kuri palaikė, padėjo ir patarė rašant šią disertaciją. Už ne tik mokslines diskusijas esu dėkingas „laboratoriniams draugams“ – dr. Renatai Gasparavičiūtei, dr. Simonai Povilonienei, Jonitai Stankevičiūtei ir Justui Vaitekūnui. Kad nepamiršo mano egzaminų, ačiū Ritai Meškienei.

Šį darbą finansavo Lietuvos valstybinis studijų fondas bei Lietuvos mokslų taryba, projektų Nr. MIP-046/2011 ir Nr. MIP-076/2011.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adams, T.B., Doull, J., Feron, V.J., Goodman, J.I., Marnett, L.J., Munro, I.C. et al. (2002) The FEMA GRAS assessment of pyrazine derivatives used as flavor ingredients. Flavor and Extract Manufacturers Association. *Food Chem Toxicol* 40: 429-451.
2. Ahuja, E.G., Janning, P., Mentel, M., Graebisch, A., Breinbauer, R., Hiller, W. et al. (2008) PhzA/B catalyzes the formation of the tricycle in phenazine biosynthesis. *J Am Chem Soc* 130: 17053-17061.
3. Andersen, O.A., Flatmark, T., and Hough, E. (2002) Crystal structure of the ternary complex of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation. *J Mol Biol* 320: 1095-1108.
4. Baldaccini, N.E., Gagliardo, A., Pelosi, P., and Topazzini, A. (1986) Occurrence of a pyrazine binding protein in the nasal mucosa of some vertebrates. *Comp Biochem Physiol B* 84: 249-253.
5. Baldwin, T.O., Christopher, J.A., Raushel, F.M., Sinclair, J.F., Ziegler, M.M., Fisher, A.J., and Rayment, I. (1995) Structure of bacterial luciferase. *Curr Opin Struct Biol* 5: 798-809.
6. Bauer, I., Max, N., Fetzner, S., and Lingens, F. (1996) 2,4-dioxygenases catalyzing *N*-heterocyclic-ring cleavage and formation of carbon monoxide. Purification and some properties of 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase from *Arthrobacter* sp. Rū61a and comparison with 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase from *Pseudomonas putida* 33/1. *Eur J Biochem* 240: 576-583.
7. Bauer, I., de Beyer, A., Tshisuaka, B., Fetzner, S., and Lingens, F. (1994) A novel type of oxygenolytic ring cleavage: 2,4-oxygenation and decarbonylation of 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline and 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline. *FEMS Microbiol Lett* 117: 299-304.
8. Beck, H.C., Hansen, A.M., and Lauritsen, F.R. (2003) Novel pyrazine metabolites found in polymyxin biosynthesis by *Paenibacillus polymyxa*. *FEMS Microbiol Lett* 220: 67-73.
9. Behrman, E.J., and Stanier, R.Y. (1957) The bacterial oxidation of nicotinic acid. *J Biol Chem* 228: 923-945.
10. Behrman, E.J., and Pitt, B.M. (1958) The elbs peroxydisulfate oxidation in the pyridine series - a new synthesis of 2,5-dihydroxypyridine. *J Am Chem Soc* 80: 3717-3718.
11. Benson, A.B. (1993) Oltipraz: a laboratory and clinical review. *J Cell Biochem Suppl* 17F: 278-291.
12. Besson, I., Creuly, C., Gros, J., and Larroche, C. (1997) Pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation on soybeans. *Appl Microbiol Biot* 47: 489-495.

