

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Benjamins  
VALIAUGA

Chinonų ir nitroaromatinių  
junginių redukcijos flavininėmis  
dehidrogenazėmis-  
transhidrogenazėmis  
mechanizmų tyrimai

**DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA**

Gamtos mokslai,  
Biochemija N004

---

VILNIUS 2020

Disertacija buvo rengta 2015-2019 metais Vilniaus Universiteto Gyvybės mokslų centre, Biochemijos institute

**Mokslinis vadovas - habil. dr. Narimantas Čėnas** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija N004)

Gynimo taryba:

Pirmininkas – **Prof. habil. dr. Albertas Malinauskas** (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, chemija, N003)

Nariai:

**Prof. dr. Rimantas Daugelavičius** (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N004);

**Dr. Elisabeth Davioud-Charvet** (Strasbūro universitetas, Prancūzija, gamtos mokslai, biochemija, N004);

**Dr. Daiva Tauraitė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N004);

**Prof. dr. Albinas Žilinskas** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija, N003).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2020 m. rugsėjo mėn. 29 d. 14 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R-401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva, LT-12057.

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

VILNIUS UNIVERSITY

Benjaminas  
VALIAUGA

Studies of reduction mechanisms  
of quinones and nitroaromatic  
compounds by flavoenzymes  
dehydrogenases-  
transhydrogenases

**SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION**

Natural Sciences,  
Biochemistry N004

---

VILNIUS 2020

This dissertation was written between 2015 and 2019 in Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of Biochemistry

**Academic supervisor - habil. dr. Narimantas Čėnas** (Vilnius University, Natural sciences, Biochemistry, N004)

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

**Chairman – Prof. habil. dr. Albertas Malinauskas** (Center for Physical Sciences and Technology, Natural sciences, Chemistry, N003).

**Members:**

**Prof. dr. Rimantas Daugelavičius** (Vytautas Magnus University, Natural sciences, Biochemistry, N004);

**Dr. Elisabeth Davioud-Charvet** (University of Strasbourg, Natural sciences, Biochemistry, N004).

**Dr. Daiva Tauraitė** (Vilnius University, Natural sciences, Biochemistry, N004);

**Prof. dr. Albinas Žilinskas** (Vilnius University, Natural sciences, Chemistry, N003).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 14 h on 29th September 2020 in the R-401 auditorium of the Life Sciences Center, Vilnius University. Address: Sauletekis ave. 7, Vilnius, Lithuania, LT-10257.

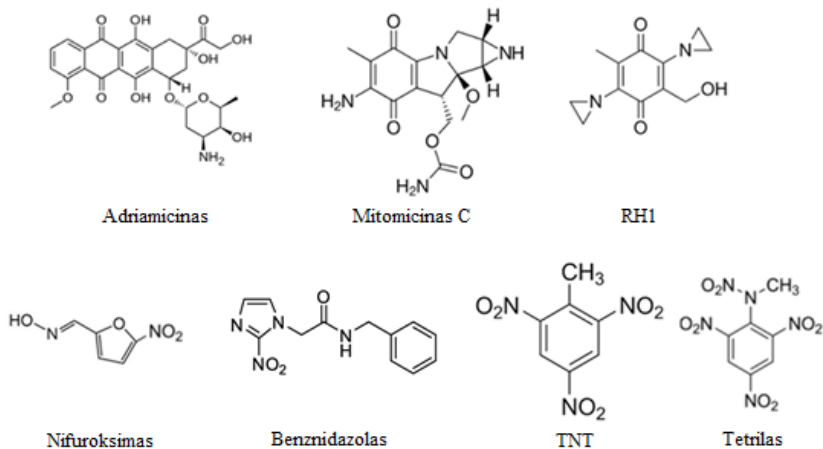
The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: [www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

## ĮVADAS

Flavininiai fermentai savo aktyviajame centre turi flavino mononukleotidą (FMN) arba flavino adenino dinukleotidą (FAD), kurie dažniausiai būna stipriai nekovalentiškai prisijungę prie apofermento ( $K_d = 10^{-10} - 10^{-8}$  M). Flavininiai fermentai yra gausiai paplitę gamtoje ir dalyvauja daugybėje metabolinių ir bioenergetinių procesų. Jie sudaro maždaug 2% visų fermentų. Didžioji dalys flavininių fermentų, 90%, yra oksidoreduktazės. Tarp jų katalizuojamų reakcijų yra elektronų pernaša, dehidrinimas, oksidacija ir hidrosilinimas. Dažniausiai flavininio fermento katalizinis ciklas yra charakterizuojamas dviejų atskirų pusiaureakcijų – flavino redukcijos ir reoksidacijos. Flavininiai fermentai yra skirstomi į 5 klases (Hemmerich ir Massey, 1979): dehidrogenazės-transhidrogenazės, oksidazės, oksigenazės, dehidrogenazės-elektrontransferazės ir elektrontransferazės. Ši klasifikacija paremta skirtingomis fermentų galimybėmis atlikti vien- arba dvielektroninę pernašą, ir skirtingomis flavinų semichinonų (laisvųjų radikalų) savybėmis.

Flavininiai fermentai vaidina svarbų vaidmenį biomedicinoje ir ekotoksikologijoje, kadangi jie yra vaistų ir ksenobiotikų taikiniai, be to, jie dalyvauja aplinkos teršalų biodegradacijoje. Šiuo atžvilgiu, flavininių fermentų

katalizuojama chinonų (Q) ir nitroaromatinių junginių (ArNO<sub>2</sub>) (1 Pav.) redukcija yra ypatingos svarbos.




---

**1 Pav.** Chinonai ir nitroaromatiniai junginiai. Adriamicinas, mitomicinas C ir RH1 yra priešvėžiniai junginiai. Nifuroksimas ir benzimidazolas yra antiparazitiniai reagentai, o TNT ir tetrilas – sprogmens, dėl ko jie laikomi aplinkos teršalais.

---

Antraciklinai, mitomicinai, aziridinilbenzochinonai, nitrofuranai ir nitroimidazoli (1 Pav.) yra naudojami arba tiriami kaip priešvėžiniai, antiparazitiniai ir antibakteriniai reagentai (McKeown *et al.*, 2007). Be to, policikliniai chinonai ir nitroaromatiniai junginiai yra toksiški atmosferos teršalai, kiti polinitroaromatiniai junginiai yra pramoninių atliekų komponentai ir pesticidai, arba 2,4,6-trinitrotoluenu (TNT) ir tetrilo (1 Pav.) atveju, toksiškų sprogmėnų liekanos aplinkoje.

Toksinis arba kai kuriais atvejais terapinis Q and ArNO<sub>2</sub> poveikis dažniausiai yra siejamas su jų vienelektronine redukcija iki radikalų, kurie yra reoksiduojami O<sub>2</sub> susiformuojant superoksidui (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), ir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei hidroksilo radikalui (OH<sup>•</sup>). Jis pažeidžia DNR ir baltymus, dėl ko pasireiškia “oksidacinio streso” tipo citotoksiškumas. Dažniausiai vienelektroninė Q and ArNO<sub>2</sub> redukcija yra katalizuojama flavininių fermentų dehidrogenazių-transhidrogenazių, kurios yra charakterizuojamos aukšto stabilumo neutraliu flavino semichinonu bei vienelektroninio fiziologinio oksidatoriaus, pavyzdžiui, hemo or FeS-baltymų buvimu. Geriausiai ištirti jų atstovai yra žinduolių NADPH:citochromo P-450 reduktazė, NADH:citochromo b<sub>5</sub> reduktazė, NADH: ubichinono reduktazė (kompleksas I), NO sintazė, įvairios kilmės ferredoksin:NADP<sup>+</sup> reduktazė, ir bakterinės deguoniui jautrios nitroreduktazės (NRs) (Peterson *et al.*, 1979; Holtzman *et al.*, 1981; Iyanagi *et al.*, 1984; Orna ir Mason, 1989; Bironaitė *et al.*, 1991; Čėnas *et al.*, 1994; Anusevičius *et al.*, 1999; Kumagai *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2005).

Dvielektroninė Q ir ArNO<sub>2</sub> redukcija turi dvejopą poveikį. Q redukcija į hidrochinonus prisideda prie jų detoksifikacijos, nes šie toliau yra konjuguojami su gliukuronatu ar sulfatu (Lind *et al.*, 1990). Tačiau aziridinilchinonų (1 Pav.) redukcija kaip tik skatina DNR alkilinimą aziridino grupėmis (Hargreaves *et*

al., 2000). Keturėlektroninės ArNO<sub>2</sub> redukcijos, susidedančios iš dviejų dvielektroninės redukcijos pakopų, metu susidaro hidroksilaminai, kurie taip pat alkilina DNR (Williams *et al.*, 2015). Antra vertus, ši reakcija yra pirmoji polinitroaromatinių aplinkos teršalų biodegradacijos pakopa (Spain, 1995). Šiame procese svarbiausi fermentai yra žinduolių DT-diaforazė (NAD(P)H:chinono oksidoreduktazė) ir bakterinės deguoniui nejautrios nitroreduktazės (NR). Jos katalizuoja dviejų elektronų (hidrido) pernašą tarp redukuojančių ir oksiduojančių substratų ir turi nestabilių anijoninį flavino semichinoną, dėl ko yra priskiriamos dehidrogenazių-transhidrogenazių klasei.

Bakterinių deguoniui nejautrių NR tyrimai yra svarbūs dėl ArNO<sub>2</sub> biodegradacijos problemų (jų gamyba siekia 10<sup>8</sup> t per metus). ArNO<sub>2</sub> žinomi kaip antibakteriniai ir antiparazitiniai agentai. Pastaruoju metu vystoma ir genais pagrįsta priešnavikinė chemoterapija naudojant bakterines nitroreduktazes (Williams *et al.*, 2015), o ArNO<sub>2</sub> pradėti tirti ir kaip galimi priešvėžiniai agentai. Todėl pagrindinis šio darbo tyrimo objektas yra menkai ištirta deguoniui nejautri NR – *Escherichia coli* nitroreduktazė A (NfsA). NfsA yra FMN kofaktorių turintis 27 kDa fermentas, kuris kaip redukuojantį substratą gali naudoti tik NADPH. Siekiant geriau charakterizuoti NfsA kitų dehidrogenazių-transhidrogenazių kontekste, buvo tiriama ir kito šios klasės atstovo, termofilinio mikroorganizmo *Thermotoga maritima* tioredoksino



reduktazės (TmTR) katalizuojama Q ir ArNO<sub>2</sub> redukcija. *T. maritima* TR yra 2x34,3 kDa fermentas, kurio aktyviajame centre yra FAD kofaktorius. TmTR struktūriškai artima augalų (*Arabidopsis thaliana*) tioredoksino reduktazė santykinai greitai redukuoja šiuos junginius (Bironaitė *et al.*, 1998; Miškinienė *et al.*, 1998), todėl ji gali dalyvauti šių junginių biodegradacijoje. TmTR katalizuojamos reakcijos svarbios ir dėl neseniai atsiradusio susidomėjimo hipertermofilinių mikroorganizmų taikymu kuro ar pramoninių chemikalų sintezėje (Zeldes *et al.*, 2015).

