

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos II k. studentė

Eglė Narmontaitė

Magistro baigiamasis darbas

**Piridino skaidymo *Rhodococcus rhodochrous* PY11  
kamiene tyrimas**

Darbo vadovė:

dr. Rūta Stanislaukienė

Vilnius 2019

## **Piridino skaidymo *Rhodococcus rhodochrous* PY11 kamiene tyrimas**

Magistro baigiamasis darbas rengtas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro  
Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje

Darbą atliko Eglė Narmontaitė .....

Darbo vadovė dr. Rūta Stanislauskienė .....

# TURINYS

SANTRUMPOS .....	5
ĮVADAS .....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	8
1.1 <i>Rhodococcus</i> spp. bakterijos .....	8
1.2 Piridinas ir jo junginiai .....	9
1.2.1 Piridinas.....	9
1.2.2 Gamtoje aptinkami piridino dariniai .....	10
1.2.3 Sintetiniai piridino junginiai .....	12
1.3 Piridino ir jo darinių skaidymas bakterijose .....	13
1.3.1 Piridino skaidymas vykstant žiedo redukcijai.....	13
1.3.2 Piridino skaidymo keliai vykstant žiedo hidroksilinimui.....	16
1.4 Ksenobiotinių medžiagų skaidyme dalyvaujantys genai .....	21
1.5 Piridino skaidyme dalyvaujantys baltymai .....	22
1.5.1 Flavino monooksigenazės .....	22
1.5.2 Flavino monooksigenazės ir reduktazės dviejų komponentų sistema.....	23
1.5.3 Amidohidrolazė.....	24
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	26
2.1 Reagentai .....	26
2.2 Bakteriniai kamienai ir plazmidės .....	27
2.3 PGR Pradmenys .....	28
2.4 RT-PGR pradmenys.....	29
2.5 Terpės ir auginimo sąlygos .....	30
2.6 Genominės DNR skyrimas .....	31
2.7 Plamidinės DNR skyrimas.....	31
2.8 DNR elektroforezė agarozės gelyje .....	32
2.9 Polimerazės grandininė reakcija (PGR).....	32
2.10 DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio .....	32
2.11 DNR fragmentų klonavimas į vektorius .....	32
2.12 <i>E. coli</i> imliųjų ląstelių ruošimas ir elektroporacija .....	33
2.13 <i>R. erythropolis</i> SQ1 imliųjų ląstelių ruošimas ir elektroporacija .....	33
2.14 Baltymų raiškos indukcija <i>E. coli</i> bakterijose .....	34
2.15 Beląstelinio ekstrakto ruošimas .....	34
2.16 Baltymų kiekio nustatymas.....	34

2.17 Baltymų elektroforezė.....	34
2.18 Amidohidrolazės gryninimas .....	34
2.19 Amidohidrolazės reakcijos su tipiniais substratais .....	35
2.20 Hipotetinės amidohidrolazės substratinio specifiškumo nustatymas.....	35
2.21 Biovirsmų tyrimai panaudojant intaktines ląsteles .....	36
2.22 Bendrosios ląstelių RNR skyrimas .....	36
2.23 Kokybinė ir kiekybinė AT-PGR analizė.....	37
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	39
3.1 Hipotetinės flavino monooksigenazės raiškos optimizavimas <i>E. coli</i> bakterijose .....	41
3.2 Piridino biovirsmų tyrimai <i>E. coli</i> transformantuose.....	45
3.3 Piridino biovirsmų tyrimai <i>R. erythropolis</i> SQ1 transformantuose.....	49
3.4 Hipotetinės amidohidrolazės tyrimai .....	51
3.5 Piridinu indukuojamų genų raiškos tyrimas .....	54
IŠVADOS.....	60
Santrauka .....	61
Summary.....	62
PADĖKA.....	63
LITERATŪROS ŠALTINIAI.....	64

## SANTRUMPOS

2-HP – 2-hidroksipiridinas

AHS – amidohidrolazių superšeima

*asr* – atviro skaitymo rėmelis (genas)

CoA – kofermentas – A

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

FMN – flavinmononukleotidas

IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktozidas

IR – infraraudonieji spinduliai

MS – masių spektrometrija

NAD – nikotinamido adenindinukleotidas

NADP – nikotinamido adenindinukleotido fosfatas

NADPH – redukuota nikotinamido adenindinukleotido fosfato forma

NDS – natrio dodecilsulfatas

OT – optinis tankis

PNO – piridino-N-oksidas

Tris – tris-(hidroksimetil) –aminometanas

UV – ultravioletiniai spinduliai

## ĮVADAS

Net du trečdaliai žinomų organinių junginių turi heterociklines struktūras (Reddy ir Reddy, 2012). Piridinas ir jo dariniai sudaro svarbią heterociklinių junginių klasę. Šie aromatiniai junginiai natūraliai egzistuojančiose biologinėse sistemose aptinkami kaip elektronų nešikliai, nukleotidai, energiją kaupiančios molekulės, kofermentai, mikotoksinai ir alkaloidai (Kaiser et al., 1996). Piridinas yra geras organinis tirpiklis, todėl plačiai naudojamas farmacijos, agrochemijos, sprogstamųjų medžiagų, herbicidų ir pesticidų pramonės srityse (Zang et al., 2014, Huang et al., 2017, Zong et al., 2018). Dėl piridino žiede esančio heterociklinio azoto atomo jis geriau tirpsta vandenyje nei jo homocikliniai homologai ir gali lengvai patekti į požeminius vandenis (Kaiser et al., 1996, Wang et al., 2018). Taip piridinas ir jo dariniai patenka į natūralias ekosistemas ir sukelia aplinkos taršą (Mathur et al., 2008). Dėl savo toksinės ir teratogeninės prigimties, piridinas kelia pavojų gyviesiems organizmams (Sun et al., 2011). Dėl šių priežasčių svarbu žinoti tolesnę šio junginio lemtį gamtoje.

Piridino skaidymas tiriamas jau kelis dešimtmečius. Nors yra atrasta nemažai mikroorganizmų, sugebančių skaidyti heterociklinius aromatinus junginius, tačiau vis dar nedaug žinoma apie proceso metu susidarancius tarpinius junginius. Šiuo metu yra išskiriami du pagrindiniai piridino skaidymo keliai bakterijose. Pirmajame vyksta hidroksilinimo reakcijos, po kurių seka redukcija, antrajame vyksta piridino žiedo redukcija, kurios metu piridinas nėra hidroksilinamas (Fetzner, 1998). Nors yra atrasta nemažai bakterijų, galinčių panaudoti piridiną kaip anglies ir energijos šaltinį, tačiau vis dar labai nedaug žinoma apie procese dalyvaujančius fermentus ir juos koduojančius genus.

Yra sukurta įvairių fizikocheminių metodų piridinu užterštoms nuotekoms valyti, tačiau dėl ekologiškumo, žemos kainos ir efektyvumo daugiausiai žadančios yra biologinės valymo sistemos, naudojančios piridiną skaidančias bakterijas (Chandra et al., 2009). Nustačius ir ištyrus piridino skaidyme dalyvaujančius fermentus, juos galima būtų pritaikyti kovojant su tarša. Taigi, svarbu tyrinėti ir gilinti žinias apie piridino skaidyme dalyvaujančius fermentus.

*Rhodococcus* yra Gram-teigiamos, aerobinės, GC turtingos bakterijos. Tai chemoorganotrofai, kuriems būdingas oksidacinis metabolizmas. Šie aktinomicetai pasižymi labai didele metaboline įvairove ir gali skaidyti įvairias natūralias ir ksenobiotines medžiagas (Goodfellow ir Maldonado, 2006). Bakterijoms būdingos didelės katabolinės plazmidės, kuriose koduojami įvairių medžiagų skaidyme dalyvaujantys genai (Martínková et al., 2009). Šio darbo objektas – *Rhodococcus rhodochrous* PY11 bakterijos, galinčios panaudoti piridiną

kaip pagrindinį anglies ir energijos šaltinį bei jų sintetinami galimai piridino skaidyme dalyvaujantys baltymai ir juos koduojantys genai.

**Darbo tikslas:** ištirti *Rhodococcus rhodochrous* PY11 bakterijose piridino skaidyme dalyvaujančius genus ir jų koduojamus baltymus bei nustatyti galimą jų funkciją.

**Darbo uždaviniai:**

1. Nustatyti ar hipotetinė flavino monooksigenazė dalyvauja pirmajame piridino skaidymo etape *Rhodococcus rhodochrous* PY11 bakterijose.
2. Atlikti hipotetinės amidohidrolazės raišką, baltymą išgryninti ir nustatyti galimą fermento funkciją piridino skaidymo procese.
3. Identifikuoti genus, kurių produktai galimai dalyvauja piridino skaidyme *Rhodococcus rhodochrous* PY11 bakterijose.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 *Rhodococcus* spp. bakterijos

*Rhodococcus* yra Gram-teigiamos bakterijos, priskiriamos daug GC turinčiai Actinobacteria klasei (Gürtler ir Seviour, 2010). Šiose bakterijose GC sudaro 67–73 % chromosominėje DNR (Goodfellow ir Maldonado, 2006). Jos priklauso mikolines rūgštis sintetinančiam *Corynebacterineae* poiliui, *Nocardiaceae* šeimai. Remiantis reikšminiais nukleotidais 16S rRNR gene, *Nocardiaceae* ir *Gordoniaceae* šeimos buvo sujungtos į vieną *Nocardiaceae* šeimą ir šiuo metu yra išskiriamos 8 gentys: *Gordonia*, *Micropolyspora*, *Millisia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Skermania*, *Smaragdicoccus* ir *Williamsia* (Zhi et al., 2009).

*Rhodococcus* genties bakterijos yra aerobiniai, sporų neformuojantys (Martínková et al., 2009) nejudrūs aktinomicetai, kurie gali būti Gram-teigiami ar Gram-variabiūs. Augimo ciklo pradžioje ląstelės būna trumpų lazdelių arba kokoidinės formos, vėliau, priklausomai nuo kamieno, gali vykti morfologiniai pokyčiai, kurių metu kokai gali pereiti į lazdelių formą ir formuoti filamentus arba šakotus hifus. Vėliau įvairios morfologinės formos fragmentuojasi ir vėl įgyja kokoidinę arba trumpų lazdelių formą (Goodfellow ir Maldonado, 2006, Jones ir Goodfellow, 2010). Dauguma *Rhodococcus* genties bakterijų formuoja šiurkščias, lygias ar gleivėtas (Goodfellow ir Maldonado, 2006) raudonos, oranžinės ar rožinės spalvos kolonijas, dėl ląstelėje sintetinamų karotenoidų (Warhurst ir Fewson., 1994), tačiau pasitaiko ir bespalvių ar kreminės spalvos kolonijų (Gürtler ir Seviour, 2010). Bakterijos gerai auga 30 °C temperatūroje, ant standartinės laboratorinės terpės, tačiau kai kuriems kamienams papildomai reikia tiamino (Goodfellow ir Maldonado, 2006).

*Rhodococcus* gentį sudaro genetiškai ir fiziologiškai įvairios bakterijos, plačiai paplitusios dirvožemyje, vandenyje, jūros dugno nuosėdose (Martínková et al., 2009). Bakterijos aptiktos dykumose (Hernández et al., 2008), išskirtos iš aktyvaus dumblo reaktorių (de los Reyes 2010), skeleto liekanų kapavietėse (Gürtler ir Seviour et al., 2010) bei Arktinių ir Antarktinių mėginių (Whyte et al., 2002). Tai rodo, kad šie mikroorganizmai yra gerai prisitaikę išgyventi ekstremaliose aplinkos sąlygose, kuriose yra ribotas maisto medžiagų kiekis (Hernández et al., 2008). Kai kurios bakterijos yra patogeniškos žmonėms, gyvūnams ar augalams (Finnerty 1992), gali būti simbiontais kraują siurbiančių nariuotakojų virškinamajame trakte (Yassin, 2005).

Tai chemoorganotrofinės bakterijos, kurioms būdingas oksidacinis metabolizmas (Goodfellow ir Maldonado, 2006), jos gali panaudoti įvairius organinius junginius kaip pagrindinį anglies ir energijos šaltinį (Gürtler et al., 2004). Mikroorganizmai geba įsisavinti



neįprastus junginius: alifatinis angliavandenilius, anilinus, biciklinius ir policiklinius angliavandenilius, azotą turinčius aromatinus junginius (pvz. piridiną) ir sterolius (Goodfellow ir Maldonado, 2006). Bakterijoms būdingi dideli genomai, turintys katabolinių genų įvairovę, gerai išvystytą reguliacinį tinklą bei papildomas katabolinių genų kopijas (Alvarez et al., 2010). *Rhodococcus* dažniausiai turi dideles linijines ar žiedines katabolines plazmidas, kuriose yra genai, koduojantys fermentus, galinčius skaidyti įvairias natūralias ir ksenobiotines medžiagas (Bell et al., 1998, Larkin et al., 2006, Martínková et al., 2009). Kai kuriems *Rhodococcus* kamienams būdingas didelis rekombinacijos dažnis, tai lemia genomo lankstumą ir naujų fermentinių aktyvumų atsiradimą (Larkin et al., 2006). Taigi *Rhodococcus* proteomas turi neįprastai didelę oksidacinių fermentų įvairovę (McLeod et al., 2006).

Ilgos alifatinės mikolinių rūgščių grandinės ląstelės paviršiuje padeda hidrofobiniams substratams patekti į ląstelę. Bakterijų sintetinami surfaktantai lemia geresnę gebėjimą metabolizuoti hidrofobinius substratus. Mikolinės rūgštys (trehaliozę turintys glikolipidai) pagerina ląstelių sukibimą su hidrofobinėmis medžiagomis, mažina tarpfazinę įtampą tarp junginių ir ląstelės bei jos paviršiuje tolygiai paskirsto junginius (Finerty et al., 1992, Bell et al., 1998, de Carvalho ir da Fonseca, 2005). Bakterijos sugeba išgyventi bado sąlygomis ir teršalų skaidymas nėra stabdomas, net jei aplinkoje yra lengviau įsisavinamų anglies šaltinių (Bell et al., 1998).

Dėl metabolinio įvairiapusiškumo ir unikalių fermentų, *Rhodococcus* bakterijos kelia vis didesnę susidomėjimą farmacijos, aplinkosaugos, chemijos bei energijos sričių pritaikyme. Jos yra naudojamos sieros pašalinimui iš iškastinio kuro (Matsui et al., 2002), bioaktyvių steroidų gamyboje (McLeod et al., 2006), pramoninėje akrilamido (Komeda et al., 1996) bei akrilo rūgšties gamyboje – tai komerciškai sėkmingiausias mikrobinių biokatalizatorių pritaikymas (Banerjee et al., 2002). Dėl savo metabolinių galimybių bakterijos atlieka biologinio valymo vaidmenį gamtoje (Bell et al., 1998).

## **1.2 Piridinas ir jo junginiai**

### 1.2.1 Piridinas

Piridinas yra organinis heterociklinis junginys, kuriame viena benzeno žiedo -CH grupė yra pakeista azoto atomu (Clayden et al., 2012). Tai šešianarės plokščios ciklinės molekulės, kurių cheminė formulė  $C_5H_5N$  (Shimizu et al., 2012) (1.2.1 pav.). Jos turi konjuguotą  $6\pi$  elektronų sistemą (Clayden et al., 2012). Piridinas ir jo homologai dažnai vadinami piridino bazėmis (Shimizu et al., 2012).

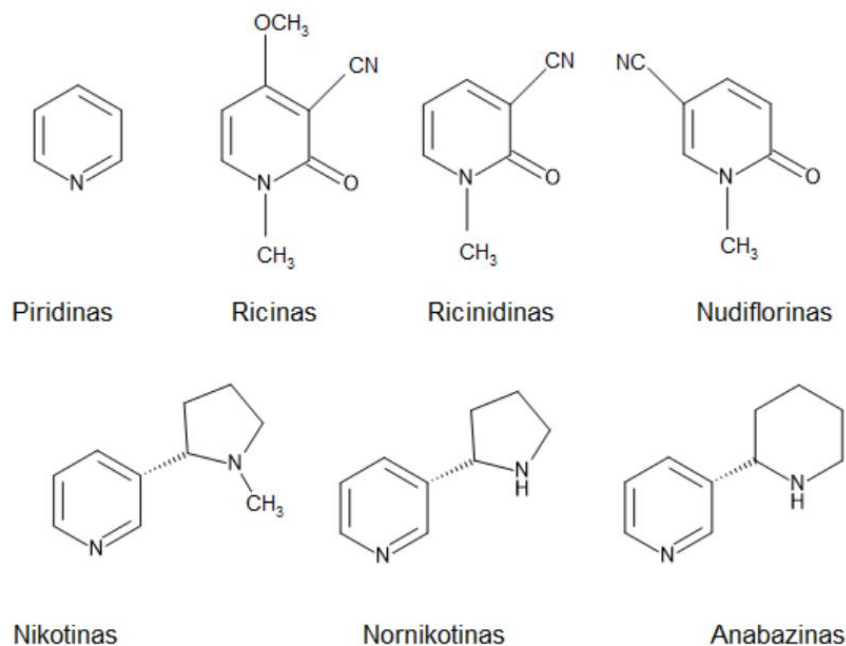
Piridinas gerai tirpsta vandenyje ir pagrindiniuose organiniuose tirpikliuose (alkoholyje, eteryje, benzene) (Shimizu et al., 2012). Piridinas ir jo dariniai yra stabilūs, palyginus nereaktyvūs, aštraus kvapo skysčiai (Joule ir Mills, 2009). Kadangi šis heterociklas turi tris dvigubuosius ryšius, egzistuoja 6  $\pi$  elektronai, formuojantys aromatinį žiedą (Shimizu et al., 2012). Piridino žiedo N atomo laisvoji elektronų pora neįeina į heteroaromatinę sistemą todėl jis gali prisijungti protoną (pasižymi bazinėmis savybėmis) (Jakubkienė, 2009). Azoto atomas yra labiau elektroneigiamas nei anglies atomai (Shimizu et al., 2012), todėl piridino žiedo atomų tankis yra pasislinkęs į N atomo pusę. Elektronų tankis 2- ir 4- padėtyse yra žemas, šie anglies atomai turi dalinį teigiamą krūvį (Jakubkienė, 2009). Dėl šios priežasties piridinas yra itin atsparus elektrofilinio pakeitimo reakcijoms (Sims ir O'Loughlin, 1989).

Į piridiną galima žiūrėti kaip į silpną bazę bei tretinį aminą, kurio N atomas turi nukleofilinių savybių (Jakubkienė, 2009). Organinių reakcijų metu piridinas veikia kaip tretinis aminas ties azoto atomu vykstant protonizacijos, alkilavimo, acilinimo ir N-oksidacijos reakcijoms bei kaip aromatinis junginys, dalyvaudamas nukleofilinio pakeitimo reakcijose (Katritzky ir Rees 1984, Perry ir Green 2007).

Piridinas pasižymi narkotinių medžiagų poveikiu. Toksinės dozės sukelia silpnumą, ataksiją (valingų judesių koordinacijos sutrikimą) ir sąmonės netekimą. Jis yra lengvai absorbuojamas per plaučius, virškinamąjį traktą bei odą. Kai kontaktuojama su piridino garais, toksiškumas pagrinde paveikia centrinę nervų sistemą ir virškinamąjį traktą – jaučiamas silpnumas, galvos skausmas, pykinimas, apetito praradimas ir nemiga (Shimizu et al., 2012).

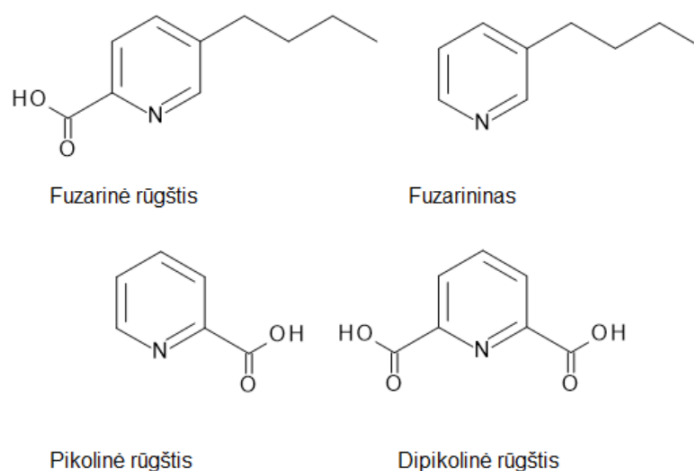
### 1.2.2 Gamtoje aptinkami piridino dariniai

Piridinas ir jo dariniai natūraliai gamtoje aptinkami nikotino rūgšties darinių ir augalų alkaloidų forma (McEwen ir Stephenson, 1979). Alkaloidai yra azotą turinčios, dažniausiai augalinės kilmės, organinės medžiagos, pasižyminčios bazinėmis savybėmis. Tai įvairios struktūros ir įvairiai veikiančios fiziologiškai aktyvios medžiagos, net ir labai mažomis dozėmis specifiskai veikiančios gyvus organizmus. Pakeisti 2-piridonai – ricininas, ricinidinas bei nudiflorinas yra sudėtinės ricinos aliejaus, gaunamo iš augalo *Ricinus communis* medžiagos (Žilinskas, 2014). Nikotinas, nornikotinas, anabazinas ir kiti piridino bei pirolidino klasės augalų alkaloidai sintetunami *Nicotiana* genties augalų (McEwen ir Stephenson, 1979) (1.2.1 pav.).



**1.2.1 pav.** Piridinas ir piridino žiedą turintys augalų alkaloidai.

Piridinas ir jo dariniai gamtoje aptinkami nedideliais kiekiais kaip biologinių sistemų dalis. Piridino žiedas gamtoje dažniau aptinkamas su pakeistomis cheminėmis grupėmis, hidroksipiridino, piridinono ir piridino karboksilinių rūgščių pavidalu (Sims ir O'Loughlin, 1989). Fuzarinė rūgštis (5-butilpikolinė rūgštis), fuzarininas (3-butilpiridinas) ir pikolinė rūgštis (piridino-2-karboksilinė rūgštis) yra sintetinami *Pyricularia oryzae* ir kitų, daugiausiai ryžinių augalų kultūras paveikiančių patogeninių grybų (Tamari, 1951, Tamari ir Kaji, 1954, Guarnan, 1958). Dipikolinė rūgštis (piridino 2,6-dikarboksilinė rūgštis) randama bakterijų endosporose ir sudaro net iki 7-13 % jų svorio (Grecz ir Tang, 1970) (1.2.2 pav.).



**1.2.2 pav.** Patogeninių grybų ir bakterijų sintetinami piridino dariniai

Nors piridino dariniai biologinėse sistemose aptinkami tik labai nedideliais kiekiais, jie yra svarbūs metabolinių kelių komponentai. Nikotinamidas ir piridoksinas (vitaminas B6) randami visose biologinėse sistemose. Nikotinamidas yra būtinas kofermentų nikotinamido adenino dinukleotido (NAD<sup>+</sup>) bei nikotinamido adenino dinukleotido fosfato (NADP<sup>+</sup>) sintezei. Piridoksinas, piridoksalis ir piridoksaminas formuoja kofermentą piridoksal-5'-fosfatą, dalyvaujantį  $\alpha$ -amino rūgščių metabolizmo reakcijose (Sims ir O'Loughlin, 1989).

### 1.2.3 Sintetiniai piridino junginiai

Aplinkos užterštumas yra viena iš svarbiausių šių laikų problemų. Milijonai tonų teršalų kasdien patenka į biosferą visame pasaulyje (Khasaeva et al., 2011). Piridinas ir jo dariniai sudaro svarbią pramoninių teršalų grupę (Zalat ir Elsayed, 2013). Piridinas naudojamas kaip tirpiklis chloro pašalinimo reakcijose, plačiai taikomas dažų, sprogstamųjų medžiagų, pesticidų bei farmacijos pramonėje (Mudliar et al., 2008), taip pat naudojamas kaip klizai tekstilės pramonėje. Dėl didelio bioaktyvumo, piridino dariniai yra svarbūs insekticidai ir herbicidai (Shimizu et al., 2012). Piridinas ir jo junginiai išskiriami į aplinką gaminant dujas iš akmens anglių ir aptinkami farmacijos pramonės bei naftos perdirbimo gamyklų nuotekose (Sims ir O'Loughlin, 1989). Minėti junginiai kelia pavojų gyviesiems organizmams (Padoley et al., 2006).

Kadangi piridinas yra aptinkamas aplinkoje ir yra kenksmingas, svarbu žinoti šio junginio tolesnę lentį gamtoje (Sims et al., 1986). Dėl heterociklinės prigimties šie junginiai geriau tirpsta vandenyje nei jų analogai sudaryti tik iš anglies (turintys benzeno žiedą) ir gali lengvai patekti į požeminius vandenis (Khasaeva et al., 2011). Pramonės nuotekos, turinčios piridino ir jo darinių, yra toksiškos vandens gyvūnijai ir kelia susirūpinimą dėl aštraus ir nemalonaus kvapo (Kumar et al., 1995, Mall et al., 2003, Lataye et al., 2008). Piridinas priskiriamas prie vienu iš pagrindinių aplinkos teršalų (Richards ir Shiets 1986). Dėl šių priežasčių piridino turinčios pramonės nuotekos prieš patenkant į aplinką turi būti išvalomos, kad nebūtų daroma žala natūralioms ekosistemoms (Chandra et al., 2009).

Egzistuoja įvairūs fizikocheminiai metodai piridino turinčių nuotekų valymui, tačiau jiems reikia daug energijos, įrengimas ir proceso sąnaudos brangiai kainuoja, bei sukuriama nepageidaujama antrinė atlieka (Padoley et al., 2006, Mudliar et al., 2008). Kaip alternatyva gali būti naudojamas biologinis valymas, kuris yra ekologiškas, nebrangus, efektyvus ir nesusidaro pašaliniai nepageidaujami produktai (Chandra et al., 2009). Pastaruoju metu vis labiau domimasi bioaugmentacija panaudojant ksenobiotines medžiagas skaidančias bakterijas ar fermentus nuotekų valymui (Wang et al., 2002, Park et al., 2008). Į valymo sistemas

pridedant piridiną skaidančių bakterijų (Li et al., 2001, Bai et al., 2010) ar imobilizuojant bakterijų ląsteles (Rhee et al., 1996, Kim et al., 2006, Tian et al., 2006), yra pagerinamas piridino ir jo darinių pašalinimas (Wen et al., 2013). Norint patobulinti šiuos procesus, svarbu suprasti kaip skaidymas vyksta bakterijose ir kokie yra pagrindiniai piridino skaidymo kelyje dalyvaujantys fermentai.

