

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**

**AGOTA AUČYNAITĖ**

**MODIFIKUOTŲJŲ NUKLEOTIDŲ METABOLIZMO FERMENTAI**

Daktaro disertacijos santrauka  
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2018

Disertacija rengta 2013–2017 m. Vilniaus universiteto Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje.

**Mokslinis vadovas:**

Dr. Jaunius Urbonavičius (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

**Disertacija bus ginama viešame disertacijos gynimo tarybos posėdyje:**

**Pirmininkė:**

Prof. dr. Edita Sužiedėlienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

**Nariai:**

Prof. dr. Hannu Myllykallio (Paryžiaus-Saclay universitetas, Prancūzija, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P);

Dr. Milda Plečkaitytė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P);

Dr. Elena Servienė (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B);

Dr. Giedrius Vilkaitis (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

Disertacija bus ginama viešame disertacijos Gynimo tarybos posėdyje 2018 m. rugsėjo mėn. 21 d. 11 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre, R101 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiųsta 2018 m. rugpjūčio mėn. 21 d.

Su disertacija galima susipažinti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>.

**VILNIUS UNIVERSITY**

**AGOTA AUČYNAITĖ**

**METABOLIC ENZYMES OF MODIFIED NUCLEOTIDES**

Summary of doctoral dissertation  
Physical sciences, biochemistry (04 P)

Vilnius, 2018

The results presented in this doctoral dissertation were obtained at the Department of Molecular Microbiology and Biotechnology, Institute of Biochemistry, Vilnius University, Vilnius, Lithuania, from 2013 to 2017.

**Scientific supervisor:**

Dr. Jaunius Urbonavičius (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P)

**The dissertation will be defended at the public meeting of the council of dissertation defence:**

**Chairwoman:**

Prof. dr. Edita Sužiedėlienė (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P).

**Members:**

Prof. dr. Hannu Myllykallio (Paris-Saclay University, France, physical sciences, biochemistry – 04 P);

Dr. Milda Plečkaitytė (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P);

Dr. Elena Servienė (Nature Research Centre, biomedical sciences, biology– 01 B);

Dr. Giedrius Vilkaitis (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P).

The doctoral dissertation will be defended at the public meeting of the council of dissertation defence at 11 AM on 21<sup>st</sup> of September, 2018 in the Life Sciences Centre of Vilnius University, R101 auditorium.

Address: Saulėtekio av. 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania.

This thesis is available at the Library of Vilnius University and the Vilnius University website: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>.

## IVADAS

Natūralūs modifikuoti nukleotidai aptinkami įvairiose nukleorūgštyse, tačiau jų įvairovė gausiausia transportinėje RNR. Nukleotidų modifikacijų funkcijos yra labai įvairios: nuo nukleorūgštims teikiamo struktūrinio stabilumo ir atsparumo fermentinei degradacijai iki dalyvavimo ląstelės reguliacijoje. Didžiulė modifikacijų įvairovė apsunkina kiekvienos iš jų konkrečios biozintezės ar funkcijos tyrimus. Nepaisant to, modifikuotųjų nukleotidų biosintezės keliai šiuo metu jau yra gana plačiai išnagrinėti, nors dar ne visi yra iki galo suprasti. Tuo tarpu modifikuotųjų nukleotidų biodegradacijos tyrimai nukleorūgštyse yra labai skurdūs, dažniausiai apsiribojantys modifikuotųjų nukleotidų susiformavimu. Netgi tolesnis jų skaldymas iki nukleozidų ir po to iki heterociklinių bazių ir cukrų yra aprašomas itin retai. Žvelgiant iš fundamentinių tyrimų pusės būtų logiška manyti, jog visi biosintezės procesai turi turėti atitinkamus skaidymo ar sugražinimo į metabolizmą atitikmenis. Kaip tiksliai tai vyksta modifikuotųjų nukleotidų, nukleozidų, heterociklinių bazių ir cukrų atveju – dažniausiai nėra žinoma. Nors šiuo metu dar tik pradedama suvokti tikrąją modifikuotųjų nukleotidų fiziologinę svarbą ląstelėse, jie jau yra naudojami medicinoje. Natūraliai gamtoje randami nukleotidai dalyvauja daugybėje biologinių procesų, yra sudedamosios DNR ir RNR dalys. Svarbios ląstelei jų funkcijos suteikia unikalią galimybę kurti sintetinius nukleotidų analogus ir naudoti juos kaip vaistus gydyti virusinėms infekcijoms ar vėžiui. Nukleotidų modifikacijos ir jų metabolizmas – ypatingai plati tyrimų sritis. Todėl ši disertacija susideda iš keleto dalių, kurios apima tiek sudėtingo archėjų viozino darinių biosintezės kelio fermentų tyrimus, tiek naujų fermentų paiešką, siekiant pagausinti duomenis apie modifikuotųjų uridino darinių biodegradaciją.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Parodyti aTrm5a baltymų iš *Pyrococcus abyssi* and *Nanoarchaeum equitans* metiltransferazinį aktyvumą.
2. Sukurti sistemą, skirtą naujų fermentų, dalyvaujančių modifikuotųjų uracilo/uridino darinių virsme į uracilą, paieškai.
3. Aptikti fermentus, gebančius versti 2-tiouracilą į uracilą.
4. Aptikti fermentus, gebančius versti 2'-O-metiluridiną į uracilą.
5. Aptikti fermentus, vykdančius izocitozino deamininimo iki uracilo reakciją.

## Mokslinis naujumas ir praktinė nauda

Šio darbo metu buvo parodyta, kad *P. abyssi* (PAB2272) ir *N. equitans* (NEQ228) aTrm5a baltymai turi dvigubą tRNR<sup>Phe</sup>:m<sup>1</sup>G/imG2 metiltransferazinį aktyvumą. Anksčiau buvo pademonstruota, kad PAB2272 katalizuoja guanino metilinimą (de Crécy-Lagard et al., 2010). Taip pat buvo spėjama, jog tas pats fermentas katalizuoja 4-demetilviozino (imG-14) virsmą izoviozinu (imG2), tačiau šie spėjimai nebuvo paremti eksperimentais. Sudėtingi viozino darinių biosintezės keliai archėjose tapo aiškesni gavus šiuos rezultatus. Taip pat, remiantis bifunkcinių metiltransferazių buvimo ląstelėse įrodymais, galima teigti, kad dvi metilinimo reakcijas vykdančios fermentai evoliucijos eigoje specializavosi į atskirus fermentus, o tai sudarė sąlygas formuotis sudėtingesniems metaboliniams keliams (Urbonavičius et al., 2016).

Taip pat buvo sukurta naujų fermentų atrankos sistema, paremta *E. coli* uracilo auksotrofija ir metagenominėmis bibliotekomis. Naudojantis ja rasti devyni nauji baltymai, kurių fermentinis aktyvumas buvo tiriamas. Trys nauji DUF523 (*angl.* Domain of Unknown Function 523) šeimos atstovai verčia 2-tiouracilą į uracilą *in vivo*. Tikėtina, jog šiuose baltymuose egzistuoja Fe-S centrai, reikalingi jų funkcionalumui (Aučynaitė et al., 2018). Ieškant 2'-*O*-metiluridino skaidyme dalyvaujančių fermentų buvo nustatytas DNR fragmentas, koduojantis du šalia išsidėsčiusius aldolazės ir nukleozidų hidrolazės genus. Tikėtina, jog tai yra dalis operono, koduojančio 2'-*O*-metiluridino katabolizme dalyvaujančius fermentus. 2'-*O*-metiluridino hidrolazės (RK9NH) fermentinis aktyvumas buvo pademonstruotas tiek *in vivo*, tiek *in vitro*. RK9NH hidrolazė gali būti pritaikyta fermentinei 2'-*O*-metilintų nukleozidų sintezei. Tokių nukleozidų poreikis yra didelis – jie yra panaudojami gaminant nukleorūgščių pagrindu kuriamus vaistus. Be to, RK9NH hidrolazė fluorintus substratus (5-fluorouridina, 5-fluoro-2'-deoksiuridina ir 5-fluoro-2'-*O*-metiluridina) verčia 5-fluorouracilu, kuris nuo seno yra naudojamas chemoterapijoje gydant vėžinius susirgimus. Trijų naujų izocitozino deaminazių aktyvumas buvo nustatytas *in vivo*. Dvi deaminazės buvo išgrynintos ir yra aktyvios *in vitro*. Kaip substratą šios deaminazės naudoja ne tik izocitozina, bet ir 8-oksoguanina, kuri skaidančių fermentų nėra žinoma daug. Dar vienas naujų deaminazių substratas yra 5-fluoroizocitozinas, kurią jos verčia 5-fluorouracilu. Tai reiškia, kad RK9NH hidrolazė ir izocitozino deaminazės gali būti pritaikytos vėžio terapijai: „Izocitozino deaminazės/5-fluorizocitozino

fermento/provaisto pora vėžio genų terapijai“ patentinė paraiška (LT2017 533) buvo pateikta 2017 m. lapkričio 8 d.

### **Ginamieji disertacijos teiginiai:**

1. Archėjų aTrm5a baltymai iš *P. abyssi* (PAB2272) ir *N. equitans* (NEQ228) yra bifunkcinės metiltransferazės, vykdančios guanozino ir 4-demetilviozino (imG-14) nukleotidų metilinimą iki atitinkamai metilguanozino (m<sup>1</sup>G) ir izoviozino (imG2) transportinėje tRNR.
2. *E. coli* uracilo auksotrofinis kamienas DH10BΔ*pyr* yra patogus įrankis, skirtas naujų fermentų paieškai naudojantis metagenominėmis bibliotekomis.
3. Trys nauji DUF523 baltymų šeimos atstovai dalyvauja verčiant 2-tiouracilą į uracilą *in vivo*.
4. Nauja RK9NH hidrolazė dalyvauja 2'-*O*-metiluridino ir jo darinių skaidyme iki uracilo.
5. Dvi naujos deaminazės (Vcz ir URA3) verčia izocitoziną į uracilą, 5-fluoroizocitoziną į 5-fluorouracilą bei 8-oksoguaniną į šlapimo rūgštį.

### **Daktaro disertacijos turinys**

Disertacija parašyta anglų kalba ir turi šias dalis: Įvadą, Literatūros apžvalgą, Medžiagas ir metodus, Rezultatus ir jų aptarimą, Išvadas, Literatūros sąrašą (132 vienetai), Priedą, 7 lenteles ir 38 paveikslėlius. Iš viso: 115 puslapių.

## MEDŽIAGOS IR METODAI

### Reagentai

Dr. Daiva Tauraitė susintetino 5-fluoroizocitoziną, 5-fluorouridiną, 5-fluoro-2'-deoksiuridiną, 5-fluoro-2'-*O*-metiluridiną ir nustatė jų grynumą. Visi kiti šiame darbe naudoti reagentai yra aukščiausios komerciškai prieinamos kokybės.

### Bakterijos

**1 lentelė.** Darbe naudotos bakterijos.

<i>E. coli</i>	Genotipas	Šaltinis
DH5α	F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>), λ<sup>-</sup></i>	Pharmacia, JAV
DH10B	F <sup>-</sup> <i>endA1 deoR<sup>+</sup> recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ(lac) X74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara, leu)7697 mcrA Δ(mr r-hsdRMS-mcrBC) Str<sup>R</sup> λ<sup>-</sup></i>	Invitrogen, JAV
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> str. B F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>(λ<sup>S</sup>)</i>	Avidis, Prancūzija
BW25113	<i>lacI<sup>+</sup>rrnB<sub>T14</sub> ΔlacZ<sub>WJ16</sub> hsdR514 ΔaraBAD<sub>AH33</sub> ΔrhaBAD<sub>LD78</sub> rph-1 Δ(araB-D)567 Δ(rhaD-B)568 ΔlacZ4787(::rrnB-3) hsdR514 rph-1</i>	Keio kolekcija, Japonija

### Plazmidiniai vektoriai

**2 lentelė.** Darbe naudoti plazmidiniai vektoriai.

Plazmidinis vektorius	Savybės	Šaltinis
708-FLPe	FLPe ekspresijai skirtas plazmidinis vektorius, Cm <sup>R</sup>	GeneBridges, Vokietija
pET21b	Vektorius, skirtas indukuojamai C-gale 6-His žymėtų rekombinantinių baltymų raiškai, Amp <sup>R</sup>	Novagen, Vokietija
pET21b-DUF523Vcz	<i>DUF523Vcz</i> genas padaugintas PGR naudojant <i>DUFVcz 21b Fw</i> ir <i>DUFVcz 21b Rv</i> pradmenis, hidrolizuotas <i>NdeI</i> bei <i>XhoI</i> ir įterptas į atitinkamą pET21b vektoriaus vietą.	Šis darbas
pET21b-RK9NH	RK9NH genas padaugintas PGR naudojant <i>NH 21b FW</i> ir <i>NH 21b RV</i> pradmenis, hidrolizuotas <i>NdeI</i> bei <i>HindIII</i> ir įterptas į atitinkamą pET21b vektoriaus vietą.	Šis darbas
pET21b-URA3	URA3 deaminazės genas padaugintas PGR naudojant <i>URA3 21b FW</i> ir <i>URA3 21b his RV</i> pradmenis, hidrolizuotas <i>NdeI</i> bei <i>XhoI</i> ir įterptas į atitinkamą pET21b vektoriaus vietą.	Šis darbas



pET28a	Vektorius, skirtas indukuojamai C-gale 6-His žymėtų rekombinantinių baltymų raiškai, Kan <sup>R</sup>	Novagen, Vokietija
pET28a-Vcz	Vcz deaminazės genas padaugintas PGR naudojant <i>Vcz 28a FW</i> ir <i>Vcz 28a his RV</i> pradmenis, hidrolizuotas <i>NcoI</i> and <i>XhoI</i> ir įterptas į atitinkamą pET28a vektoriaus vietą.	Šis darbas
pQE70	Vektorius, skirtas indukuojamai C-gale 6-His žymėtų rekombinantinių baltymų raiškai, Amp <sup>R</sup>	Qiagen, Germany
pQE70-DUF523Vcz	<i>DUF523Vcz</i> genas padaugintas PGR naudojant <i>DUFVcz pQ Fw</i> ir <i>DUFVcz pQ Rv</i> pradmenis, hidrolizuotas <i>SphI</i> bei <i>BglIII</i> ir įterptas į atitinkamą pQE70 vektoriaus vietą.	Šis darbas
pQE70-DUF523Vcz127	Mutuotas <i>DUF523Vcz</i> genas padaugintas PGR naudojant <i>DUFVcz pQ Fw</i> ir <i>DUFVcz pQ Rv</i> pradmenis, hidrolizuotas <i>SphI</i> bei <i>BglIII</i> ir įterptas į atitinkamą pQE70 vektoriaus vietą.	Šis darbas
pQE70-DUF523Vcz28	Mutuotas <i>DUF523Vcz</i> genas padaugintas PGR naudojant <i>DUFVcz pQ Fw</i> ir <i>DUFVcz pQ Rv</i> pradmenis, hidrolizuotas <i>SphI</i> bei <i>BglIII</i> ir įterptas į atitinkamą pQE70 vektoriaus vietą.	Šis darbas
pQE70-DUF523Vcz310	Mutuotas <i>DUF523Vcz</i> genas padaugintas PGR naudojant <i>DUFVcz pQ Fw</i> ir <i>DUFVcz pQ Rv</i> , hidrolizuotas <i>SphI</i> bei <i>BglIII</i> ir įterptas į atitinkamą pQE70 vektoriaus vietą.	Šis darbas
pQE70-RK9NH	The RK9NH gene was amplified by PCR using primers <i>NH pQ Fw</i> and <i>NH pQ Rv</i> , digested with <i>BamHI</i> and <i>HindIII</i> and cloned into the corresponding site of pQE70 vector.	Šis darbas
pRed-ET	Red/ET raiškos plazmidinis vektorius, Amp <sup>R</sup>	GeneBridges, Vokietija
pUC19	Daugiakopijinis klonavimo vektorius, Amp <sup>R</sup>	Thermo Scientific™

## Oligonukleotidų pradmenys

3 lentelė. Darbe naudoti oligonukleotidų pradmenys.