13. Boddupalli, S.S., Estabrook, R.W., and Peterson, J.A. (1990) Fatty acid monooxygenation by cytochrome P-450BM-3. *J Biol Chem* 265: 4233-4239.
14. Bott, G., Schmidt, M., Rommel, T.O., and Lingens, F. (1990) Microbial metabolism of quinoline and related compounds. V. Degradation of 1H-4-oxoquinoline by *Pseudomonas putida* 33/1. *Biol Chem Hoppe Seyler* 371: 999-1003.
15. Brandsch, R. (2006) Microbiology and biochemistry of nicotine degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 493-498.
16. Brophy, J.J. (1989) Pyrazines obtained from insects: Their source, identification, synthesis and function. In *Studies in Natural Products Chemistry*. Rahman, A.-u. (ed). Amsterdam: Elsevier, pp. 221-273.
17. Burns, E.A., Streuli, C.A., and Averell, P.R. (1970) *The Analytical Chemistry of Nitrogen and its compounds*. New York: Willey Interscience.
18. Buttery, R.G., Seifert, R.M., Guadagni, D.G., and Ling, L.C. (1971) Characterization of volatile pyrazine and pyridine components of potato chips. *J Agric Food Chem* 19: 969.
19. Canne, C., Lowe, D.J., Fetzner, S., Adams, B., Smith, A.T., Kappl, R. et al. (1999) Kinetics and interactions of molybdenum and iron-sulfur centers in bacterial enzymes of the xanthine oxidase family: mechanistic implications. *Biochemistry* 38: 14077-14087.
20. Chaiyen, P. (2010) Flavoenzymes catalyzing oxidative aromatic ring-cleavage reactions. *Arch Biochem Biophys* 493: 62-70.
21. Chaiyen, P., Suadee, C., and Wilairat, P. (2001) A novel two-protein component flavoprotein hydroxylase. *Eur J Biochem* 268: 5550-5561.
22. Chaiyen, P., Brissette, P., Ballou, D.P., and Massey, V. (1997) Unusual mechanism of oxygen atom transfer and product rearrangement in the catalytic reaction of 2-methyl-3-hydroxypyridine-5-carboxylic acid oxygenase. *Biochemistry* 36: 8060-8070.
23. Cheng, T.B., Reineccius, G.A., Bjorklund, J.A., and E., L. (1991) Biosynthesis of 2-methoxy-3-isopropylpyrazine in *Pseudomonas perolens*. *J Agric Food Chem* 39: 1009-1012.
24. Combourieu, B., Poupin, P., Besse, P., Sancelme, M., Veschambre, H., Truffaut, N., and Delort, A.M. (1998) Thiomorpholine and morpholine oxidation by a cytochrome P450 in *Mycobacterium aurum* MO1. Evidence of the intermediates by in situ ¹H NMR. *Biodegradation* 9: 433-442.
25. Costas, M., Mehn, M.P., Jensen, M.P., and Que, L. (2004) Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: enzymes, models, and intermediates. *Chem Rev* 104: 939-986.
26. Crozier-Reabe, K., and Moran, G.R. (2012) Form follows function: structural and catalytic variation in the class a flavoprotein monooxygenases. *Int J Mol Sci* 13: 15601-15639.

27. Danielson, P.B. (2002) The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab* 3: 561-597.
28. Darwin, A.J., Li, J., and Stewart, V. (1996) Analysis of nitrate regulatory protein NarL-binding sites in the *fdnG* and *narG* operon control regions of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 20: 621-632.
29. Degtyarenko, K.N. (1995) Structural domains of P450-containing monooxygenase systems. *Protein Eng* 8: 737-747.
30. Dickschat, J., Reichenbach, H., Wagner-Dobler, I., and Schulz, S. (2005) Novel pyrazines from the myxobacterium *Chondromyces crocatus* and marine bacteria. *Eur J Org Chem*: 4141-4153.
31. Dickschat, J.S., Susanne, W., J., B.C., Thorben, N., Stefan, S., and C., W. (2010) Pyrazine Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Eur J Org Chem* 2010: 2687-2695.
32. Ducros, V.M., Lewis, R.J., Verma, C.S., Dodson, E.J., Leonard, G., Turkenburg, J.P. et al. (2001) Crystal structure of GerE, the ultimate transcriptional regulator of spore formation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 306: 759-771.
33. Díaz, E. (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol* 7: 173-180.
34. Díaz, E., and Prieto, M.A. (2000) Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr Opin Biotechnol* 11: 467-475.
35. Ellis, H.R. (2010) The FMN-dependent two-component monooxygenase systems. *Arch Biochem Biophys* 497: 1-12.
36. Enroth, C., Neujahr, H., Schneider, G., and Lindqvist, Y. (1998) The crystal structure of phenol hydroxylase in complex with FAD and phenol provides evidence for a concerted conformational change in the enzyme and its cofactor during catalysis. *Structure* 6: 605-617.
37. Entsch, B., and van Berkel, W.J. (1995) Structure and mechanism of para-hydroxybenzoate hydroxylase. *FASEB J* 9: 476-483.
38. Entsch, B., Cole, L.J., and Ballou, D.P. (2005) Protein dynamics and electrostatics in the function of p-hydroxybenzoate hydroxylase. *Arch Biochem Biophys* 433: 297-311.
39. Ferraro, D.J., Gakhar, L., and Ramaswamy, S. (2005) Rieske business: structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 175-190.
40. Ferreira, S.B., and Kaiser, C.R. (2012) Pyrazine derivatives: a patent review (2008 - present). *Expert Opin Ther Pat* 22: 1033-1051.
41. Fetzner, S. (1998) Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 237-250.
42. Fetzner, S. (2000) Enzymes involved in the aerobic bacterial degradation of *N*-heteroaromatic compounds: molybdenum hydroxylases and ring-opening 2,4-dioxygenases. *Naturwissenschaften* 87: 59-69.