### 1.3 Piridino ir jo darinių skaidymas bakterijose

Pirmą kartą bakterinis piridino skaidymas dirvožemyje pastebėtas jau daugiau nei prieš 100 metų, kai buvo bandoma jį panaudoti kaip dirvožemio antiseptiką, tačiau vietoj dirvožemio mikrofloros sumažėjimo, buvo pastebėta, kad kai kurių rūšių bakterijų kiekis ženkliai padidėjo (Buddin 1914). Piridino ir jo darinių skaidymas tirtas aerobinėmis ir anaerobinėmis sąlygomis grynose bei negrynose kultūrose (Kaiser et al., 1996, Rhee et al., 1997, Fetzner et al., 1998, Lee et al., 2001, Mohan et al., 2003). Tyrimai parodė, kad mikroorganizmai gali panaudoti piridiną ir jo junginius kaip pagrindinius anglies ir energijos šaltinius anaerobinėmis ir aerobinėmis sąlygomis (Fetzner 1998, Padoley et al., 2006, Mudliar et al., 2008). Nors yra atrasta nemažai mikroorganizmų, galinčių skaidyti piridiną, tačiau tikslus žiedo skėlimo mechanizmas vis dar yra neaiškus. Žinoma, kad N-heterociklinių junginių skaidymas dažnai prasideda atomo, esančio šalia pakaitinio azoto, hidroksilinimu. Chemiškai piridino žiedas yra jautrus redukcijai ir nukleofilinei atakai C-2 ir C-4 padėtyse (Fetzner, 1998).

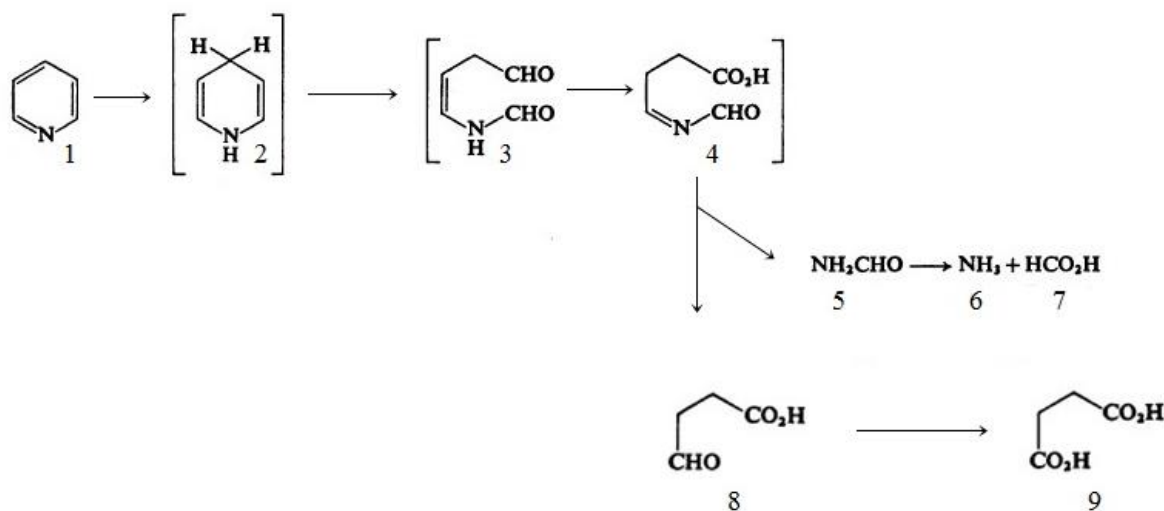
Dvi pagrindinės strategijos bakteriniam piridino skaidymui yra hidroksilinimo reakcijos, po kurių vyksta redukcija, bei aerobiniai redukciniai keliai, kurių metu nevyksta hidroksilinimo reakcijos (Fetzner, 1998). Vykstant 2- ir 4-etil piridino skaidymui, žiedo hidroksilinimo ir redukcijos reakcijos vyksta prieš žiedo skėlimą (Feng et al., 1994). Skaidant hidroksipiridinus, jie visų pirma hidroksilinami iki di- arba tri-hidroksipiridino, o paskui seka žiedo skėlimas (Kaiser et al., 1996). 3-Karboksipiridinas (nikotininė rūgštis) oksiduojama į 6-hidroksinikotininę rūgštį (Hughes, 1955). Po to vyksta oksidacinio dekarboksilinimo reakcija, susidarant 2,5-dihidroksipiridinui, kuris vėliau skeliamas susiformuojant maleino monoamidui ir skruzdžių rūgščiai (Behrman ir Stainer, 1957).

#### 1.3.1 Piridino skaidymas vykstant žiedo redukcijai

Watson ir Cain 1975, vieni iš pirmųjų nustatė piridino skaidymo kelius iš dirvožemio išskirtose *Bacillus* sp. ir *Nocardia* sp. bakterijose (Watson ir Cain, 1975). Ankstesnių tyrimų metu, piridino žiedo azoto atomas buvo aptinkamas tik NH<sub>3</sub> pavidalu. Buvo identifikuojami tik alifatiniai tarpiniai junginiai, taigi pradiniai piridino žiedo skaidymo žingsnių nustatyti

nepavykdavo (Stafford ir Callely, 1970). Tiriant iš dirvožemio išskirtas *Nocardia* Z1 ir *Bacillus* sp. 4 kamienų bakterijas paaiškėjo, kad abu kamienai geba panaudoti piridiną kaip vienintelį anglies, azoto ir energijos šaltinį. Šiose bakterijose piridino skaidymas yra indukuojamas procesas. Identifikavus skaidymo metu susidarancius tarpinius junginius, nustatyta, kad piridino skaidymo keliai *Nocardia* sp. Z1 ir *Bacillus* sp. 4 bakterijose skiriasi (Watson ir Cain, 1975).

Abiejuose kamienuose būdinga ta pati pradinė reakcija – piridinas redukuojamas iki 1,4-dihidropiridino. Eksperimentai su radioktyviai žymėtu [<sup>14</sup>C2] piridinu parodė, jog *Bacillus* sp. 4 kamienne skaidymo metu susisidaranti skruzdžių rūgštis formuojama iš heterociklinio žiedo antro anglies atomo (1.3.1 pav.). Susidarancios gintaro ir skruzdžių rūgštys parodo, kad piridino žiedas yra skeliamas tarp C2 ir C3 atomų. Po dvigubo ryšio, tarp C2 ir C3 hidrolizės susidaro 4-(*N*-formil)-amino-buten-3-eno-1-aldehidus, kuris iškart oksiduojamas į šio junginio pusiau aldehidą – 4-(*N*-formil)-amino-buten-3-enoinę rūgštį. Toliau seka heterociklino N atomo ir C-6 atomo hidrolizė ir susiformuoja formamidas ir gintaro rūgšties pusiau aldehidus. Formamidas yra veikiamas specifinės formamido amidazės ir skyla į skruzdžių rūgštį ir amoniaką. Gintaro rūgšties pusiau aldehidus yra toliau oksiduojamas iki gintaro rūgšties. Šioje reakcijoje dalyvauja piridinu indukuojama, nuo NAD priklausoma gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazė (Watson ir Cain, 1975).

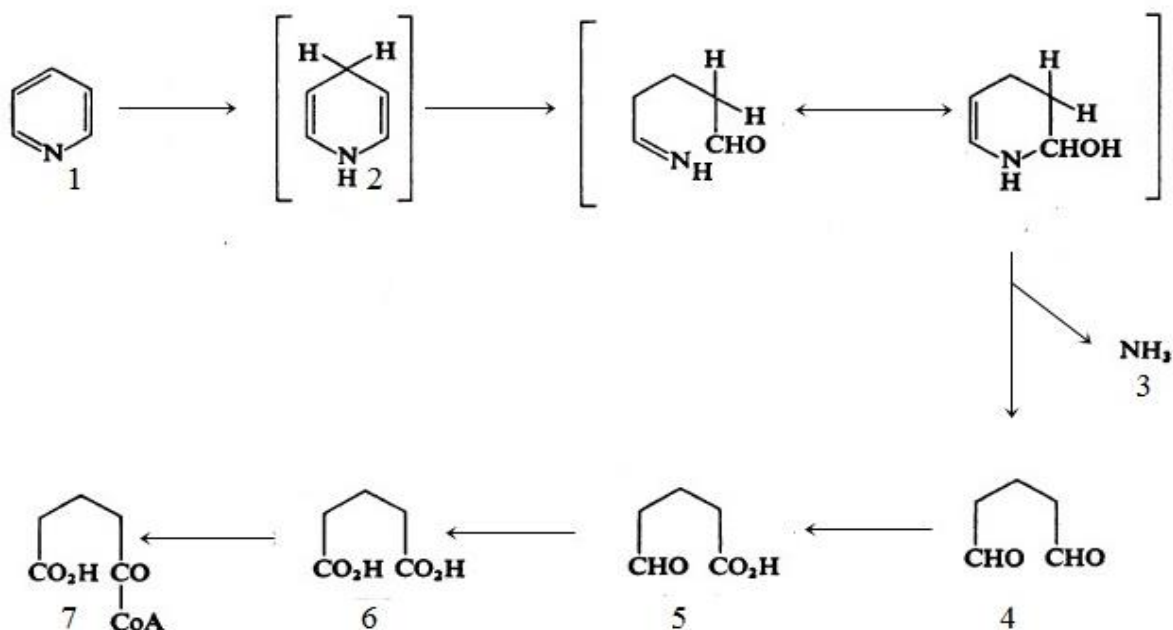


**1.3.1 pav.** Piridino skaidymas *Bacillus* sp. 4 bakterijose. 1 – piridinas; 2 – 1,4-dihidropiridinas; 3 – 4-(*N*-formil)-amino-buten-3-eno-1-aldehidus; 4 – 4-(*N*-formil)-amino-buten-3-enoinė rūgštis; 5 – formamidas; 6 – amoniakas; 7 – skruzdžių rūgštis; 8 – gintaro rūgšties pusiau aldehidus; 9 – gintaro rūgštis. Laužtiniuose skliaustuose nurodyti hipotetiniai tarpiniai junginiai (Watson ir Cain, 1975).

Shukla (1973) iš dirvožemio išskyrė *Corynebacterium* sp. ir *Brevibacterium* sp. bakterijas, galinčias skaidyti piridiną. Šiuos mikroorganizmus auginant su piridinu, jie

nesugeba skaidyti monohidroksilintų piridinių (Shukla, 1973). Vykstant piridino skaidymui iš dirvožemio išskirtose *Corynebacterium* sp. bakterijose, į terpę išskiriama skruzdžių rūgštis ir amoniakas. Terpėje esant slopikilio – pusiau karbazido, kaip tarpinis produktas susiformuoja gintaro rūgšties pusiau aldehidas (Shukla ir Kaul, 1974). Panašūs rezultatai gauti ir tiriant piridino skaidymą *Brevibacterium* sp. Kai terpėje yra inhibitorius arsenitas, kaip tarpiniai produktai susidaro gintaro rūgšties pusiau aldehidas ir piruvo rūgštis (Shukla ir Kaul, 1975). Piridino skaidymo tyrimai *Micrococcus luteus* parodė, kad šiame kamiene skaidymas vyksta tuo pačiu keliu kaip ir *Bacillus* sp. 4 bakterijose (Sims et al., 1986). Taigi, piridino skaidymas *Corynebacterium* sp. (Shukla ir Kaul, 1974), *Brevibacterium* sp. (Shukla ir Kaul, 1975) ir *Micrococcus luteus* (Sims et al., 1986) vyksta pagal Watson ir Cain pasiūlytą mechanizmą (1.3.1 pav.).

Nustatyta, kad vykstant piridino skaidymui *Nocardia* sp. Z1 hidroksilinti piridino dariniai nesusidaro (Houghton ir Cain, 1972). Šiose bakterijose piridinas visų pirma yra redukuojamas iki 1,4-dihidropiridino (1.3.2 pav.). Tuomet vyksta hidrolitinis žiedo skėlimas tarp antro anglies atomo ir heterociklinio N atomo (Watson ir Cain, 1975).



**1.3.2 pav.** Piridino skaidymas *Nocardia* sp. Z1 bakterijose. 1 – piridinas; 2 – 1,4-dihidropiridinas; 3 – amoniakas; 4 – glutaro dialdehidas; 5 – glutaro rūgšties pusiau aldehidas; 6 – glutaro rūgštis; 7 – glutaril-CoA. Laužtiniuose skliaustuose nurodyti hipotetiniai tarpiniai junginiai (Watson ir Cain, 1975).

Susidaręs junginys deamininamas iki glutaro dialdehido. Toliau vyksta oksidacijos reakcijos, kurių metu susidaro glutarato pusiau aldehidas, glutaratas ir galiausiai glutaril-CoA, kuris yra verčiamas į acetil-CoA. Skaidymo reakcijose dalyvauja piridinu indukuojami

fermentai – nuo NAD priklausoma glutaro rūgšties dehidrogenazė ir izocitrazė (Watson ir Cain, 1975).

Shukla ir Kaul iš dirvožemio išskyrė *Nocardia* sp. bakterijas, kurios gali skaidyti piridino-N-oksidadą (PNO), 2-hidroksipiridiną (2-HP) ir piridiną. Šiame mikroorganizme utilizuojant PNO, susidaro 2-HP, tačiau nei vienas iš šių junginių kaip tarpinis produktas nesusidaro piridino skaidymo metu. Kai terpėje yra slopiklio pusiau karbazido, skaidant piridiną susidaro gintaro rūgšties pusiau aldehidas (Shukla ir Kaul, 1986). Taigi skirtingai nei *Nocardia* sp. Z1, šiose *Nocardia* sp. bakterijose piridinas skaidomas kaip ir *Bacillus* sp. 4, vykstant pradiniam žiedo skėlimui tarp antro ir trečio anglies atomų (1.3.1 pav.).

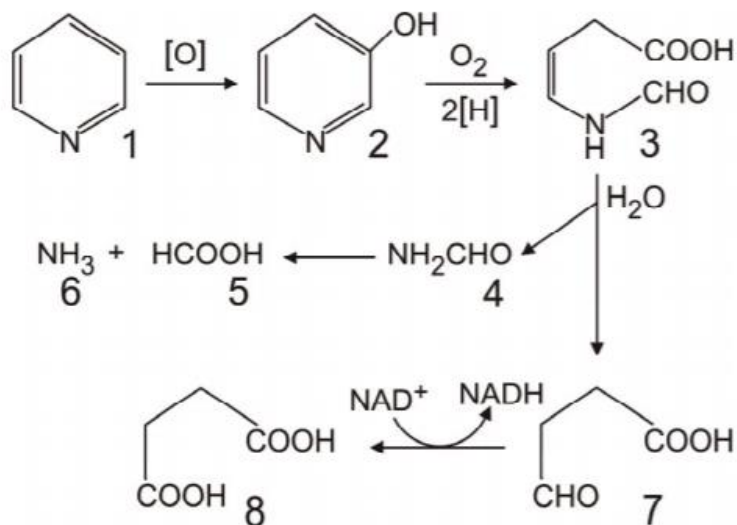
Iš pramonės nuotekų išskirtos denitrifikuojančios *Azoarcus* sp. pF6 bakterijos geba skaidyti piridiną tiek aerobinėmis, tiek anaerobinėmis sąlygomis. Auginant su piridinu ląstelės ir jų ekstraktai nesugeba skaidyti 2-, 3- ir 4-hidroksipiridinių, bei 2,3-, 2,4- ir 2,6-dihidroksipiridinių. Nustatyta, kad hidroksilinti piridino dariniai pF6 bakterijose kaip tarpiniai piridino skaidymo junginiai nesusidaro. Tiek aerobinio, tiek anaerobinio piridino skaidymo metu yra indukuojami izocitrazė bei glutaro rūgšties dialdehido dehidrogenazė. Šie rezultatai leidžia teigti, jog pF6 bakterijose piridino skaidymas vyksta tuo pačiu keliu kaip *Nocardia* sp. Z1 (1.3.2 pav.) (Rhee et al., 1997).

*Nocardia* sp. Z1, *Bacillus* sp. 4, *Brevibacterium* sp., *Corynebacterium* sp. ir *Micrococcus luteus* bakterijos nesugeba augti ant monohidroksipiridinių ir šių ląstelių ekstraktai negali oksiduoti mono- ir di-hidroksipiridinių (Shukla ir Kaul, 1974, Shukla ir Kaul, 1975, Watson ir Cain, 1975, Sims et al., 1986).

### 1.3.2 Piridino skaidymo keliai vykstant žiedo hidroksilinimui

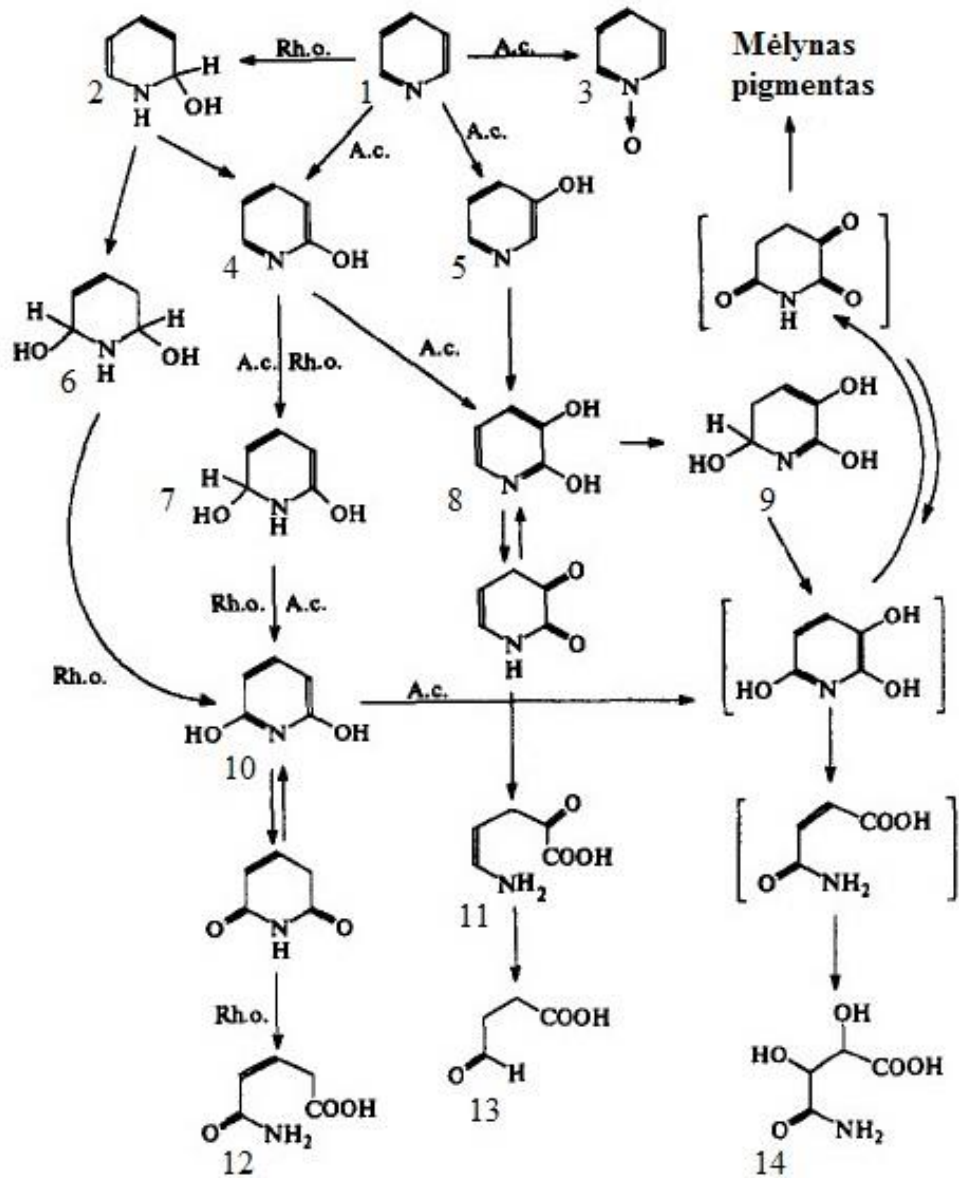
Ankstesniuose tyrimuose tarp piridino skaidymo produktų nebuvo pastebėta hidroksipiridinių (Fetzner, 1998). Korosteleva su kolegomis (1981), tyrinėjant *Nocardia* sp. KM-2, nustatė, jog šiame kamiene, vykstant piridino skaidymui, susidaro 3-hidroksipiridinas (1.3.3 pav.). Tolimesnių reakcijų metu, piridinas suskaidomas iki gintaro rūgšties ir amoniako (Korosteleva et al., 1981).





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

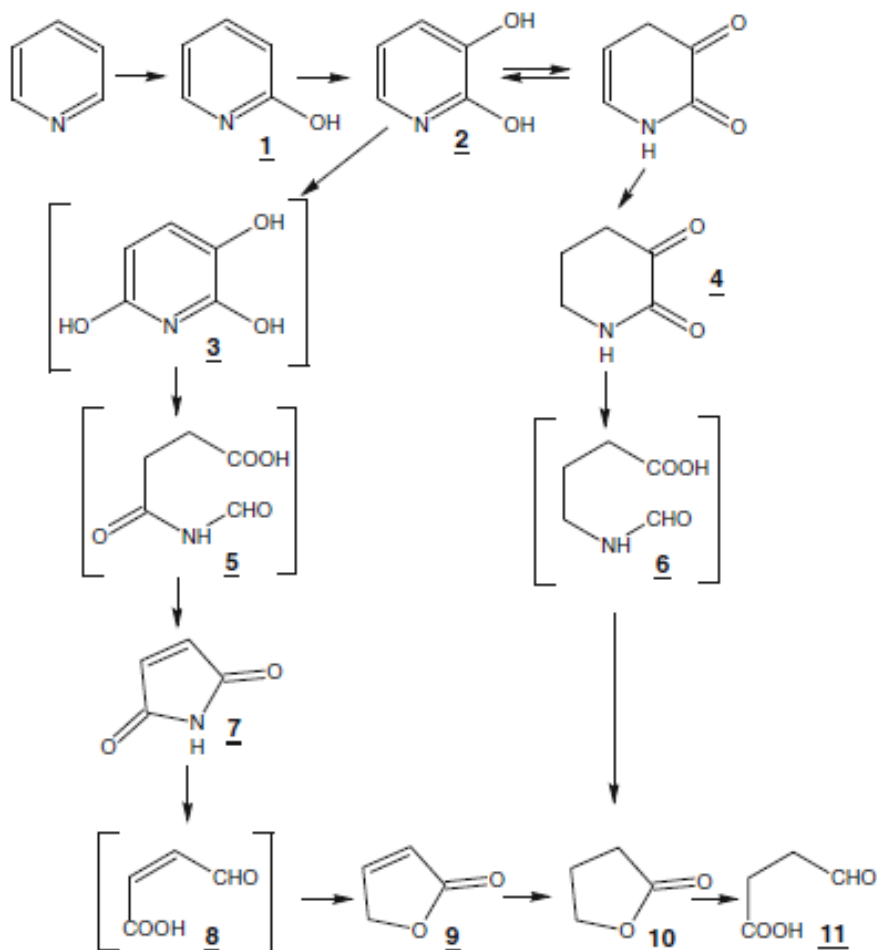
Zefirov ir kiti (1994), tyrė iš dirvožemio išskirtas *Arthrobacter crystallopoietes* ir *Rhodococcus opacus* bakterijas, gebančias skaidyti piridiną. Panaudojant UV ir IR spektroskopiją, bei dujų chromatografiją/masių spektrometriją paaiškėjo, kad skaidant piridiną susidaro hidroksilinti piridino tarpiniai junginiai. *A. crystallopoietes* bakterijose piridinas visų pirma hidroksilinamas ties trečiu anglies atomu (1.3.4 pav.). Tuomet 3-hidroksipiridinas yra toliau oksiduojamas iki 2,3-dihidroksipiridino. Toliau vyksta hidrolitinis žiedo skėlimas, susiformuojant 5-amino-2-okso-4-pentenoinei rūgščiai bei gintaro rūgšties pusiau aldehydai. Aptiktas tarpinis junginys – 2,6-dihidroksipiridinas parodo, kad hidroksilinimas gali vykti ir kitokiu eiliškumu, tuomet susidaro trihidroksipiridinas. Šis junginys verčiamas į vyno rūgšties monoamidą arba iš jo susidaro mėlynas pigmentas. *R. opacus* kamiene skaidant piridiną susidaro 2-hidroksipiridinas, kuris oksiduojamas iki 2,6-dihidroksipiridino (1.3.4 pav.). Toliau vyksta hidrolitinis žiedo skėlimas ir susidaro 3-pentanoinė rūgštis (Zefirov et al., 1994).



**1.3.4 pav.** Piridino skaidymas *Arthrobacter crystallopoietes* (A.c.) ir *Rhodococcus opacus* (Rh.o.) bakterijose. 1 – piridinas; 2 – 2-hidroksi-1,2-dihidropiridinas; 3 – piridino-N-oksidas; 4 – 2-hidroksipiridinas; 5 – 3-hidroksipiridinas; 6 – 2,6-dihidroksi-1,2,3,6-tetrahidropiridinas; 7 – 2,6-dihidroksi-1,2-dihidropiridinas; 8 – 2,3-dihidroksipiridinas; 9 – 1,2-dihidro-2,5,6-trihidroksipiridinas; 10 – 2,6-dihidroksipiridinas; 11 – 5-amino-2-okso-4-pentanoinė rūgštis; 12 – 3-pentanoinės rūgšties monoamidas; 13 – gintaro rūgšties pusiau aldehidas; 14 – vyno rūgšties monoamidas. Galimi tarpiniai junginiai nurodyti laužtiniuose skliaustuose (Zefirov et al., 1994).

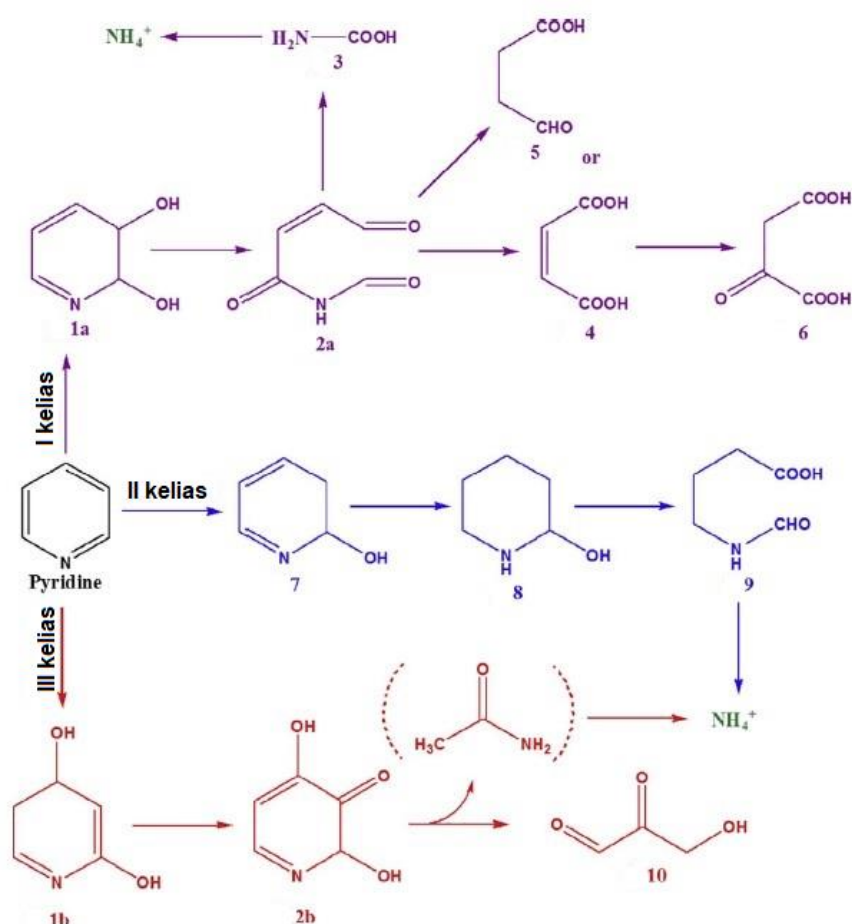
Iš dirvožemio išskirtos *Arthrobacter* sp. KM-4 bakterijos, galinčios skaidyti piridiną, 2-metilpiridiną, 4-metilpiridiną ir 2,6-dimetilpiridiną. Pritaikius dujų chrmoatografiją/masių spektrometriją ir identifikavus tarpinius metabolitus, buvo pasiūlytas naujas, prieš tai nežinomas piridino skaidymo kelias šiose bakterijose (1.3.5 pav.) (Khasaeva et al., 2011).