Pavadinimas	Seka 5'→3'	Tikslas
pyrF_kan_Rv	TTTACCTGTTTCGCGCCACTTCCGGTGCC CATCATCAAGAAGGTCTGGTCAATTAAC CCTCACTAAAGGGCG	Prideda 50 bp homologijos regionus Red/ET rekombinacijai į FRT-PGK-gb2-neo-FRT kasetę
pyrF_kan_Rv	AATACGTCCGGTTTCCGTTGAGTAGACCA GACGGCTGTTGGAATCACTCATAATACG ACTCACTATAGGGCTC	
pyrE_kan_Fw	ATGAGTCGCCTTTTTTTTGTCTGTAGAAA AGTAAGATGAGGAGCGAAGGCAATTAAC CCTCACTAAAGGGCG	

pyrE_kan_Rv	CACAGTTGCAGTAATATGACGCCGGATG ACTTTTCATCCGGCGAGTTTCTTAATACG ACTCACTATAGGGCTC		
pyrC_kan_Fw	CGAAAGGCATTGAAGTGAAGCCAGGCGA AATTGTCATTCCATTTACTGATAATTAAC CCTCACTAAAGGGCG		
pyrC_kan_Rv	GAATACGGCGGGAAAGTTCGCCAGCCAG GGCGTCAATAGCCCCAGCTGGCTAATAC GACTCACTATAGGGCTC		
Primer 2	CGAGACTAGTGAGACGTGCTAC	Genomo modifikacijos tikrinimui PGR	
pyrF_US_Fw	CTTCAGCGTCATCCGACCAT		
pyrF_DS_Rv	CGCCTGCGAGTTTTACCTTC		
pyrE_US_Fw	ATGAAAGGGATGGTAGCCCGC		
pyrE_DS_Rv	CCCAGTAAGACCCGCATGTT		
pyrC_US_Fw	CTAACCGGAGACGCCAATCT		
pyrC_DS_Rv	ATTCGCTGCGGCATAACGTA		
DUFVcz pQ Fw	TATATGCATGCAGGAAAAATCATAGTC AGC		<i>DUF523Vcz</i> geno klonavimui į pQE70 vektorių
DUFVcz pQ Rv	TTTTTAGATCTGGAGCCCGCTGC		
DUFVcz 21b Fw	ATATACATATGAAGGAAAAATCATAGT CAGCGCCTGC	<i>DUF</i> genų klonavimui į pET21b vektorių	
DUFVcz 21b Rv	TGGTGCTCGAGGGAGCCCGCTGCGGTGG CCACCAGGGAGAG		
DUFVcz 28t->g I	GCTGACCCAGCAGGGCGGCGCTGACTAT GA	<i>DUF523Vcz</i> geno mutagenezei	
DUFVcz 28t->g II	TCATAGTCAGCGCCGCCCTGCTGGGTCAG C		
DUFVcz 127t->g I	GCCACCTCGGGGGCGAACGCCAGCGC		
DUFVcz 127t->g II	GCGCTGGCGTTCGCCCCCGAGGTGGC		
DUFVcz 310t->g I	CGGCCACTGCCGGCGGAGGGACTCCC		
DUFVcz 310t->g II	GGGAGTCCCTCCGCCGGCAGTGGCCG		
URA3 21b FW	ATATACATATGGCCAAAACACTCTTGG		Izocitozino deaminazių genų klonavimui į pET raiškos vektorius
URA3 21b his RV	TATATCTCGAGTTCACCCATGACC		
Vcz 28a FW	ATATACCATGGACAAAAGAACGCTGC		
Vcz 28a his RV	TATATCTCGAGCAGCCGATGCCGGTT		
NH pQ Fw	AATAAGGATCCATGCCGACCCCGTTC	<i>RK9NH</i> geno klonavimui į pQE70 vektorių	
NH pQ Rv	TATTAAGCTTTCAGTCGAGACCGGAAGT GAAC		
NH 21b FW	AAAACATATGCCGACCCCGTTCATC	<i>RK9NH</i> geno klonavimui į pET21b raiškos vektorių	
NH 21b RV	TTTTAAGCTTGTCGAGACCGGAAGTGAA C		
pQE-F	CCCGAAAAGTGCCACCTG	pQE70 vektoriaus sekoskaitai	
pQE-R	GTTCTGAGGTCATTACTGG		
T7promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	pET vektorių sekoskaitai	
T7terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG		

## Rekombinantiniai baltymai.

4 lentelė. Rekombinantiniai baltymai naudoti šiame darbe.

Pavadinimas	Teorinis dydis be žymens, kDa	Žymuo
PAB2272	38.5	6-His C gale
NEQ228	36.3	6-His C gale
DUF523Vcz	16.5	6-His C gale
RK9NH	34.9	6-His C gale
RK9DPA	24.3	6-His C gale
Vcz	48.9	6-His C gale
URA3	49.5	6-His C gale

### Bakterijų terpės ir augimo sąlygos

**LB:** 1 % triptonas, 0,5 % mielių ekstraktas, 0,05 % NaCl.

**M9:** 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 μM CaCl<sub>2</sub>, 1.5 % agaras (ruošiama atskirai kaip „M9 agaras“), 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM NaCl, 20 mM NH<sub>4</sub>Cl („5 x M9 druskos“, pH 7,4 ruošiamos atskirai), 2 % gliukozė (40 % tirpalas ruošiamas atskirai), 0,2 % kazamino rūgštys (10 % tirpalas ruošiamas atskirai).

**NA:** Oxoid™ Nutrient Agar (Thermo Scientific™).

Visi tirpalai autoklavuojami 20 min. 121 °C temperatūroje. Kazamino rūgščių tirpalas ir kiti darbe minimi M9 terpės priedai sterilinami filtruojant. Bakterijos augintos 37 arba 30 °C temperatūroje arba kaip aprašyta.

### DNR manipuliacijos

Naudotos standartinės metodikos (Sambrook and Russell, 2001), Thermo Scientific™ TopVision Agarose, GeneRuler DNA Ladder Mix, DNR restrikcijos endonukleazės, T4 ligazė, FastAP, Phusion High-Fidelity PCR Master Mix, DreamTaq Green PCR Master Mix ir Thermo Scientific™ GeneJET Plasmid Miniprep Kit bei GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit rinkiniai pagal gamintojo rekomendacijas.

### Bakterijų transformacija

Bakterijų transformacijai naudoti standartiniai elektroporacijos arba cheminės transformacijos metodai.

## **Bioinformatinė analizė**

Plazmidinių vektorių sekoskaita atlikta MacroGen (Pietų Korėja). DNR sekos analizuotos BLAST (Altschul et al., 1990), ApE (A plasmid Editor by M. Wayne Davis), Clustal Omega (Sievers et al., 2011) ir ESPript (Robert and Gouet, 2014). Filogenetinė analizė atlikta naudojantis MEGA7 (Kumar et al., 2016).

## **Rekombinantinių baltymų raiška**

Reikiami genai buvo klonuoti į pET28a ar pET21b vektorius ir transformuoti į BL21(DE3) ląsteles. Gautos bakterijos augintos LB terpėje su 50 mg/L kanamicino (pET28a) arba 100 mg/L ampicilino (pET21b) (papildomai 20 mM FeSO<sub>4</sub> buvo pridedama auginant ląsteles, gaminančias rekombinantinį DUF523Vcz baltymą). Kultūroms, auginamoms 37 °C, pasiekus OT<sub>600</sub> 0,5–0,6, jos būdavo atvėsintos lede ir pridedama izopropil-β-D-tiogalaktopiranozido (IPTG) nuo 0,1 iki 1 mM galutinės koncentracijos. Indukuotos ląstelės augintos optimalioje geriausiai raiškai gauti temperatūroje 3 val. arba per naktį. Optimalios sąlygos buvo: DUF523Vcz – 0,1 mM IPTG, augimas per naktį 20 °C; RK9NH – 1 mM IPTG, augimas 3 val. 37 °C temperatūroje; URA3 ir Vcz deaminazės – 0,5 mM IPTG, augimas per naktį 20 °C. Ląstelės surinktos centrifuguojant, suspenduotos 50 mM TRIS-HCl, pH 8 (papildomai pridedama 150 mM NaCl ir 5mM ditionitrolio (DTT) gryninant DUF523Vcz), ir suardytos ultragarsu 750 W 1 min VC-750 procesoriuje (Sonics & Materials, Inc.). Ląstelių nuolaužos pašalintos centrifuguojant 16000×g 10 min.

## **Rekombinantinių baltymų gryninimas**

Beląsteliniai ekstraktai buvo užnešami ant Ni-NTA (GE Healthcare) baltymų gryninimo kolonėlės, prieš tai nulygsvarintos 50 mM TRIS-HCl, pH 8 (papildomai pridedama 150 mM NaCl ir 5mM ditionitrolio (DTT) gryninant DUF523Vcz). Adsorbavę baltymai nuo kolonėlės pašalinti naudojant linijinį 0-500 mM imidazolo gradientą. Frakcijos, turinčios reikalingą baltymą surinktos ir dializuotos prieš 50 mM TRIS-HCl, pH 8 buferį. Rekombinantinių baltymų grynumas patikrintas SDS-PAAG elektroforeze. Baltymų koncentracija nustatyta naudojantis Lowry metodu.

### **Metiltransferazinio aktyvumo tyrimas *in vitro***

Nustatant tRNR metiltransferazių aktyvumus, rekombinantiniai NEQ228 ir PAB2272 fermentai buvo inkubuojami su tRNR substratais. Naudota standartinė 100 µl galutinio tūrio reakcijos mišinio sudėtis: 1 µg išgryninto rekombinantinio fermento, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 5% glicerolio, 100 nCi [metil-<sup>14</sup>C]-SAM (Perkin Elmer) ir 40 µg tRNR, išskirtos iš *S. enterica* Δ*trmD27* mutanto (turinti G<sub>37</sub> savo tRNR sudėtyje) arba *S. cerevisiae* Δ*tyw2* mutanto (turinti imG-14 savo tRNR<sup>Phe</sup> sudėtyje) mutantų. Reakcijos mišiniai inkubuoti 30 min. 50 °C ir tirti, kaip aprašyta toliau.

Po inkubacijos reakcija sustabdyta pridendant 200 µl šalto 0,3 M natrio acetato (pH 5,3), po ko nedelsiant pridėtas lygus tūris fenolio/chloroformo (24:1) mišinio. Denatūravę baltymai pašalinti centrifuguojant 13000×g 3 min. kambario temperatūroje. Nukleorūgštys, buvusios viršutinėje fazėje, išsodintos 96 % etanolu, surinktos centrifuguojant, praplautos 70 % etanolu, išdžiovintos ir hidrolizuotos iki nukleotidų 5'-monofosfatų inkubuojant per naktį 37 °C su 1U nukleazės P1 (Sigma Aldrich) galutiniame 10 µl tūryje 50 mM amonio acetato/acto rūgšties buferio (pH 5,3). Gauti hidrolizatai toliau analizuoti dviejų krypčių plonasluoksne chromatografija ant 10×10 cm celiuliozinių plokštelių (Merck). Naudoti N1 (Nishimura 1) ir R2 (Rajbhandary 2) migravimo tirpalai atitinkamai pirmai ir antrai plonasluoksnės chromatografijos krypčiai. N1 tirpalo sudėtis: izobutyrynė rūgštis/konc. NH<sub>4</sub>OH/vanduo (66:1:33), 1 mM EDTA. R2 tirpalo sudėtis: 0,1 M natrio fosfatinis buferis, pH 6,8/ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/1-propanolis (100:60:2). Taip pat naudoti orientaciniai nukleotidų migravimo žemėlapiai, aprašyti Grosjean et al., 2004. Radioaktyvių dėmių detekcija atlikta po mažiausiai 3 dienų eksponavimo Fujifilm FLA-5100 vaizdinimo sistemoje. Naudota Multigauge 3.0 programa.

### **Mutantinių *E. coli* kamienų kūrimas ir metagenominės bibliotekos**

Atitinkami *pyrF*, *pyrE* ir *pyrC* genai DH10B *E. coli* kamiene buvo pakeisti atsparumo kanamicinui genu, naudojantis *The Quick and Easy E. coli Gene Deletion Kit* (Gene Bridges) rinkinį pagal gamintojo techninį protokolą (2.3 versija, 2012 m. birželis). Atsparumo kanamicinui genai pašalinti naudojantis 708-FLPe (Gene Bridges) plazmidiniu vektoriumi pagal gamintojo rekomendacijas. Metagenominės bibliotekas kūrė Rita Meškienė ir dr. Renata Gasparavičiūtė. Genominė DNR buvo išskirta iš dirvožemio

pavyzdžių, nepilnai hidrolizuota restrikcijos endonukleazėmis, įterpta į daugiakopijinį pUC19 vektorių ir išsėta ant NA terpės. Iš užaugusių kolonijų išskirta bendra plazmidinė DNR naudota DH10B $\Delta$ *pyr* kamieno transformacijai.

### **Spektroskopiniai matavimai**

UV-matomos šviesos sugerties spektrai registruoti Helios Gamma UV-Visible spektrofotometru (Thermo Scientific™), naudojant kvarcinę kiuvetę (1 cm).

### **Geležies jonų pašalinimas iš DUF523Vcz baltymo**

Geležies jonai iš DUF523Vcz baltymo pašalinti pagal metodiką, aprašytą Bouvier et al., 2014.

### **Tikslinė DUF523Vcz mutagenezė**

Mutagenezė atlikta naudojantis QuikChange™ Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) pagal gamintojo rekomendacijas. Mutacijų buvimas patvirtintas sekoskaita.

### **Fermentinio aktyvumo nustatymas**

Standartinė RK9NH fermentinė reakcija vykdyta 1 val. 37°C temperatūroje. Sudėtis (pateiktos galutinės koncentracijos): 30 mM (uridino, deoksiuridino, 2'-O-metiluridino, 5-fluorouridino, 5-fluorodeoksiuridino, 5-fluoro-2'-O-metilurino) substrato, 0.025 mg/mL rekombinantinio RK9NH fermento galutiniame 40  $\mu$ L tūrio 50 mM Tris-HCl pH 8,0 buferyje. Kitų substratų pradinės koncentracijos (ir atitinkamai naudotas RK9NH kiekis) buvo sumažintos dėl jų riboto tirpumo: naudota 20 mM citidino, deoksicitidino, 5-metiluridino, timidino; 10 mM adenzino, deoksiadenzino ir <5 mM guanozino, deoksiguanozino, inozino. Naudotos atitinkamai 0,017 mg/mL, 0,008 mg/mL, 0,004 mg/mL galutinės RK9NH baltymo koncentracijos.

Standartinė Vcz ir URA3 deaminazių reakcija vykdyta 1 val. 37 °C temperatūroje. Sudėtis (pateiktos galutinės koncentracijos): 15 mM (citozino, izocitozino ar 5-fluoroizocitozino) substrato; 0,0125 mg/mL rekombinantinių URA3 ir Vcz fermentų galutiniame 40  $\mu$ L tūrio 50 mM Tris-HCl pH 8,0 buferyje.