43. Fetzner, S. (2002) Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 243-257.
44. Fetzner, S., and Steiner, R.A. (2010) Cofactor-independent oxidases and oxygenases. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 791-804.
45. Fischer, F., and Fetzner, S. (2000) Site-directed mutagenesis of potential catalytic residues in 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase, and hypothesis on the catalytic mechanism of 2,4-dioxygenolytic ring cleavage. *FEMS Microbiol Lett* 190: 21-27.
46. Freudenberg, W., König, K., and Andreesen, J.R. (1988) Nicotine dehydrogenase from *Arthrobacter oxidans*: A molybdenum-containing hydroxylase. *FEMS Microbiol Lett* 52: 13-17.
47. Fukuta, Y., Koizumi, S., Komeda, H., and Asano, Y. (2010) A new aryl acylamidase from *Rhodococcus* sp strain Oct1 acting on omega-lactams: Its characterization and gene expression in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 46: 237-245.
48. Gallois, A., Kergomard, A., and Adda, J. (1988) Study of the biosynthesis of 3-isopropyl-2-methoxypyrazine produced by *Pseudomonas taetrolens*. *Food Chem* 28: 299-309.
49. Galán, B., Díaz, E., Prieto, M.A., and García, J.L. (2000) Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W: a prototype of a new Flavin:NAD(P)H reductase subfamily. *J Bacteriol* 182: 627-636.
50. Gartemann, K.H., and Eichenlaub, R. (2001) Isolation and characterization of IS1409, an insertion element of 4-chlorobenzoate-degrading *Arthrobacter* sp. strain TM1, and development of a system for transposon mutagenesis. *J Bacteriol* 183: 3729-3736.
51. Gauthier, J.J., and Rittenberg, S.C. (1971a) The metabolism of nicotinic acid. I. Purification and properties of 2,5-dihydroxypyridine oxygenase from *Pseudomonas putida* N-9. *J Biol Chem* 246: 3737-3742.
52. Gauthier, J.J., and Rittenberg, S.C. (1971b) The metabolism of nicotinic acid. II. 2,5-dihydroxypyridine oxidation, product formation, and oxygen 18 incorporation. *J Biol Chem* 246: 3743-3748.
53. Godon, J.J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., and Moletta, R. (1997) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 63: 2802-2813.
54. Grether-Beck, S., Igloi, G.L., Pust, S., Schilz, E., Decker, K., and Brandsch, R. (1994) Structural analysis and molybdenum-dependent expression of the pAO1-encoded nicotine dehydrogenase genes of *Arthrobacter nicotinovorans*. *Mol Microbiol* 13: 929-936.
55. Grosch, W. (2001) Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chem Senses* 26: 533-545.

56. Hale, R.C., and Aneiro, K.M. (1997) Determination of coal tar and creosote constituents in the aquatic environment. *J Chromatogr A* 774: 79-95.
57. Harayama, S., Kok, M., and Neidle, E.L. (1992) Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu Rev Microbiol* 46: 565-601.
58. Hellman, U., Wernstedt, C., Góñez, J., and Heldin, C.H. (1995) Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem* 224: 451-455.
59. Herring, P.J., Campbell, A.K., Whitfield, M., and Maddock, L. (1990) *Light and Life in the Sea*: Cambridge University Press.
60. Hille, R. (1996) The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem Rev* 96: 2757-2816.
61. Hirano, S., Morikawa, M., Takano, K., Imanaka, T., and Kanaya, S. (2007) Gentisate 1,2-dioxygenase from *Xanthobacter polyaromaticivorans* 127W. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 192-199.
62. Hund, H.K., de Beyer, A., and Lingens, F. (1990) Microbial metabolism of quinoline and related compounds. VI. Degradation of quinaldine by *Arthrobacter* sp. *Biol Chem Hoppe Seyler* 371: 1005-1008.
63. Hwang, H.I., Hartman, T.G., Rosen, R.T., Lech, J., and Ho, C.T. (1994) Formation of Pyrazines from the Maillard Reaction of Glucose and Lysine-alpha-amine-N15. *J Agric Food Chem* 42: 1000-1004.
64. Jiménez, J.I., Acebrón, I., García, J.L., Díaz, E., and Mancheño, J.M. (2010) A preliminary crystallographic study of recombinant NicX, an Fe(2+)-dependent 2,5-dihydroxypyridine dioxygenase from *Pseudomonas putida* KT2440. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 66: 549-553.
65. Jiménez, J.I., Canales, A., Jiménez-Barbero, J., Ginalska, K., Rychlewski, L., García, J.L., and Díaz, E. (2008) Deciphering the genetic determinants for aerobic nicotinic acid degradation: the nic cluster from *Pseudomonas putida* KT2440. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11329-11334.
66. Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., González-Duarte, R., Jeffery, J., and Ghosh, D. (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 34: 6003-6013.
67. Kaiser, J.P., Feng, Y., and Bollag, J.M. (1996) Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiol Rev* 60: 483-498.
68. Karlsson, A., Parales, J.V., Parales, R.E., Gibson, D.T., Eklund, H., and Ramaswamy, S. (2003) Crystal structure of naphthalene dioxygenase: side-on binding of dioxygen to iron. *Science* 299: 1039-1042.
69. Karvelis, L., Gasparavičiūtė, R., Klimavičius, A., Jančienė, R., Stankevičiūtė, J., and Meškys, R. (2013) *Pusillimonas* sp. 5HP degrading 5-hydroxypicolinic acid. *Biodegradation* Epub ahead of print