## DISERTACIJOS TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Šios disertacijos tikslas yra ištirti dviejų skirtingų grupių dehidrogenazių-transhidrogenazių (*E. coli* nitroreduktazės A (NfsA) ir *T. maritima* tioredoksino reduktazės (TmTR)) katalizuojamą nefiziologinių oksidatorių (chinonų ir nitroaromatinių junginių) redukcijos mechanizmus ir substratinį specifiškumą, bei charakterizuoti fermentų struktūrinės-funkcines ypatybes, įtakančias šių reakcijų mechanizmus.

Šiam tikslui įgyvendinti buvo suformuluoti šie uždaviniai:

1. Ištirti chinonų ir nitroaromatinių junginių redukcijos mechanizmus NfsA ir TmTR.

2. Ištirti  $\text{ArNO}_2$  suminės keturelektroninės redukcijos nitroreduktazėmis mechanizmą, įvertinant jos fermentinių ir nefermentinių stadijų vaidmenį.
3. Nustatyti TmTR ir NfsA flavininių kofaktorių oksidacijos-redukcijos potencialus.
4. Charakterizuoti galima ryšį tarp chinonų ir nitroaromatinių junginių redukcijos pobūdžio ir flavininio kofaktoriaus semichinono stabilumo NfsA ir TmTR.

## MOKSLINĖ SVARBA IR NAUJUMAS

1. Pirmą kartą charakterizuotas A grupės nitroreduktazės NfsA chinonų ir nitroaromatinių junginių redukcijos mechanizmas ir substratinis specifiskumas. Šios savybės yra artimos B grupės nitroreduktazės iš *Enterobacter cloacae* savybėms. Pirmą kartą nustatyta, kad NfsA katalizuojamos keturelektroninės nitroaromatinių junginių redukcijos metu dominuoja ne fermentinė tarpinio nitrozo junginio redukcija, o jo tiesioginė redukcija NADPH. Šie duomenys gali būti svarbūs sprendžiant GDEPT ir aplinkos taršalų biodegradacijos problemas.

2. Darbe charakterizuotos termodinaminės NfsA FMN kofaktoriaus savybės (standartinio redokso potencialo vertė, semichinoninės būsenos nestabilumas) ir nustatytas labiausiai tikėtinas vienstadijinis hidrido pernešimo mechanizmas. Šios savybės yra artimos *E. cloacae* NR savybėms. Tai papildo negausią informaciją šioje srityje ir leidžia teigti, kad nepaisant žymių amino rūgščių sekos skirtumų, A ir B grupės nitroreduktazėms būdingas bendri katalizės bruožai, greičiausiai nulemiami FAD termodinaminių savybių.
3. Nustatyta, kad TmTR chinonų ir aromatinių nitrojunginių redukcijos mechanizmas, substratinis specifiškumas ir FAD standartinis oksidacijos-redukcijos potencialas yra artimi anksčiau aprašytoms žemo m.sv. tioredoksino reduktazių iš *A. thaliana* ir *E. coli* savybėms. Gauti duomenys apibendrina informaciją šioje srityje ir leidžia teigti, kad šios grupės fermentai gali aktyviai dalyvauti oksidacijoje-redukcijoje dalyvaujančių ksenobiotikų arba aplinkos teršalų redukcijoje. Šios reakcijos gali būti svarbus teršalų biodegradacijos arba oksidacijoje-redukcijoje dalyvaujančių antibakterinių agentų poveikio faktorius.
4. Tarpinio FAD semichinono susidarymas TmTR katalizuojamos chinonų redukcijos metu yra pirmas pastebėtas tokio pobūdžio reiškinys žemo m.sv.

tioredoksino reduktazių katalizuojamuose procesuose. Jis paaiškina mišrų vien- ir dvielektroninės chinonų ir nitroaromatinių redukcijos TmTR pobūdį.

5. Skirtingi NfsA ir TmTR katalizuojamos chinonų ir nitroaromatinių junginių redukcijos mechanizmai praplėčia duomenis apie šių reakcijų, atliekamų flavininėmis dehidrogenazėmis-transhidrogenazėmis, įvairovę. Nepaisant dvielektroninio fiziologinių oksidatorių redukcijos pobūdžio, šios klasės fermentai gali redukuoti nefiziologinius elektronų akceptorius tiek vien-, tiek dvielektroniniu būdu. Tikėtina, kad šiuos skirtingus mechanizmus nulemia skirtingas flavininio kofaktoriaus semichinono stabilumas.

## TEIGINIAI

1. *E. coli* NfsA katalizuoja dvielektroninę chinonų ir nitroaromatinių junginių redukciją. Nitroaromatinių junginių reakingumas yra didesnis lyginant su to paties redukcijos potencialo chinonais. Chinonų redukcija geriausiai paaiškinama vienstadijinės (H<sup>-</sup>) hidrido pernašos mechanizmu. Fermento katalitinio ciklo limituojanti stadija yra oksidacinė pusiaureakcija.

2. Redukuojant nitroaromatinius junginius NfsA, dominuoja tiesioginė tarpinio nitrozo junginio redukcija NADPH, o ne fermentinė redukcija.
3. TmTR katalizuoja mišrią vien- ir dvielektroninę chinonų ir nitroaromatinių junginių redukciją. Chinonų reakingumas didėja didėjant jų  $E^{17}$ , ir yra didesnis nei nitroaromatinių junginių su tuo pačiu redukcijos potencialu.
4. Tarpinio FAD semichinono susidarymas durochinono redukcijos TmTR metu rodo, kad limituojanti reakcijos stadija yra semichinono oksidacija.
5. TmTR ir NfsA flavininių kofaktorių oksidacijos-redukcijos potencialai yra artimi jų analogams - *E. coli* TR ir *Enterobacter cloacae* NR.

## 1. MEDŽIAGOS IR METODAI

*Escherichia coli* nitroreduktazė (NfsA), išskirta pagal (Prosser ir kiti, 2010) metodiką, yra gauta iš Dr. David Ackerley (Viktorijos universitetas, Velingtonas, Naujoji Zelandija). Fermento koncentracija buvo nustatyta spektrofotometriškai pagal  $\epsilon_{460} = 10,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

*Thermotoga maritima* tioredoksino reduktazė (TR) yra gauta iš Dr. Nicolas Rouhier (Lotaringijos universitetas, Nansi, Prancūzija). TR koncentracija buvo nustatyta spektrofotometriškai pagal  $\epsilon_{460} = 10,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

*Thermotoga maritima* glutaredoksinas 1 (Grx1) yra gautas iš Dr. Nicolas Rouhier (Lotaringijos universitetas, Prancūzija). TR koncentracija buvo nustatyta spektrofotometriškai pagal  $\epsilon_{280} = 145 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Couturier *et al.*, 2013). Kiti fermentai ir reagentai gauti iš Sigma-Aldrich. TNT ir tetrilas (2,4,6-trinitrofenil-*N*-metilnitraminas) gauti iš Dr. Jono Šarlausko (Biochemijos institutas).

Nitroaromatinių ir chinoninių junginių redukcija NfsA buvo stebima spektrofotometru Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies) 0,1 M K-fosfato buferiniame tirpale (pH 7,0) 25 °C, esant 1 mM EDTA. Buvo matuojami 100  $\mu\text{M}$  NADPH oksidacijos greičiai ( $\Delta\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Kinetiniai reakcijų parametrai,  $k_{\text{cat}}$  ir  $k_{\text{cat}}/K_m$ , atitinkantys Lineweaver-Burk grafiko

( $[E]/V$  nuo  $1/[S]$ , kur  $V$  yra reakcijos greitis,  $[E]$  ir  $[S]$  yra atitinkamai fermento ir substrato koncentracijos) atvirkštinį susikirtimą su  $y$ -ašimi ir atvirkštinį tiesės pasvirimo kampą, buvo skaičiuoti naudojant Sigmaplot 11.0 programą.  $k_{cat}$  lygus NAD(P)H molekulių skaičiui, oksiduotam fermento aktyvaus centro per 1 s. Temperatūrinė  $k_{cat}/K_m$  priklausomybė buvo stebima 10 °C – 40 °C intervale, reakcijos aktyvacijos entalpija ( $\Delta H^\ddagger$ ) ir entropija ( $\Delta S^\ddagger$ ) buvo apskaičiuotos pagal Eyringo lygtį.

Fermentinė APAD(P)<sup>+</sup> redukcija su NAD(P)H buvo stebima susiformuojant APAD(P)H ( $\Delta\epsilon_{363} = 5,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Weber ir Kaplan, 1957). Kinetikos tyrimuose APAD(P)H buvo sitetinamas *in situ* APAD(P)<sup>+</sup> redukcija su 100 mM formiato ir 1 mg/ml formiato dehidrogenazės. APAD(P)H koncentracija buvo nustatyta pagal  $\epsilon_{365} = 7,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Kaplan ir Ciotti, 1956).

Vienelektroninės redukcijos srautas chinonų atveju buvo nustatytas 1,4-benzochinono medijuojamos citochromo  $c$  (50  $\mu\text{M}$ ) redukcijos metu, terpėje esant 100  $\mu\text{M}$  NADPH ir 50  $\mu\text{M}$  1,4-benzochinono pagal  $\Delta\epsilon_{550} = 20 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Tos pačios sąlygos buvo ir stebint fermento medijuojamą citochromo  $c$  redukciją su 50  $\mu\text{M}$  tetryl ar TNT terpėje esant 100  $\mu\text{M}$  NADPH bei neįvedus ir įvedus 100 U/ml SOD.

Tetrilo redukcija buvo stebima su NADPH regeneracijos sistema (10 mM gliukozės-6-fosfato ir 1 mg/ml gliukozės-6-

fosfato dehidrogenazės), stebint absorbciją 200-550 nm. Kai kuriais atvejais, NADH regeneracijos sistema (20  $\mu$ M NADPH, 100 mM HCOONa, ir 1mg formiato dehidrogenazės) buvo naudojama.

pH priklausomybės tyrimuose buvo naudoti 0,1 M K-fosfatiniai buferiai, kurių pH kito nuo 5,5 iki 8,0, taip pat ir 0,1 M Tris-acetato buferiai, kurių pH kito nuo 5,5 iki 8,0.

Nestacionarios kinetikos redukcijos matavimai NAD(P)H pertekliuje buvo atliekami su „sustabdytosios srovės“ SX.17 MV spektrofotometru (Applied Photophysics), esant pH 7,0 ir 25 °C. Fermento koncentracija po sumaišymo buvo 5,0  $\mu$ M.

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> susidarymas buvo stebimas su Griesso reagentu. Kai sulfanilamidas (ar sulfanilino rūgštis) yra įvedama į terpę, nitrito jonas reaguoja ir susidaro diazonio druska. Tada susidaro azo dažas (*N*-alfa-naftil-etilendiaminas), kuris pasižymi rožine spalva (Beda ir Nedospasov, 2005).