## **Tandeminė aukšto slėgio skysčių chromatografija ir masių spektrometrija (HPLC-MS)**

Naudota aukšto slėgio skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos (HPLC-MS) sistema, turinti SPD-M20A fotodiodų gardelės detektorius ir LCMS-2020 masių spektrometrą su ESI šaltiniu (Shimadzu, Japonija). Chromatografinis frakcionavimas vykdytas naudojant YMC Pack Pro kolonėlę (YMC, Japonija), 3×150 mm 40 °C temperatūroje. Naudojama mobili fazė sudaryta iš vandeninio 0,1 % skruzdžių rūgšties tirpalo (A tirpiklis) ir acetonitrilo (B tirpiklis). Masių spektrometrijos analizė atlikta tiek teigiamu, tiek neigiamu jonizacijos režimu ir analizuota naudojant LabSolutions LCMS programinę įrangą.

## REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Disertacijos darbo rezultatai susideda iš kelių dalių: metiltransferazinio archėjų PAB2272 ir NEQ228 baltymų aktyvumo tyrimo; sistemos, skirtos naujų fermentų paieškai, kūrimo; DUF523 baltymų ir 2-tiouracilo metabolizmo tyrimo; RK9NH hidrolazės ir 2'-O-metiluridino metabolizmo tyrimo; izocitozino deaminazių tyrimo.

### Metiltransferazinis NEQ228 ir PAB2272 baltymų aktyvumas

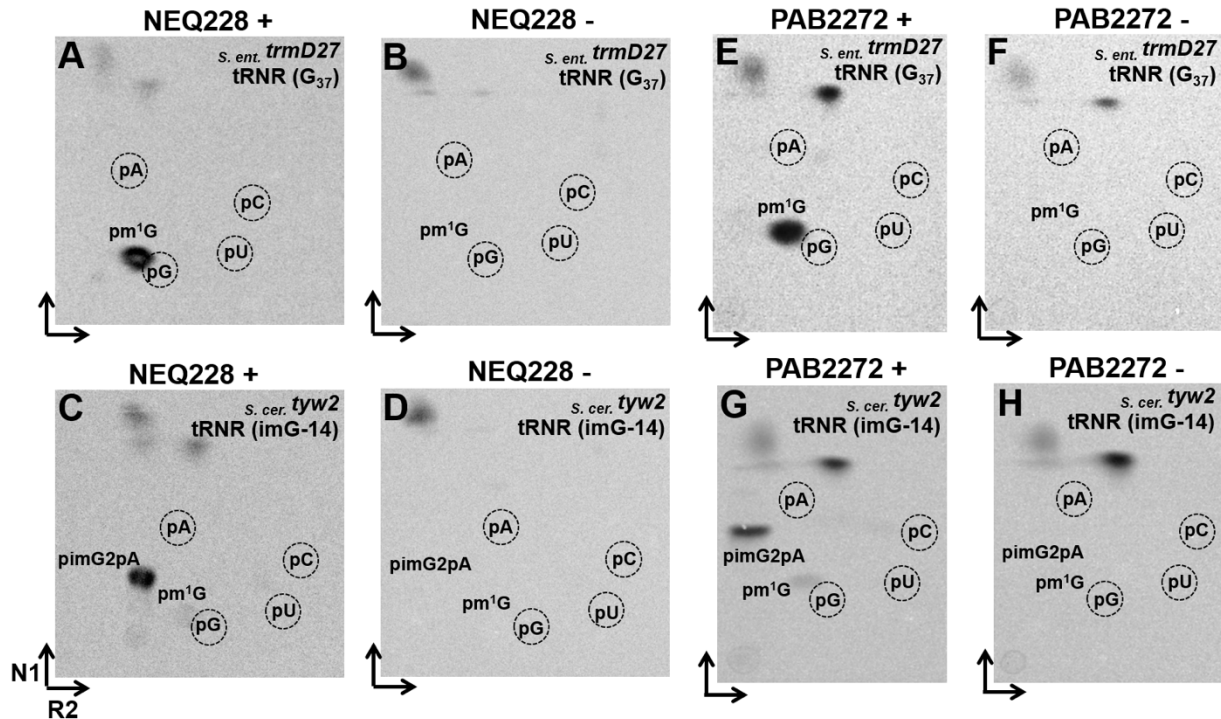
Išgrynintų rekombinantinių PAB2272 ir NEQ228 baltymų (dr. R. Rutkienė) fermentinis aktyvumas buvo matuojamas panaudojant du substratus. Pirmasis – tRNR, turinti nemodifikuotą G<sub>37</sub> nukleotidą, buvo išskirta iš *S. enterica*  $\Delta trmD27$  mutanto; antrasis – tRNR, turinti demetilvioziną (imG-14), buvo išskirta iš *S. cerevisiae*  $\Delta tyw2$  mutanto (šioje darbo dalyje naudota tRNR gauta iš dr. J. Urbonavičiaus). Po mutantinės tRNR inkubacijos su PAB2272 ir NEQ228 fermentais bei žymėtu [metil-<sup>14</sup>C]SAM (S-adenozil metioninu), tRNR buvo hidrolizuota iki pavienių nukleotidų 5'-monofosfatų ir analizuota dviejų kryptų plonasluoksne chromatografija bei autoradiografija (1 pav.).

Naudojant *S. enterica*  $\Delta trmD27$  mutanto tRNR, abiejų tirtų fermentų atveju susiformavo 1-metilguanozino 5'-monofosfatas (pm<sup>1</sup>G) (1 pav., A ir E); ne pridėjus fermentų jo neaptikta (1 pav. B ir F). Kai identiškomis sąlygomis fermentai buvo inkubuoti su *S. cerevisiae*  $\Delta tyw2$  mutanto tRNR, buvo aptikta papildoma dėmė chromatografinėse plokštelėse (1 pav., C ir G), kurios nebuvo aptinkama ne pridėjus fermentų (1 pav., D ir H). Anksčiau literatūroje buvo minima, jog tai galėtų būti izoviozino-adenino 5'-monofosfatų (pimG2pA) dinukleotidas, kuris gali atsirasti dėl nepilnos tRNR hidrolizės (Droogmans and Grosjean, 1987; Grosjean et al., 1990; de Crécy-Lagard et al., 2010). Papildomi HPLC-MS eksperimentai, aprašyti Urbonavičius et al., 2016 straipsnyje, patvirtino, jog išties plonasluoksne chromatografijoje atsirandanti dėmė yra pimG2pA dinukleotidas.

Sprendžiant iš gautų rezultatų, NEQ228 ir PAB2272 katalizuoja metil- grupės perkėlimą nuo [metil-<sup>14</sup>C]SAM ant dviejų skirtingų nukleotidų 37-ojoje tRNR<sup>Phe</sup>



pozicijoje: iš guanozino yra gaunamas 1-metilguanozinas ( $m^1G$ ), o iš 4-demetilviozino (imG-14) yra gaunamas izoviozinas (imG2).

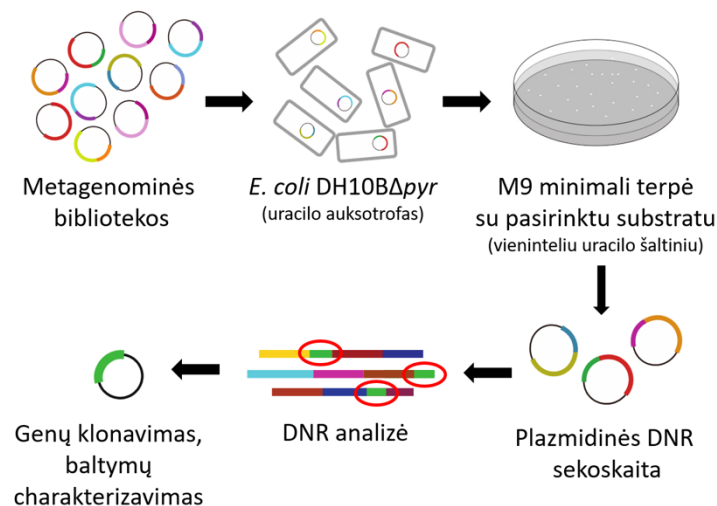


**1 pav.** Dviejų krypčių plonasluoksnės chromatografijos ir autoradiografijos rezultatai. (A) NEQ228 + *S. enterica*  $\Delta trmD27$  tRNR( $G_{37}$ ). (B) *S. enterica*  $\Delta trmD27$  tRNR( $G_{37}$ ), inkubuota be fermento. (C) NEQ228 + *S. cerevisiae*  $\Delta tyw2$  tRNR(imG-14). (D) *S. cerevisiae*  $\Delta tyw2$  tRNR(imG-14), inkubuota be fermento. (E) PAB2272 + *S. enterica*  $\Delta trmD27$  tRNR( $G_{37}$ ). (F) *S. enterica*  $\Delta trmD27$  tRNR( $G_{37}$ ), inkubuota be fermento. (G) PAB2272 + *S. cerevisiae*  $\Delta tyw2$  tRNR(imG-14). (H) *S. cerevisiae*  $\Delta tyw2$  tRNR(imG-14), inkubuota be fermento. Nukleotidų 5'-monofosfatai (pA, pG, pC ir pU), matomi UV šviesoje ir naudojami orientacijai, pažymėti apskritimais. Nedideli  $pm^1G$  kiekiai C ir G plokštelėse matomi dėl to, kad *S. cerevisiae* *tyw2* mutanto tRNR<sup>Phe</sup> pasitaiko ir nemetilinto  $G_{37}$ . Plokštelių viršuje matomos dėmės atsiranda dėl nespecifinės [ $^{14}C$ ]SAM degradacijos. N1 ir R2 yra atitinkami kiekvienoje plonasluoksnės chromatografijos kryptyje naudoti tirpalai.

Tikėtina, jog dvigubą metiltransferazinį aktyvumą turinčių fermentų yra sutinkama ir daugiau, ypač tokiuose organizmuose, kurių genomas yra palyginti mažas – juose fermentai, turintys daugiau funkcijų, atsveria tam tikrų genų nebuvimą (Kelkar and Ochman, 2013). Be to, tiriant tokius fermentus galima pastebėti, kaip evoliucijos eigoje jie specializavosi, tapo atskirais ir kaip susiformavo sudėtingi daug skirtingų fermentų reikalaujantys biosintezės keliai (Urbonavičius et al., 2016).

## Naujų fermentinių aktyvumų paieškos sistema

Pateikiama sistema sukurta genų, kurie koduoja fermentus, dalyvaujančius modifikuotųjų nukleozidų ar heterociklinių bazių metabolizmo procesuose, paieškai. Buvo padaryta prielaida, kad *E. coli* uracilo auksotrofinis kamienas (neturintis pirimidinų *de novo* biosintezės kelio komponentų) galėtų augti minimalioje terpėje tik tuo atveju, jeigu joje esantis modifikuotasis nukleozidas arba heterociklinė bazė (t. y., vienintelis uracilo šaltinis) būtų verčiamas uracilu. Tai galėtų atlikti nežinomi fermentai, koduojami genų, esančių metagenominėse bibliotekose (2 pav.). Metagenominės bibliotekos, turinčios atsitiktinius dirvožemio mikroorganizmų genomines DNR fragmentus, yra geras šaltinis genų, kurie kitais būdais nebūtų paprastai prieinami tyrimams (apžvelgta Popovic et al., 2015).



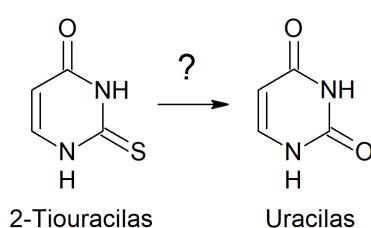
**2 pav.** Strategijos, naudotos naujus fermentus koduojančių genų paieškai metagenominėse bibliotekose, schema.

Uridino monofosfato (UMP, visų pirimidino nukleotidų pirmtako) sintezei reikalingi fermentai *E. coli* yra koduojami šešiuose operonuose (*carAB*, *pyrBI*, *pyrC*, *pyrD*, *pyrE*, *pyrF*), kurie yra skirtingose chromosomos vietose (Neuhard and Nygaard, 1987). Norint sumažinti aplinkoje esančių *pyr* genų atrankos tikimybę, iš *E. coli* DH10B kamieno genomo buvo pašalinti net trys uridino *de novo* sintezei reikalingi genai: *pyrF* (koduojantis orotidino-5'-fosfato dekarboksilazę), *pyrE* (koduojantis orotato fosforiboziltransferazę), *pyrC* (koduojantis dihidroorotazę). Gautas galutinis DH10BΔpyr kamienas, kuris negali augti minimalioje M9 terpėje be uracilo šaltinio. Šis kamienas buvo

naudojamas transformacijai metagenominėmis bibliotekomis tolesniuose šio darbo etapuose.

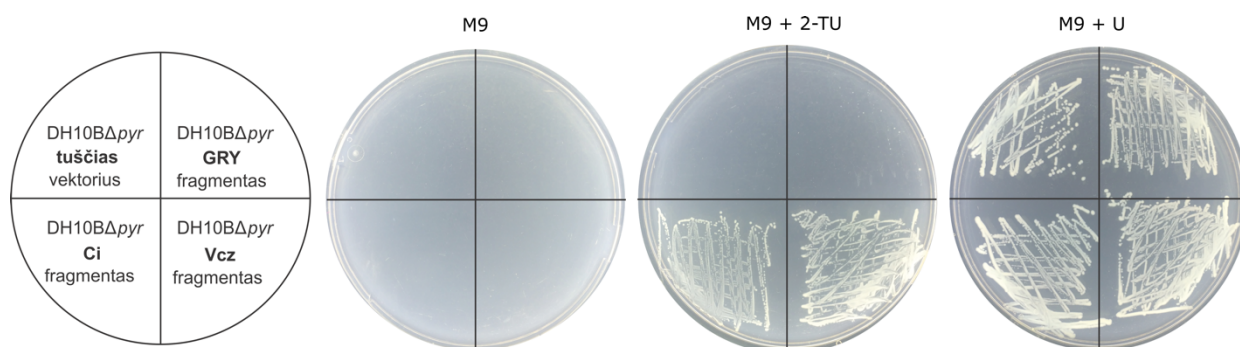
### 2-tiouracilo skaidymas: DUF523

Naudojantis aukščiau aprašyta strategija, kaip uracilo šaltinis buvo naudojama modifikuotoji heterociklinė bazė 2-tiouracilas. Pastarojo nukleozidas 2-tiouridinas ir jo dariniai yra aptinkami daugelyje tRNR molekulių, dažniausiai antikodono kilpoje, kur dalyvauja kodono-antikodono sąveikoje ar stabilizuoja tRNR struktūrą. Šių darinių biozintezė yra gana gerai ištirta (Shigi, 2014), tačiau nedaug žinoma apie tai, kas vyksta po to, kai tRNR yra suskaidoma iki pavienių nukleotidų.



**3 pav.** Nežinomo fermento vykdoma 2-tiouracilo vertimo uracilu reakcija.

Dar mažiau žinoma apie 2-tiouracilo bazės tolesnį likimą ląstelėse – ar ji pašalinama, kaip nereikalingas pašalinis produktas, ar yra panaudojama d kart, ar suskaidoma atveriant žiedą. Mes tyrėme vieną iš galimų skaidymo variantų ir ieškojome fermento (desulfurilazės), gebančio versti 2-tiouracilą į uracilą (3 pav.).