70. Kato, S., Oba, Y., Ojika, M., and Inouye, S. (2006) Stereoselective incorporation of isoleucine into Cypridina luciferin in *Cypridina hilgendorffii* (*Vargula hilgendorffii*). *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1528-1532.
71. Kauppi, B., Lee, K., Carredano, E., Parales, R.E., Gibson, D.T., Eklund, H., and Ramaswamy, S. (1998) Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure* 6: 571-586.
72. Kavanagh, K.L., Jörnvall, H., Persson, B., and Oppermann, U. (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci* 65: 3895-3906.
73. Kiener, A. (1992) Enzymatic oxidation of methyl-groups on aromatic heterocycles - a versatile method for the preparation of heteroaromatic carboxylic-acids. *Angew Chem Intl Edit* 31: 774-775.
74. Kiener, A. (1993) Microbiological process for the production of hydroxypyrazinecarboxylic acid. US5273893, United States: Lonza Ltd.
75. Kiener, A. (1996) Microbiological process for the preparation of 6-hydroxy pyrazinoic acid. EP0529653: Lonza Ltd.
76. Kiener, A., Gamenen, Y.V., and Bokel, M. (1993) Microbiological process for the production of hydroxylated heterocycles. US5229278, United States: Lonza Ltd.
77. Kiener, A., Tschech, A., Tinschert, A., and Heinzmann, K. (1994) Microbiological process for hydroxylation of nitrogen-heterocyclic-carboxylic acids. US5364940, United States: Lonza Ltd.
78. Kim, J.Y., Lee, K., Kim, Y., and Kim, C.K. (2003) Production of dyestuffs from indole derivatives by naphthalene dioxygenase and toluene dioxygenase. *Lett Appl Microbiol* 36: 343-348.
79. Kim, N.D., Kwak, M.K., and Kim, S.G. (1997) Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by 2-(allylthio)pyrazine, a potential chemoprotective agent: hepatoprotective effects. *Biochem Pharmacol* 53: 261-269.
80. Kim, S.H., Hisano, T., Takeda, K., Iwasaki, W., Ebihara, A., and Miki, K. (2007) Crystal structure of the oxygenase component (HpaB) of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase from *Thermus thermophilus* HB8. *J Biol Chem* 282: 33107-33117.
81. Kodimuthali, A., Chary, B., Prasunamba, P., and Pal, M. (2009) A new synthesis of 2-(hetero)aryl-substituted pyrazines. *Tetrahedron Lett* 50: 1618-1621.
82. Kosuge, T., Kamiya, H., and Adachi, T. (1962) Isolation of tetramethylpyrazine from culture of *Bacillus natto*, and biosynthetic pathways of tetramethylpyrazine. *Nature* 195: 1103.