Degunies suvartojimas TNT, tetrilo ir naftochinono reakcijose su askorbatu buvo stebimas Digital Model 10 Clark elektrodu (Rank Brothers Ltd., Bottisham, UK). Pradinė O<sub>2</sub> koncentracija 25 °C buvo laikoma 250  $\mu$ M.

Fluorescencijos spektrų matavimai buvo atliekami fluorimetru Hitachi MPF-7. Sužadavimo bangos ilgis – 460 nm.

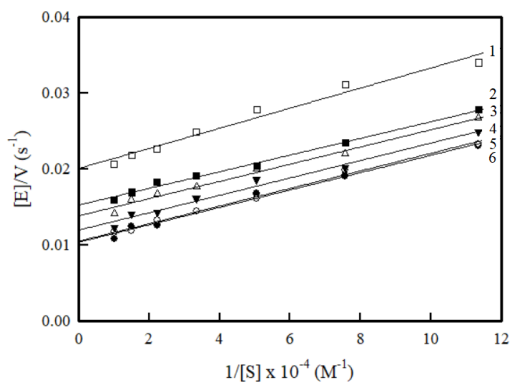


## 2. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

### 2.1. *Escherichia coli* nitroreduktazės A (NfsA) tyrimai

#### 2.1.1. NfsA stacionarios kinetikos ir substratinio specifiškumo tyrimai

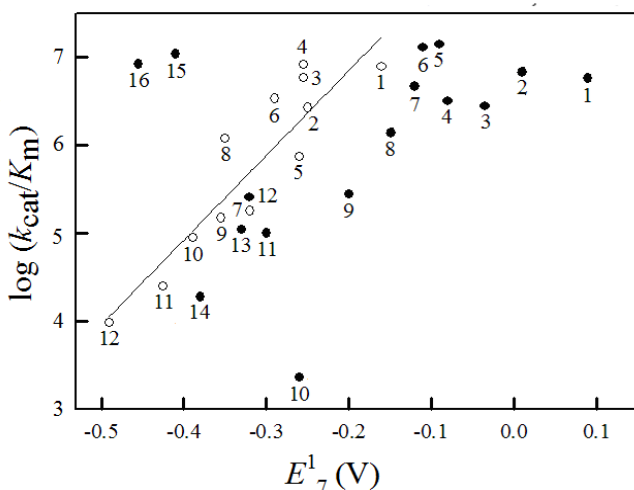
Egzistuoja paralelizmas tarp parametų, apibūdinančių chinonų vienelektroninės redukcijos energetiką (poros chinonas/chinono anijon-radikalas oksidacijos-redukcijos potencialas,  $E^{1_7}$ ) ir dvielektroninės redukcijos energetiką (poros chinonas/hidrochinono anijonas oksidacijos-redukcijos potencialas,  $E_7(Q/QH^-)$ ) (Čėnas et al., 2004). Tas pats galioja ir nitroaromatinių junginių redukcijai, kur atitinkamu koreliacijos parametru gali būti hidrido adukto susidarymo šiluma ( $\Delta H_f(\text{ArN}(\text{OH})\text{O}^-)$ ) (Nivinskas et al., 2001a). Todėl šiame darbe koreliacijos parametru buvo naudotas  $E^{1_7}$ . Darbe ištirtų NfsA oksidatorių  $E^{1_7}$  kito nuo -0,49 V iki +0,09 V. Naudojant fiksuotas NADPH koncentracijas ir kintant oksidatoriaus koncentracijai, buvo stebimos lygiagrečių tiesių serijos Lineweaver-Burko koordinatėse (2 Pav.). Tai rodo, kad reakcija vyksta pagal „ping-pong“ mechanizmą.



**2 Pav.** *E. coli* NfsA katalizuojamos NADPH oksidacijos, kai tetrilas yra naudojamas kaip oksidatorius, kinetika. NADPH koncentracijos: 20  $\mu\text{M}$  (1), 30  $\mu\text{M}$  (2), 50  $\mu\text{M}$  (3), 100  $\mu\text{M}$  (4), 150  $\mu\text{M}$  (5), ir 200  $\mu\text{M}$  (6).

NfsA katalizuojamos 1,4-benzochinono redukcijos NADPH metu pridėto į terpę citochromo *c* redukcijos greitis siekė tik 3% NADPH oksidacijos greičio. Kadangi citochromas *c* yra labai greitai redukuojamas benzosemichinono, bet ne hidrochinono, tai rodo, kad vienelektroninio pernešimo srautas sudaro tik 1,5%, t.y., vyksta dvielektroninė pernaša (Iyanagi ir Yamazaki, 1970). ArNO<sub>2</sub> atveju tai nustatyti sunkiau, nes, be nitroanijonradikalų, citochromą *c* lėtai redukuoja ir aromatiniai hidroksilaminai. Naudojant oksidatoriais tetrilą ir TNT, citochromo *c* redukcijos greitis sudarė 16% NADPH oksidacijos greičio. Ši reakcija buvo 30-40% inhibuojama SOD (100 U/ml), kuri eliminuoja O<sub>2</sub><sup>•</sup>, susidarantį nitroaromatinių junginių redukcijos-reoksidacijos ciklo metu. Tetrilo redukcijos

metu stebimas lėtas O<sub>2</sub> suvartojimas, artimas 10-15% NADPH oksidacijos greičio. Tai rodo, kad šioje reakcijoje vienelektroninis srautas taip pat siekia tik kelis procentus. Bimolekulinės oksidatorių redukcijos greičio konstantos ( $k_{cat}/K_m$ ) tetriolo ir TNT atveju buvo  $7,9 \pm 0,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , ir  $2,7 \pm 0,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , atitinkamai. NADPH oksidacijos  $k_{cat}/K_m$  lygi  $3,4 \pm 0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Apskaičiuotos maksimalios  $k_{cat}$  vertės prie begalinės NADPH koncentracijose buvo lygios  $110 \pm 13 \text{ s}^{-1}$  tetrilui, ir  $135 \pm 12 \text{ s}^{-1}$  TNT.



**3 Pav.** Chinonų ir nitroaromatinių junginių reakingumas *E. coli* NfsA katalizuojamose reakcijose. Priklausomybė tarp chinonų (juodi apskritimai) ir nitroaromatinių junginių (tuščiaviduriai apskritimai)  $\log k_{cat}/K_m$  ir jų vienelektroninės redukcijos potencialo ( $E^1_7$ ), terpėje esant pH 7.0. Chinonai: 1,4-benzochinonas (1), 2-metil-1,4-benzochinonas (2), 2,3-dichloro-1,4-naftochinonas (3), 2,6-dimetil-1,4-benzochinonas (4), 5-

hidroksi-1,4-naftochinonas (5), 5,8-dihidroksi-1,4-naftochinonas (6), 9,10-fenantrenchinonas (7), 1,4-naftochinonas (8), 2-metil-1,4-naftochinonas (9), tetrametil-1,4-benzochinonas (10), 1,4-dihidroksi-9,10-antrachinonas (11), riboflavinai (12), 1,8-dihidroksi-9,10-antrachinonas (13), 9,10-antrachinono-2-sulfurūgštis (14), 2-hidroksi-1,4-naftochinonas (15), 2-hidroksi-3-metil-1,4-naftochinonas (16). Nitroaromatiniai junginiai: 2,4,6-trinitrofenilmetilnitraminas (tetrilas) (1), 2,4,6-trinitrotoluenas (2), nifuroksimas (3), nitrofurantoinas (4), 1,4-dinitrobenzenas (5), 1,2-dinitrobenzenas (6), 4-nitrobenzaldehydas (7), 1,3-dinitrobenzenas (8), 4-nitroacetofenonas (9), CB-1954 (10), 4-nitrobenzenkarboksirūgštis (11), nitrobenzenas (12).

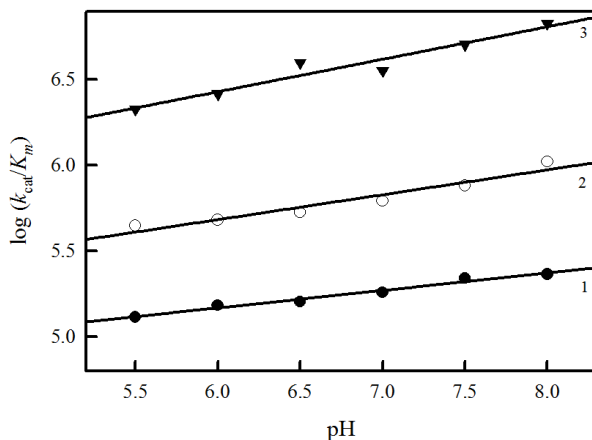
---

$\text{ArNO}_2$  reakingumas didėjo didėjant jų vienelektroninės redukcijos potencialui ( $E^{17}$ ) (3 Pav.). Jų log  $k_{\text{cat}}/K_m$  pakluso tiesinei, nors ir šiek tiek išsibarsčiusiai, priklausomybei nuo  $E^{17}$  verčių ( $r^2 = 0,8313$ ). Chinonų reakingumas buvo apie 10 kartų mažesnis nei nitroaromatinių junginių su panašiomis  $E^{17}$  vertėmis, išskyrus anomaliai greitai reaguojančius 2-hidroksi-1,4-naftochinono darinius (3 Pav.).

Siekiant įvertinti, ar chinonų redukcija vyksta pagal vienstadijinį ( $\text{H}^+$ ) ar tristadijinį ( $\text{e}^-, \text{H}^+, \text{e}^-$ ) hidrido pernašos mechanizmą, ištirtos NfsA reakcijų su riboflavinu, 2-metil-1,4-naftochinonu, ir 2,6-dimetil-1,4-benzochinonu greičio pH priklausomybė (4 Pav.). Šių junginių reakingumas didėjo didėjant pH su pakankamai artimais koeficientais  $\Delta \log k_{\text{cat}}/K_m / \Delta \text{pH}$ ,  $0,11 \pm 0,03$  (riboflavinai),  $0,14 \pm 0,03$  (2-metil-1,4-naftochinonas), ir  $0,18 \pm 0,04$  (2,6-dimetil-1,4-benzochinonas).

Ta pati tendencija buvo pastebėta riboflavinui ir 2,6-dimetil-1,4-benzochinonui Tris-acetate (pH 5,5 – 8,0). Šie duomenys prieštarauja tristadijiniam hidrido pernešimo mechanizmui, kurio atveju riboflavino reakingumas, palyginus su chinonų reakingumu, turėtų didėti mažėjant pH: riboflavino semichinono  $pK_a$  yra 8,5 (Hemmerich *et al.*, 1977), todėl jo  $E^1$  auga mažėjant pH su koeficientu  $-0.059 \text{ V}/\Delta\text{pH}$ , tuo tarpu kai chinonų  $E^1$  nepriklauso nuo pH (semichinonų  $pK_a$  lygi 4,5-5,0). Tai rodo, kad labiau tikėtina yra vienstadijinė hidrido pernaša. Panašūs dėsningumai buvo pastebėti ir B grupės nitroreduktazės iš *E. cloacae* atveju (Nivinskas *et al.*, 2002).