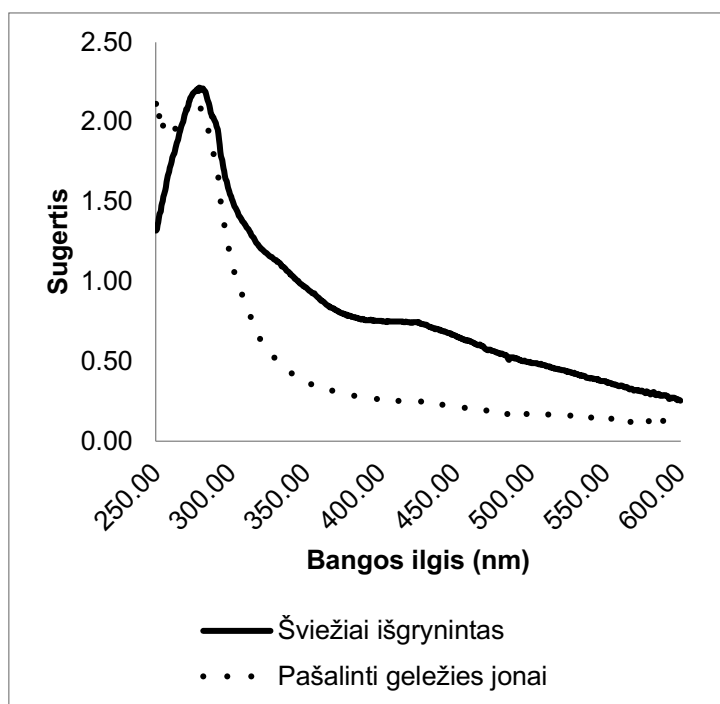
**4 pav.** Baltymų, koduojamų GRY, Vcz ir Ci DNR fragmentuose, *in vivo* veikimas. Tuščias vektorius naudotas kaip neigiama kontrolė. Naudota M9 terpė su 100 mg/L ampicilino, 15 mg/L kanamicino ir 20 mg/L 2-tiouracilo (M9 + 2-TU), uracilo (M9 + U, teigiama kontrolė) arba be jokio uracilo šaltinio (M9, neigiama kontrolė). DH10BΔpyr ląstelių augimas su vektoriumi, koduojančiu GRY DNR fragmentą yra lėtesnis, lyginant su Vcz ir Ci.

Metagenominėse bibliotekose buvo aptikti trys plazmidiniai vektoriai, kuriuose koduojami DNR fragmentai (GRY (genų banko prieigos Nr. MG027704), Vcz (genų banko prieigos Nr. MG027705), Ci (genų banko prieigos Nr. MG027703)) atstato DH10B $\Delta$ pyr ląstelių augimą ant minimalios terpės su 2-tiouracilu (4 pav.). Visuose trijuose DNR fragmentuose aptikti trumpi (~500 bp) atviro skaitymo rėmeliai (ASR), kuriuose koduojami baltymai priklauso DUF523 (*angl.* Domain of Unknown Function 523) šeimai. Įvedant delecijas GRY, Vcz ir Ci DNR fragmentuose, buvo įsitikinta, jog būtent DUF523 ASR yra reikalingi DH10B $\Delta$ pyr ląstelių augimui, naudojant 2-tiouracilą kaip uracilo šaltinį.

Maždaug 20% iš žinomų baltymų domenų yra anotuojami kaip nežinomos funkcijos (*angl.* Domain of Unknown Function) (Bateman et al., 2010). Tarp jų nemaža dalis yra būtini bakterijoms išgyventi (Goodacre et al., 2013). Tiek kompiuteriniais, tiek eksperimentiniais metodais yra intensyviai bandoma priskirti šiems domenams biologines funkcijas (Mudgal et al., 2015; Jankevicius et al., 2016; Luo et al., 2016). Nepaisant mokslininkų pastangų, kol kas nei vienam iš maždaug 1350 žinomų DUF523 šeimos narių dar nebuvo priskirta jokia funkcija. Baltymai, sudaryti iš vieno DUF523 domeno, yra labiausiai paplitę bakterijose: 2018 m. liepos mėn. buvo žinomi 1292 baltymai iš 849 bakterijų rūšių; archėjose aptiktas 41 baltymas 28 skirtingose rūšyse; eukariotuose – vos 12 baltymų iš 9 rūšių organizmų. DUF523 taip pat aptinkamas sulietas su nemažai kitokių domenų, dalis tokių baltymų yra fermentai, susiję su nukleorūgščių metabolizmu, pvz., nukleozidų 2-deoksiriboziltransferazė, aminoacil-tRNR hidrolazė ar purino nukleozidų fosforilazė. Šiuo metu žinoma 14 skirtingų rūšių baltymų sekų, turinčių DUF523 domeną savo sudėtyje (Finn et al., 2016).

Norint patikrinti DUF523 aktyvumą *in vitro*, buvo bandoma išgryninti rekombinantinius baltymus. Du iš jų (DUF523GRY ir DUF523Ci) jokiais bandytomis sąlygomis nebuvo pakankamai tirpūs, todėl gautas tik rekombinantinis DUF523Vcz baltymas. Eksperimentų metu buvo pastebėta, jog išgryninto DUF523Vcz baltymo tirpalo spalva yra ruda, todėl buvo manoma, jog baltymo sudėtyje galėtų būti Fe-S centras(ai). Be to, minėta ruda spalva greitai nyksta aerobinėmis sąlygomis (pvz., ilgesnį laiką (2-3 sav.) laikant 4 °C arba keletą kartų pakartotinai atšildžius ir vėl užšaldžius baltymo tirpalą). Dėl to iš išgryninto DUF523Vcz baltymo buvo pašalinti geležies jonai, kaip apibūdinta

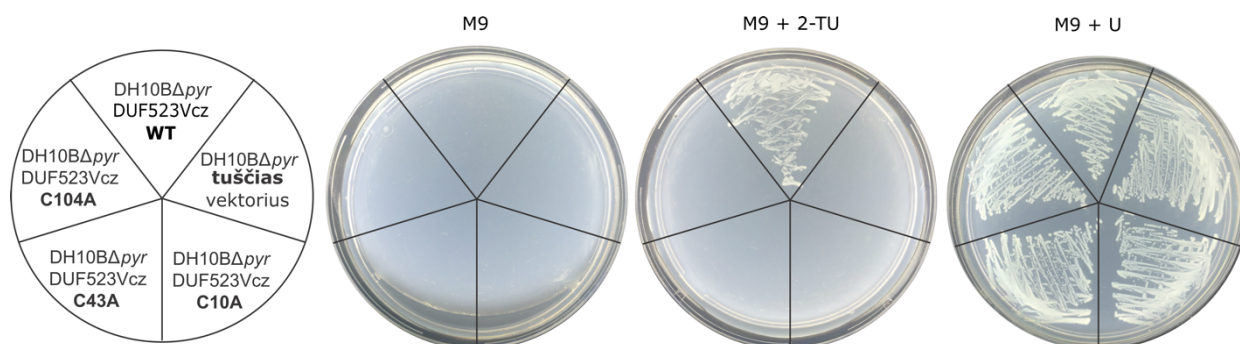
anksčiau Bouvier et al., 2014. Gauto bespalvio baltymo tirpalo UV-matomos šviesos sugerties spektras palygintas su šviežiai išgryninto baltymo, kuris parodė Fe-S centrus turintiems baltymams būdingą spektrą (5 pav.). Gauti rezultatai patvirtina prielaidą, jog Fe-S centras(ai), esantis DUF523Vcz baltyme (žr. 5 pav. “šviežiai išgrynintas” spektrą ties 400-450 nm), sparčiai suyra aerobinėse sąlygose (žr. 5 pav. “pašalinti geležies jonai” spektrą ties 400-450 nm) ir tikriausiai tai turi įtakos jo funkcijai, kurios *in vitro* aptikti nepavyko.



**5 pav.** UV-matomos šviesos sugerties spektrai. Vientisa linija: šviežiai išgrynintas rekombinantinis 6-His žymėtas DUF523Vcz baltymas; taškuota linija: DUF523Vcz po geležies jonų pašalinimo.

Tyrimo metu atrastų DUF523 ir jų artimiausių homologų baltymų sekų analizė atskleidė, jog visų jų sekose randamos trys konservatyvios cisteino aminorūgšties (toliau – a. r.) liekanos, kurios galėtų formuoti Fe-S centrą. DUF523Vcz baltymo sekoje kiekviena iš šių cisteino a. r. liekanų buvo pakeista alanino a. r. liekana, gauti trys DUF523Vcz genai, atitinkamai su C10A, C43A arba C104A pakaitais. Visi trys mutuoti DUF523Vcz genai koduoja bespalvius ir netirpius rekombinantinius baltymus, kas tik dar kartą patvirtina konservatyvių cisteino a. r. liekanų įtaką teisingam baltymo struktūros formavimuisi, geležies jonų jungimuisi ir, tikėtina, pačiai DUF523Vcz funkcijai. Norint patikrinti, ar mutuoti DUF523Vcz genai koduoja *in vivo* veiklius baltymus, šie buvo

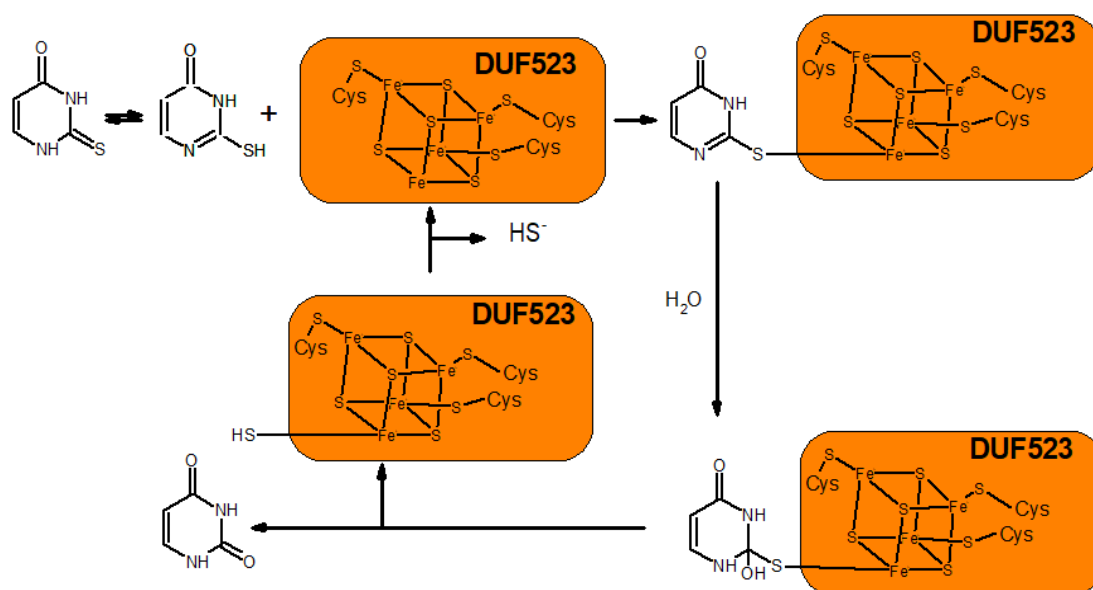
perkelti į vektorius, skirtus raiškai DH10BΔ*pyr* ląstelėse. Kaip matyti 6 pav., nei vienas iš mutuočių genų nekoduoja veiklaus DUF523Vcz baltymo. Šie duomenys patvirtina prielaidą, jog DUF523Vcz baltymas savo sudėtyje turi Fe-S centrą, kurį formuoja Cys10, Cys43 ir Cys104 aminorūgščių liekanos. Fe-S centro integralumas yra reikalingas DUF523Vcz baltymo funkcijai *in vivo*.



**6 pav.** Laukinio tipo ir mutuočių DUF523Vcz baltymų aktyvumas *in vivo*. Laukinio tipo (WT) DUF523Vcz ir jo C10A, C43A bei C104A mutantai (cisteino a.r. liekana pakeista į alanino) yra koduojami pQE70 plazmidiniame vektoriuje. Tuščias vektorius naudotas kaip neigiama kontrolė. Naudota M9 terpė su 100 mg/L ampicilino, 15 mg/L kanamicino ir 20 mg/L 2-tiouracilo (M9 + 2-TU), uracilo (M9 + U, teigiama kontrolė) arba be jokio uracilo šaltinio (M9, neigiama kontrolė).

Fermentai, katalizuojantys panašias reakcijas, tačiau vykstančias į priešingą pusę yra sutinkami tiriant tRNR modifikacijų biosintezę. Pvz., TtcA yra tRNR-tioltransferazė, kuri katalizuoja 2-tiocitidino formavimąsi (Jager et al., 2004) ir turi savo sudėtyje [4Fe-4S] centrą, reikalingą deguonies atomų pakeitimui į sieros atomus (Bouvier et al., 2014). Panašiai, [3Fe-4S] centras yra reikalingas 2-tiouridino modifikacijos formavimuisi archėjose ir eukariotuose (Liu et al., 2016). Yra du būdai, kaip Fe-S centrai gali būti panaudojami tokiose reakcijose. Pirmas būdas – Fe-S centras atlieka struktūrinę funkciją, kuri veikia fermento tretinės struktūros formavimąsi ir substrato atpažinimą (Lee et al., 2005; Stiebritz, 2014), tačiau ne pačią katalizę tiesiogiai. Antras variantas – Fe-S centras tiesiogiai dalyvauja katalizėje, kaip TtcA fermento atveju: teigiama, jog sieros atomas, prisijungęs prie Fe-S centro, yra nukleofiliškai atakuojamas ATP-aktyvuoto citidino nukleotido, dėl ko susidaro AMP ir yra gaunama s<sup>2</sup>C<sub>32</sub> modifikacija tRNR molekulėje (Bouvier et al., 2014). Vis dėlto, DUF523 atrasti šio darbo metu, yra gerokai mažesni negu dauguma RNR modifikacijos fermentų ir neturi nei PP kilpos, reikalingos prisijungti ATP, nei CXXC motyvų, kurie būdingi daugumai tRNR modifikuojančių fermentų, susijusių su s<sup>2</sup>U ar s<sup>2</sup>C biosinteze (Cavuzic and Liu, 2017). Koks yra DUF523 baltymų veikimo

mechanizmas, kolkas nėra aišku. Nepaisant išbandytos didžiulės įvairovės buferių, pH, priedų, temperatūrų ir inkubacijos laiko, *in vitro* nebuvo nustatyta 2-tiouracilo konversija į uracilą mūsų taikytais plonasluoksnės ir aukšto slėgio skysčių chromatografijos metodais. Vienas iš paaiškinimų, kodėl buvo gauti tokie rezultatai, yra tai, kad DUF523Vcz sudėtyje esantis Fe-S centras lengvai suyra aerobinėmis sąlygomis, o be jo baltymas funkcionuoti negali. 7 pav. pateikiamas galimas DUF523Vcz baltymo veikimo mechanizmas.



7 pav. Galimas DUF523 baltymų veikimo mechanizmas.