83. Kuliopulos, A., Mullen, G.P., Xue, L., and Mildvan, A.S. (1991) Stereochemistry of the concerted enolization catalyzed by delta 5-3-ketosteroid isomerase. *Biochemistry* 30: 3169-3178.
84. Kutanovas, S. (2008) Pirazino darinius skaidančių bakterijų tyrimas. Magistro darbas. *Chemijos fakultetas*. Vilnius: Vilniaus universitetas, p. 53.
85. Kweon, O., Kim, S.J., Baek, S., Chae, J.C., Adjei, M.D., Baek, D.H. et al. (2008) A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *BMC Biochem* 9: 11.
86. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
87. Lee, J.S., and Surh, Y.J. (2005) Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett* 224: 171-184.
88. Lehmann, M., Tshisuaka, B., Fetzner, S., Röger, P., and Lingens, F. (1994) Purification and characterization of isoquinoline 1-oxidoreductase from *Pseudomonas diminuta* 7, a novel molybdenum-containing hydroxylase. *J Biol Chem* 269: 11254-11260.
89. Lowe, D.J., Richards, R.L., and Bray, R.C. (1997) Role of Mo-C bonds in xanthine oxidase action. *Biochem Soc Trans* 25: 774-778.
90. MacDonald, J.C. (1973) Toxicity, analysis, and production of aspergillilic acid and its analogues. *Can J Biochem* 51: 1311-1315.
91. Maga, J.A., and Sizer, C.E. (1973) Pyrazines in foods - review. *J Agric Food Chem* 21: 22-30.
92. Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C. et al. (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* 39: 225-229.
93. Max, N., Betz, A., Facey, S., Lingens, F., Hauer, B., and Fetzner, S. (1999) Cloning, sequence analysis, and expression of the *Pseudomonas putida* 33/1 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase gene, encoding a carbon monoxide forming dioxygenase. *Biochim Biophys Acta* 1431: 547-552.
94. McLeod, M.P., Warren, R.L., Hsiao, W.W., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C. et al. (2006) The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15582-15587.
95. Merimaa, M., Heinaru, E., Liivak, M., Vedler, E., and Heinaru, A. (2006) Grouping of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase genes among phenol- and p-cresol-degrading *Pseudomonas* species and biotypes. *Arch Microbiol* 186: 287-296.
96. Moonen, M.J.H., Fraaije, M.W., Rietjens, I.M.C.M., Laane, C., and van Berkel, W.J.H. (2002) Flavoenzyme-Catalyzed Oxygenations and Oxidations of Phenolic Compounds. *Adv Synth Catal* 344: 1023-1035.

97. Moore, B.P., Brown, W.V., and Rothschild, M. (1990) Methylalkylpyrazines in aposematic insects, their hostplants and mimics. *Chemoecology* 1: 43-51.
98. Müller, R., and Rappert, S. (2010) Pyrazines: occurrence, formation and biodegradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1315-1320.
99. Nakashima, N., and Tamura, T. (2004a) A novel system for expressing recombinant proteins over a wide temperature range from 4 to 35 degrees C. *Biotechnol Bioeng* 86: 136-148.
100. Nakashima, N., and Tamura, T. (2004b) Isolation and characterization of a rolling-circle-type plasmid from *Rhodococcus erythropolis* and application of the plasmid to multiple-recombinant-protein expression. *Appl Environ Microbiol* 70: 5557-5568.
101. Nam, J.W., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., Yamane, H., and Omori, T. (2001) New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 254-263.
102. Nelson, M.J., and Snell, E.E. (1986) Enzymes of vitamin B6 degradation. Purification and properties of 5-pyridoxic-acid oxygenase from *Arthrobacter* sp. *J Biol Chem* 261: 15115-15120.
103. Neujahr, H.Y., and Gaal, A. (1973) Phenol hydroxylase from yeast. Purification and properties of the enzyme from *Trichosporon cutaneum*. *Eur J Biochem* 35: 386-400.
104. Ngo, S.C., Zimhony, O., Chung, W.J., Sayahi, H., Jacobs, W.R., and Welch, J.T. (2007) Inhibition of isolated *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I by pyrazinamide analogs. *Antimicrob Agents Ch* 51: 2430-2435.
105. Okamoto, K., Matsumoto, K., Hille, R., Eger, B.T., Pai, E.F., and Nishino, T. (2004) The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: implications for reaction mechanism and enzyme inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7931-7936.
106. Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M. et al. (2003) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact* 143-144: 247-253.
107. Peach, P., Cross, D., Kenny, J., Mann, I., Houson, I., Campbell, L. et al. (2006) Asymmetric transfer hydrogenation of alpha,beta-unsaturated, alpha-tosyloxy and alpha-substituted ketones. *Tetrahedron* 62: 1864-1876.
108. Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W. et al. (2010) A profile of ring-hydroxylating oxygenases that degrade aromatic pollutants. *Rev Environ Contam Toxicol* 206: 65-94.
109. Plazek, E. (1939) Über die Nitrierung von einigen Methylhomologen des Pyridins. *Ber Dtsch Chem Ges* 72: 577-581.
110. Poupin, P., Ducrocq, V., Hallier-Soulier, S., and Truffaut, N. (1999) Cloning and characterization of the genes encoding a cytochrome P450