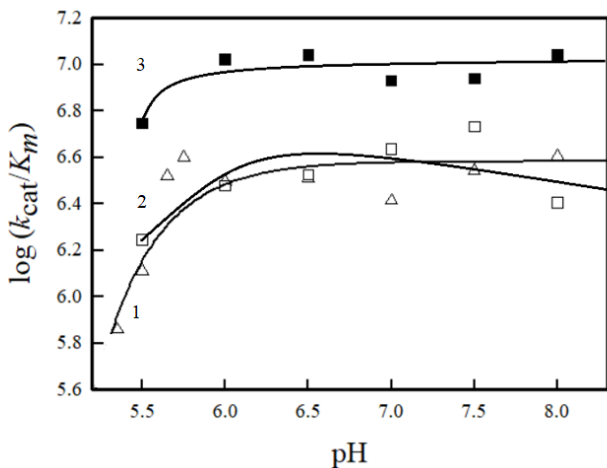
Kitų grupių oksidatorių  $\log k_{cat}/K_m$  priklausomybės nuo pH skiriasi nuo pateiktųjų 4 Pav.: vienelektroninio neigiamai įkrauto akceptorius fericianido reakingumo pH priklausomybė yra silpnai išreikšta, o nitroaromatinio junginio TNT ir didesniu aktyvumu pasižyminčio chinono 2-hidroksi-1,4-naftochinono reakingumas pradeda mažėti esant  $\text{pH} < 6,0$  (5 Pav.). Tai galėtų reikšti, kad „įprasto“ reakingumo chinonai, TNT ir 2-hidroksi-1,4-naftochinas rišasi skirtingose NfsA aktyviojo centro vietose.



**4 Pav.** NfsA reakingumo priklausomybė nuo pH reakcijoje dalyvaujant riboflavinui (1), 2-metil-1,4-naftochinonui (2), ir 2,6-dimetilbenzochinonui (3).

Temperatūrinė TNT, *p*-nitrobenzalhido, *o*-dinitrobenzeno, 2-metil-1,4-naftochinono ir 2-hidroksi-3-metil-1,4-naftochinono redukcijos  $k_{cat}/K_m$  priklausomybė parodė, kad reakcijos  $\Delta S^\ddagger$  kito nuo  $14,4 \pm 15,0$  J/mol $\times^\circ$ K (2-hidroksi-3-metil-1,4-naftochinonas) iki  $-57,4 \pm 12,0$  J/mol $\times^\circ$ K (*p*-nitrobenzalhidas). Nepastebėti sistemingi nitroaromatinių junginių ir chinonų redukcijos  $\Delta S^\ddagger$  skirtumai, būdingi jų dvielektroninei redukcijai žinduolių NAD(P)H:chinonreduktaze (NQO1) (Anusevičius *et al.*, 2002; Misevičienė *et al.*, 2006). Tuo atveju chinonai yra žymiai geresni NQO1 substratai nei nitroaromatiniai junginiai, ir yra charakterizuojami žymiai neigiamesnėmis  $\Delta S^\ddagger$ , rodančiomis jų efektyvesnę nei

nitroaromatinių junginių elektroninę sąveiką su redukuotu flavinu.



**5 Pav.** NfsA reaktingumo priklausomybė nuo pH reakcijoje dalyvaujant TNT (1), 2-hidroksi-1,4-naftochinonui (2), ir fericianidui (3).

### 2.1.2. NfsA nestacionarios kinetikos ir fotoredukcijos tyrimai

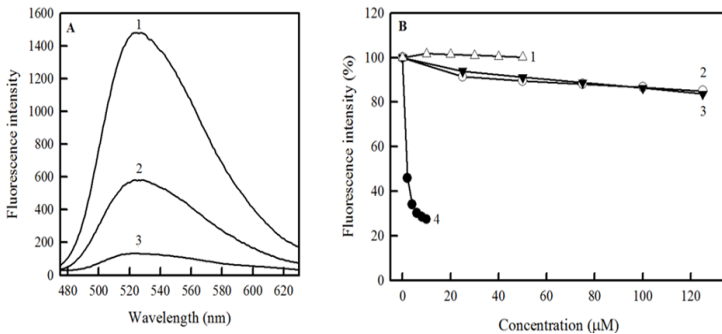
„Sustabdytosios srovės“ spektrofotometriniuose tyrimuose redukuojant NfsA NADPH pertekliumi (stebima prie 460 nm) aerobinėje terpėje reakcijų greitis viršijo  $\geq 400 \text{ s}^{-1}$ , kas yra artima prietaiso detekcijos riboms. Dėl to buvo neįmanoma nustatyti reakcijos maksimalaus greičio. Tačiau tai rodo, kad limituojanti katalitinio ciklo stadija yra redukcinė

pusiaureakcija, t.y., fermento redukcija NADPH, nes stacionarios kinetikos eksperimentuose aktyviausių oksidatorių atveju  $k_{cat}$  buvo artima  $100 \text{ s}^{-1}$ . „Ping-pong“ reakcijos mechanizmas su limituojančia oksidacine pusiaureakcija taip pat būdingas *E. coli* NfsB (Race *et al.*, 2005; Jarrom *et al.*, 2009) ir *E. cloacae* NR (Nivinskas *et al.*, 2002; Pitsawong *et al.*, 2014). Esant terpėje žemoms NADPH koncentracijoms ( $[\text{NADPH}] \ll [\text{O}_2]$ ,  $250 \mu\text{M}$ ), ~90% siekiančią redukciją sekė lėta fermento reoksidacija deguonimi,  $0,2\text{-}0,3 \text{ s}^{-1}$ . Sumaišius fermentą su NADPH ir 2,6-dimetil-1,4-benzochinono pertekliumi, ženkliai sumažėdavo FMN redukcijos laipsnis ir buvo stebima greita reoksidacija. Reakcijos metu nepastebėtas tarpinis absorbcijos išaugimas prie  $>460 \text{ nm}$ . Anaerobinėse sąlygose fotoredukuojant NfsA su  $1,5 \mu\text{M}$  5-deazaflavino nepastebėtas FMN anijoninio semichinono ( $\lambda_{max} = 380 \text{ nm}$ ) ar neutralaus semichinono ( $\lambda_{max} \sim 600 \text{ nm}$ ) susidarymas (fermento fotoredukcijos laipsnis  $>70\%$ ). Tai rodo, kad kaip ir *E. cloacae* NR atveju, NfsA FMN semichinonas yra labai nestabilus,  $\leq 1\%$  pusiausvyroje.

### 2.1.3. NfsA FMN fluorescencijos tyrimai

Siekiant charakterizuoti NfsA sąveiką su įvairiais ligandais (oksidatoriais ir inhibitoriais), buvo ištirtas jų poveikis FMN fluorescencijai (6 Pav.).





**6 Pav.** A) 5 μM FMN (1), 5 μM NfsA (2) ir 5 μM NfsB (3) fluorescencijos spektrai. B) Dikumarolo (1,4), TNT (2), ir tetrilo (3) poveikis FMN fluorescencijos intensyvumui su 5 μM NfsA (1), ir NfsB (2-4). Sužadainimas - 460 nm, emisija - 525 nm.

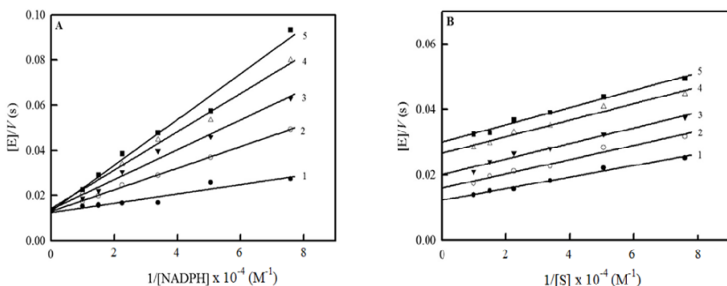
NfsA FMN fluorescencijos intensyvumas siekė 40% laisvo FMN intensyvumo (6A Pav.), t.y. daugiau nei NfsB atveju (12%) ar *E. cloacae* NR atveju (17%, Nivinskas *et al.*, 2002). Tai rodo, kad NfsA FMN izoaloksazino žiedas arba geriau kontaktuoja su tirpikliu, arba blogiau kontaktuoja su aromatinėmis arba alifatinėmis aminorūgščių liekanomis nei NfsB atveju. Inhibitorius dikumarolas (10-50 μM) negesina NfsA fluorescencijos (6B Pav.), kaip ir reakcijos produktas NADP<sup>+</sup> (100-500 μM), ar oksidatoriai tetrilas ar TNT (50-250 μM), 1,4-benzochinonas (100-400 μM), ar 2,3-dichloro-1,4-naftochinonas (10-40 μM). Tuo tarpu NfsB atveju mikromolinės dikumarolo koncentracijos gesina FMN fluorescenciją ~70%, tetrilas ir TNT (10-125 μM) – apie 20%

(6B Pav.).  $\text{NADP}^+$  (50-250  $\mu\text{M}$ ) gesino FMN fluorescenciją ~12%. Tai rodo, kad NfsA oksiduotoje formoje aromatiniai ligandai silpniau sąveikauja su FMN izoaloksazino žiedu nei NfsB atveju, ir, greičiausiai, yra labiau nuo jo nutolę.

#### 2.1.4. NfsA inhibicijos tyrimai

Nustatyta, kad reakcijos produktas  $\text{NADP}^+$  yra konkurentinis inhibitorius NADPH atžvilgiu ( $K_i = 160 \pm 30 \mu\text{M}$ ) (7A Pav.).

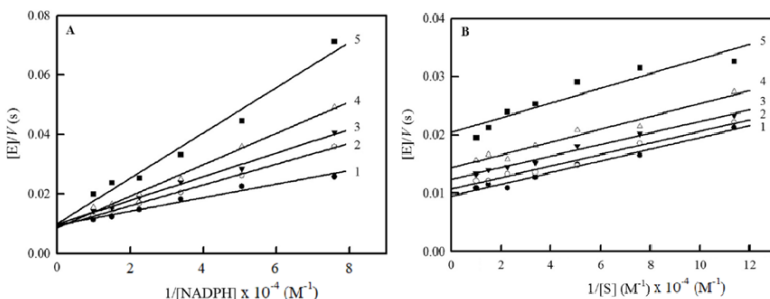
$\text{NADP}^+$  buvo mišrus (artimas bekonkurentiniam) inhibitorius tetrilo atžvilgiu (7B Pav.). Jo  $K_{is}$  (inhibicijos konstanta pagal nuolinkius Lineweaver-Burk koordinatėse) lygi  $1500 \pm 200 \mu\text{M}$ , o  $K_{ii}$  (inhibicijos konstanta pagal susikirtimus su y ašimi) lygi  $450 \pm 70 \mu\text{M}$ . Tai rodo, kad  $\text{NADP}^+$  konkuruoja su NADPH dėl tos pačios rišimosi vietos oksiduotoje fermento formoje, bet blogai jungiasi prie redukuotos fermento formos, ir silpnai įtakoja oksidatoriaus  $k_{cat}/K_m$ . Oksidacijoje-redukcijoje nedalyvaujantis 2',5'-ADP taip pat yra konkurentinis inhibitorius NADPH atžvilgiu ( $K_i = 660 \pm 100 \mu\text{M}$ ).