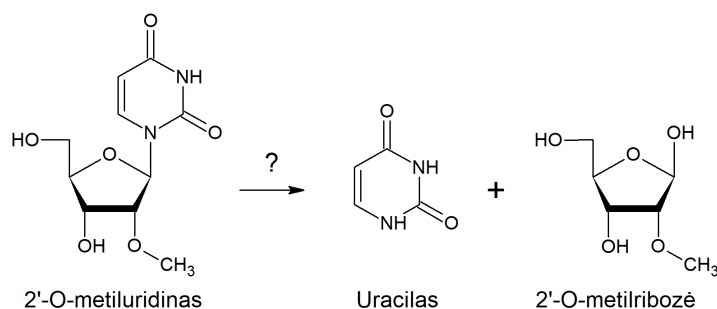
Remiantis šiuo modeliu, Fe-S centrą DUF523 baltymuose sudaro trys konservatyvios cisteino aminorūgšties liekanos, todėl jis turi laisvą sieros atomo koordinacijos vietą ties ketvirtuoju geležies jonu, kurią gali užimti hidrosulfidinis substratas, kaip siūloma straipsnyje apie tRNR tiouridino sintetazę TtuA ir kitus [4Fe-4S] centrus turinčius fermentus, aptartus tame pačiame straipsnyje (Arragain et al., 2017). Siūlomame DUF523 veikimo modelyje tiolinė 2-tiouracilo forma jungiasi prie DUF523 suformuodama Fe-S ryšį. Po to sekanti nukleofilinė ataka vandens molekulės hidroksilo grupe suformuoja aduktą, kuris virsta uracilu ir DUF523 tarpininku, turinčiu hidrosulfido ligandą. DUF523 aktyvi forma atstatoma praradus hidrosulfidinę grupę. Vis dėlto, reikalingi papildomai tyrimai norint patvirtinti arba paneigti šį ir sužinoti tikrąjį DUF523 baltymų veikimo mechanizmą. Nors *in vivo* DUF523 baltymų funkcija atrodo akivaizdi, *in vitro* ji yra tik spėjama ir galbūt reikalauja papildomų baltyminių partnerių. Be to,

DUF523 šeimos baltymai gali turėti ne vieną funkciją ir būti skirtingi, be to dar ir priklausyti nuo kitų domenų, su kuriais, kaip jau minėta, kartais yra aptinkami.

Apibendrinant, buvo atrasti trys nauji DUF523 bakterinių nežinomos funkcijos baltymų šeimos atstovai. Buvo parodyta, jog *in vivo* jie yra reikalingi 2-tiouracilo konversijai į uracilą. Tai yra pirmieji duomenys apie DUF523 baltymų šeimos funkcijas. Šiuose baltymuose yra Fe-S centras, reikalingas jų funkcionalumui *in vivo*. Tolesni tyrimai bus skirti išsiaiškinti, koks yra DUF523 baltymų vykdomos reakcijos mechanizmas.

### 2'-*O*-metiluridino metabolizmo fermentai

Ribozės metilinimas – viena iš labai paplitusių nukleotidų modifikacijų, aptinkama daugelyje RNR rūšių. 2'-*O*-metiluridinas (toliau – meUrd) aptinkamas archėjų, bakterijų ir eukariotų rRNR, snRNR, snoRNR bei tRNR. Be to, 2'-*O*-metilribonukleozidai yra medžiagos, iš kurių galima susintetinti panašius į nukleorūgštis vaistus.



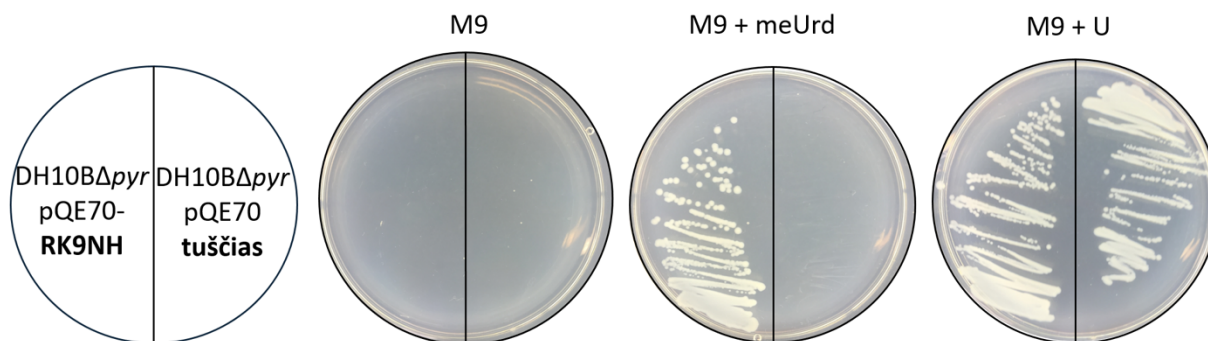
**8 pav.** Nežinomo fermento substratas 2'-*O*-metiluridinas bei galimi produktai – uracilas ir 2'-*O*-metilribozė.

Ši darbo dalis tiria galimą 2'-*O*-metiluridino metabolizmą ląstelėje (8 pav.). Nepaisant plačių praktinio pritaikymo galimybių, metilintus nukleozidus kaip substratus naudojantys fermentai ar šių molekulių skaidymo keliai nėra plačiai ištyrinėti. Naudojant DH10BΔ*pyr* kamieną ir metagenomines bibliotekas, buvo atrinktas vienas transformantas; iš jo išskirtame plazmidiniame vektoriuje buvo 2 kb dydžio DNR fragmentas. Atlikus sekoskaitą, paaiškėjo, jog šiame DNR fragmente yra du atviro skaitymo rėmeliai, kuriuos skiria vos 15 bp (9 pav.). Pirmasis ASR koduoja baltymą, homologišką deoksiribozės fosfatų aldolazei (RK9DPA), o antrasis – baltymą, homologišką nukleozidų hidrolazėms



(RK9NH). Genų grupavimas (*angl.* clustering) yra gerai ištirtas prokariotinėse ląstelėse – jis padeda gaminti metabolizmo fermentus teisinga tvarka. Dėl to, yra tikėtina, jog metagenominėse bibliotekose aptikome dalį nežinomos dirvožemio bakterijos genų sandraupos, susijusios su 2'-*O*-metiluridino metaboliniais keliais ląstelėje. Šis RK9 DNR fragmentas yra labiausiai homologiškas Gram-teigiamų *Intrasporangium* sp. bakterijų genomo (genų banko prieigos Nr. NZ\_AWQS01000091.1) sekai, tačiau jame tarp deoksiribozės aldolazės ir nukleozidų hidrolazės yra įsiterpęs GntR transkripcijos regulatoriaus genas, o prieš aldolazę koduojantį geną yra ribokinazę koduojantis genas.

Kaip ir tikėtasi, už DH10BΔ*pyr* ląstelių augimą atsakingas RK9NH – nukleozidų hidrolazę koduojantis genas (9 pav). Nukleozidų hidrolazė skelia N-glikozidinį ryšį, atpalaiduodama uracilą ir, tikėtina, 2'-*O*-metilribozę.

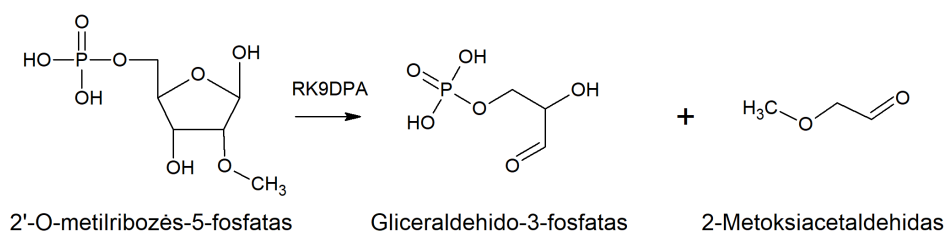


**9 pav.** RK9NH nukleozidų hidrolazės aktyvumas *in vivo*. Tuščias pQE70 vektorius naudotas kaip neigiama kontrolė. Į M9 terpę pridėta 100 mg/L ampicilino, 15 mg/L kanamicino, 20 mg/L 2'-*O*-metiluridino (M9 + meUrd) arba uracilo (M9 + U, teigiama kontrolė).

Filogenetinė RK9NH analizė nepriskiria šio fermento prie jokių konkrečių žinomų hidrolazių. Ypač netikėta yra tai, jog RK9NH nėra labai panašus į neseniai atrastą tokią pačią funkciją atliekantį fermentą iš *Lactobacillus buchneri* (Mitsukawa et al., 2016), kuris jau yra naudojamas fermentinei 2'-*O*-metilribonukleozidų sintezei (Mitsukawa et al., 2017). Taip pat aišku, jog RK9NH nėra purinams ar pirimidinams specifiška hidrolazė, tačiau ji nepriskiriama net ir prie žinomų nespecifinių hidrolazių. Remiantis filogenetine analize, galima teigti, jog RK9NH yra unikalus fermentas ir kad egzistuoja plati įvairovė fermentų, kurių substratais gali būti 2'-*O*-metilribonukleozidai.

RK9DPA aldolazės filogenetinė analizė taip pat nepriskyrė šio fermento prie jokių gerai žinomų aldolazių. RK9DPA yra iš dalies homologiška deoksiribozės-fosfato

aldolazėms (*E. coli* DERA), kurios katalizuoja grįžtamą aldolinę reakciją tarp acetaldehido ir D-gliceraldehido 3-fosfato, iš kurių gaunamas 2-deoksi-D-ribozės 5-fosfatas. Genetinės komplementacijos būdu, naudojant atitinkamus *E. coli* mutantus (Baba et al., 2006) ir RK9DPA pQE70 plazmidiniame vektoriuje, buvo įsitikinta, jog RK9DPA aldolazė neatlieka *E. coli* DERA fermento funkcijos *in vivo*. Taip yra tikriausiai todėl, kad deoksiribozės fosfatas nėra RK9DPA substratas.

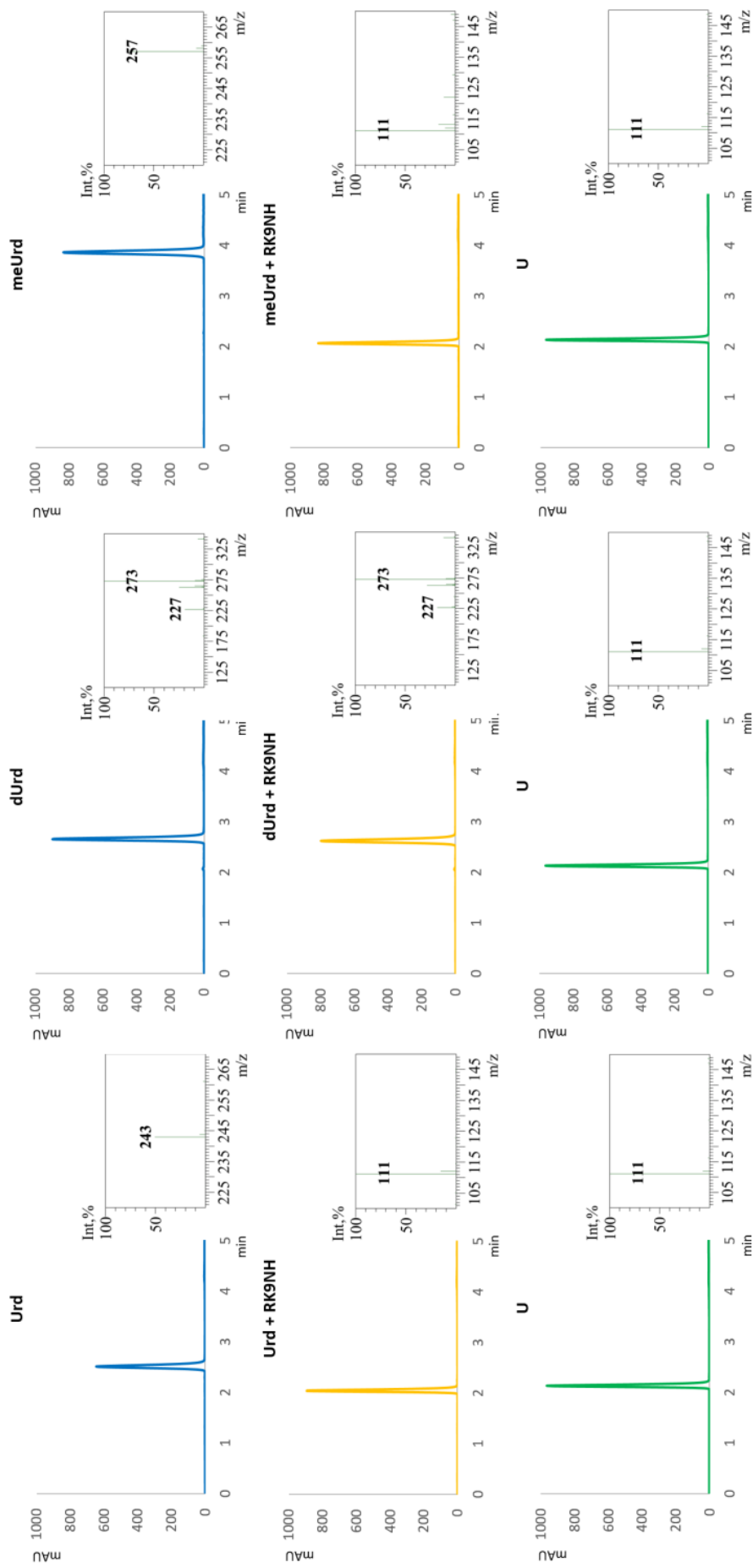


**10 pav.** Tikėtina RK9DPA aldolazės katalizuojama reakcija.

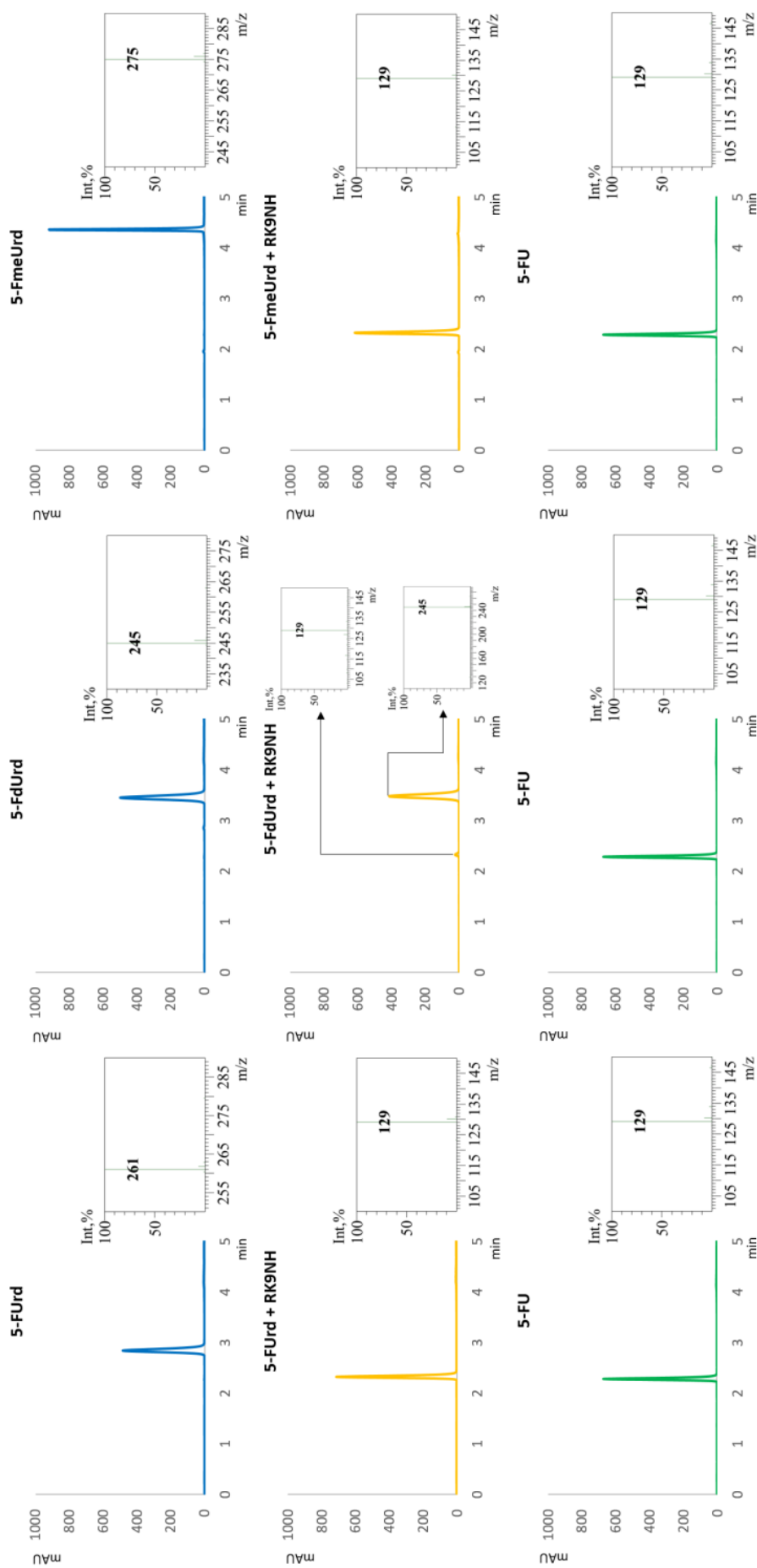
Jeigu išties RK9 operone koduojami 2'-*O*-metiluridino metabolizmo fermentai, tuomet RK9DPA substratas (arba produktas) yra 2'-*O*-metilribozės 5-fosfatas, kurio skaidymo metu turėtų susidaryti 2-metoksiacetaldehidas ir gliceraldehido-3-fosfatas (10 pav.).