Pradinėje reakcijoje piridinas yra hidroksilinamas iki 2-hidroksipiridino (1.3.5 pav). Toliau šis junginys hidroksilinamas trečioje žiedo pozicijoje. Dalis susidariusio 2,3-dihidroksipiridino yra hidroksilinama iki 2,3,6-trihidroksipiridino, o kita dalis vykstant C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> dvigubo ryšio redukcijai, formuoja piperidindioną. Tolesnėse reakcijose skeliamas 2,3,6-trihidroksipiridino ryšys tarp antro ir tečio anglies atomo ir susidaro 4-formilamino-butano rūgštis. Atskeliant vieną anglies atomą, vyksta ciklizacija, ir susiformuoja 2,5-pirolidionas. Toliau, manoma, kad susidaro maleino rūgšties pusiau aldehydas, o iš jo furanonas-2, kuris redukuojamas iki butriolacetono. Vykstant tolesnei redukcijai, formuojasi gintaro rūgšties pusiau aldehydas. Manoma, kad šis junginys taip pat pat formuojasi ir iš piperidindiono (Khasaeva et al., 2011).



**1.3.5 pav.** Piridino skaidymas *Arthrobacter* sp. KM-4 bakterijose. 1 – 2-hidroksipiridinas; 2 – 2,3-dihidroksipiridinas; 3 – 2,3,6-trihidroksipiridinas; 4 – piperidin-2,3-dionas; 5 – 4-formilamino-butano rūgštis; 6 – 4-formilamino-4-oksobutano rūgštis; 7 – 2,5-pirolidionas; 8 – maleino rūgšties pusiau aldehydas; 9 – furanonas-2; 10 – butirolaktonas; 11 – gintaro rūgšties pusiau aldehydas. Galimi tarpiniai junginiai nurodyti laužtiniuose skliaustuose (Khasaeva et al., 2011).

Wang ir kiti išskyrė piridiną skaidančias *Paracoccus* sp. NJUST30 bakterijas iš nuotekų valymo bioreaktoriaus aerobinių granulių. Susidarę tarpiniai skaidymo junginiai buvo identifikuoti taikant tandeminę skysčių chromatografiją ir masių spektrometriją. Remiantis gautais rezultatais, pasiūlyti 3 galimi piridino skaidymo keliai šiose bakterijose (1.3.6 pav.) (Wang et al., 2018).



**1.3.6 pav.** Piridino skaidymo kelias *Paracoccus* sp. NJUST30 bakterijose. 1a – 2,3-dihidroksipiridinas; 1b – 2,4-dihidroksipiridinas; 2a – N-(1,4-okso-but-1-enil)-formamidas; 2b – 2,4-dihidroksi-2H-piridino-3-onas; 3 – karbamo rūgštis; 4 – maleino rūgštis; 5 – gintaro rūgšties pusiau aldehidas; 6 – 2-karbonil-gintaro rūgštis; 7 – 2-hidroksipiridinas; 8 – piperidin-2-olis; 9 – 4-formilamino-sviesto rūgštis; 10 – 3-hidroksi-2-okso-propionaldehidas (Wang et al., 2018).

Pradiniame žingsnyje vyksta piridino žiedo hidroksilinimas, susidarant 2-hidroksipiridinui arba 2,3- ar 2,4-dihidroksipiridinui. Pirmame kelyje toliau vyksta C-C ryšio tarp dviejų hidroksilintų anglies atomų skėlimas ir oksidacija. Susidaręs N-(1,4-okso-but-1-enil)-formamidas toliau skeliamas tarp C ir N atomų ir susiformuoja maleino rūgštis arba gintaro rūgšties pusiau aldehidas, tuo pačiu metu atskylant karbamo rūgščiai. Maleino rūgšties C=C

ryšys toliau oksiduojamas ir susiformuoja 2-karbonil-gintaro rūgštis. Kitame galimame *Paracoccus* sp. NJUST30 piridino skaidymo kelyje, pradinėje reakcijoje hidroksilinamas C1 piridino atomas, susidarant hidroksipiridinui. Toliau vyksta C=C ir C=N ryšių hidrinimas iki piperidin-2-olio. Susiformavęs junginys oksiduojamas iki 4-formilamino sviesto rūgštis. Trečiame skaidymo kelyje, piridinas hidroksilinamas iki 2,4-dihidroksipiridino, kuris toliau karbonilinamas ties antru anglies atomu susiformuojant 2,4-dihidroksi-2H-piridino-3-onui. Pastarasis vykstant C-N ryšio skilimui transformuojamas į 3-hidroksi-2-okso-propionaldehidą. Azoto grupė pašalinama acetamido forma (Wang et al., 2018).

Piridino skaidymas tyrinėjamas jau daugelį metų, tačiau tikslus žiedo skėlimo mechanizmas išlieka neaiškus. Yra pasiūlyti du pagrindiniai piridino skaidymo mechanizmai. Viename iš jų pradiniam žingsnyje vyksta hidroksilinimo reakcijos, po kurių seka redukcija, kitame piridino žiedas yra hidrinamas, nesusiformuojant hidroksipiridinams (Fetzner, 1998). Daugeliu atveju piridinas skaidomas iki gintaro rūgštis pusiau aldehido, gintaro rūgštis, arba glutaro rūgštis.

#### 1.4 Ksenobiotinių medžiagų skaidyme dalyvaujantys genai

Ksenobiotinės medžiagos – tai žmonių sukurtos sintetinės dažniausiai aromatinės medžiagos, sunkiai skaidomos gamtoje (Lodha et al., 2008). *Rhodococcus* genties bakterijų gebėjimas panaudoti kenksmingus junginius yra susijęs su bakterijų tolerantiškumu šiems substratams. Pagrindinis faktorius lemiantis šį prisitaikymą – didžiulė genetinė įvairovė. *Rhodococcus* sp. RHA1 genomo analizė, parodė, kad kataboliniai genai yra išsidėstę chromosomoje ir trijose didelėse linijinėse plazmidėse. Aptiktos 6 žiedą hidroksilinančios dioksigenazės ir 10 citochromų P450. Toks homologų paplitimas galėtų paaiškinti kaip bakterijos prisitaiko katabolizuoti tokį platų substratų spektrą. *Rhodococcus aetherovorans* I24 ir *R. erythropolis* PR4 genomuose taip pat aptinkami daugybiniai genų homologai (Larkin et al., 2005).

Manoma, kad *Rhodococcus* genties bakterijose aptinkamos didelės linijinės plazmidės dalyvauja genų pernašoje ir rekombinacijoje. Genų duplikacijos, transpozabilūs elementai, didelis rekombinacijos dažnis ir *Rhodococcus* genties polinkis kaupti genus prisideda prie didelio katabolinių genų homologų išsidėstymo chromosomoje ir plazmidėse (Larkin et al., 2005).

Dažniausiai aromatinių junginių kataboliniai genai yra išsidėstę genų klasteriais, kuriuose taip pat yra reguliaciniai ir už transportą atsakingi genai ir kai kuriais atvejais eflukso pompas koduojantys genai. Medžiagos patekimas į ląstelę ir indukuojama katabolinių genų

raiška yra svarbūs reguliaciniai elementai, kurie lemia skaidymo kelio efektyvumą. Skaidymo valdymą transkripciniame lygmenyje vykdo reguliaciniai baltymai (aktyvatoriai ir represoriai), kurių struktūra ir veikimo mechanizmai yra labai įvairūs. Jie išsivystė nepriklausomai nuo katabolinių genų (Jiménez et al., 2010).

### 1.5 Piridino skaidyme dalyvaujantys baltymai

Nors ir atrasta nemažai piridiną galinčių skaidyti mikroorganizmų, tačiau labai nedaug žinoma apie skaidyme dalyvaujančius fermentus ir jų funkcijas. *Rhodococcus* genties bakterijų proteome aptinkamas platus spektras monooksigenazių ir dioksigenazių (Larkin et al., 2005). Nustatyta, kad šie fermentai dalyvauja aromatinių junginių su pakeistomis šoninėmis grupėmis (Karlson et al., 1993), tiokarbamatų ir atrazino skaidyme (Nagy et al., 1995).

#### 1.5.1 Flavino monooksigenazės

Nuo flavino priklausomos monooksigenazės dalyvauja daugybėje biologinių procesų. Dauguma šių fermentų atlieka pagrindinę funkciją natūralių ir antropogeninių junginių katabolizme, kiti prisideda prie vitaminų, antibiotikų ir hormonų biosintezės. Nuo flavino priklausomos monooksigenazės katalizuoja vieno molekulinio deguonies atomo įterpimą į substratą, o antras deguonies atomas yra redukuojamas iki vandens (Huijbers et al., 2014). Deguonies aktyvacija šiuose redokso fermentuose susijusi su laikinai stabilus C4a-deguonies adukto formavimusi (Masey, 1994). Flavino monooksigenazės katalizuoja hidroksilinimo, Baeyer-Villiger oksidacijos, sulfoksidacijos, epoksidacijos bei halogeninimo reakcijas (van Berkel et al., 2006).

Pagal IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) nomenklatūros komiteto rekomendacijas, nuo flavino priklausomos monooksigenazės yra priskiriamos oksireduktazių 1.13 ir 1.14 subklasėms (Huijbers et al., 2014). Tai didžiausia flavofermentų šeima (Macheroux et al., 2011). Remiantis struktūrinėmis ir funkcinėmis savybėmis, šie fermentai skirstomi į 8 grupes. A-B grupių monooksigenazės (EC 1.4.13) sudarytos iš vienkomponenčių fermentų, kurie naudoja NAD(P)H kaip išorinį elektronų donorą. C-F grupių monooksigenazėms (EC 1.14.14) reikia reduktazės, kuri dalyvauja redukuoto flavino pernašoje. G ir H grupės (EC 1.13.12) sudarytos iš vidinių monooksigenazių, kurios redukuoja flavino kofaktorių vykstant substrato oksidacijai (Huijbers et al., 2014).

Tiesioginė reakcija tarp organinio junginio anglies atomo ir deguonies yra negalima, tačiau nemaža dalis fermentų panaudoja molekulinį deguonį kaip substratą organinio junginio oksidacijai. Tokiai reakcijai vykti reikalingas aktyvuotas molekulinis deguonis, kad jis būtų

pernešamas, monooksigenazės dažnai naudoja pereinamuosius metalus, prijungtus, arba neprijungtus, prie organinio kofaktoriaus (pvz. hemos P450 monooksigenazėse). Nuo flavino priklausomos monooksigenazės naudoja tik organinį kofaktorių oksidacijos reakcijoms (van Berkel et al., 2006). Flavino kofaktorius turi būti redukuotos formos, kad galėtų reaguoti su molekulinio deguonimi. Toks daug elektronų turintis tarpinis junginys gali panaudoti molekulinį deguonį kaip substratą (Massey, 1994). Vykstant elektrono perdavimui nuo redukuoto flavino deguoniui, formuojamas superoksido ir flavino radikalo kompleksas. Daugumoje flavino monooksigenazių formuojasi kovalentinis aduktas tarp flavino C4a ir molekulinio deguonies, susidarant reaktyviam C4a-hidroperoksiflaviniui. Toks peroksiflavinas yra nestabilus ir paprastai skyla į vandenilio peroksidą ir oksiduotą flaviną (van Berkel et al., 2006), tačiau flavino monooksigenazės sugeba C4a-hidroperoksiflaviną stabilizuoti ir šis gali oksiduoti substratą (Entsch ir van Berkel, 1995). Priklausomai nuo peroksiflavino protonizacijos lygio, vyksta arba elektrofilinė, arba nukleofilinė substrato ataka ir vienas deguonies atomas yra įterpiamas į substratą, o kitas redukuojamas iki vandens (van Berkel et al., 2006).

#### 1.5.2 Flavino monooksigenazės ir reduktazės dviejų komponentų sistema

Redukuoti flavofermentai reaguoja su deguonimi. Daugumai tokių fermentų tai yra žalinga pašalinė reakcija ir dažnai yra slopinama pačių baltymų, tačiau monooksigenazės ir oksidazės evoliucionavo taip, kad galėtų panaudoti deguonį kaip fiziologinį substratą. Monooksigenazės ir reduktazės dviejų komponentų sistema sudaryta iš dviejų atskirų fermentų. Skirtingai nei vienkomentėse sistemose, čia flavinas yra labiau substratas nei prostetinė grupė. Flavinas yra redukuojamas reduktazės, perduodamas monooksigenazei ir tuomet oksiduoja substratą (Palfey ir McDonald, 2010). Pati reduktazė gali būti flavoproteinas, kurio prostetinė grupė yra redukuojama piridino nukleotido ir oksiduojama flavino substrato – tai II klasės reduktazės. Reduktazė taip pat gali būti ir paprastas polipeptidas kuris katalizuoja reakciją tarp piridino nukleotido ir flavino substrato. Tokios reduktazės priskiriamos I klasės reduktazėms (Tu, 2001).

Skirtingai nei vienkomentėse sistemose, dvikomponentėse sistemose redukuotas flavinas turi būti perduodamas nuo reduktazės monooksigenazei. Galimi du šio proceso mechanizmai. Viename iš jų redukuotas FMN gali būti pernešamas laisvos difuzijos būdu (Tinikul et al., 2013). Kitame redukuotas FMN tiesiogiai perduodamas nuo reduktazės monooksigenazei. Vykstant tiesioginiam redukuoto flavino perdavimui, jis yra apsaugomas nuo nefermentinės reakcijos su deguonimi (Tu, 2001). Laisvas flavinas su deguonimi reaguoja

sąlyginai lėčiau nei pasiekia monooksigenazę laisvosios difuzijos būdu, todėl gamtoje egzistuoja abu mechanizmai (Palfey ir McDonald, 2010). Reduktazė dažniausiai turi didesnį afiniškumą oksiduotai FMN formai nei redukuotai, o monooksigenazė atvirkščiai (Ukaegbu et al., 2010). Flavinui prisijungus prie monooksigenazės, jis reaguoja su molekulinio deguonimi prieš prisijungiant tiksliniam substratui (Sucharitakul et al., 2006). Substratui prisijungus, jis yra oksiduojamas, iš hidrosiflavino pašalinamas vanduo (taip susidaro oksiduotas produktas bei flavinas) ir yra regeneruojama laisva monooksigenazė (Crozier-Reabe ir Moran, 2012).

### 1.5.3 Amidohidrolazė

Amidohidrolazių superšeimos (AHS) fermentai turi  $(\beta/\alpha)_8$  statinaitės struktūrinę klostę ir katalizuoja nuo metalo priklausomas hidrolizės reakcijas (Williams et al., 2006). Priklausomai nuo fermento, amidohidrolazės gali hidrolizuoti C-O, P-O, P-S, C-N, C-S ir C-Cl ryšius (Jackson et al., 2005, Shapir et al., 2006, Elias et al., 2008, Khurana et al., 2009, Duarte et al., 2011). Daugumoje AHS fermentų yra aptinkamos vienbranduolės arba dvibranduolės metalų prisijungimo sritys (Seibert ir Raushel, 2005), tačiau neseniai atrasta fermentų turinčių tribranduolį metalo kofaktorių, arba išvis neturinčių metalo kofaktorių (Liu ir Huo 2014). Metalų jono(ų) funkcija katalizėje varijuoja, priklausomai nuo hidrolizuojamo substrato ir paties fermento (Gerlt ir Babbitt, 2001, Babbitt et al., 2010). Vienas arba du metalai mažina katalitinės vandens molekulės pKa ir taip padeda susidaryti nukleofiliniam hidroksidui (Liaw et al., 2003). Antrasis metalas gali poliarizuoti substratą tiesiogiai, dažnai ties karboniliniu ar fosforiliniu ryšiu, arba stabilizuoja pereinamosios būsenos neigiamą krūvį (Jackson et al., 2008; Liao et al., 2008).

Amidohidrolazių superšeimos fermentai yra skirstomi į 9 subtipus pagal specifinius prie metalo prisirišančius ligandus konservatyviuose vienbranduolių ir dvibranduolių metalų jungimosi srityse (Sugrue et al., 2015). Subtipai I, II ir VI turi dvibranduolę metalo prisirišimo sritį, kuriai būdingas jungiamasis ligandas (paprastai glutamato arba karboksilinto lizino aminorūgštys) koordinuojantis abu  $M_\alpha$  ir  $M_\beta$  metalo jonus (Buchbinder et al., 1998, Benning et al., 2001, Nitani et al., 2002). Vienbranduoliai metalų rišantys ligandai yra įvairesni, metalo jonas gali būti išdėstomas tiek ties  $M_\alpha$ , tiek ties  $M_\beta$  sritimis ir yra būdingi III, IV, V, VI, VII ir IX subtipams (Seibert ir Raushel, 2005). VIII subtipui priklausantiems fermentams būdingas Asn-Xaa-His motyvas, tačiau nežinoma motyvo funkcija ir fermento veikimo mechanizmas. Nustatyta, kad I, VIII ir IX subtipų fermentai dalyvauja aplinkoje aptinkamų ksenobiotinių medžiagų hidrolizėje (Sugrue et al., 2015).



Nukleofilinė vandens molekulė yra aktyvuojama sudarydama kompleksą su vienbranduoliu arba dvibranduoliu metalo centru. Dvibranduoliuose metalo centruose karbonil- ir fosforil- grupės yra poliarizuojamos per Lewiso rūgščių katalizę, sudarant kompleksą su  $\beta$  metalo jonu, o tirpiklio molekulė nukleofilinei atakai yra aktyvuojama  $\alpha$  metalo jono. Vienbranduoliuose metalo centruose substratai yra aktyvuojami vykstant protonų pernašai iš aktyvaus fermento centro, o vandens molekulė aktyvinama vykstant metalo ligacijai ir bendrajai šarminei katalizei (Seibert ir Raushel, 2005).

*Rhodococcus* genties bakterijos yra plačiai paplitusios aplinkoje ir sugeba išlikti net ir nepalankiomis sąlygomis. Viena iš pagrindinių prisitaikymo strategijų – nepaprastai didelė katabolinių fermentų įvairovė, dėl kurių šie mikroorganizmai sugeba skaidyti ir panaudoti įvairius organinius junginius kaip pagrindinį anglies ir energijos šaltinį. Piridinas yra vienas iš pagrindinių aplinkos teršalų, dėl plataus šio junginio panaudojimo įvairiose pramonės šakose. Jis yra kenksmingas gyviesiems organizmams, todėl svarbu suprasti šio junginio lemtį aplinkoje. Nors ir yra atrasta nemažai mikroorganizmų galinčių skaidyti piridiną, mažai žinoma apie skaidymo reakcijose dalyvaujančius fermentus ir jų koduojamus genus. Todėl šio darbo metu buvo tiriamos piridiną skaidančios *Rhodococcus rhodochrous* PY11 bakterijos skaidymo procese dalyvaujantys genai bei jų koduojami baltymai.

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Reagentai

Reagentai	Gamintojas
5-bromo-4-chloro-indolil- $\beta$ -Dgalaktopiranozidas (X-gal), izopropil- $\beta$ -Dgalaktopiranozidas (IPTG), T4 ligazė, Proteinazė K, restrikcijos endonukleazės, DNR išskyrimo iš gelio rinkinys, plazmidžių gryninimo rinkinys, Gene Ruler DNA ladder Mix, MassRuler High Range DNA ladder – DNR molekulinų masių žymenys, Unstained Protein Molecular Weight Marker ir PageRuler Prestained Protein Ladder – baltymų molekulinų masių žymenys, Dream Taq Hot start PCR Master Mix, Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix, MgCl <sub>2</sub> , natrio acetatas, aLICator LIC Cloning and Expression Kit	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
LB, agarizuota LB, mielių ekstraktas	Oxoid, Jungtinė Karalystė
Agaras, NaOH	Merck, Vokietija
Chloroformas, lizocimas, gintaro rūgštis, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O, MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O, FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O, NaCl	Reachim, Rusija
Natrio dodecilsulfatas (NDS)	Sigma, JAV
PGR pradmenys	Metabion, Vokietija
Etanolis	Vilniaus degtinė, Lietuva
Akrilamidas, etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA), fenolio-chloroformo mišinys, stiklo rutuliukai 0,1 mm	Roth, Vokietija
Agarozė, etidžio bromidas, chloramfenikolis	Serva, Vokietija
Acto rūgštis	Chempur, Lenkija
Kanamocinas, tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris)	AppliChem, Vokietija
Piridinas, acetonitrilas	Sigma–Aldrich, Vokietija
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Girochem, Slovėnija
Amonio acetatas, glicerolis, ampicilinas, kalio acetatas, gliukozė, tetraciklinas, pusiau karbamidas	Fluka, Vokietija
Reagentai RNR skyrimui: lizės buferis, silicio oksidu dengtos magnetinės dalelės, proteazė	Roche, Šveicarija
Syto 9, reagentai RNR skyrimui: AW1 buferis, AW2 buferis	Invitrogen-Molecular Probes Qiagen, Vokietija
AT-PGR pradmenys	General Biosystems, JAV
AT-PGR pradmenys	Biologio, Olandija

## 2.2 Bakteriniai kamieniai ir plazmidės

Bakteriniai kamieniai	Genotipas, savybės	Šaltinis
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> PY11	sugeba panaudoti piridiną ir 2-hidroksipiridiną kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį	Gasparavičiūtė, 2008
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> PY11GA18	<i>Rhodococcus</i> sp. PY11 mutantas, nesugebantis skaidyti piridino ir 2-hidroksipiridino	Gasparavičiūtė, nepublikuota
<i>Escherichia coli</i> DH5α	φ80dlacZΔM15 Δ(lacZY-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) sup E44 thi-1 gyrA96 relA1	Pharmacia, JAV
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3); kamienas baltymų raiškai	Avidis, Prancūzija
<i>Escherichia coli</i> ER2566	F- λ- fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7p07 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb 210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]; kamienas baltymų raiškai	NEB, JAV
<i>Escherichia coli</i> HMS174	F- λ- recA1 hsdR(rK12- mK12+)(Rif <sup>R</sup> ); kamienas baltymų raiškai	Novagen, Vokietija
<i>Rhodococcus erythropolis</i> SQ1	lengviau transformuojamas ATCC4277– 1 bakterijų mutantas	Quan ir Dabbs, 1993
Plazmidės	Savybės, klonavimo schema	Šaltinis
pTZ57R/T	Ap <sup>f</sup> , lacZα, fl ori, PGR produktų klonavimui	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
pJet 1.2	Ap <sup>f</sup> , pUC ori, T7 pro; klonavimo vektorius	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
pACYCduet–1	Cm <sup>r</sup> , lacI, p15A ori, T7 pro, baltymų koekspresijai	Invitrogen, JAV
pET28b	Km <sup>r</sup> , lacI, T7 pro, fl ori, baltymų raiškai	Invitrogen, JAV
pLate31	Ap <sup>f</sup> , lacI, T7 pro, baltymų raiškai	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
pNit–QC1	Cm <sup>r</sup> , repAB (pRE2895), konstitutyviai rekombinantinių baltymų raiškai <i>Rhodococcus</i> spp. bakterijose	Nakashima ir Tamura, 2004
pNit–RT1	Tet <sup>r</sup> , rep (pRE8424), konstitutyviai rekombinantinių baltymų raiškai <i>Rhodococcus</i> spp. bakterijose	Nakashima ir Tamura, 2004

pET28b-MNX	Hipotetinę monooksigenazę iš <i>R. rhodochrous</i> PY11 koduojantis genas padaugintas PGR būdu naudojant MonoxN_F ir MonoxH_R pradmenis, gautas DNR fragmentas hidrolizuotas <i>NcoI</i> ir <i>HindIII</i> ir klonuotas į pET28b vektorių, paveiktą minėtomis restrikcijos endonukleazėmis	Šis darbas
pLATE31-MNX	Hipotetinę monooksigenazę iš <i>R. rhodochrous</i> PY11 koduojantis genas padaugintas PGR būdu naudojant Late31M_F ir Late31M_R pradmenis ir klonuotas į pLate31 vektorių.	Šis darbas
pLate31-ADH	Hipotetinę amidohidrolazę iš <i>R. rhodochrous</i> PY11 koduojantis genas padaugintas PGR būdu naudojant Late31N_F ir Late31N_R pradmenis ir klonuotas į pLate31 vektorių.	Šis darbas
pACYCDuet-1-FMNR	Hipotetinę flavino reduktazę iš <i>R. rhodochrous</i> PY11 koduojantis genas padaugintas PGR būdu naudojant FMNR_F ir FMNR_R pradmenis, hidrolizuotas <i>NcoI</i> ir <i>HindIII</i> ir klonuotas į pACYCDuet-1 vektorių, paveiktą minėtomis restrikcijos endonukleazėmis	Šis darbas
pACYCDuet-1-HPYE	<i>hpyE</i> genas iš <i>Arthrobacter</i> sp. PY22 klonuotas į pACYCDuet-1 vektorių	Časaitė, nepublikuota
pNitQC1-MNX	Hipotetinę monooksigenazę iš <i>R. rhodochrous</i> PY11 koduojantis genas klonuotas į pNitQC1 vektorių, konstruota taip, kaip pET28b-MNX atveju.	Šis darbas
pNitRT1-FMNR	Hipotetinę reduktazę iš <i>R. rhodochrous</i> PY11 koduojantis genas klonuotas į pNitRT1 vektorių, konstruota taip, kaip pACYCDuet-1-FMNR atveju	Šis darbas

### 2.3 PGR Pradmenys

Pradmuo	Seka 5'-3'
Monox_F	CTCCAGCAATACAGGAAGCTGCCAAC
Monox_R	CCGTCCATATCGAATACGTGCAGTCG
Nitr_F	CCTTTTCACCTCGTACTGTCCTGCC
Nitr_R	TACAGGCCACGACGACCTCGATTAC
MonoxN_F	AACGACCATGGTCAGCATCGTC
MonoxH_R	CCGGGTCAAGCTTGGAGACTCC
FMNR_F	GAAGAACCATGGCCTGTTCTGAC
FMNR_R	CCTCTCTGAAGCTTTCAGTTATCCG
Late31M_F	AGAAGGAGATATAACTATGAAGATCTGGGTCACCAC
Late31M_R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGGAGAAGCTCCGGGAGC

Late31N_F	AGAAGGAGATATAACTATGGTCGAATACACAAACACATTC
Late31N_R	GTGGTGGTGGTGGTGGTGGCCGAGGGTGGCTGTCCG
PLT_F	ACCGTCTACATCACGAGTTCGTATG
PLT_R	GTGTCACCTCGTTTGCATAGAGTC

## 2.4 RT-PGR pradmenys

Pradmuo	Seka, 5'-3'	Taikinys	Fragmen to ilgis
asr 3_F	CCCCATATGTCTTCGTTGACTCCC	Amidazė	220 nt
asr 3_R	GCTCAGTGGGTTCTCATCCGC		
asr 10_F	ATGAGTGCATTCAATTCGCATGCC	Fosfometilpiri- midino sintazė ThiC	249 nt
asr 10_R	ATCGTCGAGCAGATCCCGCT		
asr 12_F	CCTTGCATATGACCGGCTTCAGCTC	Gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazė I	231 nt
asr 12_R	GATCTCCGACCGTTCACGAGG		
asr 13_F	ATGATAGTCCAGATCAATGGGTGT	Hipotetinis baltymas	231 nt
asr 13_R	GAGGGAACGAGTGACGATGG		
asr 14_F	GTGATCTACGAGATCAGGGAGTAC	NIPSNAP šeimos baltymas	243 nt
asr 14_R	CGCTTGCTGCCATTCAGGATC		
asr 15_F	GAACCATATGTGTTCTGACAAAGCCC	FMN-reduktazė	257 nt
asr 15_R	CAGGTGGTTCGAGGACGTCTG		
asr 16_F	ATGACGACCTCCATTCCGTTTCG	Ribozės fosfato pirofosfokinazė	234 nt
asr 16_R	GGCGCTGAGGCCTTCGATGGGAT		
asr 17_F	ATGAGTAACGGGGTTCTAGTGGTC	Ribokinazė	249 nt
asr 17_R	GGTGACGTCGACACCGGA		
asr 19_F	ATGGAACCGCTCAAGATCCTCTTC	Citoplazminis baltymas	239 nt
asr 19_R	CCGATATCGGAGATGACAACACTACG		
asr 22_F	CTCCAGCAATACAGGAACTGCCAAC	Monooksigena-zė	286 nt
asr 22_R	GGTCGAGGAAACTCATCTCCG		
asr 23_F	CGTCCATATGCCCACTATCTCGG	Nikotinato fosforibozil- transferazė	217 nt
asr 23_R	CTTCGGCCTCATCGATGTCGG		
asr 24_F	GGATCCATATGATGACAAAGTTGCCG	Aldehido dehidrogenazė I	261 nt
asr 24_R	CGATATCGAGCAGCACCTGAGC		

asr 25_F	GGATCATATGAGTGAGATTGCCATAG AACACG	Amidohidrolazė I	214 nt
asr 25_R	CGTTGTCAGGTGCACGTGGC		
asr 26_F	ATGGGTACGACACAGCGTATGAC	Formiato dehidrogenazės didysis subvienetas	237 nt
asr 26_R	CCGGTGGCCTGGTGTTC		
asr 27_F	ATGGGACGAGTGACCACCC	Sulfurtransferazė FdhD	242 nt
asr 27_R	GCGCCCGTGCTGTTGCAG		
asr 28_F	ATGTCCCATTCGTTGTCATCGG	Kanalo baltymas	252 nt
asr 28_R	GATGGTGCGGTGCGAAGACG		
asr 29_F	ATGAGCATCGCCGAACCGTC	SDR oksidoreduktazė	246 nt
asr 29_R	GTCGACGTCGGATTGAGG		
asr 30_F	ATGGAGATGTTGTGTGTTCTGGG	Metabolito - protonų simporteris	254 nt
asr 30_R	GAGAACGTGGCGAAGGCG		
asr 31_F	ATGACCGCGCCACCGAAG	LuxR šeimos transkripcijos regulatorius	231 nt
asr 31_R	TCGCCGAAGACGCGGAATC		
asr 38_F	GACAGCATATGGAAACCACTGCGAC	Aldehido dehidrogenazė II	249 nt
asr 38_R	TCGTGTCGTCGCGTGACTTC		
asr 62_F	GGAGCATATGACCCACACTCTCCC	Gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazė II	240 nt
asr 62_R	GTGCGCAGTATTCGCCACG		
asr 80_F	CCTTTTCACCTCGTACTGTCCTGCC	Amidohidrolazė II	239 nt
asr 80_R	GAATTCTCGTGGTAGCGCAC		
rrs mod_F	ACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCC	16S rRNR	323 nt
rrs mod_R	CGTTGCGGGACTTAACCCAAC		

## 2.5 Terpės ir auginimo sąlygos

Terpė	Sudėtis
LB	5 g/l peptono, 5g/l NaCl, 3 g/l mielių ekstrakto
LB (agarizuota)	LB + 15 g/l agarų
EFA	10 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 4 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,5 g/l mielių ekstrakto, (0,4 g/l MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O, 10 ml/l druskų tirpalo – į terpę pridedami po autoklavavimo)
EFA (agarizuota)	EFA+ 15 g/l agarų

Druskų tirpalas	2 g/l CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O, 1 g/l MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O, 0,5 g/l FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O, viskas ištirpinta 0,1N HCl
-----------------	--

Visos terpės buvo autoklavuojamos 30 min. esant 1 atmosferos slėgiui, 121 °C temperatūroje. *Escherichia coli* DH5α, *Escherichia coli* BL21(DE3), *Escherichia coli* ER2566 ir *Escherichia coli* HMS174 bakterijos ant agarizuotų terpių buvo auginamos 37 °C temperatūroje, o *Rhodococcus rhodochrous* PY11, *Rhodococcus rhodochrous* PY11GA18 ir *Rhodococcus erythropolis* SQ1 bakterijos 30 °C temperatūroje. Skystose terpėse visų kamienų bakterijos buvo auginamos 30 °C temperatūroje aeruojant (180 aps./min).

## 2.6 Genominės DNR skyrimas

Genominė *R. rhodochrous* PY11 ir *R. rhodochrous* PY11GA18 DNR buvo skirta pagal modifikuotą Woo ir kolegų sukurtą metodiką (Woo et al., 1992). Bakterijos buvo auginamos 20 ml LB terpės per naktį 30 °C temperatūroje aeruojant (180 aps./min). Tuomet ląstelės surinktos centrifuguojant 10 min., 3220×g šaldant. Nupylus supernatantą, ląstelės resuspenduotos 4 ml TNE buferinio tirpalo ir vėl surinktos centrifuguojant minėtomis sąlygomis. Pašalinus supernatantą, ląstelės resuspenduotos 270 μl TNE buferinio tirpalo ir papildomai pridėta 270 μl TNE buferinio tirpalo, kuriame yra 2 % Triton X-100. Pridėjus sauso lizocimo (10 mg/ml), bakterijų suspensija inkubuota 30 min., 37 °C temperatūroje. Tuomet pridėta 30 μl proteinazės K ir inkubuota 2 val., 65 °C temperatūroje. Po inkubacijos gautas tirpalas nucentrifuguotas 5 min. 16100×g šaldant. Supernatantas perkeltas į švarų mėgintuvėlį ir užšaldytas. Tokiu būdu paruošta DNR naudota PGR reakcijoms.

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

## 2.7 Plamidinės DNR skyrimas

Plazmidės buvo skiriamos pagal šarminės lizės metodiką (Sambrook et al., 1989).

Naudoti tirpalai:

Šarminės lizės I tirpalas: 250 μl 40% gliukozės, 50 μl 1 M Tris-OH (pH 8,0), 20 μl 0,5 M EDTA, 680 μl H<sub>2</sub>O.

Šarminės lizės II tirpalas: 0,2 N NaOH, 1 % SDS.

Šarminės lizės III tirpalas: 7,5M amonio acetatas.

Plazmidės taip pat buvo skiriamos panaudojant GeneJET Plasmid Miniprep Kit rinkinį (Thermo Scientific) arba ZR Plasmid Miniprep™ rinkinį (Zymo research) laikantis gamintojo

rekomendacijų. Plazmidžių koncentracija nustatyta vykdant DNR elektroforezę horizontaliame agarozės gelyje, naudojant Mass Ruler DNA Ladder (High Range) molekulinės masės ir kiekio žymenį.

### **2.8 DNR elektroforezė agarozės gelyje**

DNR elektroforezė atliekama 1,0 % horizontaliame agarozės gelyje TAE buferyje, nustačius 120 V įtampą. Elektroforezė vykdoma naudojant Power station 300 (Labnet) horizontalios elektroforezės prietaisą. Po elektroforezės gelis dažomas etidžio bromido tirpalu ir analizuojamas ultravioletinėje šviesoje. DNR fragmentų molekulinės masės nustatytos naudojant Gene Ruler DNA Ladder Mix.

50 x TAE: 121 g Tris-OH, 18,6 g Na<sub>2</sub>EDTA, 28,6 ml acto rūgšties, H<sub>2</sub>O iki 500 ml.

### **2.9 Polimerazės grandininė reakcija (PGR)**

Šiame darbe PGR buvo naudojamas 2X DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix. Fragmentai, skirti klonavimui, buvo padauginti naudojant 2X Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix. Kaip matrica panaudota chromosominė DNR iš *R. rhodochrous* PY11. Reakcijos mišiniai buvo ruošiami pagal gamintojo rekomendacijas. PGR buvo atliekama Thermomixer comfort (ependorf) aparatu.

PGR programa su DreamTaq DNR polimeraze: 95 °C 3 min.; 95 °C 30 s, 55-65 30 s, 72 °C 1 min./kb – 30 ciklų; 72 °C 10min.

PGR programa su Phusion Hot Start II DNA polimeraze: 98 °C 30 s.; 98°C 10 s, 60-70 30 s, 72 °C 30 s/kb – 30 ciklų; 72 °C 10min.

### **2.10 DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio**

Tiriama DNR buvo frakcionuojama 1 % agarozės gelyje. Reikiamų dydžių fragmentai buvo išpjaunami iš gelio ir išskiriami naudojant DNR gryninimo iš gelio rinkinį laikantis gamintojo rekomendacijų.

### **2.11 DNR fragmentų klonavimas į vektorius**

PGR metu gauti DNR fragmentai buvo hidrolizuojami *NcoI* ir *HindIII* restrikcijos endonukleazėmis pagal gamintojo rekomendacijas ir klonuoti į pET28b, pACYCduet-1, pNitQC1 ir pNitRT1 raiškos vektorius, paveiktus tais pačiais hidrolizės fermentais. Ligavimo reakcija buvo atliekama kambario temperatūroje (22 °C) 1 val., arba 4 °C temperatūroje 16 val., naudojant T4 DNR ligazę. Norint inaktivuoti ligazę, reakcijos mišinys buvo kaitinamas 15 min. 65 °C temperatūroje. Atvėsintas reakcijos mišinys panaudotas bakterijų transformacijai. DNR



fragmentų klonavimas į pLATE31 raiškos vektorių atliktas panaudojant aLICator LIC Cloning and Expression Kit rinkinį, laikantis gamintojo rekomendacijų.

### **2.12 *E. coli* imliųjų ląstelių ruošimas ir elektroporacija**

*Escherichia coli* DH5  $\alpha$ , *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* ER2566 ir *E. coli* HMS174 bakterijos buvo užsėtos į 5 ml LB terpės ir augintos 15 val. 30 °C temperatūroje aeruojant (180 aps./min). Po 1 ml naktinės kultūros užsėjama į 20 ml LB terpės ir auginama 30 °C temperatūroje aeruojant (aps. 180/min.), kol optinis tankis ( $A_{600}$ ) pasiekė 0,5. Tuomet ląstelės atvėsinašamos jas 15 min. laikant ledo vonioje. Paskui ląstelės centrifuguojamos 10 min. 3220 $\times$ g šaldant. Supernatantas nupilamas ir ląstelės resuspenduojamos 10 ml 10 % šalto glicerolio tirpalo. Centrifuguojama minėtomis sąlygomis, supernatantas nupilamas ir procesas kartojamas ląsteles praplaunant su 5 ml ir 1 ml 10 % šalto glicerolio tirpalo. Užpylus 1 ml šalto 10% glicerolio tirpalo ląstelės suspenduojamos (Sharma ir Schimke, 1996). Taip paruoštos ląstelės išpilstomos į mėgintuvėlius po 100  $\mu$ l ir laikomos –80 °C temperatūroje.

Elektroporacija atliekama naudojant 100  $\mu$ l talpos Eppendorf elektroporavimo kiuvetes su 1 mm tarpu ir Electroporator 2510 Eppendorf elektroporatorių. Elektroporacijai naudojamos kiuvetės ir ląstelės atšaldomos ledo vonioje. Į 100  $\mu$ l imliųjų ląstelių dedama iki 1  $\mu$ g DNR ir kelias minutes inkubuojama ledo vonioje. Tuomet ląstelių suspensija su DNR perkeliama į atšaldytą kiuvetę. Vykdomas 4,8-5,6 ms elektros impulsas nustačius 2000 V/cm įtampą. Iškart po elektroporacijos ant ląstelių užpilama 100  $\mu$ l LB terpės ir suspensija perkeliama į mėgintuvėlį su 800  $\mu$ l LB terpės. *E.coli* bakterijos inkubuojamos 37 °C temperatūroje 45 min. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 1 min. 16000 $\times$ g ir išsėjamos ant LB terpės su atitinkamu antibiotiku (ampicilinu (100  $\mu$ g/ml), kanamicinu (40  $\mu$ g/ml), chloramfenikoliu (20  $\mu$ g/ml), tetraciklinu (10  $\mu$ g/ml)).

### **2.13 *R. erythropolis* SQ1 imliųjų ląstelių ruošimas ir elektroporacija**

*R. erythropolis* SQ1 ląstelės buvo užsėjamos į 5 ml LB terpės ir augintos 15 val. 30 °C temperatūroje aeruojant (180 aps./min). 1 ml naktinės kultūros buvo užsėjama į 20 ml LB terpės ir auginama 30 °C temperatūroje aeruojant (180 aps./min.), kol optinis tankis ( $A_{600}$ ) pasiekė 0,8. Suspensija atšaldyta 15 min. laikant ledo vonioje. Ląstelės surinktos centrifuguojant 10 min. 3220 $\times$ g šaldant, po to suspenduotos 10 ml šalto 10 % glicerolio tirpalo. Pridėjus 100  $\mu$ l lizocimo (4 mg/ml) ląstelės inkubuotos 30 °C temperatūroje 30 min. Tuomet ląstelės vėl surinktos centrifuguojant, du kartus praplautos šaltu 10 % glicerolio tirpalu ir suspenduotos 1 ml šalto 10 % glicerolio tirpalo (Gartemann ir Eichenlaub, 2001).

Elektroporacija atliekama analogiškai kaip *E. coli*. Po elektroporacijos bakterijos inkubuojamos 30 °C temperatūroje per naktį. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 1 min. 16000×g ir išsėjamos ant LB terpės su atitinkamais antibiotikais (chloramfenikoliu (20 µg/ml), tetraciklinu (10 µg/ml)) ir auginamos 30 °C temperatūroje 2 paras.

#### **2.14 Baltymų raiškos indukcija *E. coli* bakterijose**

Bakterijos užsėjamos į 5 ml LB terpės ir auginamos 30 °C temperatūroje aeruojant (180 aps./min.) per naktį. 1 ml naktinės ląstelių suspensijos sėjamas į 20 ml LB terpės ir auginama 30 °C temperatūroje aeruojant (180 aps/min..) kol optinis tankis ( $A_{600}$ ) pasiekia 0,6. Tuomet pridedamas atitinkamas IPTG kiekis (detalizuota toliau tekste) ir bakterijos auginamos 16–20 °C temperatūroje aeruojant (180 aps./min.) 18 valandų.

#### **2.15 Beląstelinio ekstrakto ruošimas**

Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min. 3220×g šaldant. Supernatantas nupilamas ir ląstelės resuspenduojamos 2 ml 50 mM kalio fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 7,2). Ląstelės ardomos 2 min. (10 s impulsas, 15 s pertrauka) SONICS vibra cell ultragarsiniu dezintegratoriumi ledo – vandens vonioje. Ardant *Rhodococcus* spp. kamienų ląsteles papildomai pridedama 500 µl 0,1 mm skersmens stiklo rutuliukų. Ląstelių nuolaužos pašalinamos centrifuguojant 10 min. 16000×g šaldant.

#### **2.16 Baltymų kiekio nustatymas**

Baltymų kiekis buvo nustatomas panaudojant Folino reagentą, pagal Lowry ir kolegų metodiką (Lowry et al., 1951).

#### **2.17 Baltymų elektroforezė**

Baltymų elektroforezė buvo vykdoma denatūruojančiomis sąlygomis, naudojant 4,5 % koncentruojantį ir 10 % skirstomąjį poliakrilamidinius gelius. Baltymai buvo dažomi Coomassie Brilliant Blue R- 250 dažu. Po dažymo gelis išblukintas 7 % acto rūgštimi. Baltymų molekulinės masės nustatytos pagal Unstained Protein Molecular Weight Marker ir PageRuler Prestained Protein Ladder – baltymų molekulinį masių žymenis. Elektroforezei naudotas Consort EV231 (Sigma – Aldrich) prietaisas.

#### **2.18 Amidohidrolazės gryninimas**

Imobilizuotų metalo jonų afininė chromatografija yra giminingumo chromatografijos metodas, paremtas pereinamųjų metalų jonų ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) giminingumu histidinui ir cisteinui vandeniniuose tirpaluose. Prie rekombinatinio baltymo esančios histidino uodegėlės

koordinaciniu ryšiu jungiasi su metalų jonais ir sudaro patvarų kompleksą su ligandais. *Rhodococcus rhodochrous* PY11 hipotetinis amidohidrolazės baltymas, turintis 6-His uodegą C gale, grynintas panaudojant agreguotos skysčių chromatografijos sistemą.

Šiuo tikslu *E. coli* BL21(DE3) bakterijos buvo transformuotos pLate31-ADH plazmide. Baltymo raiška atlikta kaip aprašyta 2.14 skyrelyje, naudojant 1 mM galutinę IPTG koncentraciją, indukcija vykdyta 20 °C temperatūroje 17 valandų. Ląstelių biomasė surinkta centrifuguojant, beląstelinis ekstraktas paruoštas kaip aprašyta 2.15 skyrelyje. Beląstelinis ekstraktas užneštas ant HiTrapIMAC FF, 1 ml nikelio kolonėlės (GE Healthcare). Specifinės sąveikos su nikelio jonais nesudarantys baltymai buvo nuplauti 50 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu (pH 7,2). Tuomet, polihistidininę uodegą turintys baltymai nuplauti 50 mM kalio fosfato buferiniu tirpalu (pH 7,2), turinčiu 0,5 M imidazolo. Amidohidrolazės baltymo grynumas patikrintas atlikus baltymų elektroforezę poliakrilamidiniame gelyje kaip nurodyta 2.17 skyrelyje. Išgryninus baltymą, daugiausiai fermento turinčios elucijos frakcijos buvo sujungtos ir įvykdyta dializė 50 mM kalio fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 7,2) (fermento ir buferio santykis – 1:100), kad būtų pašalintos nereikalingos druskos (pvz. imidazolas).

### **2.19 Amidohidrolazės reakcijos su tipiniais substratais**

Išgryninus amidohidrolazę buvo atliekamos reakcijos su tipiniais amidohidrolazių substratais: 4-nitrobenzanilidu ir 4-nitroacetanilidu. Reakcijos buvo atliekamos 96 šulinėlių mikroplokštelėje kambario temperatūroje (22 °C). Reakcijos buvo vykdomos 50 mM kalio fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 7,2) į reakcijos mišinį pridedant hipotetinės amidohidrolazės iš *Rhodococcus rhodochrous* PY11 (galutinė koncentracija reakcijos mišinyje 34 mM arba 17 mM), ir substratų 4-nitrobenzanilido arba 4-nitroacetanilido (galutinė koncentracija reakcijos mišinyje 1mM). Kontrolinės reakcijos vykdytos į reakcijos mišinį nededant amidohidrolazės. Reakcijos buvo vertinamos pagal įvykusį spalvinį pokytį (fermentui reaguojant su substratu reakcijos mišinys pagelsta).

### **2.20 Hipotetinės amidohidrolazės substratinio specifiškumo nustatymas**

Amidohidrolazę išgryninus kaip aprašyta anksčiau, per naktį buvo vykdoma reakcija kalio fosfatiniame buferiniame tirpale 50 mM (pH 7,2) su (Z)-4-formamidobut-3-enoine rūgštimi (santykis su buferiniu tirpalu 1:1), pridedant hipotetinės amidohidrolazės iš *Rhodococcus rhodochrous* PY11 (galutinė koncentracija reakcijos mišinyje 34 mM arba 17 mM). Vykstant reakcijai turėjo susidaryti gintaro rūgšties pusiau aldehidas – gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazės substratas. Šio baltymo iš *Arthrobacter* sp. 68b fermentinis

aktyvumas buvo matuojamas pagal susidariusio NADPH kiekį, vertinamą spektrofotometriškai matuojant 30 s 340 nm bangos ilgiyje. Reakcijos mišiniai buvo sudaryti iš 100 µl substrato, 10 µl NADP ir 10µl gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazės ir 880 µl 50 mM kalio fosfatinio buferinio tirpalo.

### **2.21 Biovirsmų tyrimai panaudojant intaktines ląsteles**

Piridino biovirsmų tyrimams *E.coli* BL21(DE3) bakterijos buvo transformuotos plazmidėmis: pLATE31-MNX, pLATE31-MNX ir pACYCDuet-1-HPYE, pLATE31-MNX ir pACYCDuet-1-FMNR bei atitinkamomis kontrolinėmis plazmidėmis: pET28b, pET28b ir pACYCDuet-1 ir augintos 20 ml LB terpės su atitinkamais antibiotikais 30 °C temperatūroje aeruojant (180 aps./min.) kol optinis tankis  $A_{600}$  pasiekė 0,6. Tuomet buvo pridamas 1mM IPTG ir auginama 16 valandų 20 °C temperatūroje. Ląstelės surinktos centrifuguojant iš 3 ml kultūrinio skysčio ir 3 kartus praplautos 50 mM kalio fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 7,2). Reakcija buvo vykdoma ląsteles suspendavus 1,5 ml 50 mM kalio fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 7,2). Tuomet į reakcijos mišinį buvo įdėta 0,8 mM piridino.

Biokonversijos tyrimams *Rhodococcus erythropolis* SQ1 bakterijos, transformuotos pNitQC1-MNX ir pNitRT1-FMNR bei pNitQC1 ir pNitRT1 (kontrolė) plazmidėmis buvo auginamos 20 ml LB terpės su atitinkamais antibiotikais 30 °C temperatūroje aeruojant (180 aps./min.) 16 valandų. Biovirsmų tyrimams ląstelės paruoštos kaip aprašyta anksčiau.

Paruošus reakcijų mišinius, ląstelės buvo resuspenduojamos ir nedelsiant nucentrifuguojamos 1 min. 16000×g. 100 µl supernatanto perkelta į 96 šulinėlių UV mikroplokštelę ir matuotas pradinis spektras 220 – 400 nm bangos ilgio intervale. Likęs reakcijos mišinys buvo resuspenduojamas ir inkubuojamas 30°C temperatūroje purtyklėje Thermomixer comfort (ependorf) (450 aps./min). Vėliau sugerties spektras buvo matuojamas atitinkamais laiko intervalais. Matavimams naudotas mikroplokštelių skaitytuvas ir GEN5 programinė įranga.

### **2.22 Bendrosios ląstelių RNR skyrimas**

*R. rhodochrous* PY11 bakterijos buvo auginamos 2 paras ant agarizuotos EFA terpės, su 0,1 % gintaro rūgšties. Tuomet bakterijos buvo sėjamos į 50 ml skystos EFA terpės ir auginamos indukcinėmis sąlygomis su 0,1 % piridinu, kontrolė su 0,1 % gintaro rūgštimi, kaip vieninteliu anglies šaltiniu atskirose purtyklėse 30 °C temperatūroje aeruojant (180 aps./min.). Tam tikrais laiko tarpais, kai optinis tankis ( $A_{600}$ ) pasiekė 0,5, 0,75 ir 1, atitinkamas kiekis biomasės buvo surenkamas centrifuguojant 1 min. 16000 ×g. Pašalinus supernatantą ląstelės

resuspenduotos 200  $\mu$ l lizės buferio. Po to pridėta 80  $\mu$ l proteinazės ir 160  $\mu$ l silicio oksidu padengtų magnetinių geležies oksido dalelių. Tuomet mėginiai buvo pavartomi ir inkubuojami 25 °C temperatūroje 10 min. Reakcijos mišinys centrifuguotas 10 s 16000  $\times$ g. Panaudojant magnetą, magnetinės dalelės surinktos, supernatantas pašalintas ir ant dalelių užpilta 500  $\mu$ l AW1 buferinio tirpalo. Mėgintuvėliai buvo pavartomi, centrifuguojami 10 s 16000  $\times$ g ir magnetinės dalelės vėl surenkamos kaip minėta anksčiau. Toliau užpilta 500  $\mu$ l AW2 buferinio tirpalo, mėginiai buvo pavartomi, trumpai nucentrifuguojami ir surinkus magnetines daleles, supernatantas pašalintas. Po to magnetinės dalelės džiovintos 25 °C temperatūroje 30 min. Ant išdžiovintų magnetinių dalelių buvo pridėdama 30  $\mu$ l buferinio tirpalo (23,75  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 3  $\mu$ l DNAzė I (1u/ $\mu$ l), 3  $\mu$ l 10x buferio, 0,25  $\mu$ l RNAzės inhibitorius (40u/ $\mu$ l)) išmaišoma pipetuoiant ir perkeliama į naują mėgintuvėlį. Mėginiai inkubuoti 37 °C temperatūroje 40 min. Magnetinės dalelės pašalintos panaudojant magnetą ir reakcijos mišinys perkeltas į naują mėgintuvėlį. Pridėta 3  $\mu$ l 50 mM EDTA ir 1  $\mu$ l glikogeno tirpalo. Mėginiai gerai išmaišyti pipetuoiant ir inkubuoti 65 °C temperatūroje 10 min. Po to 2 min. buvo vėsinami ir pridėta 36,66  $\mu$ l natrio acetato ir izopropanolio mišinio (3,33  $\mu$ l 3M natrio acetato ir 33,33  $\mu$ l izopropanolio). Mėginiai išmaišyti ir inkubuoti – 20 °C temperatūroje 20 min. Po to buvo centrifuguojami 5 min. 16000  $\times$ g 4 °C temperatūroje. Supernatantas pašalintas, RNR išdžiovinta 25 °C temperatūroje 20 min. ir ištirpinta 20  $\mu$ l vandens. Taip paruošta RNR buvo naudojama AT-PGR.