**7 Pav.** A) NfsA katalizuojamos tetrilo redukcijos inhibicija  $\text{NADP}^+$  - varijuojamos NADPH koncentracijos terpėje esant  $100 \mu\text{M}$  tetrilo.  $\text{NADP}^+$  koncentracijos: 0 mM (1), 0,125 mM (2), 0,25 mM (3), 0,5 mM (4), ir 0,75 mM (5). B) NfsA katalizuojamos tetrilo redukcijos inhibicija  $\text{NADP}^+$  - varijuojamos tetrilo koncentracijos terpėje esant  $100 \mu\text{M}$  NADPH.  $\text{NADP}^+$  koncentracijos: 0 mM (1), 0,125 mM (2), 0,25 mM (3), 0,5 mM (4), ir 0,75 mM (5).

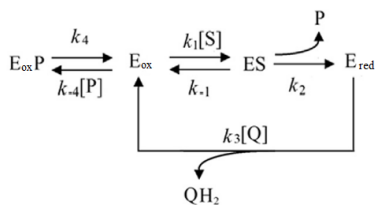
Klasikinis žinduolių NQO1 ir B grupės nitroreduktazių inhibitorius dikumarolas yra konkurentinis ( $K_{is} = 18,0 \pm 1,6 \mu\text{M}$ ) inhibitorius NADPH atžvilgiu (8A Pav.) ir bekonkurentinis oksidatoriaus tetrilo atžvilgiu (8B Pav.). Kadangi dikumarolo koncentracijos, artimos jo konkurentinei  $K_i$  NADPH atžvilgiu (8B Pav.) neįtakoja tetrilo  $k_{cat}/K_m$ , tai rodo, kad jo giminingumas oksiduotai NfsA formai yra gerokai didesnis nei redukuotai. Taip pat pastebėta, kad dikumarolas gerokai stipriau inhibuoja NfsB nei NfsA – jis taip pat buvo konkurentinis inhibitorius NADPH atžvilgiu ( $K_i = 1,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ). Ši vertė atitinka anksčiau gautus rezultatus (Anlezark *et al.*, 1992). Kitas klasikinis NAD(P)H priklausomų fermentų inhibitorius,

Cibakrono mëlis, buvo labai stiprus konkurentinis inhibitorius NADPH atžvilgiu ( $K_i = 0,09 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ).



**8 Pav.** A) NfsA katalizuojamos tetrilo redukcijos inhibicija dikumarolu - varijuojamos NADPH koncentracijos terpėje esant 100  $\mu\text{M}$  tetrilo. Dikumarolo koncentracijos: 0  $\mu\text{M}$  (1), 5  $\mu\text{M}$  (2), 10  $\mu\text{M}$  (3), 20  $\mu\text{M}$  (4), ir 30  $\mu\text{M}$  (5). B) NfsA katalizuojamos tetrilo redukcijos inhibicija dikumarolu - varijuojamos tetrilo koncentracijos terpėje esant 100  $\mu\text{M}$  NADPH. Dikumarolo koncentracijos: 0  $\mu\text{M}$  (1), 5  $\mu\text{M}$  (2), 10  $\mu\text{M}$  (3), 20  $\mu\text{M}$  (4), ir 30  $\mu\text{M}$  (5).

NADP<sup>+</sup> inhibicijos duomenys (7 Pav.) leido pasiūlyti NfsA katalizės mechanizmo schemą, kur NADP<sup>+</sup> (P) stipriai rišasi prie oksiduotos fermento formos (E<sub>ox</sub>), bet silpnai arba beveik nesiriša prie redukuotos formos (E<sub>red</sub>):



**Schema 1.** NfsA „ping-pong“ mechanizmas.

Šiuo atveju reakcijos greitis aprašomas lygtimi:

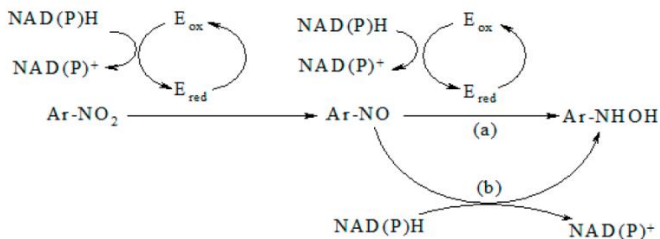
$$\frac{[E]}{V} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3[Q]} + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 k_2 [S]} \left( 1 + \frac{k_{-4}[P]}{k_4} \right) \quad (1)$$

Terpėje nesant NAD(P)<sup>+</sup> (P), lygtis (1) virsta lygtimi (2), aprašančią paprastą “ping-pong“ schemą:

$$\frac{[E]}{V} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3[Q]} + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 k_2 [S]} \quad (2)$$

#### 2.1.5. 2e<sup>-</sup>/4e<sup>-</sup> nitroaromatinių junginių redukcijos NfsA mechanizmo tyrimai

Nitroreduktazės redukuoja ArNO<sub>2</sub> į hidroksilaminus (ArNHOH) dvejomis hidrido pernašos pakopomis (2 × 2e<sup>-</sup>), susidarant tarpiniams nitrozo (ArNO) junginiams. ArNO virtimo ArNHOH mechanizmas nėra pilnai supastas. Kadangi *E. coli* NfsB ar *E. cloacae* NR redukuoja nitrozobenzeną apytikriai 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> kartų greičiau nei nitrobenzeną (Koder ir Miller, 1998; Race *et al.*, 2005), manoma, kad ArNO yra redukuojami nitroreduktazių, vykstant antram katalitiniam ciklui (Schema 2, (a) kelias). Tačiau žinoma, kad NAD(P)H gali pakankamai greitai redukuoti kaip kuriuos ArNO ir tiesiogiai, nedalyvaujant fermentui (Leskovac *et al.*, 1989; Knox *et al.*, 1992). Todėl nitroreduktazinėje reakcijoje neatmestina ir tiesioginės ArNO redukcijos galimybė (Schema 2, (b) kelias):



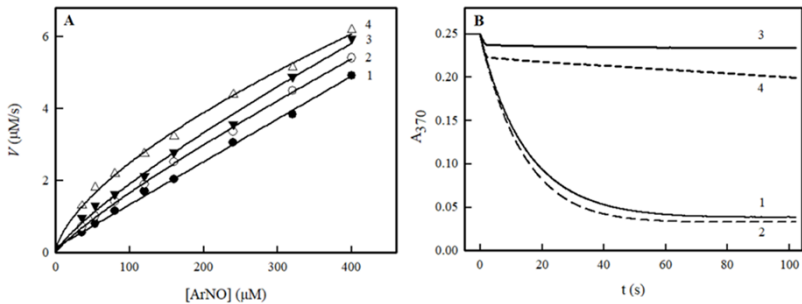

---

**Schema 2.** Fermentinis (a) ir nefermentinis (b) kelias susidarant ArNHOH iš ArNO.

---

Siekiant išaiškinti reakcijos mechanizmą, nustatyta, kad NADPH oksidacija nitrozobenzenu vyksta kaip bimolekulinė reakcija su  $k = 124,3 \pm 4,5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , t.y., greičiu, panašiu į gautą ankstesniuose tyrimuose (Race *et al.*, 2005; Leskovac *et al.*, 1989). Katalitinės NfsA koncentracijos ( $\leq 40 \text{ nM}$ ) tik nežymiai pagreitindavo reakciją (9A Pav.). Dėl to galima daryti išvadą, kad stacionarios kinetikos tyrimuose nefermentinė NADPH oksidacija viršija fermentinės oksidacijos greitį. Nustatyta, kad esant  $100 \text{ }\mu\text{M}$  NADPH, nitrozobenzenas oksiduoja NfsA su  $k_{\text{cat(app.)}} = 55.0 \pm 9.5 \text{ s}^{-1}$  ir  $k_{\text{cat}}/K_m = 5.7 \pm 1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Pastaroji reikšmė yra žemesnė nei anksčiau nustatyta *E. coli* NfsB atveju,  $2.2 \div 15.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Race *et al.*, 2005). Tai gali atspindėti skirtingą NfsA ir NfsB reaktingumą, arba tai, kad mūsų atveju buvo naudotas tikslesnis „sustabdytosios srovės“ matavimo metodas. Kadangi askorbatas redukuoja nitrozobenzoną žymiai

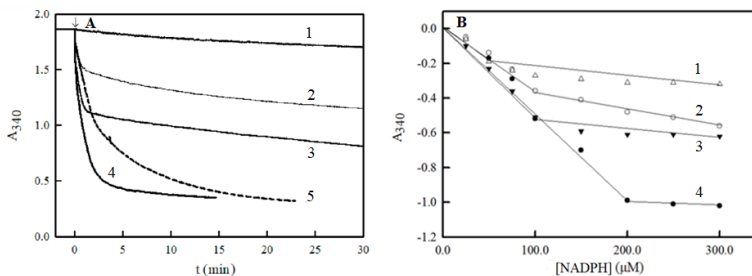
greičiau nei NAD(P)H ( $k = 2.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , Uršič *et al.*, 1998), askorbato įvedimas į terpę stipriai inhibavo reakciją (9B Pav.).



**9 Pav.** A) 100 μM NADPH oksidacijos greičiai nitrozobenzenu (1) ir terpėje esant NfsA (2–4). Fermento koncentracijos - 10 nM (2), 20 nM (3), ir 40 nM (3). B) 100 μM NADPH oksidacijos kinetika 400 μM nitrozobenzenu terpėje nesant (1,3) ir esant (2,4) 40 nM NfsA. 2 mM askorbato buvo įvesta į švirksną su NADPH (3,4).

Pastebėta, kad fermentinėje reakcijoje pirmojoje fazėje 1 molis TNT oksiduoja 2 molius NADPH (10A Pav.), o antrosios fazės greitis buvo artimas NfsA NADPH oksidaziniams aktyvumui. Tai atitinka duomenis, kad TNT yra redukuojamas į 2(4)-monohidroksilamino-dinitrotolueną (Yang *et al.*, 2013). Kadangi 1 molis tetrilo oksiduoja 4 molius NADPH, šiuo atveju reakcijos produktas yra dihidroksilaminas, kaip ir *E. cloacae* NR katalizuojamose reakcijose (Nivinskas *et al.*, 2001a). Askorbato sumažindavo reakcijos greitį (10A Pav.) ir šią stochiometriją pakeisdavo į 1:1 (TNT) ir 2:1 (tetrilas) (10B

Pav.). Toks askorbato poveikis yra paaiškinamas greita ArNO tarpinių junginių redukcija askorbatu (Uršič *et al.*, 1998), dėl ko jis negali toliau oksiduoti NADPH. Reakcijos greičių sulėtinimas ribine 2 mM askorbato koncentracija svyravo tarp 1,63 ir 2,57 karto, naudojant oksidatoriais nitrobenzeną, *p*-nitrobenzoinę rūgštį, *p*-nitroacetofenoną, TNT ir tetrilą.