**1 lentelė.** RK9NH substratinis specifiškumas. Santykinis aktyvumas apskaičiuotas iš aukšto slėgio skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos duomenų: gauto produkto (heterociklinės bazės) molekulinės masės kiekis, padalintas iš substrato ir produkto molekulių masių sumos.

Substratas	Santykinis RK9NH aktyvumas (%)
Uridinas (Urd)	100
Deoksiuridinas (dUrd)	0
2'- <i>O</i> -metiluridinas (meUrd)	100
5-fluorouridinas (5-FUrd)	100
5-fluorodeoksiuridinas (5-FdUrd)	4
5-fluoro-2'- <i>O</i> -metiluridinas (5-FmeUrd)	100
Citidinas	65
Deoksicitidinas	0
5-metiluridinas (ribotimidinas)	100
Timidinas	0
Adenozinas	10
Deoksiadenozinas	0
Guanozinas	100
Deoksiguanozinas	3
Inozinas	22



**11 pav.** RK9 substratinis specifiskumas (1 dalis). UV chromatogramos (kaireje) ir masių spektrometrijos duomenys, atitinkantys smailes (dešinėje). Mėlyna spalva: substratų standartai; geltona spalva: RK9NH fermentinės reakcijos mišiniai; žalia spalva: produktų standartai. Urd: uridinas; U: uracilas; dUrd: deoksiuridinas; meUrd: 2'-*O*-metiluridinas. M/z atitinka [M-H]<sup>-</sup> molekulinį jonų detekciją, m/z 273 atitinka deoksiuridino [M+HCOOH-H]<sup>-</sup>.



**12 pav.** RK9 substratinis specifškumas (2 dalis). UV chromatogramos (kairėje) ir masių spektrometrijos duomenys, atitinkantys smailės (dešinėje). Mėlyna spalva: substratų standartai; geltona spalva: RK9NH fermentinės reakcijos mišiniai; žalia spalva: produktų standartai. 5-FUrd: 5-fluorouridinas; 5-FU: 5-fluorouracilas; 5-FdUrd: 5-fluorodeoksiuridinas; 5-FmeUrd: 5-fluoro-2'-*O*-metiluridinas. M/z atitinka [M-H]<sup>-</sup> molekuliųjų jonų detekciją.

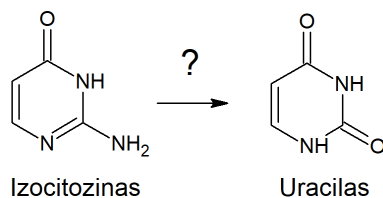
Rekombinantinė RK9NH hidrolazė buvo išgryninta bei ištirtas jos fermentinis aktyvumas ir substratinis specifiskumas *in vitro* (1 lentelė, 11 pav., 12 pav.). Paaikėjo, jog RK9NH yra ribonukleozidų hidrolazė, taip pat šiek tiek veikianti 5-fluorodeoksiuridiną ir deoksiguanoziną. 2'-*O*-metiluridinas (11 pav.) ir 5-fluoro-2'-*O*-metiluridinas (12 pav.) taip pat yra RK9NH substratai. Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, jog RK9NH atpažįsta 2'-hidroksi arba 2'-metoksi grupę substrato ribozėje. Pirmenybė teikiama uracilo (11 pav.), 5-fluorouracilo (12 pav.) ir guanino heterociklinėms bazėms, tačiau inozinas ir adeninas (1 lentelė) taip pat yra tinkami RK9NH hidrolazės substratai.

Remiantis šiais duomenimis, galima teigti, jog RK9NH substratinis specifiskumas yra platus bei tarpinis tarp nespecifinių ir pirimidinams specifinių nukleozidų hidrolazių. RK9NH geriau hidrolizuoja substratus, kurių sudėtyje yra pirimidinų heterociklinės bazės. Metilinti ribonukleozidai šiuo metu yra paklausūs dėl to, kad juos galima panaudoti sintetinant nukleorūgštims paremtus vaistus. DNR ar RNR oligomerai, savo sudėtyje turintys metilintų nukleotidų yra termostabilesni ir atsparesni nukleazėms negu nemodifikuoti. Todėl modifikuotieji nukleotidai yra reikalingi gaminant DNR ar RNR oligomerus, skirtus naudoti kaip priešprasminius (*angl.* antisense) vaistus, ribozimus, siRNR paremtus vaistus ir aptamerus (Mikhailopulo ir Miroshnikov, 2011). Neseniai buvo parodyta, jog nukleozidų hidrolazes galima panaudoti fermentinei metilintų nukleozidų sintezei (Mitsukawa et al., 2017 ir 2018), todėl galima teigti, jog RK9NH turi plačias praktinio panaudojimo galimybes. Be to, RK9NH substratai taip pat yra 5-fluorouridinas, 5-fluorodeoksiuridinas ir 5-fluoro-2'-*O*-metiluridinas (12 pav.), iš kurių gaunamas produktas 5-fluorouracilas yra seniai žinomas ir klinikoje naudojamas priešvėžinis vaistas. Tai reiškia, jog RK9NH taip pat gali būti pritaikyta naudojimui vėžio terapijoje.

### **Izocitozino deaminazės**

Citozinas – viena iš standartinių genetinio kodo heterociklinių bazių, randama tiek DNR, tiek RNR. Jį uracilu verčia gerai ištirtas klasikinis fermentas – citozino deaminazė. Izocitozinas (2-aminouracilas) yra citozino izomeras. Kartu su izoguaninu jie buvo vieni iš pirmųjų nenatūralių bazių porų tyrimuose naudotų heterociklinių bazių. Izocitozinas

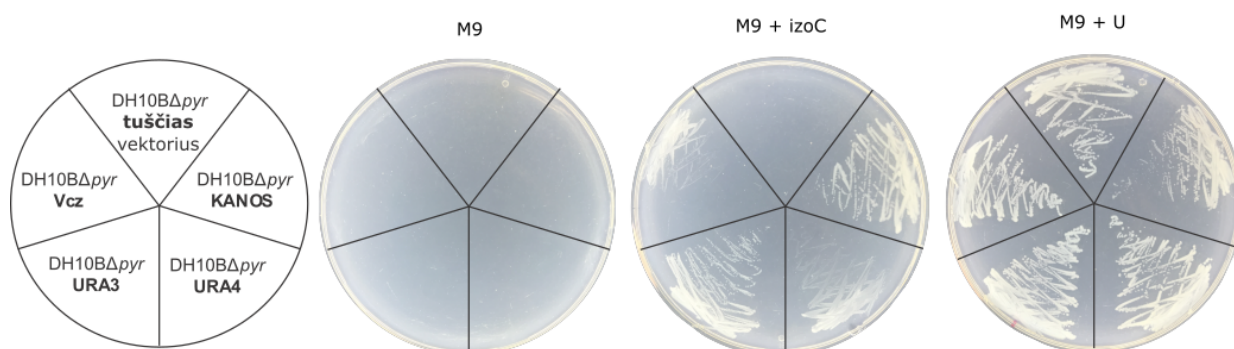
naudojamas struktūriniais nukleorūgščių tyrimams (Yang et al., 1998), taip pat fizikocheminiams metalo kompleksų tyrimams (Gupta et al., 2004), vandenilio ryšių tyrimams (Camacho-García et al., 2015), tautomerizmo ir protonų perdavimo tyrimams (Delchev and Mikosch, 2007). Iki šiol nebuvo atkreiptas dėmesys į fermentus, gebančius izocitoziną versti uracilu (13 pav.).



**13 pav.** Izocitozino deaminazės veikimo schema.

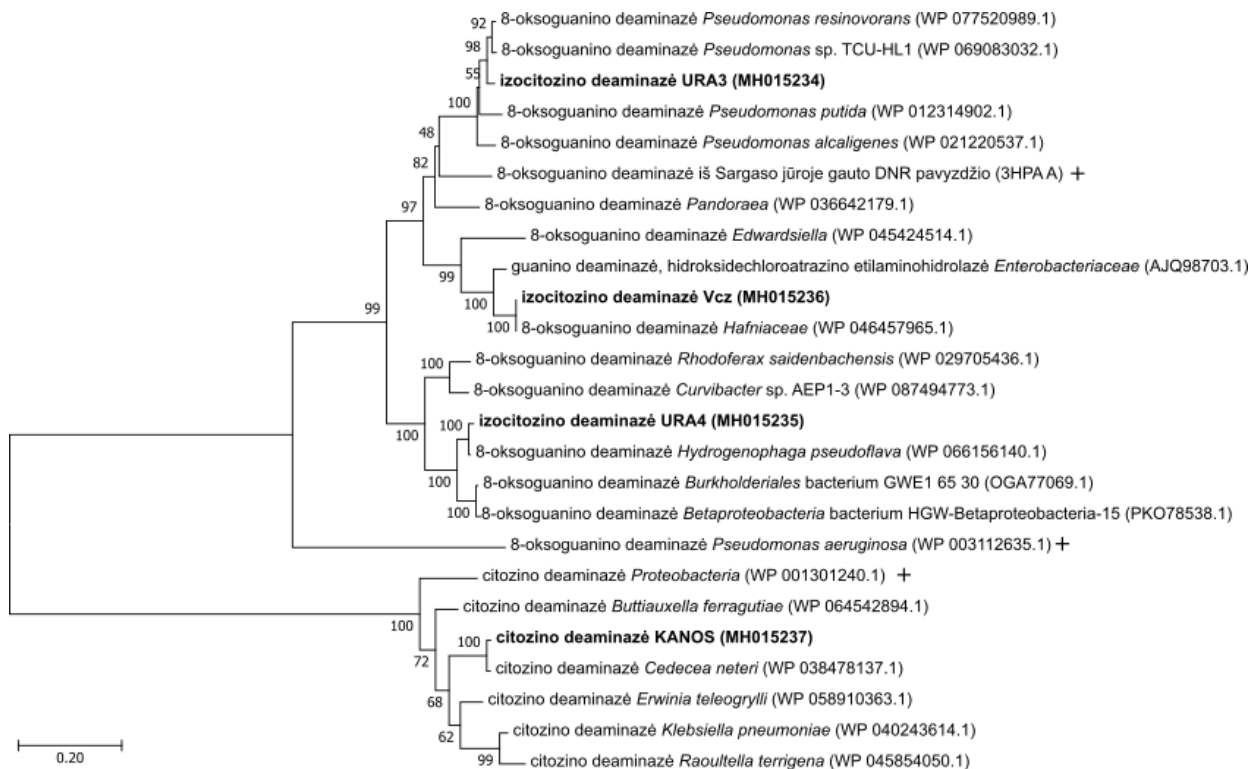
Remiantis citozino deaminazės ir 5-fluorocitozino kaip vėžio genų terapijoje naudojamos fermento-provaisto poros pavyzdžiu, izocitozinas galėtų būti pagrindu naujam provaistui 5-fluoroizocitozinui, jei būtų atrastas fermentas, gebantis efektyviai versti izocitoziną uracilu ir 5-fluoroizocitoziną 5-fluorouracilu.

Izocitozinas buvo panaudotas kaip uracilo šaltinis ieškant naujų fermentų anksčiau apibūdintu būdu. Iš metagenominių bibliotekų buvo atrinkti keturi DNR fragmentai (14 pav.): KANOS (genų banko prieigos Nr. MH015237), URA4 (genų banko prieigos Nr. MH015235), URA3 (genų banko prieigos Nr. MH015234) ir Vcz (genų banko prieigos Nr. MH015236).



**14 pav.** Baltymų, koduojamų KANOS, URA4, URA3 ir Vcz DNR fragmentuose, *in vivo* veikimas. Tuščias vektorius naudotas kaip neigiama kontrolė. Naudota M9 terpė su 100 mg/L ampicilino, 15 mg/L kanamicino ir 20 mg/L izocitozino (M9 + izoC), uracilo (M9 + U, teigiama kontrolė) arba be jokio uracilo šaltinio (M9, neigiama kontrolė).

Kiekviename iš aptiktų DNR fragmentų yra ASR, koduojantis deaminazę. Filogenetinė analizė (15 pav.) atskleidė, jog šie fermentai priklauso dviems grupėms: KANOS fragmente koduojama deaminazė yra klasikinė citozino deaminazė, o URA4, URA3 ir Vcz izocitozino deaminazės yra homologiškos 8-oksoguanino deaminazėms. Naujai atrastos izocitozino deaminazės skiriasi nuo žinomų adenino ir citozino deaminazių, kas leidžia daryti prielaidą, jog 2-amino padėtis yra reikalinga šių fermentų veikimui.



**15 pav.** KANOS, URA3, URA4 ir Vcz deaminazių filogenetinis medis. Medis sudarytas artimiausių grupių sujungimo metodu, naudojant artimiausių BLAST analizės pateikiamų homologų sekas ir patvirtintas funkcijos deaminazių sekas (pažymėta +). 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.

Dvi rekombinantinės deaminazės (URA3 ir Vcz) buvo išgrynintos, tirtas jų fermentinis aktyvumas *in vitro* ir substratinis specifiskumas inkubuojant su citoziniu, izocitoziniu, 5-fluoroizocitoziniu, guaninu ir 8-oksoguaninu. Kaip matyti 16 pav., nė viena iš šių deaminazių nenaudoja citozino kaip substrato, tačiau verčia izocitoziną uracilu, o 5-fluoroizocitoziną 5-fluorouracilu.

### 16 pav. Vcz ir URA3

izocitozino deaminazių substratinis specifškumas. UV chromatogramos (kairėje) ir masių spektrometrijos

duomenys, atitinkantys smailes (dešinėje).

Mėlyna spalva:

substratų standartai;

raudona spalva: Vcz

fermentinės reakcijos mišiniai; geltona

spalva: URA3

fermentinės reakcijos

mišiniai; žalia spalva:

produktų standartai. C:

citozinas; U: uracilas;

IsoC: izocitozinas; 5-

FisoC: 5-

fluorizocitozinas; 5-

FU: 5-fluorouracilas.