### 2.23 Kokybinė ir kiekybinė AT-PGR analizė

RNR, išskirta iš *R. rhodochrous* PY11 anksčiau aprašytu metodu, buvo naudojama tikro laiko atvirkštinės transkriptazės (AT) PGR analizei. AT-PGR atlikta RotorGene 6000 HRM (Corbett Research) prietaisu. Reakcija vykdyta 15  $\mu$ l reakcijos mišinio sudaryto iš: 7,5  $\mu$ l 2X Verso 1-Step qPCR Mix, 0,15  $\mu$ l Verso fermento, 0,75  $\mu$ l RT Enhancer (visi reagentai iš Verso 1-Step qRT-PCR rinkinio), po 200 mM pradmenų ir 1  $\mu$ l išskirtos RNR. Siekiant patikrinti RNR grynumą ir DNR priemaišų nebuvimą, buvo atliekama identiška reakcija be atvirkštinės transkriptazės (vietoj Verso fermento naudota Taq polimerazė).

Analizei taikyta tokia AT-PGR programa:

- 1 ciklas: 50 °C 15 min., 95 °C 15 min.
- 45 ciklai: 95 °C 15s, 60 °C 1min., 72 °C 15s.

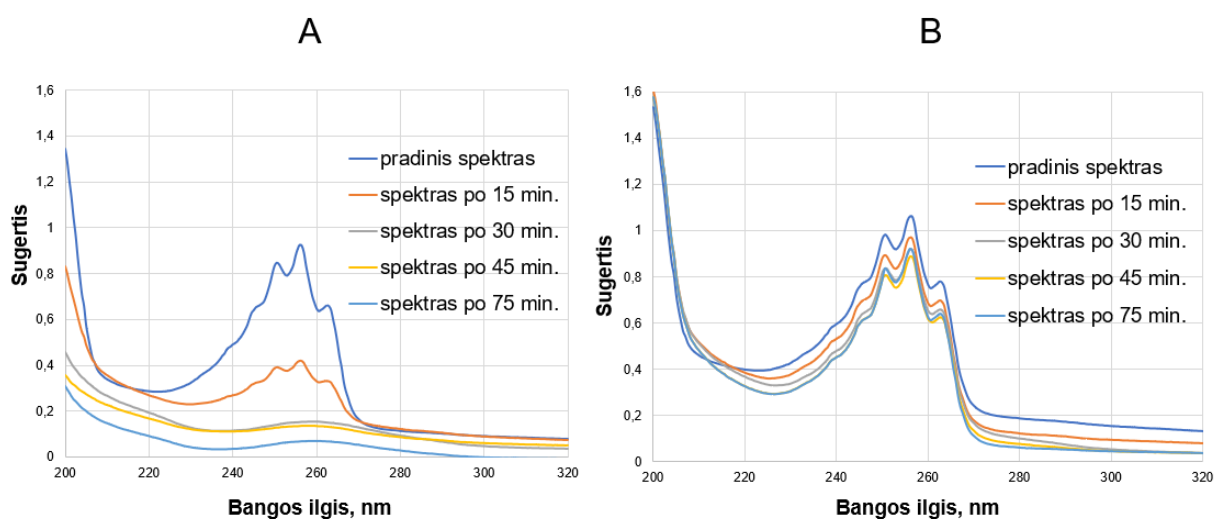
Atliekant tikro laiko AT-PGR, fluorescencija buvo matuojama po pradmenų prilydimo žingsnio. Slenkstinis ciklas ( $C_T$ ) buvo nustatytas iš amplifikavimo kreivių, naudojant slenkstinę vertę 0,035. Tiriamos RNR santykinis kiekis buvo išreikštas kaip santykis su 16S rRNR kiekiu tame pavyzdyje, apskaičiavus  $C_T$  reikšmių skirtumą tarp taikinio  $C_T$  ir 16S rRNR  $C_T$  reikšmių

ir taikant algoritmą  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Kokybinei AT-PGR analizei susidarę produktai buvo vertinami atliekant elektroforezę 1,0 % agarozės gelyje. Kalibravimui buvo pasirinktas 1 mėginys (RNR iš bakterijų augintų su piridinu).

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

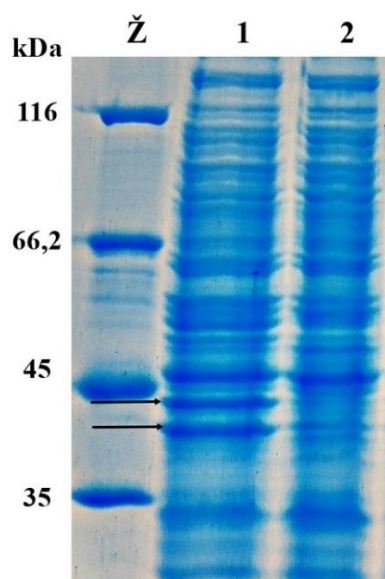
Ankstesnių Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus darbų metu iš dirvožemio buvo išskirtos *Rhodococcus rhodochrous* PY11 bakterijos, galinčios panaudoti piridiną ir 2-hidroksipiridiną kaip vienintėlį anglies ir energijos šaltinį (Gasparavičiūtė, 2008). Tyrimų metu buvo nustatyta, kad piridino ir 2-hidroksipiridino skaidymas vyksta skirtingais metaboliniais keliais. 2-Hidroksipiridino skaidymo kelias šiose bakterijose jau yra nustatytas ir ištirtas (Vaitekūnas et al., 2016). Šio darbo tikslas ištirti piridino skaidymą minėtose bakterijose.

Ankstesnio darbo metu buvo atlikti piridino biovirsimų tyrimai panaudojant intaktines *Rhodococcus rhodochrous* PY11 ląsteles. Bakterijos buvo auginamos EFA terpėje su 0,1 % piridino (optimali koncentracija) ir 0,1 % gintaro rūgšties (kontrolė) ir paruošiamos biovirsimų tyrimui kaip aprašyta 2.21 skyrelyje. Atlikus eksperimentą paaiškėjo, kad tik bakterijos, augintos su piridinu, gali jį skaidyti (3.1 pav. A), o bakterijos, augintos su gintaro rūgštimi, piridino neskaido (3.1 pav. B). Tai rodo, kad piridino skaidymas šiose bakterijose yra indukuojamas procesas.



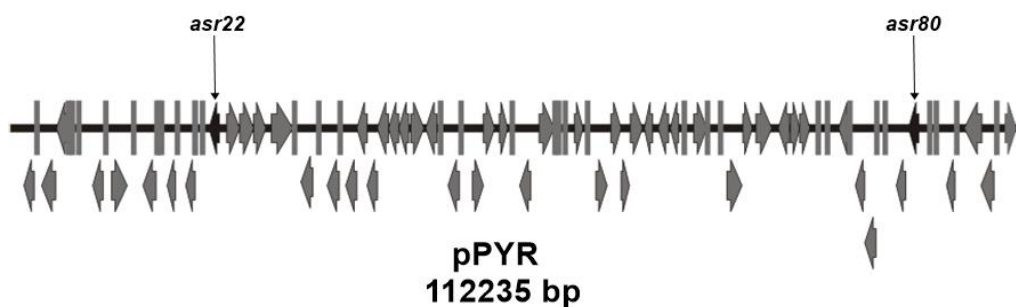
**3.1 pav.** Piridino biokonversija panaudojant *Rhodococcus rhodochrous* PY11 intaktines ląsteles. A – bakterijos, augintos EFA terpėje su piridinu; B – su gintaro rūgštimi.

Atlikus piridinu indukuojamų baltymų paiešką, paaiškėjo, kad bakterijas auginant EFA terpėje su 0,1% piridinu yra indukuojami bent 2 baltymai (~ 40 kDa ir ~ 41 kDa) (3.2 pav.). Atlikus peptidų *de novo* sekoskaitą Vilniaus universitete Biochemijos institute Proteomikos centre, buvo gautos minėtų baltymų potencialios peptidų sekos. Nustatytos aminorūgščių sekos buvo panaudotos aptikti genus, koduojančius tiriamus baltymus, dalinai nustatytame *Rhodococcus rhodochrous* PY11 genome.



**3.2 pav.** Piridinu indukuojami baltymai *Rhodococcus rhodochrous* PY11 kamieno. Baltymų analizė 10 % poliakrilamidiniame gelyje. Ž – baltymų molekulinį masių žymuo (kDa). 1 – *R. rhodochrous* PY11 bakterijos augintos su 0,1% piridinu; 2 – *R. rhodochrous* PY11GA18 bakterijos augintos su 0,1% gintaro rūgštimi. PY11GA18 – PY11 mutantas, neskaidantis piridino.

Atlikus paiešką, buvo identifikuoti 40 kDa ir 41 kDa baltymus koduojantys atviro skaitymo rėmeliai (*asr*). Nustatyta, kad piridinu indukuojamus 40 kDa ir 41 kDa baltymus atitinkamai koduoja *asr22* ir *asr80*. Jie yra išsidėstę *Rhodococcus* sp. PY11 katabolinėje plazmidėje (3.3 pav.). Manoma, kad genai yra koduojami plazmidėje, nes šio kamieno mutantas PY11GA18 nesugeba skaidyti piridino, o tai gali būti siejamas su jos praradimu. Panaudojant *asr22* ir *asr80* pradmenis, buvo atlikta PGR kaip matricą naudojant genominę DNR iš *R. rhodochrous* PY11 kamieno ir PY11GA18 mutanto. Išanalizavus PGR produktus agaroziniame gelyje, paaiškėjo, kad tiriamų genų fragmentai gauti tik tuose reakcijų mišiniuose, kuriuose naudota *Rhodococcus* sp. PY11 kamieno DNR. Taigi, tai patvirtina, kad *asr22* ir *asr80* yra greičiausiai išsidėstę pPYR katabolinėje plazmidėje.



**3.3 pav.** *R. rhodochrous* PY11 pPYR katabolinės plazmidės dalis. Pilka spalva pažymėti atviro skaitymo rėmeliai, koduojantys galimus baltymus. Juoda spalva pažymėti skaitymo rėmeliai, koduojantys hipotetinius piridinu indukuojamus 41 kDa (*asr22*) ir 40 kDa (*asr80*) baltymus.

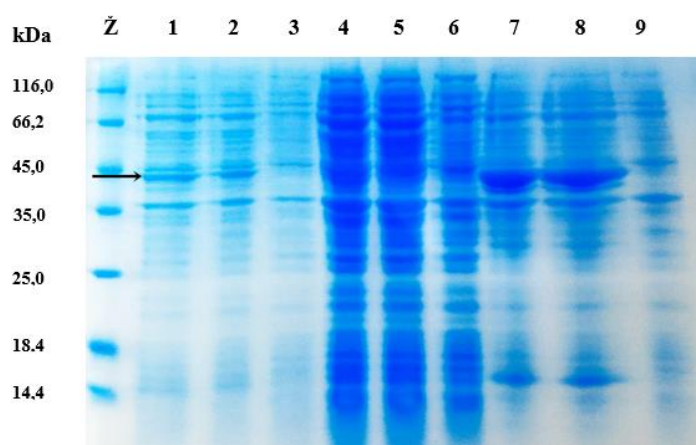


Atlikta 40 kDa ir 41 kDa baltymų homologų paieška bei filogenetinė analizė atskleidė, kad 41 kDa baltymas yra giminingiausias *Rhodococcus* sp. BUPNP1 LLM (*angl.* luciferase like monooxygenase) baltymui, kuris priskiriamas į liuciferazes panašių nuo flavino priklausomų monooksigenazių klasei, o 40 kDa *Rhodococcus* sp. Chr-9 amidohidrolazei. Žinoma, kad tiek amidohidrolazė, tiek nuo flavino priklausoma monooksigenazė dalyvauja piridino skaidymo reakcijose (Časaitė et al., nepublikuota), todėl šio darbo metu nuspręsta ištirti šių hipotetinių baltymų galimą funkciją piridino skaidymo procese *R. rhodochrous* PY11 bakterijose.

### 3.1 Hipotetinės flavino monooksigenazės raiškos optimizavimas *E. coli* bakterijose

Šio darbo metu buvo atliekama hipotetinės nuo flavino priklausomos oksidoreduktazės iš *R. rhodochrous* PY11 raiška ir piridino sunaudojimo tyrimai *E. coli* bakterijose. Šiuo tikslu buvo sukonstruota pET28b-MNX plazmidė. Kaip aprašyta 2.8 – 2.10 skyreliuose, genas buvo padaugintas PGR būdu, gautas DNR fragmentas hidrolizuotas ir klonuotas į pET28b raiškos vektorių.

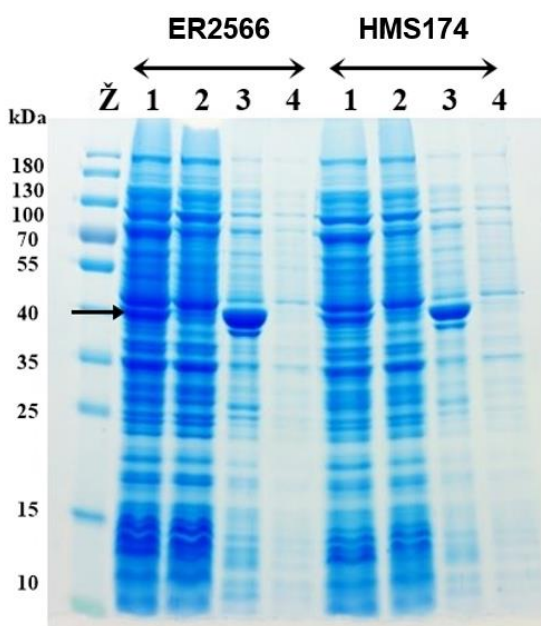
Tiriamo baltymo sintezei pET28b-MNX (plazmidė, turinti monooksigenazės geną) ir pET28b (kontrolė) plazmidės buvo transformuotos į *E. coli* BL21(DE3) bakterijas. Jos buvo auginamos kaip nurodyta 2.14 skyrelyje, naudojant skirtingas galutines induktoriaus (IPTG) koncentracijas – 0,5 mM ir 1,0 mM. Po to ląstelės buvo suardytos kaip aprašyta 2.14 skyrelyje ir baltymų sudėtis nagrinėta panaudojant jų beląstelinį ekstraktą bei buferiniame tirpale resuspenduotus netirpius baltymus ir ląstelių nuolaužas 14 % poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis elektroforezės būdu (3.1.1 pav.).



**3.1.1 pav.** Baltymų raiška *E. coli* BL21 (DE3) bakterijose. Ž - baltymų molekulinė masių žymuo; 1 – pET28b-MNX 0,5 mM IPTG ląstelės; 2 – pET28b-MNX 1,0 mM IPTG ląstelės; 3 – pET28b 0,5 mM ląstelės; 4 – pET28b-MNX 0,5 mM IPTG tirpūs baltymai; 5 – pET28b-MNX 1,0 mM IPTG tirpūs baltymai; 6 – pET28b 0,5 mM tirpūs baltymai; 7 – pET28b-MNX 0,5 mM IPTG netirpūs baltymai ir ląstelių nuolaužos; 8 – pET28b-MNX 1,0 mM IPTG netirpūs baltymai ir ląstelių nuolaužos; 9 – pET28b 0,5 mM IPTG netirpūs baltymai ir ląstelių nuolaužos.

Gautoje elektroforezės gelio nuotraukoje (3.1.1 pav.) matome, kad yra indukuojama ~ 41 kDa hipotetinės monooksigenazės sintezė. Lyginant 0,5 mM IPTG ir 1,0 mM IPTG indukatoriaus koncentracijas, nežymiai didesnis tirpaus baltymo kiekis buvo gautas naudojant 1,0 mM IPTG galutinę koncentraciją, tačiau didžioji baltymo dalis susidarė netirpi – intarpiniuose kūneliuose. Jie formuojasi dėl specifinio baltymo lankstymosi. Net ir maži pokyčiai, atsirandantys baltymui įgaunant tretinę struktūrą, gali lemti netirpaus baltymo susidarymą (Fahnert ir Neubauer, 2004). Kadangi tolesniems tyrimams buvo reikalingas tirpus baltymas, toliau buvo siekiama optimizuoti baltymo raišką.

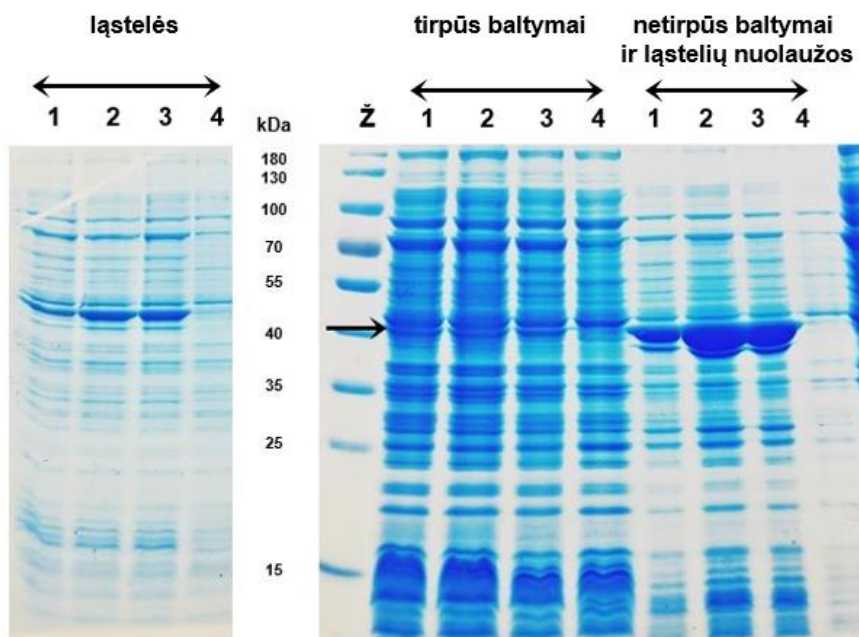
Šiuo tikslu buvo nuspręsta hipotetinės monooksigenazės raišką atlikti kituose *E. coli* kamienose – HMS174 ir ER2566. Plazmidės pET28-MNX ir pET28b (kontrolė) buvo transformuotos į minėtus *E. coli* kamienus. Ląstelės buvo auginamos skystoje LB terpėje, kai jų optinis tankis ( $A_{600}$ ) pasiekė 0,6, buvo indukuojama geno raiška (1mM galutinė IPTG koncentracija). Tuomet bakterijos buvo auginamos 20 °C temperatūroje 18 valandų. Ląstelės buvo suardytos ir, panaudojant beląstelinį ekstraktą, baltymų sudėtis nagrinėta poliakrilamidinaime gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (3.1.2 pav.).



**3.1.2 pav.** Baltymų raiška *E. coli* ER2566 ir HMS174 bakterijose. Ž – baltymų molekulinį masių žymuo (kDa). 1 – pET28b-MNX tirpūs baltymai; 2 – pET28b tirpūs baltymai; 3 – pET28b-MNX netirpūs baltymai ir ląstelių nuolaužos; 4 – pET28b netirpūs baltymai ir ląstelių nuolaužos.

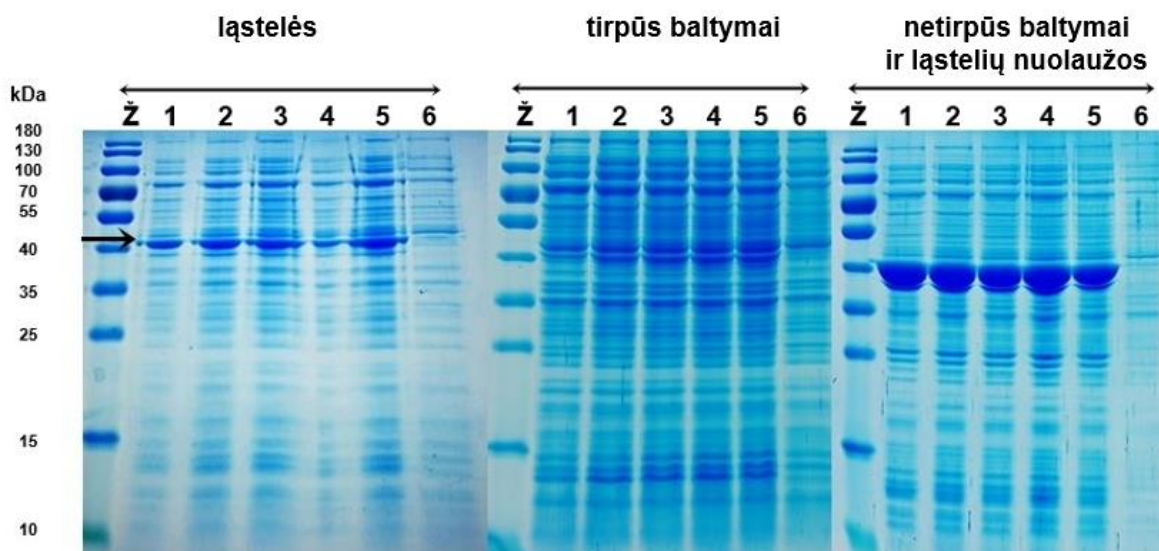
Gautoje baltymų elektroforezės gelio nuotraukoje (3.1.2 pav.) matome, jog nežymiai daugiau tirpaus tikslinio baltymo susidaro *E. coli* ER2566 bakterijose nei *E. coli* HMS174, todėl tolesniam baltymo sintezės optimizavimui pasirinktas šis bakterijų kamienas.

Toliau buvo siekiama nustatyti optimalią induktoriaus IPTG koncentraciją. Geno raiška *E. coli* ER2566 bakterijose buvo indukuojama panaudojant skirtingas galutines IPTG koncentracijas (0,1 mM, 0,5 mM ir 1,0 mM). Gautoje baltymų elektroforezės gelio nuotraukoje (3.1.3 pav.) galima pastebėti, kad, lyginant skirtingas induktoriaus koncentracijas ir susidariusios hipotetinės monooksigenazės kiekį, mažiau baltymo gauta naudojant 0,1 mM IPTG. Lyginant 0,5 mM ir 1,0 mM galutines IPTG koncentracijas, nebuvo pastebėta didelių skirtumų, tačiau šiek tiek daugiau tirpaus baltymo susidarė naudojant 1,0 mM IPTG.



**3.1.3 pav.** Baltymų raiška *E. coli* ER2566 bakterijose. Ž – baltymų molekulių masių žymuo (kDa); 1 – pET28b-MNX 0,1 mM IPTG; 2 – pET28b-MNX 0,5 mM IPTG; 3 – pET28b-MNX 1,0 mM IPTG; 4 – pET28b 1,0 mM IPTG.

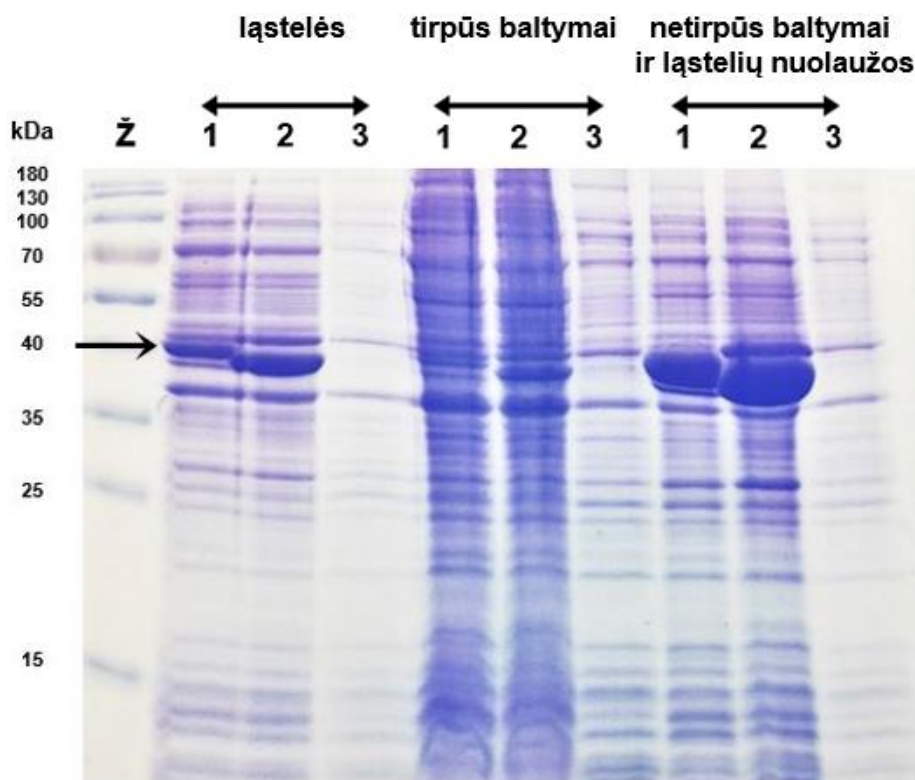
Toliau buvo siekiama hipotetinės monooksigenazės kiekį padidinti indukuojant geno raišką, kai suspensijoje yra skirtingas ląstelių kiekis, t.y. skiriasi suspensijos optinis tankis. *E. coli* ER2566 bakterijos buvo auginamos skystoje LB terpėje 30°C temperatūroje, kol optinis tankis  $A_{600}$  pasiekė 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 ir 1,2, tada buvo pridėta IPTG (galutinė koncentracija 1,0 mM) ir bakterijos augintos 20°C temperatūroje 18 valandų. Tuomet suardžius ląsteles, baltymų sudėtis nagrinėta panaudojant beląstelinį ekstraktą ir buferiniame tirpale resuspenduotas ląstelių nuolaužas bei netirpius baltymus poliakrilamidiniame gelyje elektroforezės būdu denatūruojančiomis sąlygomis (3.1.4 pav.)



**3.1.4 pav.** Baltymų raiška *E. coli* ER2566 bakterijose. Ž – baltymų molekulinė masė žymuo (kDa) 1 – 5 pET28b-MNX; 6 – pET28b. Indukcija atlikta ląstelių optiniam tankiui pasiekus: 1 –  $A_{600} = 0,4$ ; 2 –  $A_{600} = 0,6$ ; 3 –  $A_{600} = 0,8$ ; 4 –  $A_{600} = 1,0$ ; 5 –  $A_{600} = 1,2$ ; 6 –  $A_{600} = 0,6$ .

Nagrinėjant gautą baltymų elektroforezės gelio nuotrauką, matyti, jog ląstelių optinis tankis, kurį pasiekus yra vykdoma indukcija, neturi reikšmės hipotetinės monooksigenazės sintezei (kiek mažesnis tirpaus baltymo kiekis pastebėtas monooksigenazę koduojančio geno indukciją vykdant, kai ląstelių optinis tankis  $A_{600}$  pasiekia 0,4).