**10 Pav.** A) 300 μM NADPH oksidacijos kinetika su 50 nM NfsA terpėje nesant elektronų akceptoriaus (1), arba esant 50 μM TNT (2,3), arba 50 μM tetryl (4,5). 2,0 mM askorbato buvo dviejuose reakcijų mišiniuose (2,5). B) 340 nm absorbcijos pokyčiai pirmoje oksidacijos fazėje. Oksidatoriai: 50 μM TNT (1,2), 50 μM tetrilo (3,4), esant 2,0 mM askorbato (1,3).

Ištyrus askorbato poveikį NADPH oksidacijos  $k_{cat(app.)}$  ir  $k_{cat}/K_m$  esant fiksuotoms oksidatoriaus koncentracijoms, gauta, kad NADPH  $k_{cat}/K_m$  reikšmės yra panašios, naudojant skirtingus ArNO<sub>2</sub> (Lentelė 1), o askorbatas mažindavo ir reakcijų  $k_{cat}/K_m$ , ir  $k_{cat(app.)}$ .



**Lentelė 1.** NADPH oksidacijos  $k_{\text{cat(app.)}}$  ir  $k_{\text{cat}}/K_m$  prie fiksuotų oksidatoriaus koncentracijų NfsA katalizuojamose reakcijose terpėje esant ir nesant 2,0 mM askorbato.

Nr.	Oksidatorius	-askorbatas		+askorbatas	
		$k_{\text{cat(app.)}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat(app.)}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
1.	TNT (50 $\mu\text{M}$ )	52,0 $\pm$ 5,5	3,85 $\pm$ 0,36 $\times 10^6$	23,0 $\pm$ 3,5	1,56 $\pm$ 0,22 $\times 10^6$
2.	Tetrasilas (50 $\mu\text{M}$ )	41,8 $\pm$ 7,0	3,78 $\pm$ 0,50 $\times 10^6$	16,1 $\pm$ 3,0	2,08 $\pm$ 0,23 $\times 10^6$
3.	<i>p</i> -Nitroaceto- fenonas (0,5 mM)	50,8 $\pm$ 6,2	3,20 $\pm$ 0,4 $\times 10^6$	20,1 $\pm$ 3,5	1,62 $\pm$ 0,21 $\times 10^6$
4.	<i>p</i> - Nitrobenzenkarb oksidirūgštis (2,0 mM)	30,6 $\pm$ 4,5	3,30 $\pm$ 0,42 $\times 10^6$	19,7 $\pm$ 1,2	2,05 $\pm$ 0,30 $\times 10^6$
5.	Nitrobenzenas (1,5 mM)	4,6 $\pm$ 0,3 <sup>1</sup>	n.d. <sup>2</sup>	3,1 $\pm$ 0,2 <sup>1</sup>	n.d. <sup>2</sup>
6.	5-OH-1,4-NQ (50 $\mu\text{M}$ )	19,4 $\pm$ 2,9	1,60 $\pm$ 0,22 $\times 10^6$	18,3 $\pm$ 2,2 <sup>1</sup>	n.d. <sup>3</sup>
7.	1,4-NQ (50 $\mu\text{M}$ )	26,0 $\pm$ 3,2	1,52 $\pm$ 0,18 $\times 10^6$	22,0 $\pm$ 3,0 <sup>1</sup>	n.d. <sup>3</sup>
8.	2-OH-1,4-NQ (20 $\mu\text{M}$ )	26,5 $\pm$ 1,4	1,70 $\pm$ 0,22 $\times 10^6$	26,2 $\pm$ 3,7	1,46 $\pm$ 0,23 $\times 10^6$

<sup>1</sup> Greitis NADPH prisotintoje koncentracijoje, 250  $\mu\text{M}$ ;

<sup>2</sup> Nenustatytas dėl mažų NADPH  $K_m$  reikšmių;

<sup>3</sup> Nenustatytas dėl duomenų išsibarstymo.

Tačiau askorbatas neįtakojo NADPH  $k_{\text{cat}}/K_m$  kai oksidatoriais buvo naudojami chinonai, be to, NADPH  $k_{\text{cat}}/K_m$  buvo  $\sim 2$  kartus mažesnė nei naudojant  $\text{ArNO}_2$  (Lentelė 1). Tai nėra suderinama su “ping-pong“ reakcijos mechanizmu, kur reduktoriaus  $k_{\text{cat}}/K_m$  neturi priklausyti nuo oksidatoriaus prigimties (Cleland, 1970). Todėl galime teigti, kad nitrozo darinių redukcijos metu vyrauja nefermentinis tiesioginės NADPH oksidacijos kelias (Schema 2, (b) kelias). Antras greitesnis katalitinis ciklas,  $\text{ArNO}$  redukcija redukuotu

fermentu, neturėtų pakeisti NADPH  $k_{cat}/K_m$ , nes abejais atvejais NADPH reaguoja su ta pačia fermento forma.

Šios mechanizmo detalės gali būti svarbus polinitroaromatinių junginių biodegradacijoje, nes jos metu kai kada kaupiasi nitrozobenzenei, pvz. 50% dinitrotolueno nitrozo metabolito degraduojant TNT su *Salmonella typhimurium* anaerobinėse sąlygose (Sayama *et al.*, 1991), arba 25% azoksiareno (nitrozo ir hidroksilamino metabolitų kondensacijos produktų) aerobinės TNT inkubacijos su *Pseudomonas* sp. metu (Haidour *et al.*, 1996). Manoma, kad galima šio reiškinio priežastis yra NAD(P)H stygius. Todėl mūsų nuomone, askorbato arba kito egzogeninio reduktoriaus pridėjimas į biodegradacijos terpę galėtų gerokai sumažinti ArNO kaupimąsi.

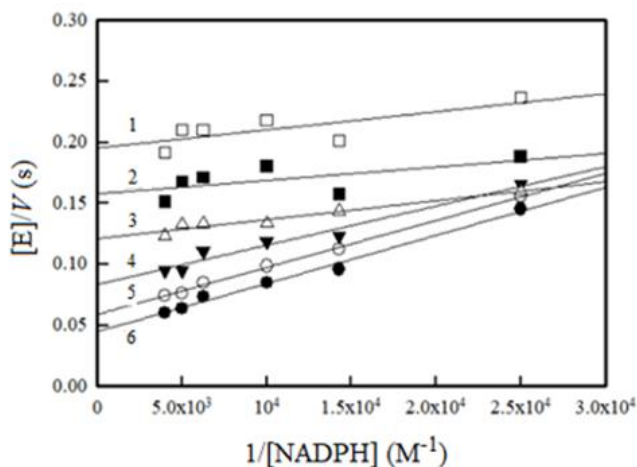
#### 2.1.6. NfsA FMN kofaktoriaus oksidacijos-redukcijos potencialo nustatymas

Daugumoje atvejų oksidacijos-redukcijos potencialai nustatomi spektrofotometriškai arba spektroelektrochemiškai, stebint reakcijos pusiausvyrą tarp flavino kofaktoriaus ir redokso indikatorius. Antra vertus, pagal Haldane principą reakcijos pusiausvyros konstanta ( $K$ ) yra lygi tiesioginės ir atvirkštinės reakcijos konstantų santykiui, jei reakcijos vyksta dalyvaujant tam pačiam tarpiniui junginiui. Šis metodas buvo

pritaikytas glutationo reduktazės ir žiurkių tioredoksino reduktazės standartinių redokso potencialų nustatymui (Rakauskienė *et al.*, 1989; Čėnas *et al.*, 2004), naudojant jų greičio konstantas ( $k_{cat}/K_m$ ) reakcijose su NADPH ir NADP<sup>+</sup>. Pagal Nernsto lygtį dviejų elektronų pernašai,  $\log K = \Delta E^0_7$  (V)/0,0295.

NADP<sup>+</sup> redukcijos NfsA kinetinių parametrų įvertinimas yra kompliktuotas dėl tinkamo elektronų donoro nebuvimo. Todėl buvo iširtos NfsA reakcijas su oksiduotu ir redukuotu NADP(H) analogu 3-acetilpiridino adenino dinukleotido fosfatu (APADP(H),  $E^0_7 = -0,258$  V). 11 Pav. duomenys rodo, kad transhidrogenazinė NfsA reakcija, APADP<sup>+</sup> redukcija NADPH, vyksta pagal „ping-pong“ mechanizmą, kuri komplikuoja inhibicija APADP<sup>+</sup>. Šiuo atveju APADP<sup>+</sup> yra konkurentinis NADPH atžvilgiu inhibitorius ( $K_i = 150$  μM), besijungiantis prie oksiduotos fermento formos. APADP<sup>+</sup> redukcija yra aprašoma  $k_{cat} = 25 \pm 4,2$  s<sup>-1</sup> ir  $k_{cat}/K_m = 4,3 \pm 0,6 \times 10^4$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Priešingoje reakcijoje APADPH buvo gautas *in situ* naudojant gliukozės-6-fosfato/gliukozės-6-fosfato dehidrogenazės regeneracinę sistemą. Reakcijos greitis buvo stebimas naudojant elektronų akceptoriumi fericianidą, nes jo absorbcija nepersidengė su APADPH absorbcija. Reakcijos greitis nepriklausė nuo fericianido koncentracijos (0,2-1,0 mM), ir yra aprašomas  $k_{cat} = 5,5 \pm 0,6$  s<sup>-1</sup> ir  $k_{cat}/K_m = 1,35 \pm 0,29 \times 10^6$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Tuo remiantis  $K = 31,4 \pm 11,1$ , ir  $E^0_7$  yra lygus  $-0,215 \pm 0,005$  V.

Šis oksidacijos-redukcijos potencialas yra teigiamesnis nei kitos A grupės nitroreduktazės, *V. harveyi* Frp, -0,255 V (Lei *et al.*, 2005), ir yra labiau artimas *E. cloacae* NR  $E^0$ , -0,190 V (Koder *et al.*, 2002). Tačiau šiuo metu neįmanoma charakterizuoti faktorių, nulemiančių tokias nitroreduktazių oksidacijos-redukcijos potencialų reikšmes dėl nepakankamo šios klasės fermentų potenciometrinių duomenų kiekio.