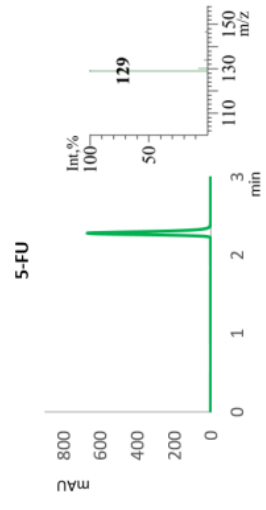
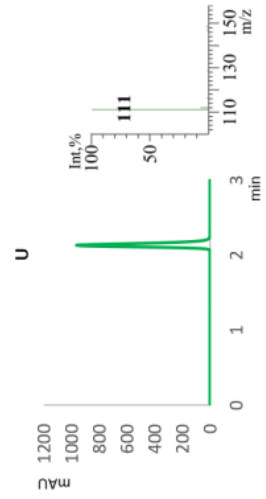
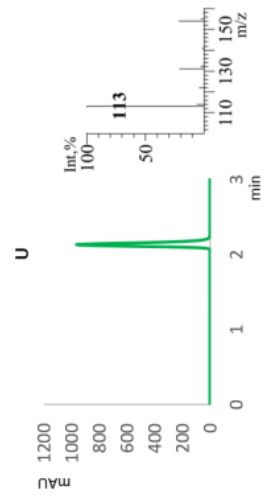
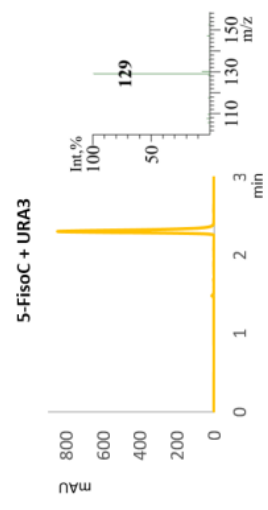
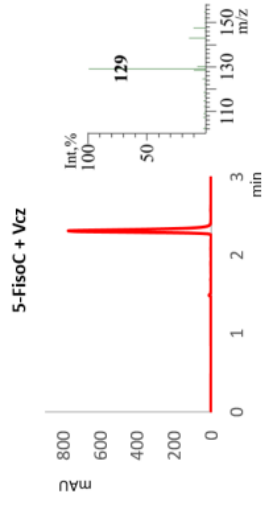
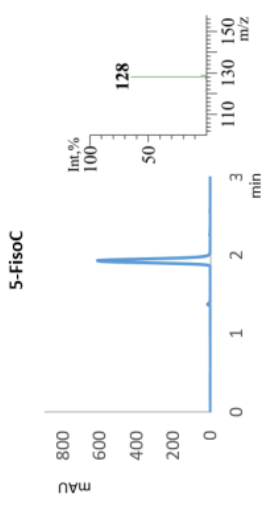
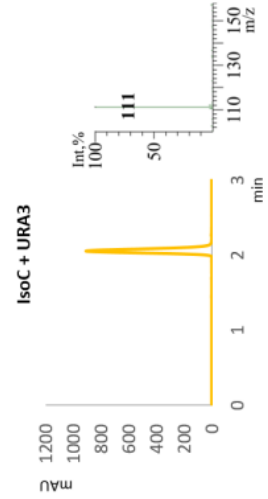
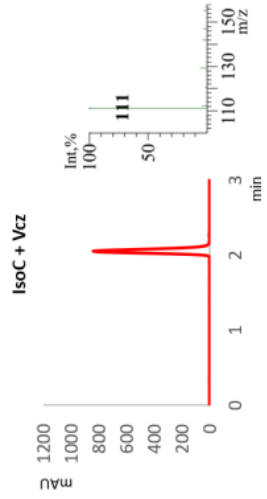
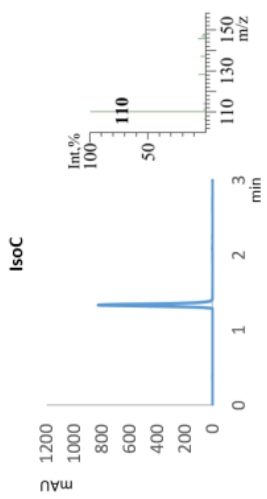
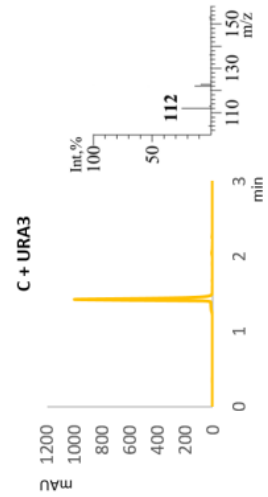
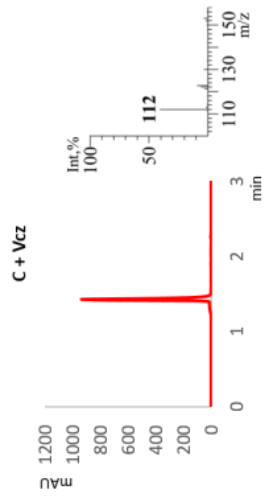
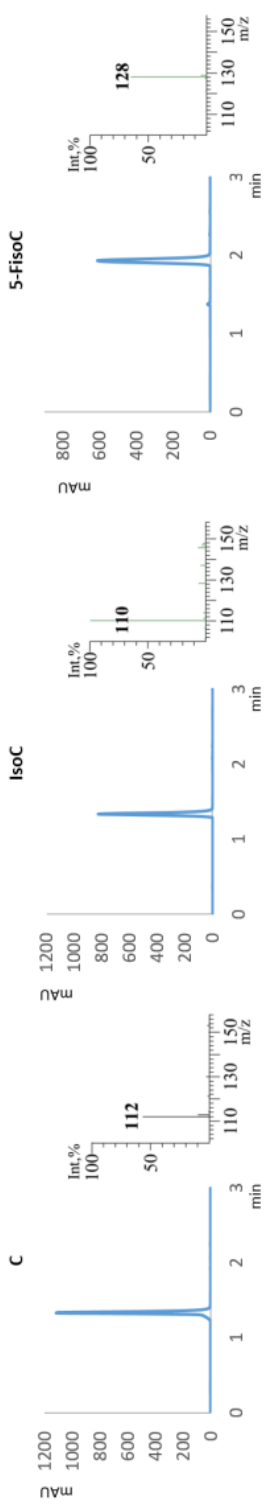
Pirmajame stulpelyje

m/z atitinka  $[M+H]^+$

molekulinių jonų

detecciją, antrajame ir

trečiajame –  $[M-H]^-$ .





Gauti rezultatai patvirtina prielaidą, jog Vcz ir URA3 deaminazės atpažįsta 2-amino grupę substratuose. Prastas guanino ir 8-oksoguanino tirpumas naudotame buferyje apsunkino jonizaciją ir molekulių masių nustatymą, tačiau gauti rezultatai patvirtino, jog 8-oksoguaninas URA3 ir Vcz deaminazių yra verčiamas šlapimo rūgštimi, o guaninas – ksantinu. Šie duomenys patvirtina filogenetinės analizės rezultatus, kad naujai atrastos izocitozino deaminazės priklauso 8-oksoguanino deaminazių šeimai, kuri kol kas neturi daug narių su patvirtintomis funkcijomis, nors jų genai yra plačiai paplitę, randama daug galimų 8-oksoguanino deaminazių vykdant bioinformatinę paiešką.

Nors svarbių izocitozino deaminazių substratų yra ne vienas, šio darbo tikslas buvo rasti fermentą, gebantį katalizuoti 5-fluoroizocitozino vertimą 5-fluorouracilu, kas gali būti panaudota vėžio genų terapijai. Klasikinė citozino deaminazės/5-fluorocitozino fermento/provaisto pora yra labai plačiai tiriama pastaraisiais metais, tačiau susiduria su problemomis dėl kylančio nemažo sisteminio toksiškumo organizmui. Žarnyno mikroflora geba versti 5-fluorocitoziną į 5-fluorouracilą todėl, kad citozino deaminazės yra paplitę bakteriniai fermentai (Harris et al., 1986; Malet-Martino et al., 1991; Longley et al., 2003; Malekshah et al., 2016). Vcz ar URA3 izocitozino deaminazės, kartu su 5-fluoroizocitoziniu, galėtų būti naudojamos kaip nauja provaisto/fermento pora vėžio genų terapijai. Žarnyno mikroflora neturėtų metabolizuoti 5-fluoroizocitozino taip gerai, kaip 5-fluorocitozino todėl, kad izocitozinas nėra gamtoje sutinkama medžiaga. Nors citozino deaminazės geba hidrolizuoti izocitoziną, kinetiniai šių reakcijų parametrai yra dešimt kartų didesni kai substratas yra citozinas, lyginant su izocitoziniu (Hall et al., 2011). Taigi, 5-fluoroizocitozino/izocitozino deaminazių provaisto/fermento pora galėtų palengvinti sisteminio vėžio genų terapijos toksiškumo problemas sprendimą.

## APIBENDRINIMAS

Šio darbo metu buvo įrodyta, jog archėjų PAB2272 ir NEQ228 fermentai yra bifunkcinės metiltransferazės, galinčios metilinti tiek guaniną, tiek 4-demetilvioziną. Tai yra fermentai, dalyvaujantys sudėtinguose archėjų viozino darinių biosintezės keliuose, kurie, gavus šiuos duomenis, tapo dar labiau ištirti. Be to, buvo sukurta sistema naujų fermentų paieškai metagenominėse bibliotekose. Naudojantis ja atrasti nauji baltymai, dalyvaujantys 2-tiouracilo, 2'-*O*-metiluridino ir izocitozino metabolizme bakterijose. Pirmą kartą pademonstruota trijų naujų DUF523 nežinomos funkcijos domenų funkcija *in vivo*: 2-tiouracilo vertimas uracilu. Šių baltymų veikimui ląstelėse yra reikalingas Fe-S centras. Taip pat atrasta dalis genetinio fragmento, dalyvaujančio 2'-*O*-metiluridino metabolizme ląstelėje. Jame koduojama nukleozidų hidrolazė RK9NH yra funkcionali *in vitro* ir gali būti pritaikyta tiek 2'-*O*-metilintų nukleozidų sintezei, tiek vėžio genų terapijoje. Atrastos trys naujos izocitozino deaminazės, kurios verčia 5-fluoroizocitoziną į 5-fluorouracilą. 5-fluoroizocitozinas ir izocitozino deaminazės gali būti panaudotos kaip nauja provaisto/fermento pora vėžio genų terapijoje.

## IŠVADOS

1. *Pyrococcus abyssi* PAB2272 ir *Nanoarchaeum equitans* NEQ228 baltymai turi dvigubą tRNA<sup>Phe</sup>:m<sup>1</sup>G/imG2 metiltransferazinį aktyvumą.
2. *E. coli* uracilo auksotrofinis kamienas DH10B $\Delta$ *pyr* yra patogus įrankis naujų fermentų paieškai metagenominėse bibliotekose.
3. Trys nauji DUF523 nežinomos funkcijos baltymų šeimos nariai yra susiję su 2-tiouracilo virsmu į uracilą *in vivo*. Šie baltymai turi Fe-S centrus.
4. 2'-O-metiluridinas ir jo dariniai yra naujos nukleozidų hidrolazės RK9NH substratai. Tai yra ribonukleozidų hidrolazė, kuri taip pat verčia fluorintus uridino darinius į 5-fluorouracilą.
5. Izocitozinas yra dviejų naujų (URA3 ir Vcz) deaminazių substratas. Šios deaminazės taip pat verčia 5-fluoroizocitoziną į 5-fluorouracilą ir 8-oksoguaniną į šlapimo rūgštį.

## PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

### Straipsniai

1. Urbonavičius, J., Rutkienė, R., Lopato, A., Tauraitė, D., Stankevičiūtė, J., **Aučynaitė, A.**, Kalinienė L., van Tilbeurgh H., Meškys R. (2016) Evolution of tRNA<sup>Phe</sup>:imG2 methyltransferases involved in the biosynthesis of wyosine derivatives in Archaea. *RNA* 22:1871-1883. doi: 10.1261/rna.057059.116
2. **Aučynaitė, A.**, Rutkienė, R., Gasparavičiūtė, R., Meškys, R., Urbonavičius, J. (2018) A gene encoding a DUF523 domain protein is involved in the conversion of 2-thiouracil into uracil. *Environ Microbiol Rep* 10:49-56. doi: 10.1111/1758-2229.12605.
3. **Aučynaitė, A.**, Rutkienė, R., Tauraitė, D., Meškys, R., Urbonavičius, J. (2018) Novel bacterial deaminases convert the prodrug 5-fluoroisocytosine into the active drug 5-fluorouracil. Pateikta *Frontiers in Microbiology*.

### Patentinė paraiška

Urbonavičius, J., Tauraitė, D., **Aučynaitė, A.**, Rutkienė, R., Meškys, R. Izocitozino deaminazės/5-fluorizocitozino fermento/provaisto pora vėžio genų terapijai. LT2017 533. Pateikta 2017 m. Lapkričio 8 d.

### Stendiniai konferencijų pranešimai

1. Urbonavičius J., Rutkienė R., **Aučynaitė A.**, Tauraitė D., Naprytė J., Stankevičiūtė J., Meškys R., Grosjean H. Biosynthesis of wyosine derivatives in tRNA<sup>Phe</sup> of *Archaea*: role of a remarkable bifunctional tRNA<sup>Phe</sup>:m<sup>1</sup>G/imG2 methyltransferase. 2014. The FEBS Journal 281 (Suppl. 1), p. 770.
2. Urbonavičius J., Rutkienė R., **Aučynaitė A.**, Tauraitė D., Naprytė J., Stankevičiūtė J., Meškys R., Grosjean H. Biosynthesis of wyosine derivatives in tRNA<sup>Phe</sup> of *Archaea*: role of a remarkable bifunctional tRNA<sup>Phe</sup>:m<sup>1</sup>G/imG2 methyltransferase. 2014. 25th tRNA Conference Abstract Book, p. 119.

3. **Aučynaitė A.**, Meškienė R., Janilionytė G., Urbonavičius J., Meškys R. Novel deaminases from metagenomic libraries. 2014. Abstracts book of The XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical Society, p. 62.
4. **Aučynaitė A.**, Rutkienė R., Tauraitė D., Petrauskaitė L., Meškys R., Urbonavičius J. Discovery and characterization of a novel uridine hydrolase. 2016. Abstracts book of The XIVth International Conference of Lithuanian Biochemical Society, p. 97.
5. **Aučynaitė A.**, Rutkienė R., Meškys R., Urbonavičius J. Discovery of a novel gene, involved in the conversion of 2-thiouracil into uracil. 2016. The FEBS Journal 283 (Suppl. 1), p. 206.
6. Tauraitė D., **Aučynaitė A.**, Rutkienė R., Meškys R., Urbonavičius J. Discovery of bacterial genes encoding isocytosine deaminases. 2016. The FEBS Journal 283 (Suppl. 1), p. 206.
7. **Aučynaitė A.**, Rutkienė R., Meškys R., Urbonavičius J. Domain of Unknown Function is involved in the conversion of 2-thiouracil into uracil. 2017. Abstract book of the 7th Congress of European Microbiologists FEMS 2017, FEMS7-1090.
8. Urbonavičius J., **Aučynaitė A.**, Rutkienė R., Tauraitė D., Meškys R. Discovery and characterization of the novel bacterial isocytosine deaminases. 2017. Abstract book of the 7th Congress of European Microbiologists FEMS 2017, FEMS7-1202.
9. **Aučynaitė A.**, Rutkienė R., Tauraitė D., Meškys R., Urbonavičius J. Discovery and substrate specificity of a novel nucleoside hydrolase. 2017. The FEBS Journal 284 (Suppl. 1), p. 343.
10. Tauraitė D., **Aučynaitė A.**, Meškys R., Urbonavičius J. Synthesis of modified uracil derivatives and their potential use as prodrugs. 2017. The FEBS Journal 284 (Suppl. 1), p. 341.