Kadangi, išbandžius įvairias hipotetinės monooksigenazės geno raiškos sąlygas (skirtingus *E. coli* kamienus, induktoriaus koncentracijas, indukciją ląstelėms pasiekus skirtingą optinį tankį bei indukciją skirtingoje temperatūroje), nepavyko gauti didelio kiekio tirpaus baltymo (didžioji baltymo dalis susidaro intarpiniuose kūneliuose), buvo nuspręsta baltymo raiškai naudoti kitą raiškos vektorių. Tam tikslui buvo pasirinktas raiškos vektorius – pLATE31, sukurtas aukštam tikslinių baltymų raiškos lygiui, suderintam su minimalia bazine (neindukuota) raiška. Šiuo tikslu hipotetinę monooksigenazę koduojantis genas buvo klonuotas į pLATE31 raiškos vektorių ir sukonstruota plazmidė pLATE31-MNX. *E. coli* BL21(DE3) bakterijos buvo transformuotos pLATE31-MNX, pET28b-MNX ir pET28b (kontrolė) plazmidėmis ir augintos 30°C temperatūroje aeruojant, kol optinis tankis  $A_{600}$  pasiekė 0,6. Tuomet pridėjus IPTG, kad galutinė koncentracija būtų 1,0 mM, bakterijos augintos 20°C temperatūroje aeruojant 18 valandų. Suardžius ląsteles, baltymų sudėtis nagrinėta poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis elektroforezės būdu (3.1.5 pav.).



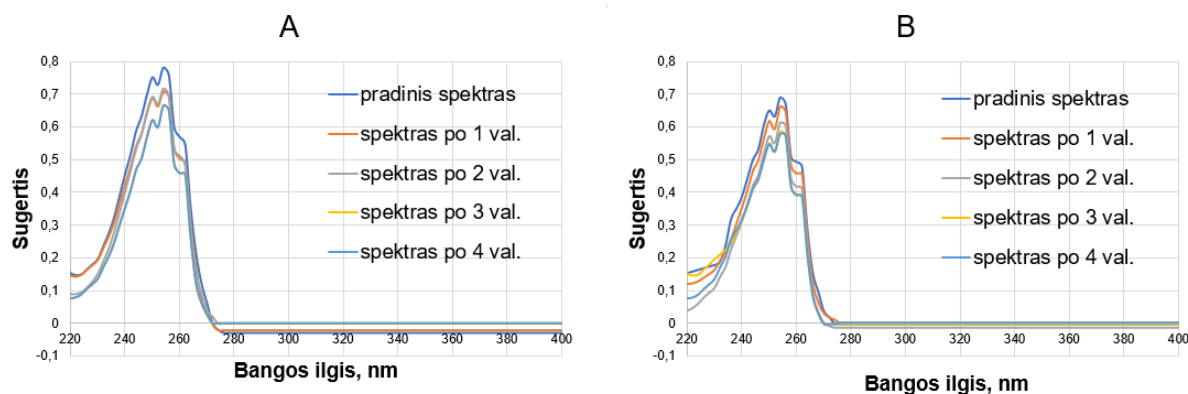
**3.1.5 pav.** Baltymų raiška *E. coli* BL21(DE3) bakterijose. Ž – baltymų molekulinį masių žymuo (kDa). Bakterijos transformuotos plazmidėmis: 1 – pET28b-MNX; 2 – pLate31-MNX; 3 – pET28b.

Gautoje baltymų elektroforezės gelio nuotraukoje matyt, jog ląstelėse transformuotose pLATE31-MNX plazmide susidaro didesnis tirpus tikslinio baltymo kiekis nei bakterijose transformuotose pET28b-MNX plazmide, todėl tolesnių darbų metu piridino biovirsmų tyrimams buvo naudojama pLATE31-MNX plazmidė.

### 3.2 Piridino biovirsmų tyrimai *E. coli* transformantuose

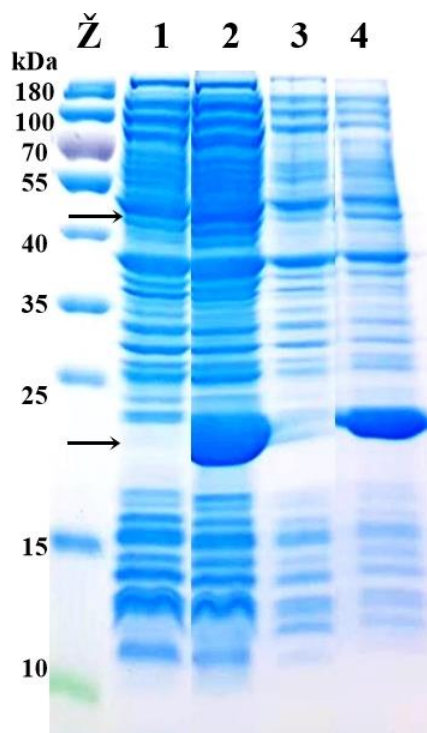
Žinoma, kad *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose monooksigenazė dalyvauja pradinėje piridino žiedo skėlimo reakcijoje. Vykstant piridino biokonversijai šiose bakterijose, piridino žiedas yra iškart oksiduojamas ir skeliamas tarp C2 ir C3 atomų (Stanislauskienė, 2012). Kadangi hipotetinė monooksigenazė yra vienas iš piridinu indukuojamų baltymų *R. rhodochrous* PY11 bakterijose, buvo siekiama išsiaiškinti, ar šis baltymas dalyvauja pradinėje žiedo skėlimo reakcijoje. Šiuo tikslu buvo atliekami piridino biovirsmų tyrimai *E. coli* BL21(DE3) bakterijose, transformuotose pLATE31-MNX ir pET28b (kontrolė) plazmidėmis. Tuomet buvo tikrinamas gautų transformantų gebėjimas skaidyti piridiną. Ląsteles, paruošus kaip nurodyta 2.21 skyrelyje, piridino biokonversija *E. coli* transformantuose buvo stebima spektrofotometriškai matuojant UV sugerties spektro pokyčius 220-400 nm bangos ilgyje.

Gautuose spektruose (3.2.1 pav.) nebuvo pastebėta piridino sugerties pokyčių tarp bakterijų, sintetinančių hipotetinę monooksigenazę, ir bakterijų, neturinčių šio baltymo.



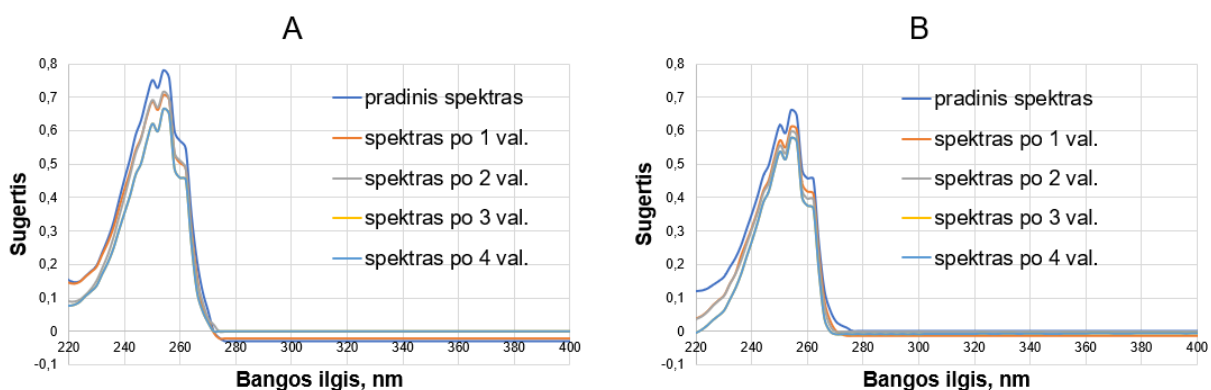
**3.2.1 pav.** Piridino biokonversija panaudojant *E. coli* BL21(DE3) bakterijas. A – transformuotas pET28b plazmide; B – transformuotas pLATE31-MNX plazmide.

Nustatyta, kad *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose pradinėje piridino žiedo skėlimo reakcijoje dalyvaujančios monooksigenazės aktyvumui reikia nuo FMN priklausomos reduktazės, kuri suteikia redukuotą flaviną oksidoreduktazei ir ši oksiduoja substratą (Čsaitė et al., nepublikuota). Remiantis šiais duomenimis buvo daroma prielaida, kad galbūt ir hipotetinės monooksigenazės iš *R. rhodochrous* PY11 aktyvumui reikia reduktazės. Siekiant patikrinti šią prielaidą, *E. coli* BL21(DE3) bakterijos buvo transformuotos pLATE31-MNX, pACYCduet-1-HPYE (plazmidė, turinti klonuotą flavino reduktazės geną) bei pET28b ir pACYCDuet-1 (kontrolė) plazmidėmis. Kai ląstelių optinis tankis  $A_{600}$  pasiekė 0,6, buvo pridėta IPTG (galutinė koncentracija 1,0 mM) ir auginta 20°C temperatūroje aeruojant 17 valandų. Suardžius ląsteles, baltymų sudėtis buvo nagrinėta denatūruojančiomis sąlygomis elektroforezės būdu poliakrilamidinaime gelyje (3.2.2 pav.). Gautoje gelio nuotraukoje matyti, kad *E. coli* BL21(DE3) bakterijose vyksta abiejų tikslinių baltymų (20 kDa FMN reduktazės ir 41 kDa monooksigenazės) sintezė.



3.2.2 pav. Baltymų raiška *E. coli* BL21(DE3) bakterijose. Ž – baltymų molekulinė masė (kDa). 1 – pET28b ir pACYCduet tirpūs baltymai; 2 – pLate31-MNX ir pACYCduet-1-HPYE tirpūs baltymai; 3 – pET28b ir pACYCduet netirpūs baltymai ir ląstelių nuolaužos; 4 – pLate31-MNX ir pACYCduet-1-HPYE netirpūs baltymai ir ląstelių nuolaužos.

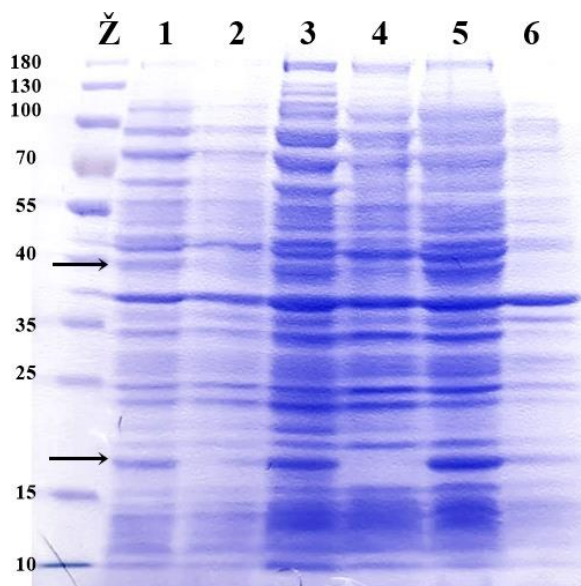
Tuomet, *E. coli* BL21(DE3) transformantų ląsteles paruošus kaip aprašyta 2.21 skyrelyje, buvo atliekamas piridino biovirsmų tyrimas. Piridino sugerties spektras buvo vertinamas spektrofotometriškai 220-400 nm bangos ilgyje. Gautuose piridino sugerties spektruose (3.2.3 pav.) pokyčių nepastebėta. Taigi, *E. coli* BL21(DE3) bakterijos, kuriose sintetinama monooksigenazės iš *R. rhodochrous* PY11 ir flavino reduktazė iš *Arthrobacter* sp. PY22, piridino neskaido.



3.2.3 pav. Piridino biokonversija panaudojant *E. coli* BL21(DE3) bakterijas. A – transformuotas pET28b ir pACYCDuet plazmidėmis; B – transformuotas pLATE31-MNX ir pACYCDuet-1-HPYE plazmidėmis.

Daroma prielaida, kad piridino skaidymas galėjo nevykti dėl to, kad monooksigenazė negali sudaryti dviejų komponentų sistemos su reduktaze iš kito organizmo. Kadangi *R. rhodochrous* PY11 pPYR katabolinėje plazmidėje buvo aptiktas ir hipotetinę FMN reduktazę koduojantis atviro skaitymo rėmelis (*asr15*), toliau buvo nuspręsta atlikti piridino biovirsmų tyrimus *E. coli* transformantuose, kuriuose vyktų tiek *R. rhodochrous* PY11 monooksigenazės, tiek FMN reduktazės sintezė. Šiuo tikslu hipotetinę FMN reduktazę koduojantis genas buvo klonuotas į pACYCDuet-1 raiškos vektorių kaip aprašyta 2.10 skyrelyje ir sukonstruota pACYCDuet-1-FMNR plazmidė.

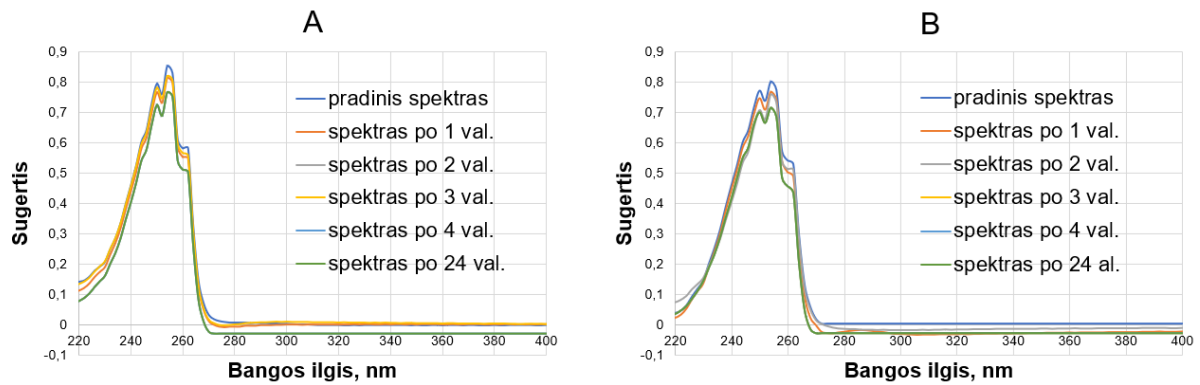
*E. coli* BL21(DE3) bakterijas transformavus pLate31-MNX ir pACYCDuet-1-FMNR plazmidėmis ir jas užauginus indukcinėmis sąlygomis, buvo gauta abiejų baltymų raiška. Baltymų elektroforezės gelio nuotraukoje (3.2.4 pav.) matyti, kad susidaro 41 kDa hipotetinės monooksigenazės ir 18 kDa FMN reduktazės baltymai.



3.2.4 Baltymų raiška *E. coli* BL21(DE3) bakterijose. Ž – baltymų molekulių masių žymuo (kDa). 1 – pLATE31-MNX ir pACYCDuet-1-FMNR ląstelės; 2 – pET28b ir pACYCDuet ląstelės; 3 – pLate31-MNX ir pACYCduet -FMNR tirpūs baltymai; 4 – pET28b ir pACYCduet tirpūs baltymai; 5 – pLate31-MNX ir pACYCduet -HPYE netirpūs baltymai; 6 – pET28b ir pACYCduet netirpūs baltymai.

Įsitikinus, kad *E. coli* BL21(DE3) yra sintetinama tiek monooksigenazė, tiek FMN reduktazė iš *R. rhodochrous* PY11, buvo tiriama ar minėti baltymai sudaro dviejų komponentų sistemą ir dalyvauja pradinėje piridino žiedo skėlimo reakcijoje. Šiuo tikslu *E. coli* BL21(DE3) bakterijose, transformuotose pLATE31-MNX ir pACYCDuet-1-FMNR plazmidėmis, buvo atliekamas piridino biovirsmų tyrimas anksčiau aprašytu būdu. Gautame piridino sugerties spektre (3.2.5 pav.) nepastebėta piridino sugerties sumažėjimo net ir praėjus 24 val. nuo reakcijos pradžios.



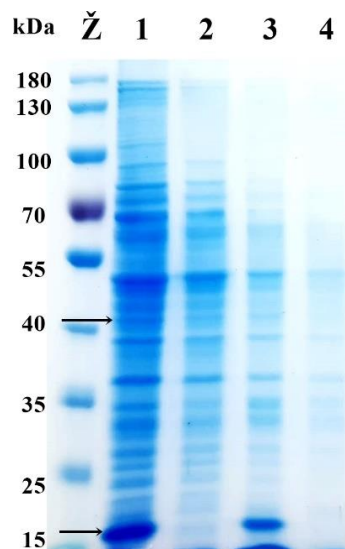


**3.2.5 pav.** Piridino biokonversija panaudojant *E. coli* BL21(DE3) bakterijas. A – transformuotas pET28b ir pACYCDuet-1 plazmidėmis; B – transformuotas pLATE31-MNX ir pACYCDuet-1-FMNR plazmidėmis.

Taigi, *E. coli* bakterijos, kurios sintetina rekombinantines *R. rhodochrous* PY11 monooksigenazę ir FMN reduktazę, nesugeba skaidyti piridino. Gali būti, kad minėti baltymai *E. coli* bakterijose yra tiesiog nefunkcionalūs. Didžioji dalis hipotetinės monooksigenazės susidaro intarpiniuose kūneliuose ir tikėtina, kad tirpaus ir funkcionalaus baltymo kiekio nepakanka vykdyti žiedo skėlimo reakcijai. *Rhodococcus rhodochrous* PY11 yra Gram-teigiamos bakterijos, pasižyminčios GC turtingu genomu. Reiškiny, kai *E. coli* bakterijose sintetinami neaktyvūs Gram-teigiamų bakterijų baltymai yra gerai žinomas, tačiau to priežastys nėra aiškios. Manoma, kad taip gali būti dėl skirtingų *E. coli* ir *Rhodococcus* sp. viduląstelių aplinkų, baltymų sintezės greičio, baltymų lankstymo mechanizmų, osmotinio slėgio ir redokso būsenų. Kita Gram-teigiamų bakterijų baltymų sintezės *E. coli* problema yra ta, kad kai kurie Gram teigiamų bakterijų kodonai yra retai naudojami *E. coli* genome (Nakashima ir Tamura, 2004). Tokių baltymų raiškos problemų galima išvengti raiškai pasirinkus giminingą šeiminingą. Todėl šio darbo metu hipotetinių monooksigenazės ir FMN reduktazės iš *R. rhodochrous* PY11 sintezei buvo pasirinktos piridino neskaidančios *Rhodococcus erythropolis* SQ1 bakterijos.

### 3.3 Piridino biovirsmų tyrimai *R. erythropolis* SQ1 transformantuose

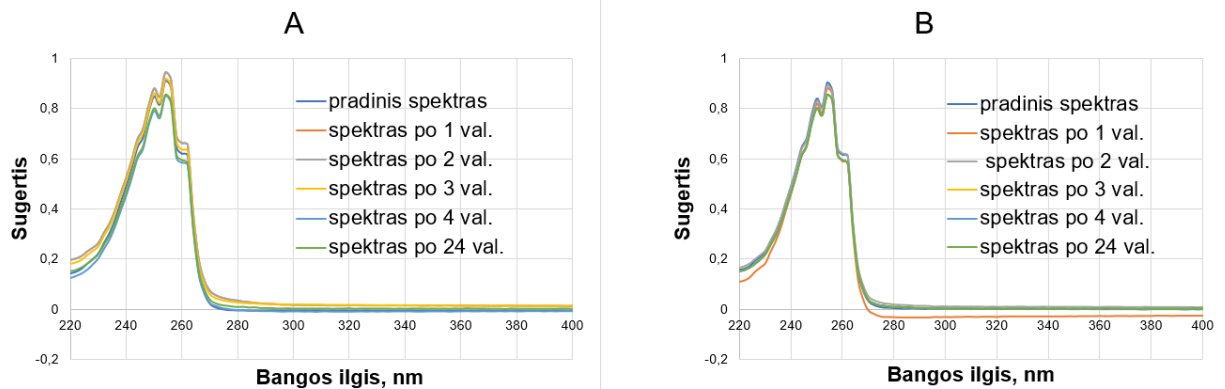
Hipotetinių monooksigenazės ir FMN reduktazės sintezei ir biovirsmų tyrimams *R. erythropolis* SQ1 bakterijose buvo sukonstruotos pNitQC1-MNX ir pNitRT1-FMNR plazmidės. Įklonuotų genų sekos buvo patikrintos atlikus sekoskaitą. *R. erythropolis* SQ1 bakterijos buvo transformuotos pNitQC1-MNX ir pNitRT1-FMNR bei pNitQC1 ir pNitRT1 (kontrolė) plazmidėmis ir auginamos 30 °C temperatūroje 16 valandų. Baltymų sudėtis nagrinėta denatūruojančiomis sąlygomis elektroforezės būdu panaudojant 10% poliakrilamidinį gelį (3.3.1 pav.).



**3.3.1 pav.** Baltymų raiška *R. erythropolis* SQ1 bakterijose. Ž – baltymų molekulių masių žymuo (kDa). 1 – pNitQC1-MNX ir pNitRT1-FMNR tirpūs baltymai; 2 – pNitQC1 ir pNitRT1 tirpūs baltymai; 3 – pNitQC1-MNX ir pNitRT1-FMNR netirpūs baltymai ir ląstelių nuolaužos; 4 – pNitQC1 ir pNitRT1 netirpūs baltymai ir ląstelių nuolaužos.

Gautoje elektroforezės gelio nuotraukoje matomas 18 kDa reduktazės rekombinantinis baltymas. Rodykle pažymėta vieta, kurioje turėtų susidaryti 41 kDa hipotetinė flavino monooksigenazė. pNitRT1 ir pNitQC1 plazmidėse klonuotų genų raiška vyksta konstitutyviai, todėl susintetinamas nedidelis 41 kDa monooksigenazės iš *R. rhodochrous* PY11 kiekis, kurio gelio nuotraukoje tiesiog nematome. *R. erythropolis* SQ1 bakterijos buvo auginamos su atitinkamais antibiotikais, todėl be transformuotų plazmidžių jos nesugebėtų augti, tad galime daryti prielaidą, kad monooksigenazė yra sintetinama. Be to, yra didesnė tikimybė, kad susidaręs monooksigenazės baltymas yra funkcionalus, nes sintezė buvo vykdoma giminingame šeimininke.

Toliau buvo tikrinamas gautų *R. erythropolis* SQ1 transformantų gebėjimas katabolizuoti piridiną. Piridino biokonversija buvo stebima spektrofotometriškai matuojant piridino UV sugerties spektro pokyčius reakcijos mišinyje, kuris buvo paruoštas kaip aprašyta 2.21 skyrelyje. Gautose piridino sugerties spektruose (3.3.2 pav.) matyti, kad bakterijos, sintetinančios rekombinantinius monooksigenazės ir reduktazės baltymus, piridino neskaido.

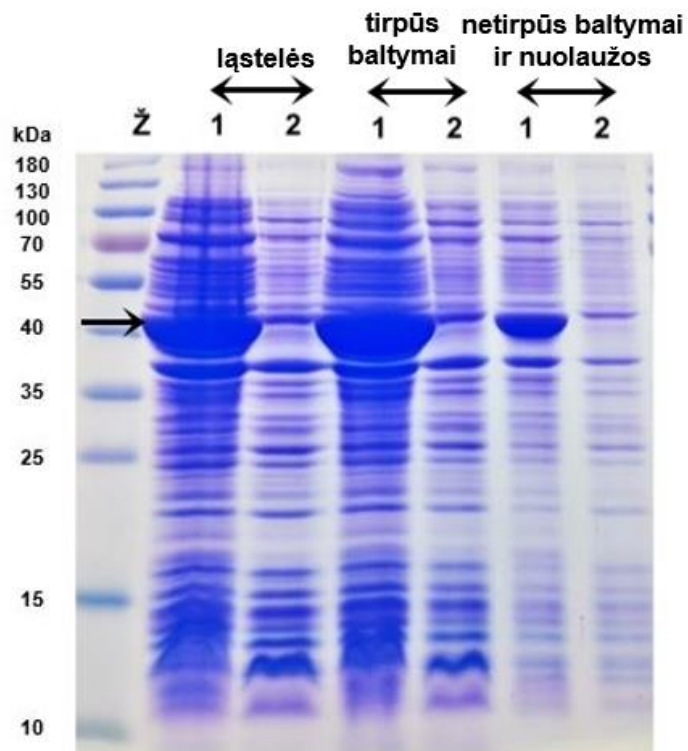


**3.3.2 pav.** Piridino biokonversija panaudojant *R. erythropolis* SQ1 bakterijas. A – transformuotas pNitQC1 ir pNitRT1 plazmidėmis; B – transformuotas pNitQC1-MNX ir pNitRT1-FMNR plazmidėmis.

Buvo tikimasi, kad hipotetiniai *R. rhodochrous* PY11 baltymai – monooksigenazė ir FMN reduktazė sudaro dviejų komponentų sistemą ir dalyvauja pradinėje piridino žiedo oksidacijos reakcijoje, skeliant žiedą tarp C2 ir C3 atomų. Tačiau, atsižvelgiant į atliktus piridino biovirsmų tyrimus *E. coli* ir *R. erythropolis* SQ1 transformatuose, galime daryti išvadą, kad hipotetinė monooksigenazė bei reduktazė iš *R. rhodochrous* PY11 pradinėje piridino žiedo skėlimo reakcijoje greičiausiai nedalyvauja. Gali būti, kad fermentai dalyvauja tolesnėse piridino skaidymo reakcijose

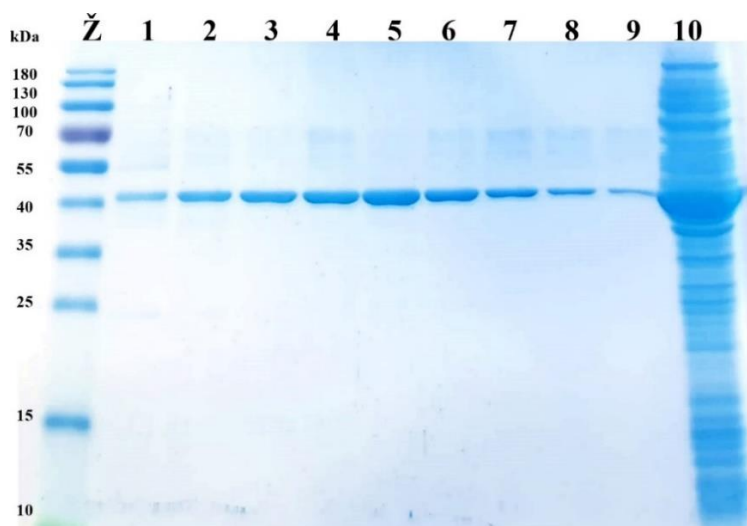
### 3.4 Hipotetinės amidohidrolazės tyrimai

Šio darbo metu taip pat buvo tiriama hipotetinė amidohidrolazė iš *R. rhodochrous* PY11 bakterijų. Tai antrasis piridino indukuojamas baltymas šiose bakterijose (3.2 pav.). Siekiant nustatyti galimą fermento funkciją, rekombinantinio baltymo raiška tirta *E. coli* BL21(DE3) bakterijose. Buvo sukonstruota pLATE31-ADH plazmidė, turinti geną, kuris koduoja amidohidrolazę su 6-histidinių inkaru C-gale. Šia plazmide transformavus *E. coli* BL21(DE3) bakterijas, buvo tirtos indukcijos sąlygos tikslinio baltymo sintezei (indukuojama, kai optinis tankis ( $A_{600}$ ) pasiekia 0,6, įdedama IPTG (galutinė koncentracija 1 mM), ir auginama 20 °C temperatūroje 17 val.). Suardžius ląsteles ir panaudojus beląstelinį ekstraktą, baltymų sudėtis buvo nagrinėta denatūruojančiomis sąlygomis elektroforezės būdu poliakrilamidiniame gelyje. Gautoje gelio nuotraukoje (3.4.1 pav.) matyti, jog didžioji baltymo dalis susidaro tirpi, todėl buvo nuspręsta šį baltymą gryninti.