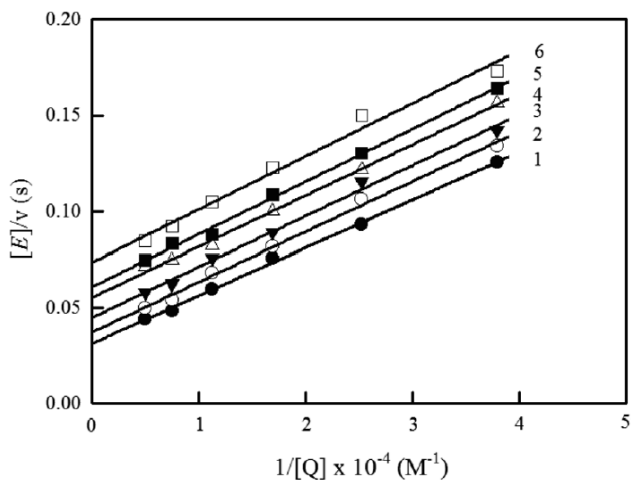
**11 Pav.** NfsA transhidrogenazinės reakcijos vaidmens priklausomybė nuo NADPH koncentracijos, esant fiksuotai APADP<sup>+</sup> koncentracijai. APADP<sup>+</sup> koncentracijos yra: (1) 0,132 mM, (2) 0,198 mM, (3) 0,296 mM, (4) 0,444 mM, (5) 0,667 mM, (6) 1,0 mM;

## 2.2. *Thermotoga maritima* tioredoksino reduktazės tyrimai

### 2.2.1. *T. maritima* TR stacionarios kinetikos ir substratinio specifiškumo tyrimai

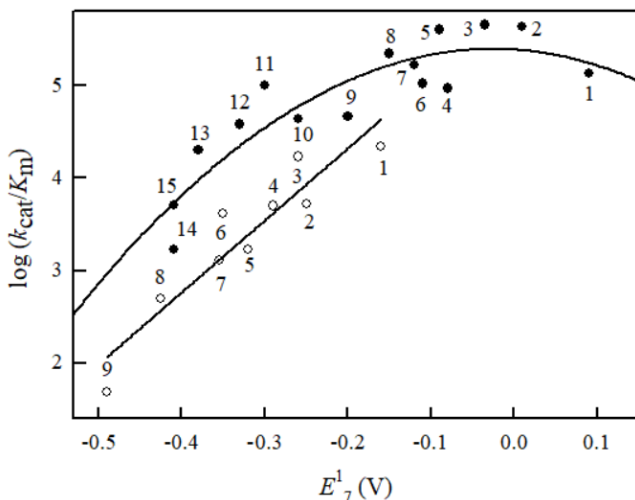
*T. maritima* tioredoksino reduktazė (TmTR) labai lėtai ( $k_{cat} = 0.2-0.3 \text{ s}^{-1}$ ) redukuoja savo kol kas vienintelį charakterizuotą fiziologinį oksidatorių glutaredoksiną 1 (Grx1) (Yang ir Ma, 2010). Tačiau jos katalizuojama Q ir ArNO<sub>2</sub> redukcija yra daug greitesnė. Naudojant oksidatoriumi 5,8-dihidroksi-1,4-naftochinoną (naftazariną) stebimos lygiagrečios tiesės Lineweaver-Burk koordinatėse (12 Pav.). Tai rodo, kad reakcija vyksta pagal “ping-pong” mechanizmą, kuris taip pat buvo būdingas ir *A. thaliana* TR katalizuojamoje chinonų ir nitroaromatinių junginių redukcijoje (Bironaitė *et al.*, 1997; Miškinienė *et al.*, 1998). Šiuo atveju naftazarino  $k_{cat}/K_m$  buvo  $3.3 \pm 0.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , o NADH  $k_{cat}/K_m$  -  $1.7 \pm 0.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .  $k_{cat}$  buvo lygi  $39.1 \pm 3.5 \text{ s}^{-1}$ . Pagal 1,4-benzochinono medijuojamą citochromo *c* redukciją nustatyta, kad vienelektroninės redukcijos srautas yra lygus 25%. TmTR katalizuojamos *p*-dinitrobenzeno ar tetrilo redukcijos atveju citochromo *c* reakcijos greitis buvo lygus, atitinkamai, 160% ir 182% NADH oksidacijos greičio. Citochromo *c* redukcija buvo inhibuojama 100 U/mg SOD 25% (*p*-dinitrobenzenas) ir 31% (tetrilas). Tai rodo, kad šiuo atveju vienelektroninės redukcijos srautas yra ne mažesnis kaip 20-27%. Reakcijos lydimos beveik

stechiometrinio  $O_2$  suvartojimo. Vyksta redukcinis tetrilo denitrinimas susidarant N-metilpikramidui ir nitritui, kuris būdingas šio junginio vienelektroninei redukcijai (Anusevičius *et al.*, 1998).



**12 Pav.** *T. maritima* TR “ping-pong” schema NADH oksidacijoje naudojant kaip oksidatorių naftazariną. NADH koncentracijos: 100 μM (1), 66,6 μM (2), 44,4 μM (3), 29,6 μM (4), 19,8 μM (5), ir 13,2 μM (6).

Oksidatorių log  $k_{cat}/K_m$  didėjo didėjant jų  $E^{17}$  (13 Pav.). Nitroaromatinių junginių aktyvumas buvo apie 10 kartų mažesnis lyginant su panašios  $E^{17}$  vertės chinonais.



**13 Pav.** Chinonų ir nitroaromatinių junginių reakingumas *T. maritima* TR katalizuojamose reakcijose. Priklausomybė tarp chinonų (juodi apskritimai) ir nitroaromatinių junginių (tuščiaviduriai apskritimai)  $\log k_{cat}/K_m$  ir jų vienelektroninės redukcijos potencialo ( $E^1_7$ ), terpėje esant pH 7.0. Chinonai: 1,4-benzochinonas (1), 2-metil-1,4-benzochinonas (2), 2,3-dichloro-1,4-naftochinonas (3), 2,6-dimetil-1,4-benzochinonas (4), 5-hidroksi-1,4-naftochinonas (5), 5,8-dihidroksi-1,4-naftochinonas (6), 9,10-fenantrenchinonas (7), 1,4-naftochinonas (8), 2-metil-1,4-naftochinonas (9), tetrametil-1,4-benzochinonas (10), 1,4-dihidroksi-9,10-antrachinonas (11), 1,8-dihidroksi-9,10-antrachinonas (12), 1,1'-dibenzil-4,4' -bipiridinas (13), 9,10-antrachinono-2-sulfūrūgštis (14), 2-hidroksi-1,4-naftochinonas (15). Nitroaromatiniai junginiai: 2,4,6-trinitrofenilmetilnitraminas (tetrilas) (1), 2,4,6-trinitrotoluenas (2), 1,4-dinitrobenzenas (3), 1,2-dinitrobenzenas (4), 4-nitrobenzaldehydas (5), 1,3-dinitrobenzenas (6), 4-nitroacetofenas (7), 4-nitrobenzenkarboksirūgštis (8), nitrobenzenas (9).

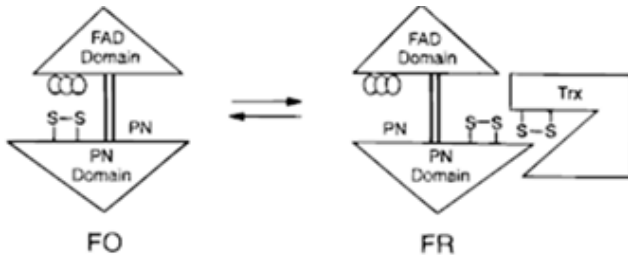
Tokia Q ir ArNO<sub>2</sub> reakingumo priklausomybė nuo jų E<sup>1</sup><sub>7</sub> ir mažesnis nitroaromatinių junginių aktyvumas būdingas ir anksčiau tirtai *A. thaliana* TR (Bironaitė *et al.*, 1998; Miškinienė *et al.*, 1998). Formaliai, ši priklausomybė atitinka „išorinės sferos“ elektronų pernašos modelį (Marcus ir Sutin, 1985), kur mažesnis ArNO<sub>2</sub> reakingumas paaiškinamas jų ~100 kartų mažesne nei chinonų vidine elektronų mainų konstanta (Meotner ir Neta, 1986; Gramp ir Jaenicke, 1987). Ji taip pat atitinka mišrios vieno ir dviejų elektronų pernašos (e<sup>-</sup>, H<sup>+</sup>, e<sup>-</sup>), modelį, kur po pirmojo elektrono pernešimo seka chinono ir flavino jon-radikalinės poros disociacija arba antrojo elektrono pernešimas jon-radikalinėje poroje (Anusevičius *et al.*, 2005). Šie dėsniniai skiriasi nuo NfsA reakingumo duomenų, kur galimai vyksta vienos stadijos (H<sup>-</sup>) hidrido pernaša ir stebimas kitoks substratų specifiškumas (3 Pav.).

### 2.2.2. *T. maritima* TR fluorescencijos tyrimai

TmTR seka (Genbank duomenų bazės numeris TM\_0869 arba AAD35951) parodė, kad joje yra išsilaikęs *E. coli* TR katalitinio disulfido motyvas Cys147, Ala148, Thr149, ir Cys150, dalyvaujantis Grx1 redukcijoje. Žinoma, kad NADP(H) rišasi *E. coli* TR katalitinio disulfido domene, tačiau jo nikotinamido žiedas yra 17 Å nutolęs nuo FAD izoaloksazino (Williams, 1995). Katalizės metu vyksta žymūs domenų tarpusavio poslinkiai, t.y., perėjimas tarp nefluorescuojančios



flavino-ties-disulfidu ir fluorescuojančios flavino-ties-NAD(P)H konformacijos (Dai *et al.*, 1996; Lennon *et al.*, 1997; 1999) (14 Pav.). TmTR yra išsilaikęs ir tarpdomeninis motyvas Gly251, Pro254, analogiškas *E. coli* TR Gly244, Pro247 ir *A. thaliana* TR Gly298, Pro301 motyvams, dalyvaujantiems domenų rotacijoje. Siekiant nustatyti, ar šie konformaciniai pokyčiai yra būdingi ir TmTR, ištirta įvairių ligandų įtaką TmTR FAD fluorescencijos intensyvumui.




---

**14 Pav.** *E. coli* L-TR konformaciniai pokyčiai NADPH (PN) ir tioredoksino (Trx) rišimosi domenuose (Wang *et al.*, 1998).

---

Nustatyta, kad TmTR FAD fluorescencijos intensyvumas sudaro 20% laisvo FAD, kuris yra artimas 25% *A. thaliana* TR atveju (Nivinskas *et al.*, 2001). ADP-ribozė ir Grx1 padidino FAD fluorescencijos intensyvumą, bet NAD<sup>+</sup> jį sumažino (Lentelė 2). Palyginus su kitų TR duomenimis (Lentelė 2) matome, kad Trx/Grx rišimasis prie katalitinio disulfido gali sukelti konformacinius pokyčius ir padidinti fluorescuojančio

TR konformero koncentraciją. Skirtinga piridino nukleotidų ir jų analogų įtaka FAD fluorescencijai gali būti paaiškunami dviem faktoriais: i) padidėjusi fluorescuojančio FR konformero koncentracija, kai prisijungia AADP<sup>+</sup>, NAD(P)<sup>+</sup> ar 2',5'-ADP/ADP-ribozė, bei ii) AADP<sup>+</sup> ir NAD(P)<sup>+</sup> sukeliamas FAD fluorescencijos gesinimas. Mūsų nuomone, šie efektai yra kiekybiniai, o ne kokybiniai, ir gali būti susieti su skirtinga FAD ir NAD(P)H rišimosi domenų tarpusavio padėtimi skirtingos kilmės fermentuose (Dai *et al.*, 1996).