## **Žodiniai konferencijų pranešimai**

1. **Aučynaitė A.**, Rutkienė R., Meškys R., Urbonavičius J. Discovery of a novel gene, involved in the conversion of 2-thiouracil into uracil. 2016. Abstracts book of The XIVth International Conference of Lithuanian Biochemical Society, p. 11.
2. **Aučynaitė A.**, Rutkienė R., Meškys R., Urbonavičius J. Discovery of a novel gene, involved in the conversion of 2-thiouracil into uracil. 2016. Book of abstracts for 3rd Congress of Baltic Microbiologists 2016 (CMB2016), p. 19. (pristatė dr. J. Urbonavičius).

## **FINANSINĖ PARAMA**

Šis darbas iš dalies buvo finansuotas Lietuvos Mokslo Tarybos MIP-103/2015 ir SEN-07/2015 projektų ir Lietuvos-Prancūzijos programos „Žiliberas“ (TAP-LZ\_14-003) lėšomis.

## **PADĖKA**

Norėčiau padėkoti savo vadovui dr. Jauniui Urbonavičiui už galimybę atlikti šį darbą, vertingus patarimus ir pagalbą planuojant eksperimentus bei rengiant šią disertaciją. Taip pat noriu padėkoti dr. Rolandui Meškiui už patarimus ir nesibaigiančias idėjas.

Dėkoju dr. Daivai Tauraitei už substratus naujiesiems fermentams ir pagalbą atliekant aukšto slėgio chromatografiją-masių spektrometriją. Taip pat Ritai Meškienei už metagenomines bibliotekas ir dr. Rasai Rutkienei už rekombinantinių baltymų gryninimą.

Be to, dėkoju visam Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriui už visokeriopą pagalbą ir diskusijas.

## SUMMARY

During the span of the work presented in this thesis, it was established that the PAB2272 and NEQ228 proteins are bifunctional archaeal methyltransferases that produce both in the isowyosine (imG2) and methylguanosine (m<sup>1</sup>G) in the archaeal biosynthetic pathway for wyosine derivatives, further elucidating its constitutive parts. Also, a new strategy for the search of novel enzymatic activities was successfully employed in the case of enzymes that metabolize 2-thiouracil, 2'-*O*-methyluridine and isocytosine. For the first time, 2-thiouracil desulfuration function *in vivo* has been demonstrated for three novel members of the DUF523 family of domains of unknown function. Also, these proteins appear to have a Fe-S cluster that is required for their activity *in vivo*. A part of a genetic unit that is involved in the metabolism of 2'-*O*-methyluridine has been found. A nucleoside hydrolase, which is a part of aforementioned genetic unit and acts on 2'-*O*-methyluridine, has been tested for enzymatic activity and substrate specificity *in vitro*. This enzyme could be used not only for the enzymatic synthesis of methylated ribonucleosides, but also for the targeted cancer therapy as an enzyme producing 5-fluorouracil from 5-fluorouridine and 5-fluoro-2'-*O*-methyluridine. Three novel isocytosine/8-oxoguanine deaminases have been found, two of which have been tested for *in vitro* enzymatic activity and substrate specificity. Novel Vcz and URA3 deaminases convert 5-fluoroisocytosine into 5-fluorouracil; therefore this novel enzyme-prodrug pair is proposed for the targeted cancer gene therapy.



## ***CURRICULUM VITAE***

**Vardas, pavardė:** Agota Aučynaitė

**Gimimo data ir vieta:** 1988 10 04, Vilnius, Lietuva

**Darbo adresas:** Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyrius,  
Biochemijos institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas  
Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva

**Tel. Nr.:** +37062082954

**El. paštas:** [agota.aucynaite@bchi.vu.lt](mailto:agota.aucynaite@bchi.vu.lt)

**Išsilavinimas:**

2013–2017 Biochemijos doktorantūros studijos,  
Biochemijos institutas, Vilniaus universitetas, Lietuva.

2011–2013 Molekulinės biologijos magistro laipsnis,  
Biotechnologijos institutas, Vilniaus universitetas, Lietuva.

2007–2011 Molekulinės biologijos bakalauro laipsnis,  
Biotechnologijos institutas, Vilniaus universitetas, Lietuva.

**Darbo patirtis:**

Nuo 2017 Jaunesnioji mokslo darbuotoja, Biochemijos institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas, Lietuva.

2013–2017 Specialistė, Biochemijos institutas, Vilniaus universitetas, Lietuva.

2009–2013 Laborantė, Biotechnologijos institutas, Vilniaus universitetas, Lietuva.

### **Mokslinės publikacijos:**

**Aučynaitė, A.**, Rutkienė, R., Gasparavičiūtė, R., Meškys, R., Urbonavičius, J. (2018) A gene encoding a DUF523 domain protein is involved in the conversion of 2-thiouracil into uracil. *Environ Microbiol Rep* 10:49-56. doi: 10.1111/1758-2229.12605.

Šimkus, R., Meškienė, R., **Aučynaitė, A.**, Ledas, Ž., Baronas, R., Meškys, R.. (2018) Phoretic interactions and oscillations in active suspensions of growing *Escherichia coli*. *R Soc open sci* 5: 180008. doi: 10.1098/rsos.180008.

Urbonavičius, J., Rutkienė, R., Lopato, A., Tauraitė, D., Stankevičiūtė, J., **Aučynaitė, A.**, Kalinienė L., van Tilbeurgh H., Meškys R. (2016) Evolution of tRNA<sup>Phe</sup>:imG2 methyltransferases involved in the biosynthesis of wyosine derivatives in Archaea. *RNA* 22:1871-1883. doi: 10.1261/rna.057059.116

Čiplys, E., **Aučynaitė, A.**, Slibinskas, R. (2014) Generation of human ER chaperone BiP in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 13: 22. doi: 10.1186/1475-2859-13-22.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
2. Arragain, S., Bimai, O., Legrand, P., Caillat, S., Ravanat, J. L., Touati, N. et al. (2017) Nonredox thiolation in tRNA occurring via sulfur activation by a [4Fe-4S] cluster. *PNAS* 114: 7355–7360. doi: 10.1073/pnas.1700902114.
3. Aučynaitė, A., Rutkienė, R., Gasparavičiūtė, R., Meškys, R., Urbonavičius, J. (2018) A gene encoding a DUF523 domain protein is involved in the conversion of 2-thiouracil into uracil. *Environ Microbiol Rep* 10:49-56. doi: 10.1111/1758-2229.12605.
4. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M. et al. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2: 2006.0008. doi: 10.1038/msb4100050.
5. Bateman, A., Coggill, P., Finn, R. D. (2010) DUFs: families in search of function. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 66: 1148-1152. doi: 10.1107/S1744309110001685.
6. Bouvier, D., Labessan, N., Clemancey, M., Latour, J.M., Ravanat, J.L., Fontecave, M., Atta, M. (2014) TtcA a new tRNA-thioltransferase with an Fe-S cluster. *Nucleic Acids Res.* 42: 7960-7970. doi: 10.1093/nar/gku508.
7. Camacho-García, J., Montoro-García, C., López-Pérez, A. M., Bilbao, N., Romero-Pérez, S., González-Rodríguez, D. (2015) Synthesis and complementary self-association of novel lipophilic  $\pi$ -conjugated nucleoside oligomers. *Org Biomol Chem* 13: 4506-4513. doi: 10.1039/c5ob00098j.
8. Cavuzic, M., Liu, Y. (2017) Biosynthesis of sulfur-containing tRNA modifications: a comparison of bacterial, archaeal, and eukaryotic pathways. *Biomolecules* 7: E27. doi: 10.3390/biom7010027.
9. de Crécy-Lagard, V., Brochier-Armanet, C., Urbonavičius, J., Fernandez, B., Phillips, G., Lyons, B. et al. (2010) Biosynthesis of wyosine derivatives in tRNA: an ancient and highly diverse pathway in Archaea. *Mol Biol Evol* 27: 2062-2077. doi: 10.1093/molbev/msq096.
10. Delchev, V. B., Mikosch, H. (2007) Theoretical study of the intermolecular H-bonding and intermolecular proton transfer between isocytosine tautomeric forms and R,S-lactic acid. *J Mol Model* 13: 19-28. doi: 10.1007/s00894-005-0090-y.
11. Droogmans, L., Grosjean, H. (1987) Enzymatic conversion of guanosine 3' adjacent to the anticodon of yeast tRNA<sup>Phe</sup> to N1-methylguanosine and the wye nucleoside: dependence on the anticodon sequence. *EMBO J* 6: 477-483.
12. Finn, R. D., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L. et al. (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res* 44: D279-D285. doi: 10.1093/nar/gkv1344.
13. Goodacre, N. F., Gerloff, D. L., Uetz, P. (2013) Protein domains of unknown function are essential in bacteria. *MBio* 5: e00744-e00713. doi: 10.1128/mBio.00744-13.
14. Grosjean, H., Droogmans, L., Giégé, R., Uhlenbeck, O. C. (1990) Guanosine modifications in runoff transcripts of synthetic transfer RNA-Phe genes microinjected into *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1050: 267-273.
15. Grosjean, H., Keith, G., Droogmans, L. (2004) Detection and quantification of modified nucleotides in RNA using thin-layer chromatography. *Methods Mol Biol* 265: 357-391. doi: 10.1385/1-59259-775-0:357.
16. Gupta, D., Huelsekopf, M., Morell Cerdà, M., Ludwig, R., Lippert, B. (2004) Complex formation of isocytosine tautomers with PdII and PtII. *Inorg Chem* 43: 3386-3393. doi: 10.1021/ic0353965.
17. Hall, R. S., Fedorov, A. A., Xu, C., Fedorov, E. V., Almo, S. C., Raushel, F. M. (2011) Three-dimensional structure and catalytic mechanism of cytosine deaminase. *Biochemistry* 50: 5077-5085. doi: 10.1021/bi200483k.
18. Harris, B. E., Manning, B. W., Federle, T. W., Diasio, R. B. (1986) Conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil by human intestinal microflora. *Antimicrob Agents Chemother* 29:44-48.
19. Jager, G., Leipuviene, R., Pollard, M. G., Qian, Q., and Bjork, G. R. (2004) The conserved Cys-X1-X2-Cys motif present in the TtcA protein is required for the thiolation of cytidine in position 32 of tRNA from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 186: 750-757.
20. Jankevicius, G., Ariza, A., Ahel, M., and Ahel, I. (2016) The toxin-antitoxin system DarTG catalyzes reversible ADP-ribosylation of DNA. *Mol Cell* 64: 1109-1116. doi: 10.1016/j.molcel.2016.11.014.

21. Kelkar, Y. D., Ochman, H. (2013) Genome reduction promotes increase in protein functional complexity in bacteria. *Genetics* 193: 303-307. doi: 10.1534/genetics.112.145656.
22. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
23. Lee, T. T., Agarwalla, S., Stroud, R. M. (2005) A unique RNA Fold in the RumA-RNA-cofactor ternary complex contributes to substrate selectivity and enzymatic function. *Cell* 120: 599-611. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.037.
24. Liu, Y., Vinyard, D. J., Reesbeck, M. E., Suzuki, T., Manakongtreecheep, K., Holland, P. L. et al. (2016) A [3Fe-4S] cluster is required for tRNA thiolation in archaea and eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* pii: 201615732. doi: 10.1073/pnas.1615732113.
25. Longley, D. B., Harkin, D. P., Johnston, P. G. (2003) 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3: 330-338. doi: 10.1038/nrc1074.
26. Luo, M., Gamage, T. T., Arentson, B. W., Schlasner, K. N., Becker, D. F., Tanner, J. J. (2016) Structures of Proline Utilization A (PutA) reveal the fold and functions of the aldehyde dehydrogenase superfamily Domain of Unknown Function. *J Biol Chem* 291: 24065-24075. doi: 10.1074/jbc.M116.756965.
27. Malekshah, O. M., Chen, X., Nomani, A., Sarkar, S., Hatefi, A. (2016) Enzyme/prodrug systems for cancer gene therapy. *Curr Pharmacol Rep* 2: 299-308. doi: 10.1007/s40495-016-0073-y.
28. Malet-Martino, M. C., Martino, R., de Forni, M., Andremont, A., Hartmann, O., Armand, J. P. (1991) Flucytosine conversion to fluorouracil in humans: does a correlation with gut flora status exist? A report of two cases using fluorine-19 magnetic resonance spectroscopy. *Infection* 19: 178-180.
29. Mikhailopulo, I. A., Miroshnikov, A. I. (2011) Biologically important nucleosides: modern trends in biotechnology and application. *Mendeleev Commun* 21: 57-68. doi: 10.1016/j.mencom.2011.03.001.
30. Mitsukawa, Y., Hibi, M., Matsutani, N., Horinouchi, N., Takahashi, S., Ogawa, J. (2016) A novel nucleoside hydrolase from *Lactobacillus buchneri* LBK78 catalyzing hydrolysis of 2'-O-methylribonucleosides. *Biosci Biotechnol Biochem* 80: 1568-1576. doi: 10.1080/09168451.2016.1182853.
31. Mitsukawa, Y., Hibi, M., Matsutani, N., Horinouchi, N., Takahashi, S., Ogawa J. (2017) Enzymatic synthesis of 2'-O-methylribonucleosides with a nucleoside hydrolase family enzyme from *Lactobacillus buchneri* LBK78. *J Biosci Bioeng* 123: 659-664. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.01.005.
32. Mitsukawa, Y., Hibi, M., Matsutani, N., Horinouchi, N., Takahashi, S., Ogawa, J. (2018) New nucleoside hydrolase with transribosylation activity from *Agromyces* sp. MM-1 and its application for enzymatic synthesis of 2'-O-methylribonucleosides. *J Biosci Bioeng* 125: 38-45. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.07.016.
33. Mudgal, R., Sandhya, S., Chandra, N., Srinivasan, N. (2015) De-DUFing the DUFs: Deciphering distant evolutionary relationships of Domains of Unknown Function using sensitive homology detection methods. *Biol Direct* 10: 38. doi: 10.1186/s13062-015-0069-2.
34. Neuhard, J., Nygaard, P. (1987) Purines and pyrimidines, p. 445-473. In: F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, DC.
35. Popovic, A., Tchigvintsev, A., Tran, H., Chernikova, T. N., Golyshina, O. V., Yakimov, M. M. et al. (2015) Metagenomics as a tool for enzyme discovery: hydrolytic enzymes from marine-related metagenomes. *Adv Exp Med Biol* 883: 1-20. doi: 10.1007/978-3-319-23603-2\_1.
36. Robert, X., Gouet, P. (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* 42: W320-W324. doi: 10.1093/nar/gku316.
37. Sambrook, J., Russell, D. W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
38. Shigi, N. (2014) Biosynthesis and functions of sulfur modifications in tRNA. *Front Genet* 5: 67. doi: 10.3389/fgene.2014.00067.
39. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W. et al. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7: 539. doi: 10.1038/msb.2011.75.

40. Stiebritz, M. T. (2014) A role for [Fe<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>] clusters in tRNA recognition – a theoretical study. *Nucleic Acids Res* 42: 5426-5435. doi: 10.1093/nar/gku227.
41. Urbonavičius, J., Rutkienė, R., Lopato, A., Tauraitė, D., Stankevičiūtė, J., Aučynaitė, A. et al. (2016) Evolution of tRNA<sup>Phe</sup>:imG2 methyltransferases involved in the biosynthesis of wyosine derivatives in Archaea. *RNA* 22: 1871-1883. doi: 10.1261/rna.057059.116.
42. Yang, X. L., Sugiyama, H., Ikeda, S., Saito, I., Wang, A. H. (1998) Structural studies of a stable parallel-stranded DNA duplex incorporating isoguanine:cytosine and isocytosine:guanine basepairs by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biophys J* 75: 1163-1171. doi: 10.1016/S0006-3495(98)74035-4.