**3.4.1 pav.** Baltymų raiška *E. coli* BL21(DE3) bakterijose. Ž – baltymų molekulių masių žymuo (kDa). 1 – transformuotose pLATE31-ADH plazmide; 2 – pET28b plazmide.

Amidohidrolazė buvo dalinai išgryninta kaip aprašyta 2.17 skyrelyje naudojant nikelio chelatinę kolonėlę (3.4.2 pav.). Eliucijos frakcijos, turinčios daugiausiai tikslinio baltymo, buvo sujungtos, įvykdyta dializė, kad būtų pašalinti nereikalingi cheminiai junginiai, pvz. imidazolas, tuomet baltymas buvo sukonzentruotas.

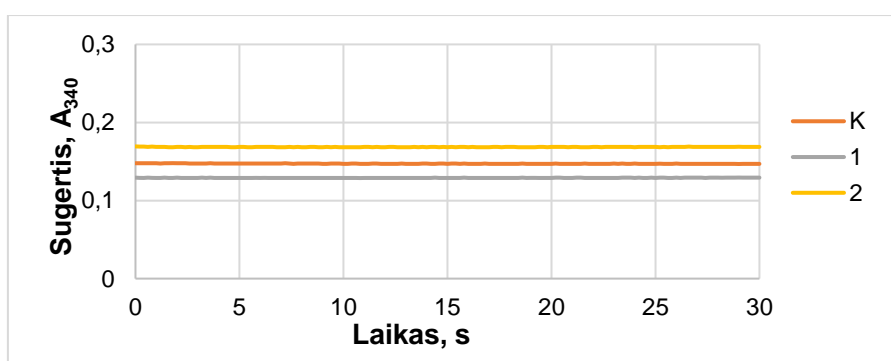


**3.4.2 pav.** Rekombinantinio amidohidrolazės baltymo gryninimas. His<sub>6</sub>-ADH (~ 41 kDa) buvo išgrynintas iš beląstelinių ekstraktų, naudojant nikelio chelatinę kolonėlę. Ž – baltymų molekulių masių žymuo (kDa). 1 – 9 dalinai išgryninto baltymo eliucijos frakcijos; 10 – *E. coli* BL21(DE3) transformuotų pLATE31-ADH plazmide, tirpūs baltymai.

Hipotetinė amidohidrolazė buvo dalinai išgryninta be didesnių kitų baltymų priemaišų, kurie galėtų trukdyti tolesniems fermento tyrimams. Toliau buvo nustatyta baltymo koncentracija kaip aprašyta 2.16 skyrelyje, tuomet jis buvo naudojamas hipotetinės amidohidrolazės substratinio specifiškumo tyrimuose.

Išgryninus hipotetinę amidohidrolazę, buvo siekiama nustatyti galimus šio fermento substratus. Reakcijos su tipiniais amidohidrolazių substratais: 4-nitrobenzanilidu ir 4-nitroacetanilidu, buvo vykdomos kaip aprašyta 2.19 skyrelyje. Kadangi spalvinių pokyčių nebuvo pastebėta, galima teigti, kad fermentas minėtų substratų neskaido.

Toliau šiame darbe buvo siekiama išsiaiškinti galimą hipotetinės amidohidrolazės funkciją piridino skaidyme. *Arthrobacter* sp. 68b bakterijose nustatyta, kad vykstant piridino skaidymui, procese dalyvaujanti amidohidrolazė verčia (Z)-4-formamidobut-3-enoinę rūgštį į gintaro rūgšties pusiau aldehidą. Kitoje reakcijoje, veikiant nuo NAD priklausomai gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazei, iš gintaro rūgšties pusiau aldehido susidaro gintaro rūgštis (Časaitė et al., nepublikuota). Taigi, buvo siekiama išsiaiškinti, ar tiriamą amidohidrolazę katalizuoja (Z)-4-formamidobut-3-enoinės rūgšties virsmą į gintaro rūgšties pusiau aldehidą. Šiuo tikslu minėtas fermentas buvo inkubuojamas su minėtu junginiu per naktį. Panaudojus gautą reakcijos mišinį kaip substratą gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazei, buvo matuojamas jos aktyvumas kaip aprašyta 2.20 skyrelyje. Gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazė turi du substratus: gintaro rūgšties pusiau aldehidą bei NADP. Fermentui reaguojant su substratais, turėtų susidaryti gintaro rūgštis ir NADPH. Minėto fermento aktyvumas yra nustatomas spektrofotometriškai pagal sugerties pokyčius, atsirandančius dėl susidariusio NADPH, 340 nm bangos ilgyje. Atliekant tyrimą, buvo nustatyta, kad NADPH nesusidaro (3.4.1 pav.)

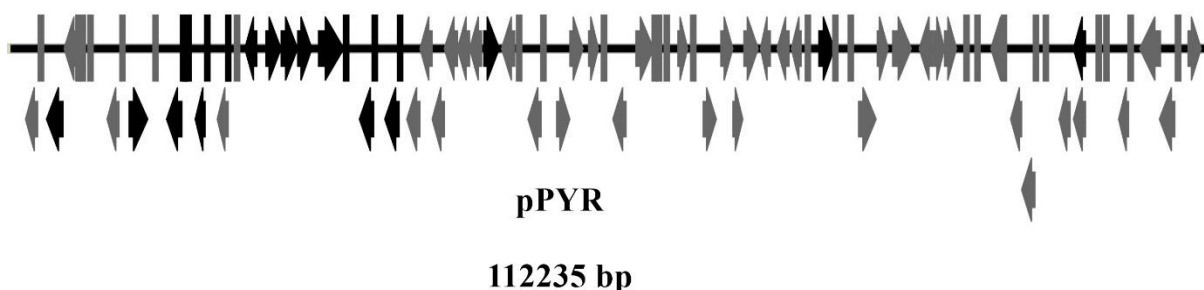


**3.4.1 pav.** Gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazės fermentinis aktyvumas. Fermentinis aktyvumas nustatomas pagal susidariusio NADPH kiekį, vertinamą spektrofotometriškai matuojant 30 s 340 nm bangos ilgyje. K – kontrolė (reakcijos mišinys, kuriame (Z)-4-formamidobut-3-enoinė rūgštis nebuvo inkubuota su amidohidrolaze); 1 ir 2 – reakcijos mišiniai, kuriuose (Z)-4-formamidobut-3-enoinė rūgštis per naktį inkubuota su 33,55  $\mu\text{g}$  ir 16,78  $\mu\text{g}$  amidohidrolazės.

Tai reiškia, kad gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazė nebuvo aktyvi, nes nebuvo susidaręs jos substratas – gintaro rūgšties pusiau aldehidas, todėl galima daryti išvadą, kad amidohidrolazė negali panaudoti (Z)-4-formamidobut-3-enoinės rūgšties kaip substrato, t. y. nehidrolizuoja minėto junginio.

### 3.5 Piridinu indukuojamų genų raiškos tyrimas

Norint geriau suprasti junginio skaidymo mechanizmą, yra svarbu identifikuoti šiame procese dalyvaujančius genus (Boundy-Mills et al., 1997). Nors yra atrasta nemažai mikroorganizmų, gebančių skaidyti piridiną, tačiau labai mažai žinoma apie genus, susijusius su piridino katabolizmu. Šio darbo metu buvo siekiama išsiaiškinti, kurie genai yra atsakingi už piridino skaidymą *Rhodococcus rhodochrous* PY11 bakterijose. Šiuo tikslu buvo atliekama genų, kurių raiška yra indukuojama piridino skaidymo metu, paieška. Kaip minėta anksčiau *R. rhodochrous* PY11 nustatyta dalis (112 kb) katabolinės plazmidės pPYR sekos, kurioje nustačius atviro skaitymo rėmelius ir jų koduojamų baltymų galimas funkcijas, aptikta nemažai katabolizme dalyvaujančių fermentų. Remiantis turimomis žiniomis apie piridino skaidymą kituose mikroorganizmuose, genų raiškos tyrimui buvo pasirinkti 22 taikiniai. Tai atviro skaitymo rėmeliai (3.5.1 pav.), kurių koduojami hipotetiniai baltymai galėtų dalyvauti piridino skaidyme (baltymai pateikti 3.5.1 lentelėje).



**3.5.1 pav.** *Rhodococcus* sp. PY11 pPYR katabolinės plazmidės dalis. Pilka spalva pažymėti atviri skaitymo rėmeliai, koduojantys galimus baltymus; juoda, piridinu indukuojamų genų raiškos tyrimui pasirinkti atviri skaitymo rėmeliai, koduojantys galimai piridino skaidyme dalyvaujančius baltymus.

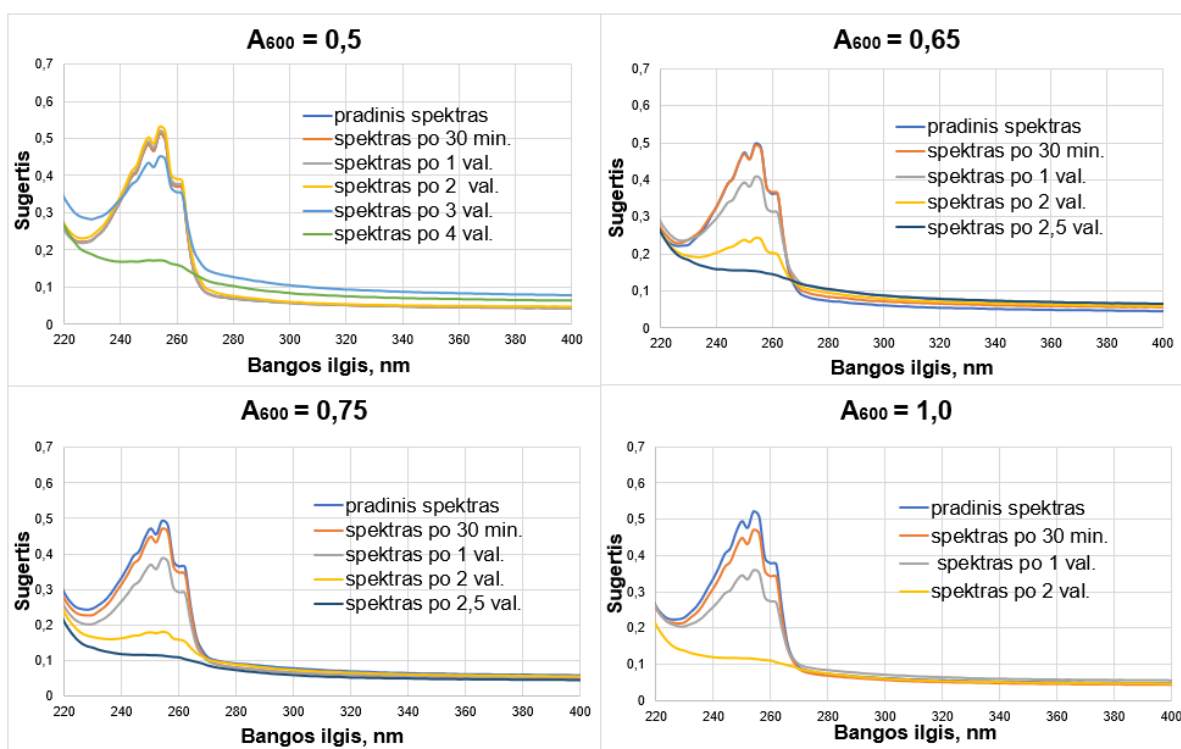
**3.5.1 lentelė** Genų raiškos tyrimui pasirinkti *asr*, koduojami *Rhodococcus rhodochrous* PY11 pPYR katabolinėje plazmidėje

<i>asr</i>	Kodujamo baltymo ilgis ar.	Homologas	NCBI duomenų bazės priegos nr.	Identiškų ar. sk/ bendras ar. sk. (%)	E vertė	Literatūros šaltinis
<i>asr3</i>	515	Amidazė <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	BAA03744.1	504/515(98%)	0	Kobayashi et al., 1993
<i>asr10</i>	585	Fosfometilpirimidino sintazė ThiC/ hidrosimetilpirimidino sintazė <i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	WP-120285407.1	573/585(98%)	0	Hatzinikolaou et al., 2018
<i>asr12</i>	485	Nuo NAD priklausoma gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazė <i>Rhodococcus</i> sp. BUPNP1	OWY79121.1	480/485(99%)	0	Sengupta et al., nepublikuota
<i>asr13</i>	77	Hipotetinis baltymas	KHJ74478.1	76/77(99%)	2e-48	Sun et al., 2015
<i>asr14</i>	109	NIPSNAP šeimos baltymas <i>Rhodococcus</i> sp. BUPNP1	OWY80220.1	107/109(98%)	1e-73	Sengupta et al., 2017
<i>asr15</i>	190	NADH-FMN oksidoreduktazė RutF, (DIM6/NTAB) šeimos flavino reduktazė	SEC02793.1	188/190(99%)	4e-137	Varghese ir Submissions, 2016
<i>asr16</i>	330	Ribozės fosfato pirofosfokinazė <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> AK37	EHK83626.1	329/330(99%)	0	Kriszt et al., 2011
<i>asr17</i>	307	Ribokinazė <i>Rhodococcus</i> sp. Chr-9	KHJ74476.1	303/307(99%)	4e-160	Sun et al., 2015
<i>asr19</i>	251	Citoplazminis baltymas <i>Williamsia</i> sp. 1135	ORM36238.1	210/251(84%)	2e-128	Nahar, 2016
<i>asr22</i>	363	LLM ( <i>angl.</i> luciferase like monooxygenase) – į liuciferazes panašių baltymų klasei priklausanti nuo flavino priklausoma monoooksigenazė <i>Rhodococcus</i> sp. BUPNP1	OWY80214	362/363(99%)	0	Sengupta, nepublikuota

<i>asr23</i>	486	Nikotinato fosforiboziltransferazė <i>Rhodococcus</i> sp. Chr-9	KHJ74472.1	481/486(99%)	0	Sun et al., 2015
<i>asr24</i>	491	Aldehido dehidrogenazė <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> AK37	EHK83619.1	447/452(99%)	0	Kriszt et al., 2011
<i>asr25</i>	418	Amidohidrolazė <i>Rhodococcus</i> sp. Chr-9	KHJ74471.1	410/418(98%)	0	Sun et al., 2015
<i>asr26</i>	792	Formiato dehidrogenazės didysis subvienetas <i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	RKS37836.1	781/792(99%)	0	Hatzinikolaou et al., 2018
<i>asr27</i>	291	Sulfurtransferazė FdhD <i>Rhodococcus</i> sp. BUPNP1	OWY80208.1	277/291(95%)	0	Sengupta, nepublikuota
<i>asr28</i>	460	Kanalo baltymas <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> SB3094	AHD21481.1	420/440(95%)	0	Dueholm et al., 2014
<i>asr29</i>	253	SDR šeimos oksidoreduktazė <i>Rhodococcus biphenylivorans</i>	AWZ22824.1	241/253(95%)	1e-149	Wang, 2017
<i>asr30</i>	466	Metabolitų – protonų simporteris <i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	SEC03627.1	438/439(99%)	0	Varghese ir Submissions, 2016
<i>asr31</i>	212	LuxR šeimos transkripcijos reguliatorius <i>Rhodococcus</i> sp. IITR03	KLL96148.1	212/212(100%)	2e-133	Bajaj ir Manickman, nepublikuota
<i>asr38</i>	491	Aldehido dehidrogenazė <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> AK37	EHK83602.1	474/477(99%)	0	Kriszt et al., 2011
<i>asr62</i>	481	Nuo NAD priklausoma gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazė <i>Rhodococcus</i> sp. p52	AOD20951.1	473/481(98%)	0	Li ir Ding, nepublikuota
<i>asr80</i>	366	Amidohidrolazė <i>Rhodococcus</i> sp. Chr-9	KHJ73436.1	364/366(99%)	0	Sun et al., 2015



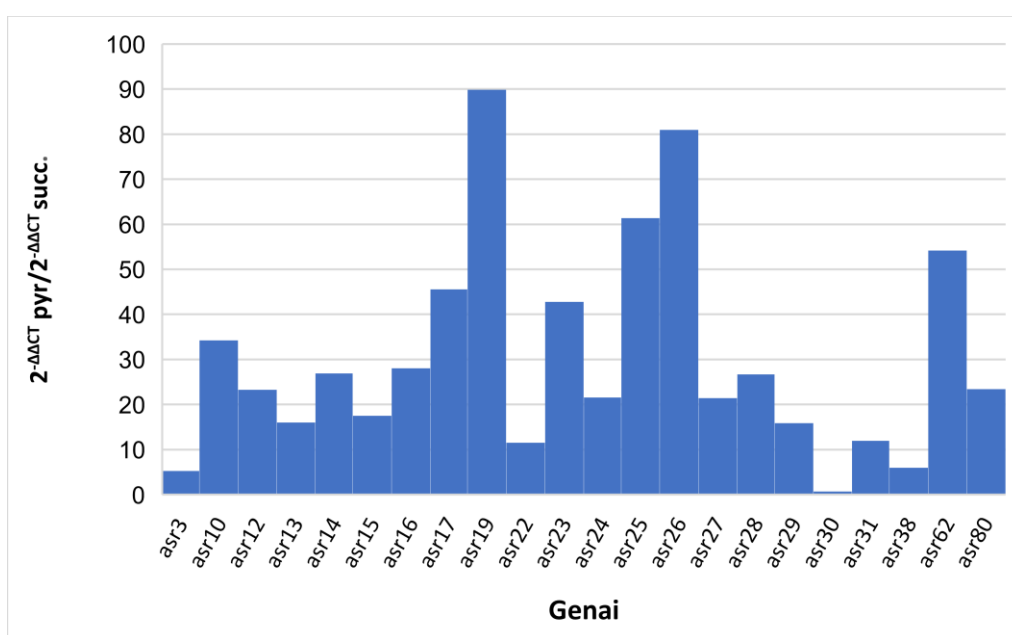
Visų pirma buvo siekiama išsiaiškinti kokį optinį tankį ląstelėms pasiekus, geriausia išskirti RNR ir atlikti genų raiškos tyrimą. Buvo nuspręsta šį atskaitos tašką pasirinkti pagal bakterijų piridino skaidymo efektyvumą, ląstelėms pasiekus skirtingą optinį tankį. Šiuo tikslu *R. rhodochrous* PY11 bakterijos buvo auginamos su piridinu skystoje EFA terpėje, kol ląstelių optinis tankis  $A_{600}$  pasiekė 0,5, 0,65, 0,75 ir 1,0. Ląstelėms pasiekus skirtingą optinį tankį, buvo atliekami piridino biovirsmų tyrimai kaip aprašyta 2.21 skyrelyje panaudojant vienodą ląstelių kiekį (3.5.2.pav.)



**3.5.2 pav.** Piridino biovirsmai panaudojant *Rhodococcus rhodochrous* PY11 intaktines ląsteles. Tyrimas atliktas ląstelėms pasiekus skirtingą optinį tankį  $A_{600}$ . Eksperimentui naudotas vienodas ląstelių kiekis.

Nagrinėjant piridino sugerties spektro pokyčius, matyti, jog piridinas greičiausiai skaidomas *Rhodococcus rhodochrous* PY11 bakterijoms pasiekus optinį tankį  $A_{600} = 1,0$ . Šiame optiniame taške piridinas yra pilnai suskaidomas po 2 valandų, tuo tarpu kai ląstelių optinis tankis  $A_{600}$  yra 0,5, toks pats kiekis piridino yra suskaidomas tik po 4 valandų. Kai ląstelių optinis tankis  $A_{600}$  pasiekia 0,65 ir 0,75, nepastebėta skirtumų tarp piridino skaidymo efektyvumo. Abiem atvejais piridinas yra pilnai suskaidomas po 2,5 valandų. Remiantis šiais duomenimis, genų raiškos tyrimui buvo pasirinktas taškas kai, ląstelių, augintų su piridinu bei gintaro rūgštimi (kontrolė), optinis tankis  $A_{600}$  pasiekė 1,0.

Norint nustatyti, ar piridinas indukuoja tiriamų genų raišką, *R. rhodochrous* PY11 bakterijos buvo auginamos su piridinu ir gintaro rūgštimi (kontrolė) kaip pagrindiniu anglies ir energijos šaltiniu. Kai ląstelių optinis tankis  $A_{600}$  pasiekė 1,0, buvo surinktas vienodas ląstelių kiekis ir buvo skiriama RNR (2.22 skyrelis), tuomet buvo atliktas kiekybinis tikro laiko AT-PGR, kaip aprašyta 2.23 skyrelyje. Po reakcijų susidarė visų 22 tirtų genų taikinių produktai bakterijose, augintose tiek su piridinu, tiek su gintaro rūgštimi. Tai rodo, jog katabolinėje pPyr plazmidėje nuolatos vyksta bazinė genų raiška. Tačiau, buvo pastebėta, kad ląstelėse augintose su skirtingais substratais (gintaro rūgštimi ir piridinu) skyrėsi sintetiamos RNR kiekis (3.5.3 pav.).



**3.5.3pav.** *Rhodococcus rhodochrous* PY11 genų raiškos tyrimas. Kiekybinė AT-PGR analizė atlikta naudojant RNR, išskirtą iš bakterijų, augintų su skirtingais anglies šaltiniais: 0,1% piridinu ir 0,1 % gintaro rūgštimi. Rezultatai pateikti kaip santykis tarp santykinio RNR kiekio, apskaičiuoto pagal  $2^{-\Delta\Delta CT}$  algoritmu, ląstelėse, augintose su piridinu, ir ląstelėse, augintose su gintaro rūgštimi. *asr3* – amidazė, *asr10* – fosfometilpirimidino sintazė ThiC, *asr12* – nuo NAD priklausomą gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazę I, *asr13* – hipotetinį baltymą, *asr14* – NIPSNAP šeimos baltymą, *asr15* – FMN reduktazę, *asr16* – ribozės fosfato pirofosfokinazę, *asr17* – ribokinazę, *asr19* – citoplazminį baltymą, *asr22* – monooksigenazę, *asr23* – nikotinato fosforiboziltransferazę, *asr24* – aldehido dehidrogenazę I, *asr25* – amidohidrolazę I, *asr26* – formiato dehidrogenazės didįjį subvienetą, *asr27* – sulfurtransferazę FdhD, *asr28* – kanalo baltymą, *asr29* – SDR šeimos oksidoreduktazę, *asr30* – metabolitų-protonų simporterį, *asr31* – LuxR šeimos transkripcijos reguliatorių, *asr38* – aldehido dehidrogenazę II, *asr62* – nuo NAD priklausomą gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazę II, *asr80* – amidohidrolazę II, koduojantys atviro skaitymo rėmeliai.

Tirti genai buvo stipriau nuskaitomi bakterijose, augintose su piridinu nei su gintaro rūgštimi. 21 iš 22 tirtų genų santykinis RNR kiekis buvo ženkliai didesnis ląstelėse, augintose

su piridinu, nei su gintaro rūgštimi. Vientintelis genas kurio raiška tarp ląstelių augintų su skirtingais substratais nesiskyrė – *asr30*, tai metabolitų-protonų simporterį koduojantis atviro skaitymo rėmelis. Santykinis RNR kiekis ląstelėse, augintose su piridinu ir gintaro rūgštimi, skyrėsi nuo 6 iki 89 kartų. Citoplazminio baltymo (*asr19*) geno santykinis RNR kiekis yra didesnis net 90 kartų, formiato dehidrogenazės didžiojo subvieneto (*asr26*) – 81 kartą, amidohidrolazės I (*asr25*) – 61 kartą, nuo NAD priklausomos gintaro rūgšties pusiau aldehido dehidrogenazės II – 54 kartus, ribokinazės (*asr17*) – 46 kartus, nikotinato fosforiboziltransfrazės (*asr23*) – 43 kartus, fosfometilpirimidino sintazės ThiC (*asr10*) – 34 kartus. Visų kitų tirtų genų šis santykis vyravo nuo 10 iki 30 kartų. Tik 2 genų amidazės (*asr3*) bei aldehido dehidrogenazės II (*asr38*) santykinis RNR kiekis ląstelėse augintose su skirtingais substratais skyrėsi mažiau nei 10 kartų.

Metabolinių genų raiška dažniausiai vykdoma tik tada, kai jų reikia mikroorganizmo augimui (Brzostowicz et al., 2000). Informacinė RNR labai greitai prisitaiko prie ląstelės poreikių, o rRNR ir tRNR yra stabilios ir degraduojamos tik tada, kai ląstelės patiria stresą arba susintetinta RNR yra defektyvi (Deutscher, 2006). Trumpas iRNR gyvavimo laikas suteikia papildomą genų raiškos reguliavimo kontrolę ir leidžia augančioms ląstelėms prisitaikyti prie jas supančios aplinkos. RNR sintezės ir ardymo ciklas yra dinamiškas ir toje pačioje ląstelių generacijoje gali vykti net kelis kartus (Jain, 2002). Genų raiška yra susijusi su specifinių baltymų sintezės poreikiu ląstelėse. Akivaizdu, kad *Rhodococcus rhodochrous* PY11 bakterijas, auginant su piridinu, yra indukuojama bent 21 iš 22 tirtų genų raiška. Padidėjusi genų raiška piridino skaidymo metu rodo, kad šie genai ir jų koduojami baltymai greičiausiai dalyvauja junginio skaidyme

## IŠVADOS

1. Hipotetinė flavino monooksigenazė greičiausiai nedalyvauja pirmajame piridino skaidymo etape *Rhodococcus rhodochrous* PY11 bakterijose.
2. Išgrynintos rekombinantinės amidohidrolazės iš *R. rhodochrous* PY11 funkcijos nustatyti nepavyko.
3. Nustatyta, kad piridinas indukuoja bent 21 iš 22 tirtų genų, esančių katabolinėje pPYR plazmidėje, raišką.

# VILNIAUS UNIVERSITETAS

## GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Eglė Narmontaitė

### **Piridino skaidymo *Rhodococcus rhodochrous* PY11 kamiene tyrimas**

#### *Santrauka*

*Rhodococcus* genties bakterijos pasižymi ypatingai didele katabolinių fermentų įvairove ir geba skaidyti įvairias natūralias ir ksenobiotines medžiagas. Šio darbo tikslas buvo iširti *Rhodococcus rhodochrous* PY11 bakterijose piridino skaidyme dalyvaujančius genus ir jų koduojamus baltymus bei nustatyti galimą jų funkciją. Visų pirma buvo tiriama, ar piridino indukuojamas baltymas – hipotetinė flavino monooksigenazė dalyvauja pradinėje žiedo skėlimo reakcijoje. Atlikus piridino biovirsmų tyrimus rekombinantinę monooksigenazę bei reduktazę sintetinančiose *E. coli* ir *R. erythropolis* SQ1 bakterijose, paaiškėjo, kad piridinas nėra skaidomas. Taigi, minėti fermentai greičiausiai nedalyvauja pradinėje žiedo skėlimo reakcijoje.