- (PipA) involved in piperidine and pyrrolidine utilization and its regulatory protein (PipR) in *Mycobacterium smegmatis* mc2155. *J Bacteriol* 181: 3419-3426.
111. Poupin, P., Truffaut, N., Combourieu, B., Besse, P., Sancelme, M., Veschambre, H., and Delort, A.M. (1998) Degradation of morpholine by an environmental *Mycobacterium* strain involves a cytochrome P-450. *Appl Environ Microbiol* 64: 159-165.
 112. Quan, S., and Dabbs, E.R. (1993) Nocardioform arsenic resistance plasmid characterization and improved *Rhodococcus* cloning vectors. *Plasmid* 29: 74-79.
 113. Rajini, K.S., Sasikala, C., and Ramana, C.V. (2010) Reductive degradation of pyrazine-2-carboxylate by a newly isolated *Stenotrophomonas* sp. HCU1. *Biodegradation* 21: 801-813.
 114. Rajini, K.S., Aparna, P., Sasikala, C., and Ramana, C.V. (2011) Microbial metabolism of pyrazines. *Crit Rev Microbiol* 37: 99-112.
 115. Rappert, S., and Müller, R. (2005) Microbial degradation of selected odorous substances. *Waste Manag* 25: 940-954.
 116. Rappert, S., Botsch, K.C., Nagorny, S., Francke, W., and Müller, R. (2006) Degradation of 2,3-diethyl-5-methylpyrazine by a newly discovered bacterium, *Mycobacterium* sp. strain DM-11. *Appl Environ Microbiol* 72: 1437-1444.
 117. Rappert, S., Li, R., Kokova, M., Antholz, M., Nagorny, S., Francke, W., and Müller, R. (2007) Degradation of 2,5-dimethylpyrazine by *Rhodococcus erythropolis* strain DP-45 isolated from a waste gas treatment plant of a fishmeal processing company. *Biodegradation* 18: 585-596.
 118. Roberts, G.A., Grogan, G., Greter, A., Flitsch, S.L., and Turner, N.J. (2002) Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp. *J Bacteriol* 184: 3898-3908.
 119. Romão, M.J., Archer, M., Moura, I., Moura, J.J., LeGall, J., Engh, R. et al. (1995) Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido-reductase from *D. gigas*. *Science* 270: 1170-1176.
 120. Sachelaru, P., Schiltz, E., and Brandsch, R. (2006) A functional mobA gene for molybdopterin cytosine dinucleotide cofactor biosynthesis is required for activity and holoenzyme assembly of the heterotrimeric nicotine dehydrogenases of *Arthrobacter nicotinovorans*. *Appl Environ Microbiol* 72: 5126-5131.
 121. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T. et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
 122. Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

123. Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
124. Sandu, C., Chiribau, C.B., Sachelaru, P., and Brandsch, R. (2005) Plasmids for nicotine-dependent and -independent gene expression in *Arthrobacter nicotinovorans* and other *Arthrobacter* species. *Appl Environ Microbiol* 71: 8920-8924.
125. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
126. Schmid, A., Dordick, J., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., and Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409: 258-268.
127. Schoemaker, H.E., Mink, D., and Wubbolts, M.G. (2003) Dispelling the myths--biocatalysis in industrial synthesis. *Science* 299: 1694-1697.
128. Schreuder, H.A., Prick, P.A., Wierenga, R.K., Vriend, G., Wilson, K.S., Hol, W.G., and Drenth, J. (1989) Crystal structure of the p-hydroxybenzoate hydroxylase-substrate complex refined at 1.9 Å resolution. Analysis of the enzyme-substrate and enzyme-product complexes. *J Mol Biol* 208: 679-696.
129. Sekine, M., Tanikawa, S., Omata, S., Saito, M., Fujisawa, T., Tsukatani, N. et al. (2006) Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4. *Environ Microbiol* 8: 334-346.
130. Semėnaitė, R., Gasparavičiūtė, R., Duran, R., Precigou, S., Marcinkevičienė, L., Bachmatova, I., and Meškys, R. (2003) Genetic diversity of 2-hydroxypyridine-degrading soil bacteria. *Biologija* 2: 27-30.
131. Shafiee, A., and Hutchinson, C.R. (1988) Purification and reconstitution of the electron transport components for 6-deoxyerythronolide B hydroxylase, a cytochrome P-450 enzyme of macrolide antibiotic (erythromycin) biosynthesis. *J Bacteriol* 170: 1548-1553.
132. Shimomura, O., and Johnson, F.H. (1975) Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 1546-1549.
133. Shingler, V., Powlowski, J., and Marklund, U. (1992) Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J Bacteriol* 174: 711-724.
134. Sielaff, B., Andreesen, J.R., and Schräder, T. (2001) A cytochrome P450 and a ferredoxin isolated from *Mycobacterium* sp. strain HE5 after growth on morpholine. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 458-464.
135. Smirnov, L.D., Dyumaev, K.M., Shuikin, N.I., and Bel'skii, I.F. (1962) Synthesis of 2, 4, 6-trialkyl-3-hydroxypyridines. *B Acad Sci USSR Ch+* 11: 2148-2149.