Šio darbo metu taip pat buvo tiriamas piridino indukuojamas baltymas *Rhodococcus rhodochrous* PY11 bakterijose – hipotetinė amidohidrolazė. Išgryninus rekombinantinį baltymą, buvo tiriamas fermento substratinis specifiškumas, tačiau nei vieno iš tirtų substratų, fermentas neskaidė. Hipotetinės amidohidrolazės funkcija piridino skaidymo procese išlieka neaiški. Šio darbo metu taip pat buvo nustatyta, kad piridinas aktyvina bent 21 iš 22 tirtų galimai piridino skaidyme dalyvaujančių genų, koduojamų pPYR katabolinėje plazmidėje, raišką.

VILNIUS UNIVERSITY

LIFE SCIENCES CENTER

Eglė Narmontaitė

**Investigation of pyridine degradation in *Rhodococcus rhodochrous* PY11 strain**

*Summary*

*Rhodococcus* strains are capable of degrading wide range of natural and xenobiotic compounds due to their variety of catabolic enzymes. The aim of this work was to investigate the genes and enzymes responsible for degradation of pyridine in *Rhodococcus rhodochrous* PY11 strain. Firstly, we were trying to determine if pyridine inducible protein – hypothetical monooxygenase initiates first step of pyridine ring cleavage. *E.coli* and *R. erythropolis* SQ1 cells were transformed with recombinant plasmids carrying hypothetical monooxygenase and FMN reductase genes. The experiment of pyridine bionconversion in *E.coli* and *R. erythropolis* SQ1 cells showed that they are incapable to degrade pyridine. The results suggest that hypothetical monooxygenase is most likely not involved in initial reaction of pyridine cleavage.

Pyridine inducible amidohydrolase from *Rhodococcus rhodochrous* PY11 strain was investigated as well. Recombinant amidohydrolase was expressed in *E.coli* and purified. Purified enzyme was added to reaction mixtures with different substrates. Unfortunately no products of reaction were obtained and hypothetical amidohydrolase function in pyridine degradation remains unclear. It was also revealed that pyridine activates expression of at least 21 of 22 investigated genes that might be involved in degradation of pyridine.

## **PADĖKA**

Norėčiau nuoširdžiai padėkoti savo darbo vadovei dr. Rūtai Stanislauskienei už visas pastangas, rūpestį ir naudingus patarimus atliekant šį darbą. Taip pat esu labai dėkinga skyriaus vedėjui dr. Rolandui Meškiui už suteiktą galimybę atlikti šį darbą bei visiems Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus darbuotojams ir studentams už diskusijas, patarimus ir sukurtą jaukią darbo atmosferą.

Ypač norėčiau padėkoti dr. Rasai Rutkienei už pagalbą gryninant amidohidrolazę, dr. Vidai Časaitei už patarimus matuojant fermentinį aktyvumą, bei dr. Maksim Bratchikov už pagalbą skiriant RNR ir atliekant kiekybinę AT-PGR analizę.

## LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Alvarez HM, (ed). 2010. Biology of *Rhodococcus*. Microbiology Monographs 16, 625.
2. Babbie, A., Tokuriki, N., Hollfelder, F. (2010). What makes an enzyme promiscuous?. *Current opinion in chemical biology*, 14(2), 200-207.
3. Bai, Y., Sun, Q., Zhao, C., Wen, D., Tang, X. (2010). Bioaugmentation treatment for coking wastewater containing pyridine and quinoline in a sequencing batch reactor. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(5), 1943-1951.
4. Banerjee, A., Sharma, R., Banerjee, U. (2002). RETRACTED ARTICLE: The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(1-2), 33-44.
5. Behrman, E. J., Stanier, R. Y. (1957). The bacterial oxidation of nicotinic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 228(2), 923-945.
6. Bell, K. S., Philp, J. C., Aw, D. W. J., Christofi, N. (1998). The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85(2), 195-210.
7. Benning, M. M., Shim, H., Raushel, F. M., Holden, H. M. (2001). High resolution X-ray structures of different metal-substituted forms of phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry*, 40(9), 2712-2722
8. Boundy-Mills, K. L., De Souza, M. L., Mandelbaum, R. T., Wackett, L. P., Sadowsky, M. J. (1997). The atzB gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 916-923.
9. Brzostowicz, P. C., Gibson, K. L., Thomas, S. M., Blasko, M. S., Rouvière, P. E. (2000). Simultaneous identification of two cyclohexanone oxidation genes from an environmental *Brevibacterium* isolate using mRNA differential display. *Journal of bacteriology*, 182(15), 4241-4248.
10. Buchbinder, J. L., Stephenson, R. C., Dresser, M. J., Pitera, J. W., Scanlan, T. S., Fletterick, R. J. (1998). Biochemical characterization and crystallographic structure of an *Escherichia coli* protein from the phosphotriesterase gene family. *Biochemistry*, 37(15), 5096-5106.
11. Buddin, W. (1914). Partial sterilization of soil by volatile and non-volatile antiseptics, *Journal of Agricultural Science.*, 6, 417.
12. Chandra, R., Bharagava, R. N., Kapley, A., Purohit, H. J. (2009). Isolation and characterization of potential aerobic bacteria capable for pyridine degradation in presence of picoline, phenol and formaldehyde as co-pollutants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12), 2113-2119.
13. Clayden J., Greeves N., Warren S. (2012). Organic Chemistry. 2nd ed. Oxford University Press.
14. Crozier-Reabe, K., Moran, G. (2012). Form follows function: structural and catalytic variation in the class A flavoprotein monooxygenases. *International journal of molecular sciences*, 13(12), 15601-15639.
15. de Carvalho CC, da Fonseca MM. (2005). The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Applied microbiology and biotechnology*; 67:715-26.
16. de los Reyes F. L. (2010). Foaming, p. 215-259. In Seviour R. J., Nielsen P. H. (ed.), Microbial ecology of activated sludge. IWA Publishing, London, United Kingdom.
17. Deutscher, M. P. (2006). Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic acids research*, 34(2), 659-666.
18. Duarte, M., Ferreira-da-Silva, F., Lünsdorf, H., Junca, H., Gales, L., Pieper, D. H., Nunes, O. C. (2011). *Gulosibacter molinativorax* ON4T molinate hydrolase, a novel cobalt-dependent amidohydrolase. *Journal of bacteriology*, 193(20), 5810-5816.



19. Elias, M., Dupuy, J., Merone, L., Mandrich, L., Porzio, E., Moniot, S., Rochum D, Lecomte C, Rossi M, Masson P., Manco, G., Chabriere, E. (2008). Structural basis for natural lactonase and promiscuous phosphotriesterase activities. *Journal of molecular biology*, 379(5), 1017-1028.
20. Entsch, B., Van Berkel, W. J. (1995). Structure and mechanism of para-hydroxybenzoate hydroxylase. *The FASEB journal*, 9(7), 476-483.
21. Fahnert B, Lilie H, Neubauer P: Inclusion bodies: formation and utilisation. (2004). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 89:93–142.
22. Feng, Y., Kaiser, J. P., Minard, R. D., Bollag, J. M. (1994). Microbial transformation of ethylpyridines. *Biodegradation*, 5(2), 121-128.
23. Fetzner, S. (1998). Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(3), 237-250.
24. Finnerty WR. (1992). The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annual Review of Microbiology*, 46:193–218.
25. Gartemann, K. H., 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. *Journal of bacteriology*, 183(12), 3729-3736
26. Gerlt, J. A., Babbitt, P. C. (2001). Divergent evolution of enzymatic function: mechanistically diverse superfamilies and functionally distinct suprafamilies. *Annual review of biochemistry*, 70(1), 209-246.
27. Goodfellow, M., Maldonado, L. A. (2006). The families dietziaceae, gordoniaceae, nocardiaceae and tsukamurellaceae. *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*, 843-888.
28. Grecz N, Tang T. (1970). Relation of dipicolinic acid to heat resistance of bacterial spores. *Journal of general microbiology*. 63(3):303-310.
29. Guarnan E. (1958). The mechanism of fusaric acid injury. *Photopathology*.; 48.
30. Gürtler, V., Mayall B. C., Seviour R.J. (2004). Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*? *FEMS Microbiol. Rev.* 28:377–403.
31. Gürtler, V., Seviour, R. J. (2010). Systematics of Members of the Genus *Rhodococcus* (Zopf 1891) Emend Goodfellow et al. 1998. In *Biology of Rhodococcus* (pp. 1-28). Springer, Berlin, Heidelberg.
32. Hernández, M. A., Mohn, W. W., Martínez, E., Rost, E., Alvarez, A. F., Alvarez, H. M. (2008). Biosynthesis of storage compounds by *Rhodococcus jostii* RHA1 and global identification of genes involved in their metabolism. *BMC genomics*, 9(1), 600.
33. Houghton, C., Cain, R. B. (1972). Microbial metabolism of the pyridine ring. Formation of pyridinediols (dihydroxypyridines) as intermediates in the degradation of pyridine compounds by micro-organisms. *Biochemical Journal*, 130(3), 879-893.
34. Huang, D., Liu, W., Wu, Z., Liu, G., Yin, H., Chen, Y., ... Jia, L. (2017). Removal of pyridine from its wastewater by using a novel foam fractionation column. *Chemical Engineering Journal*, 321, 151-158.
35. Hughes, D. E. (1955). 6-Hydroxynicotinic acid as an intermediate in the oxidation of nicotinic acid by *Pseudomonas fluorescens*. *Biochemical Journal*, 60(2), 303.
36. Huijbers, M. M., Montersino, S., Westphal, A. H., Tischler, D., van Berkel, W. J. (2014). Flavin dependent monooxygenases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 544, 2-17.
37. Jackson, C. J., Liu, J. W., Coote, M. L., Ollis, D. L. (2005). The effects of substrate orientation on the mechanism of a phosphotriesterase. *Organic, biomolecular chemistry*, 3(24), 4343-4350

38. Jackson, C. J., Foo, J. L., Kim, H. K., Carr, P. D., Liu, J. W., Salem, G. Ollis, D. L. (2008). In crystallo capture of a Michaelis complex and product-binding modes of a bacterial phosphotriesterase. *Journal of molecular biology*, 375(5), 1189-1196.
39. Jain, C. (2002). Degradation of mRNA in *Escherichia coli*. *IUBMB life*, 54(6), 315-321.
40. Jakubkienė V. (2009). Organinė chemija. Mokomoji knyga. Vilnius: Vilniaus universitetas.
41. Jiménez, J. I., Nogales, J., García, J. L., Díaz, E. (2010). A genomic view of the catabolism of aromatic compounds in *Pseudomonas*. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1297-1325.
42. Jones, A., Goodfellow M. (2010) Genus II. *Rhodococcus* (Zopf 1891) emend Goodfellow et al. 1998. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (pp. 1-65), vol 4, 2nd edn. Springer.
43. Joule, J.A., Mills K. (2009). *Heterocyclic Chemistry*. 5th ed. Wiley.
44. Kaiser, J. P., Feng, Y., Bollag, J. M. (1996). Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, 60(3), 483-498.
45. Karlson, U., Dwyer, D. F., Hooper, S. W., Moore, E. R., Timmis, K. N., Eltis, L. D. (1993). Two independently regulated cytochromes P-450 in a *Rhodococcus rhodochrous* strain that degrades 2-ethoxyphenol and 4-methoxybenzoate. *Journal of bacteriology*, 175(5), 1467-1474.
46. Katritzky A.R., Rees C.W (Eds.) (1984). *Comprehensive Heterocyclic Chemistry: The Structure, Reaction, Synthesis and Uses of Heterocyclic Compounds*, vol. 2, Part 2A, Pergamon Press, Oxford, p. 511.
47. Khasaeva, F., Vasilyuk, N., Terentyev, P., Troshina, M., Lebedev, A. T. (2011). A novel soil bacterial strain degrading pyridines. *Environmental chemistry letters*, 9(3), 439-445.
48. Khurana, J. L., Jackson, C. J., Scott, C., Pandey, G., Horne, I., Russell, R. J., Herlt, A., Easton, C., Oakeshott, J. G. (2009). Characterization of the phenylurea hydrolases A and B: founding members of a novel amidohydrolase subgroup. *Biochemical Journal*, 418(2), 431-441.
49. Kim, M., Singleton, I., Yin, C. R., Quan, Z. X., Lee, M., Lee, S. T. (2006). Influence of phenol on the biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pseudomonas putida* MK1. *Letters in applied microbiology*, 42(5), 495-500.
50. Komeda, H., Hori, Y., Kobayashi, M., Shimizu, S. (1996). Transcriptional regulation of the *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitA gene encoding a nitrilase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), 10572-10577.
51. Korosteleva LA, Kost AN, Vorobeva LI, Modyanova LV, Terentev PB, Kulikov NS. (1981) Microbiological degradation of pyridine and 3-methylpyridine. *Applied Biochemistry and Microbiology* 17: 276–283.
52. Kumar, R., Mishra, I. M., Mall, I. D. (1995). Treatment of pyridine bearing waste-water using activated carbon. *Research and Industry*, 40(1), 33-37.
53. Larkin, M. J., Kulakov, L. A., Allen, C. C. (2005). Biodegradation and *Rhodococcus*—masters of catabolic versatility. *Current opinion in Biotechnology*, 16(3), 282-290.
54. Larkin, M. J., Kulakov, L. A., Allen, C. C. (2006). Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: biochemistry, physiology, and genetic adaptation. *Advances in applied microbiology*, 59, 1-29.
55. Lataye, D. H., Mishra, I. M., Mall, I. D. (2008). Adsorption of 2-picoline onto bagasse fly ash from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 138(1-3), 35-46.

56. Lee, J. J., Rhee, S. K., Lee, S. T. (2001). Degradation of 3-methylpyridine and 3-ethylpyridine by *Gordonia nitida* LE31. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4342-4345.
57. Li, Y., Gu, G., Zhao, J., Yu, H. (2001). Anoxic degradation of nitrogenous heterocyclic compounds by acclimated activated sludge. *Process Biochemistry*, 37(1), 81-86.
58. Liao, R. Z., Yu, J. G., Raushel, F. M., Himo, F. (2008). Theoretical investigation of the reaction mechanism of the dinuclear zinc enzyme dihydroorotase. *Chemistry—A European Journal*, 14(14), 4287-4292.
59. Liaw, S. H., Chen, S. J., Ko, T. P., Hsu, C. S., Chen, C. J., Wang, A. H. J., Tsai, Y. C. (2003). Crystal structure of D-aminoacylase from *Alcaligenes faecalis* DA1: a novel subset of amidohydrolases and insights into the enzyme mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4957-4962.
60. Liu, A. and Huo, L. (2014). Amidohydrolase Superfamily. In eLS, John Wiley, Sons, Ltd (Ed.).
61. Lodha, B., Bhadane, R., Patel, B., Killedar, D. (2008). Biodegradation of pyridine by an isolated bacterial consortium/strain and bio-augmentation of strain into activated sludge to enhance pyridine biodegradation. *Biodegradation*, 19(5), 717-723.
62. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
63. Macheroux, P., Kappes, B., Ealick, S. E. (2011). Flavogenomics—a genomic and structural view of flavin-dependent proteins. *The FEBS journal*, 278(15), 2625-2634.
64. Mall, I. D., Tewari, S., Singh, N., Mishra, I. M. (2003). Utilisation of bagasse fly ash and carbon waste from fertiliser plant for treatment of pyridine and 3-picoline bearing wastewater., " *Proceedings of the 18th International Conference on Solid Waste Technology and Management (Philadelphia, PA)*, pp. 1273-1282.
65. Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nešvera, J., Křen, V. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment international*, 35(1), 162-177.
66. Massey, V. (1994). Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 269(36), 22459-22462.
67. Mathur, A. K., Majumder, C. B., Chatterjee, S., Roy, P. (2008). Biodegradation of pyridine by the new bacterial isolates *S. putrefaciens* and *B. sphaericus*. *Journal of hazardous materials*, 157(2-3), 335-343.
68. Matsui, T., Noda, K. I., Tanaka, Y., Maruhashi, K., Kurane, R. (2002). Recombinant *Rhodococcus* sp. strain T09 can desulfurize DBT in the presence of inorganic sulfate. *Current microbiology*, 45(4), 240-244.
69. McEwen, F. L. and Stephenson, G. R. (1979). *The Use and Significance of Pesticides in the Environment*, John Wiley, Sons, New York, pp. 118-21, 162, 192.
70. McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., ... , Dosanjh, M. (2006). The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15582-15587.
71. Mohan, S. V., Sistla, S., Guru, R. K., Prasad, K. K., Kumar, C. S., Ramakrishna, S., Sarma, P. N. (2003). Microbial degradation of pyridine using *Pseudomonas* sp. and isolation of plasmid responsible for degradation. *Waste Management*, 23(2), 167-171.
72. Mudliar, S. N., Padoley, K. V., Bhatt, P., Sureshkumar, M., Lokhande, S. K., Pandey, R. A., Vaidya, A. N. (2008). Pyridine biodegradation in a novel rotating rope bioreactor. *Bioresource technology*, 99(5), 1044-1051.

73. Nagy, I., Schoofs, G., Compernelle, F., Proost, P., Vanderleyden, J., De Mot, R. (1995). Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (S-ethyl dipropylcarbamothioate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21 involve an inducible cytochrome P-450 system and aldehyde dehydrogenase. *Journal of bacteriology*, 177(3), 676-687.
74. Nakashima, N., Tamura, T. (2004). Isolation and characterization of a rolling-circle-type plasmid from *Rhodococcus erythropolis* and application of the plasmid to multiple-recombinant-protein expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5557-5568.
75. Nitanaï, Y., Satow, Y., Adachi, H., Tsujimoto, M. (2002). Crystal structure of human renal dipeptidase involved in  $\beta$ -lactam hydrolysis. *Journal of molecular biology*, 321(2), 177-184.
76. Padoley, K. V., Rajvaidya, A. S., Subbarao, T. V., Pandey, R. A. (2006). Biodegradation of pyridine in a completely mixed activated sludge process. *Bioresource technology*, 97(10), 1225-1236.
77. Palfey, B. A., McDonald, C. A. (2010). Control of catalysis in flavin-dependent monooxygenases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 493(1), 26-36.
78. Park, D., Lee, D. S., Kim, Y. M., Park, J. M. (2008). Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility. *Bioresource Technology*, 99(6), 2092-2096.
79. Perry R.H., Green D.W., (2007). Perry's Chemical Engineers' Handbook, 8th ed., McGraw-Hill, 2007.
80. Reddy, D. M., Reddy, G. (2012). Microbial Degradation of Pyridine and Its Derivatives. In *Microorganisms in Environmental Management* (pp. 249-262). Springer, Dordrecht.
81. Rhee, S. K., Lee, G. M., Lee, S. T. (1996). Influence of a supplementary carbon source on biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pimelobacter* sp. *Applied microbiology and biotechnology*, 44(6), 816-822.
82. Rhee, S. K., Lee, G. M., Yoon, J. H., Park, Y. H., Bae, H. S., Lee, S. T. (1997). Anaerobic and aerobic degradation of pyridine by a newly isolated denitrifying bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2578-2585.
83. Richards, D. J., Shieh, W. K. (1986). Biological fate of organic priority pollutants in the aquatic environment. *Water Research*, 20(9), 1077-1090.
84. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
85. Seibert, C. M., Raushel, F. M. (2005). Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry*, 44(17), 6383-6391.
86. Shapir, N., Pedersen, C., Gil, O., Strong, L., Seffernick, J., Sadowsky, M. J., Wackett, L. P. (2006). TrzN from *Arthrobacter aurescens* TC1 is a zinc amidohydrolase. *Journal of bacteriology*, 188(16), 5859-5864.
87. Sharma, R. C., Schimke, R. T. (1996). Preparation of electro-competent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques*, 20(1), 42-44.
88. Shimizu, S., Watanabe, N., Kataoka, T., Shoji, T., Abe, N., Morishita, S., Ichimura, H. (2012). Pyridine and pyridine derivatives. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
89. Shukla, O. P. (1973). Microbial decomposition of pyridine. *Indian journal of experimental biology*, 11(5), 463.
90. Shukla, O. P., Kaul, S. M. (1974). A constitutive pyridine degrading system in *Corynebacterium* sp. *Indian journal of biochemistry and biophysics*, 11(3), 201.
91. Shukla, O. P., Kaul, S. M. (1975). Succinate semialdehyde, an intermediate in the degradation of pyridine by *Brevibacterium* sp. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 12(4), 326-330.

92. Shukla, O. P., Kaul, S. M. (1986). Microbiological transformation of pyridine N-oxide and pyridine by *Nocardia* sp. *Canadian journal of microbiology*, 32(4), 330-341.
93. Sims, G. K., O'Loughlin, E. J., Crawford, R. L. (1989). Degradation of pyridines in the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 19(4), 309-340.
94. Sims, G. K., Sommers, L. E., Konopka, A. (1986). Degradation of pyridine by *Micrococcus luteus* isolated from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 963-968.
95. Stafford, D. A., Callely, A. G. (1970). Properties of a pyridine-degrading organism. *Journal of general microbiology*, 63(3), xiv-xiv.
96. Stanislaukienė R. *Arthrobacter* spp. plazmidžių tyrimas (2012) [Daktaro disertacija]. Vilnius: Vilniaus universitetas.
97. Sucharitakul, J., Chaiyen, P., Entsch, B., Ballou, D. P. (2006). Kinetic mechanisms of the oxygenase from a two-component enzyme, p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase from *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17044-17053.
98. Sugrue, E., Fraser, N. J., Hopkins, D. H., Carr, P. D., Khurana, J. L., Oakeshott, J. G., ... , Jackson, C. J. (2015). Evolutionary expansion of the amidohydrolase superfamily in bacteria in response to the synthetic compounds molinate and diuron. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7), 2612-2624.
99. Sun, J. Q., Xu, L., Tang, Y. Q., Chen, F. M., Liu, W. Q., & Wu, X. L. (2011). Degradation of pyridine by one *Rhodococcus* strain in the presence of chromium (VI) or phenol. *Journal of hazardous materials*, 191(1-3), 62-68.
100. Tamari K, Kaji J. (1954). The isolation of A-picolinic acid and pircularin, the toxic substances produced by *Pyricularia oryzae*. Bull. Fac. Agric. Niigata Univ.
101. Tamari K. (1951). On the biochemical studies of fusaric acid a metabolic product of the causative mould of the "Bakanae" disease of rice plants. I. Studies on the synthesis of fusarinin. Bull. Fac. Agric. Niigata Univ.
102. Tian, S., Qian, C., Yang, X. (2006). Biodegradation of biomass gasification wastewater by two species of *Pseudomonas* using immobilized cell reactor. *Applied biochemistry and biotechnology*, 128(2), 141-147.
103. Tinikul, R., Pitsawong, W., Sucharitakul, J., Nijvipakul, S., Ballou, D. P., Chaiyen, P. (2013). The transfer of reduced flavin mononucleotide from LuxG oxidoreductase to luciferase occurs via free diffusion. *Biochemistry*, 52(39), 6834-6843.
104. Tu, S. C. (2001). Reduced flavin: donor and acceptor enzymes and mechanisms of channeling. *Antioxidants and Redox Signaling*, 3(5), 881-897.
105. Ukaegbu, U. E., Kantz, A., Beaton, M., Gassner, G. T., Rosenzweig, A. C. (2010). Structure and ligand binding properties of the epoxidase component of styrene monooxygenase. *Biochemistry*, 49(8), 1678-1688.
106. Vaitekūnas, J., Gasparavičiūtė, R., Rutkienė, R., Tauraitė, D., Meškys, R. (2016). A 2-hydroxypyridine catabolism pathway in *Rhodococcus rhodochrous* strain PY11. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 1264-1273.
107. Van Berkel, W. J. H., Kamerbeek, N. M., Fraaije, M. W. (2006). Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *Journal of biotechnology*, 124(4), 670-689.
108. Wang J L, Quan X C, Wu L B, Qian Y, Hegemann W. (2002). Bioaugmentation as a tool to enhance the removal of refractory compound in coke plant wastewater. *Process Biochemistry*, 38(5), 777-781.

109. Wang, J., Jiang, X., Liu, X., Sun, X., Han, W., Li, J., ..., Shen, J. (2018). Microbial degradation mechanism of pyridine by *Paracoccus* sp. NJUST30 newly isolated from aerobic granules. *Chemical Engineering Journal*, 344, 86-94.
110. Warhurst, A. M., Fewson, C. A. (1994). Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Critical reviews in biotechnology*, 14(1), 29-73.
111. Watson, G. K., Cain, R. B. (1975). Microbial metabolism of the pyridine ring. Metabolic pathways of pyridine biodegradation by soil bacteria. *Biochemical Journal*, 146(1), 157-172.
112. Wen, D., Zhang, J., Xiong, R., Liu, R., Chen, L. (2013). Bioaugmentation with a pyridine-degrading bacterium in a membrane bioreactor treating pharmaceutical wastewater. *Journal of Environmental Sciences*, 25(11), 2265-2271.
113. Whyte, L. G., Schultz, A., Van Beilen, J. B., Luz, A. P., Pellizari, V., Labbé, D., Greer, C. W. (2002). Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 41(2), 141-150.
114. Williams, L., Nguyen, T., Li, Y., Porter, T. N., Raushel, F. M. (2006). Uronate isomerase: a nonhydrolytic member of the amidohydrolase superfamily with an ambivalent requirement for a divalent metal ion. *Biochemistry*, 45(24), 7453-7462.
115. Woo, T. H., Cheng, A. F., Ling, J. M. (1992). An application of a simple method for the preparation of bacterial DNA. *Biotechniques*, 13(5), 696.
116. Yassin, A. F. (2005). *Rhodococcus triatoma* sp. nov., isolated from a blood-sucking bug. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1575-1579.
117. Zalat, O. A., Elsayed, M. A. (2013). A study on microwave removal of pyridine from wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1(3), 137-143.
118. Zefirov, N. S., Agapova, S. R., Terentiev, P. B., Bulakhova, I. M., Vasyukova, N. I., Modyanova, L. V. (1994). Degradation of pyridine by *Arthrobacter crystallopoietes* and *Rhodococcus opocus* strains. *FEMS microbiology letters*, 118(1-2), 71-74.
119. Zhang, Y., Chang, L., Yan, N., Tang, Y., Liu, R., Rittmann, B. E. (2013). UV photolysis for accelerating pyridine biodegradation. *Environmental science and technology*, 48(1), 649-655.
120. Zhi XY, Li WJ, Stackebrandt E (2009) An update of the structure and 16S rRNA gene sequence based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59:589-608.
121. Zong, L., Liu, F., Chen, D., Zhang, X., Ling, C., Li, A. (2018). A novel pyridine based polymer for highly efficient separation of nickel from high-acidity and high-concentration cobalt solutions. *Chemical Engineering Journal*, 334, 995-1005.
122. Žilinskas A. (2014). Alkaloidai. Mokomoji knyga. Vilnius: Vilniaus universitetas.