136. Stanislauskiene, R., Gasparaviciute, R., Vaitekunas, J., Meskiene, R., Rutkiene, R., Casaite, V., and Meskys, R. (2012) Construction of *Escherichia coli*-*Arthrobacter*-*Rhodococcus* shuttle vectors based on a cryptic plasmid from *Arthrobacter rhombi* and investigation of their application for functional screening. *FEMS Microbiol Lett* 327: 78-86.
137. Steiner, R.A., Janssen, H.J., Roversi, P., Oakley, A.J., and Fetzner, S. (2010) Structural basis for cofactor-independent dioxygenation of *N*-heteroaromatic compounds at the alpha/beta-hydrolase fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 657-662.
138. Stephan, I., Tshisuaka, B., Fetzner, S., and Lingens, F. (1996) Quinaldine 4-oxidase from *Arthrobacter* sp. R61a, a versatile procaryotic molybdenum-containing hydroxylase active towards *N*-containing heterocyclic compounds and aromatic aldehydes. *Eur J Biochem* 236: 155-162.
139. Stevens, A.M., Dolan, K.M., and Greenberg, E.P. (1994) Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12619-12623.
140. Sutton, W.B. (1957) Mechanism of action and crystallization of lactic oxidative decarboxylase from *Mycobacterium phlei*. *J Biol Chem* 226: 395-405.
141. 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* 28: 2731-2739.
142. Taylor, B.F., and King, C.A. (1987) Phthalic acid and pyridine dicarboxylic acids as catabolic analogs. *FEMS Microbiol Lett* 44: 401-405.
143. Taylor, D.G., and Trudgill, P.W. (1986) Camphor revisited: studies of 2,5-diketocamphane 1,2-monooxygenase from *Pseudomonas putida* ATCC 17453. *J Bacteriol* 165: 489-497.
144. Tinschert, A., Tschsch, A., Heinzmann, K., and Kiener, A. (2000) Novel regioselective hydroxylations of pyridine carboxylic acids at position C2 and pyrazine carboxylic acids at position C3. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 185-195.
145. Uemura, D., Toya, Y., Watanabe, I., and Hirata, Y. (1979) Isolation and structures of two new pyrazines, palythazine and isopalythazine, from *Palythoa tuberculosa*. *Chem Lett*: 1481-1482.
146. Vaillancourt, F.H., Bolin, J.T., and Eltis, L.D. (2006) The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41: 241-267.
147. van Berkel, W.J., Kamerbeek, N.M., and Fraaije, M.W. (2006) Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J Biotechnol* 124: 670-689.

148. Van Lancker, F., Adams, A., and De Kimpe, N. (2012) Impact of the *N*-terminal amino acid on the formation of pyrazines from peptides in Maillard model systems. *J Agric Food Chem* 60: 4697-4708.
149. Virk, A.P., Sharma, P., and Capalash, N. (2012) Use of laccase in pulp and paper industry. *Biotechnol Prog* 28: 21-32.
150. Vyas, A.V., Jahdavi, R.T., Phad, S.T., and Ostrovskiy, M.A. (2011) Substance having antioxidant, geroprotective and anti-ischemic activity and method for the preparation thereof. US2011/0045065, United States: LUCAS & MERCANTI, LLP.
151. Wang, J., Ortiz-Maldonado, M., Entsch, B., Massey, V., Ballou, D., and Gatti, D.L. (2002) Protein and ligand dynamics in 4-hydroxybenzoate hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 608-613.
152. Wheeler, J.W., and Blum, M.S. (1973) Alkylpyrazine alarm pheromones in ponerine ants. *Science* 182: 501-503.
153. Whitesides, G.M. (1985) Applications of cell-free enzymes in organic synthesis. *Ciba Found Symp* 111: 76-96.
154. Wijnmans, M., Pratt, D.A., Brinkhorst, J., Serwa, R., Valgimigli, L., Pedulli, G.F., and Porter, N.A. (2004) Synthesis and reactivity of some 6-substituted-2,4-dimethyl-3-pyridinols, a novel class of chain-breaking antioxidants. *J Org Chem* 69: 9215-9223.
155. Wilcox, R.D., Horne, D.J., and Johnston, H. (1970) Pyrazine pesticides and their preparation. US3501472A, United States: Dow Chemical Co.
156. Woo, T.H., Cheng, A.F., and Ling, J.M. (1992) An application of a simple method for the preparation of bacterial DNA. *Biotechniques* 13: 696-698.
157. Woolfson, A., and Rothschild, M. (1990) Speculating about pyrazines. *Proc Biol Sci* 242: 113-119.
158. Xu, Y., Mortimer, M.W., Fisher, T.S., Kahn, M.L., Brockman, F.J., and Xun, L. (1997) Cloning, sequencing, and analysis of a gene cluster from *Chelatobacter heintzii* ATCC 29600 encoding nitrilotriacetate monooxygenase and NADH:flavin mononucleotide oxidoreductase. *J Bacteriol* 179: 1112-1116.
159. Yamada, H., and Shimizu, S. (1988) Mikrobielle und enzymatische Verfahren zur Produktion biologisch und chemisch wertvoller Verbindungen. *Angew Chem* 100: 640-661.
160. Zhang, Y., Wade, M., Scorpio, A., Zhang, H., and Sun, Z. (2003) Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chem* 52: 790-795.

1 PRIEDAS

P1 lentelė. *R. jostii* TMP1 bakterijose tetrametilpirazinu indukuojamo 40 kDa baltymo *de novo* peptidų sekos, nustatytos MS/MS sekoskaitos būdu.

Peptido masė	Prognozuojama seka	Amino rūgščių modifikacijos
1158.59	KKVSGEIANGR	
	RKASGEIANGR	
	KRASGEIANGR	
1141.48	SPEKYGGFTR	
	SPEKYNFTR	
1308.64	EAKEPHPLYK	
	EAGAEPHPPLYK	
	EAAGEPHPLYK	
	KEAEPHPPLYK	
	KEAEPHHGLYK	
1294.58	EPASM*VG YQ*APK	Deamidinimas (NQ) [9]; oksidacija(M) [5]
	PQ*ASM*VG YQ*APK	Deamidinimas (NQ) [2,9]; oksidacija (M) [5]
	PQ*ASM*VG YEAPK	Deamidinimas (NQ) [2]; oksidacija (M) [5]
	Q*PASFVG YEAPK	Deamidinimas (NQ) [1]
	PEASM*VG YEAPK	Oksidacija (M) [5]
	PEASFVG YQ*APK	Deamidinimas (NQ) [9]
	EPASM*VG YEAPK	Oksidacija (M) [5]
	EPASFVG YQ*APK	Deamidinimas (NQ) [9]
	PQ*ASFVG YQ*APK	Deamidinimas (NQ) [2,9]
	EPASFVG YEAPK	
	DAAGEPHSKV KR	
	DAAADPHSKV KR	
	RDGDPHSKV KR	
	WHM*KHDQ*KAP	Deamidinimas (NQ) [7] oksidacija (M) [3]
	WKQ*DHGAM*HAP	Deamidinimas (NQ) [3]; oksidacija (M) [8]
	WKQ*DHKM*HAP	Deamidinimas (NQ) [3]; oksidacija (M) [7]
	WHFAGHDQ*KAP	Deamidinimas (NQ) [8]
	WHM*KHDEKAP	Oksidacija (M) [3]
	WKEDHGAM*HAP	Oksidacija (M) [8]
	WKQ*DHGAFHAP	Deamidinimas (NQ) [3]
	AN*KQ*PHPPLHGP	Deamidinimas (NQ) [2,4]
	AN*KEPHPPLHGP	Deamidinimas (NQ) [2]
	PLPN*PPHPEKAP	Deamidinimas (NQ) [4]
	AN*AGEPHPPLHPG	Deamidinimas (NQ) [2]
	AN*AGEPHPPLHGP	Deamidinimas (NQ) [2]
	ADKQ*PHPPLHGP	Deamidinimas (NQ) [4]
	ADKEPHPPLHGP	
	PLPDPPHPEKAP	
	ADAGEPHPPLHPG	
	ADAGEPHPPLHGP	

	CGYFKHDEKAP	
	GCYFKHDEKAP	
	GCYFKDHEKAP	
	CGYFKDHEKAP	
	WKRKDHDGPR	
	WKEDHKAAGPR	
	WKEHDKAAGPR	
	WHFKHDDGPR	
	WKRKHDDGPR	
	WKEHDKRGAAP	
	LSAGNRHDEGAAP	
	CGPGEDHKAAPVN	
	GCPGEDHKAAPVN	
	SLGANRHDEGAAP	
	LSGANRHDEGAAP	
	KEANRHDEGAAP	
	WAGEDHRNVPN	
	WAGEDHKAAVGGP	
	WAGEDHKAAGVGP	
	TVAGNRHDEGAAP	
864.42	VC*HHVGR	Ureidometilas (C) [2]
	VC*HHRR	Ureidometilas (C) [2]
	VGHCHVGR	
	(157.09)PAAHVGR	
	VGCHHVGR	
	GTTRHHR	
	VGHCRHR	
	VGCRHHR	
	GTTHHVGR	
	VGCHRHR	
	CAHKLHR	
	SSHKLHR	
	ACHKLHR	
	CAHLKHR	
	SSHLKHR	
	ACHLKHR	
	GTTVGHHR	
	ASTVGHHR	
	VGCHRHR	
	GTRTHHR	
	GTTHHRR	
	VGHCRHR	
	GTTHRHR	
	SATHRHR	
	ASTHRHR	
	TGTHRHR	