**Lentelė 2.** Ligandų įtaka įvairios kilmės TR fluorescencijos intensyvumui.

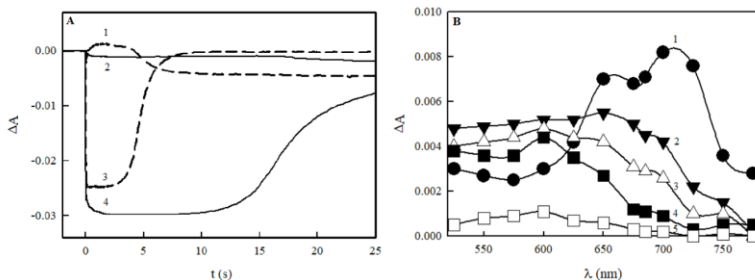
Fermento kilmė	Ligandas				Nuoroda
	3-AADP <sup>+</sup> a	NAD(P) <sup>+</sup>	2',5'-ADP/ADP-ribozė	Trx/Grx	
<i>E. coli</i>	-75%	nėra <sup>b</sup>	netirta	netirta	Mulrooney ir Williams, 1997
<i>A. thaliana</i>	-20%	+100%	+28%	+30%	Nivinskas <i>et al.</i> , 2001b
<i>T. maritima</i>	n.d.	-15% <sup>c</sup>	+30% <sup>d</sup>	+10% <sup>e</sup>	Šis darbas

<sup>a</sup>3-Aminopiridino adenino dinukleotido fosfatas; <sup>b</sup>C.H. Williams, Jr., asmeninis pranešimas, <sup>c</sup>įsisotinanti NAD<sup>+</sup> koncentracija 100 μM; <sup>d</sup>įsisotinanti ADP-ribozės koncentracija 150 μM; <sup>e</sup>įsisotinanti Grx1 koncentracija 40 μM.

### 2.2.3. *T. maritima* TR nestacionarios kinetikos tyrimai

Stebint TmTR FAD redukciją esant 460 nm, nustatyta, kad NADH jį redukuoja maksimaliu 82±3.0 s<sup>-1</sup> greičiu, ir su bimolekuline 1.6±0,15×10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> greičio konstanta. Greitą FAD redukciją sekė lėtesnė reoksidacija deguonimi (15A Pav.).

Ši reakcija buvo ženkliai pagreitinta tetrametil-1,4-benzochinono (durochinono). Esant durochinonui, buvo stebimas laikinas absorbcijos išaugimas 600 nm, kuris buvo beveik nepastebimas reakcijoje su O<sub>2</sub> (15A Pav.).



**15 Pav.** A) TmTR FAD absorbcijos pokyčiai, stebėti 600 nm (1,2) ir 460 nm (3,4), terpėje esant 100  $\mu\text{M}$  durochinono (1,3), arba nesant (2,4). Fermento koncentracija – 5,0  $\mu\text{M}$ . B) Susiformavusių tarpinių reakcijos junginių spektrai 5,0  $\mu\text{M}$  *T. maritima* TR redukcijoje su 50  $\mu\text{M}$  NADH ir 100  $\mu\text{M}$  durochinono. Spektrai buvo fiksuoti po (1) 0,2 s (1), 2,0 s (2), 3,0 s (3), 4,0 s (4), ir 6,0 s (5).

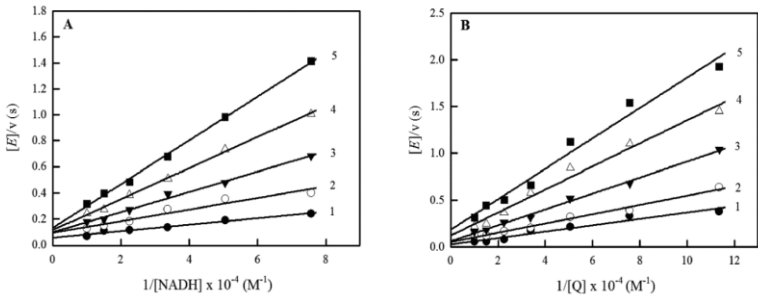
Laikinas absorbcijos išaugimas stebimas 525-775 nm intervale (15B Pav.). Reakcijos pradžioje jam būdingas  $\lambda_{\text{max}}$  ties 700 nm (15B Pav.), tačiau vėliau susiformuoja naujas absorbcijos spektras su  $\lambda_{\text{max}}$  ties 600 nm (15B Pav.), kuris yra būdingas neutraliam (mėlynam) FAD semichinonui (FADH<sup>•</sup>). Pastarasis buvo stebimas *E. coli* TR fotoredukcijos anaerobinėse sąlygose metu, tačiau nesusidaro jai reaguojant su fiziologiniu oksidatoriumi tioredoksinu (Zanetti *et al.*, 1968). Laikinas FADH<sup>•</sup> susidarymas reakcijos metu rodo, kad

reaguojant dvejais elektronais redukuotam FAD su chinonais, limituojanti reakcijos stadija yra FADH• oksidacija. Antra vertus, yra įmanoma, kad chinonų redukcijos metu lygiagrečiai susidaro ir kiti tarpiniai junginiai, pavyzdžiui FADH<sub>2</sub>-NAD<sup>+</sup> krūvio pernešimo kompleksas. Kiti reakcijos tarpiniai junginiai, pavyzdžiui, virš 700 nm absorbuojantis FADH<sub>2</sub>-NAD<sup>+</sup> kompleksas (Lennon ir Williams, 1997) gali susiformuoti reakcijos pradžioje, kas yra matoma 15B Pav.

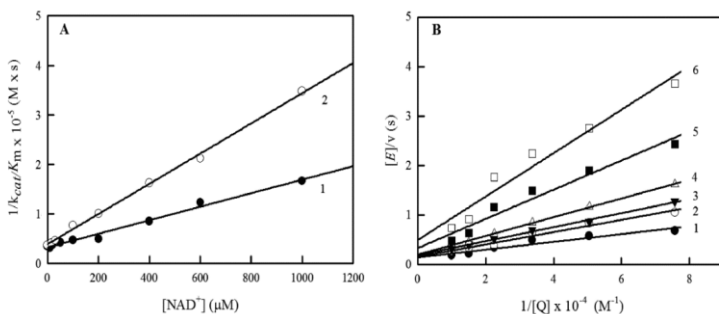
#### 2.2.4. *T. maritima* TR inhibicijos tyrimai

*T. maritima* TR reakcijose NAD<sup>+</sup> veikė kaip mišrus inhibitorius ir NADH atžvilgiu (16A Pav.), ir kaip mišrus inhibitorius oksidatoriaus naftazarino atžvilgiu (16B Pav.). Tai reiškia, kad NAD<sup>+</sup> ne tik konkuruoja su NADH dėl rišimosi prie oksiduotos fermento formos, bet ir konkuruoja su chinoniniu elektronų akceptoriumi dėl rišimosi prie redukuotos fermento formos ir galbūt reoksiduoja fermentą (Rudolph *et al.*, 1979). NAD<sup>+</sup> inhibuojantis poveikis naftazarino  $k_{cat}/K_m$  sumažėjo padidinus NADH koncentraciją nuo 30 μM iki 100 μM (17A Pav.). Be to, esant terpėje 600 μM NAD<sup>+</sup>, ir varijuojant naftazarino koncentracijas prie fiksuotų NADH koncentracijų, Lineweaver-Burk koordinatėse gauta serija susikertančių (nelygiagrečių) tiesių (17B Pav.). Tai skiriasi nuo 13 Pav. duomenų (serija lygiagrečių tiesių), gautų terpėje nesant NAD<sup>+</sup>

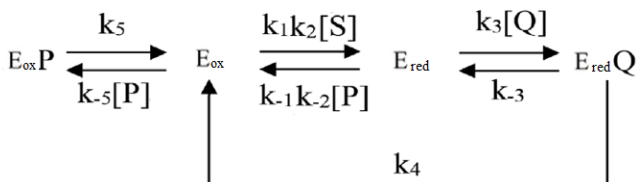
(12 Pav.). Visa tai atitinka reakcijos mechanizmą, kai reakcijos produktas  $\text{NAD}^+$  (P) ne vien konkuruoja su substratu (S) dėl rišimosi prie oksiduotos fermento formos ( $\text{E}_{\text{ox}}$ ) bei su oksidatoriumi (Q) dėl rišimosi prie redukuotos fermento formos ( $\text{E}_{\text{red}}$ ), bet gali ir reoksiduoti fermentą (Rudolph *et al.*, 1979; Rudolph, 1979) (Schema 3):



**16 Pav.** TmTR inhibicija su  $\text{NAD}^+$ . (A) TmTR chinonų redukcijos inhibicija su  $\text{NAD}^+$  varijuojamose NADH koncentracijose, terpėje esant  $100 \mu\text{M}$  naftazarino.  $\text{NAD}^+$  koncentracijos: 0 mM (1), 0,2 mM (2), 0,4 mM (3), 0,6 mM (4), ir 1,0 mM (5). (B) TmTR chinonų redukcijos inhibicija su  $\text{NAD}^+$  varijuojamose naftazarino koncentracijose, terpėje esant  $100 \mu\text{M}$  NADH.  $\text{NAD}^+$  koncentracijos: 0 mM (1), 0,2 mM (2), 0,4 mM (3), 0,6 mM (4), ir 1,0 mM (5).



**17 Pav.** TmTR inhibicija su  $NAD^+$ . (A) Naftazarino  $k_{cat}/K_m$  sumažėjimas dėl  $NAD^+$ , kai  $[NADH]=100 \mu M$  (1), ir  $[NADH]=30 \mu M$  (2); (B)  $600 \mu M$   $NAD^+$  įtaka TmTR katalizuojamos NADH oksidacijos naftazarinu greitis. NADH koncentracijos:  $100 \mu M$  (1),  $66,7 \mu M$  (2),  $44,4 \mu M$  (3),  $29,6 \mu M$  (4),  $19,8 \mu M$  (5),  $13,2 \mu M$  (6).



**Schema 3.** TmTR reakcijos mechanizmas.

Pagal schemą (3) gaunama stacionarios kinetikos lygtis (3):

$$\frac{[E]}{V} = \frac{1}{k_4} + \left(1 + \frac{k_{-3}}{k_4}\right) \left( \frac{1}{k_3[Q]} + \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-5}[P]^2}{k_1k_2k_3k_5[S][Q]} + \frac{k_{-1}k_{-2}[P]}{k_1k_2k_3[S][Q]} \right) + \frac{1}{k_1k_2[S]} \left(1 + \frac{k_{-5}[P]}{k_5}\right) \quad (3)$$

Terpėje nesant  $NAD^+$  ( $[P] = 0$ ), lygtis (3) virsta lygtimi (4), kuri aprašo paprastą „ping-pong“ mechanizmą:

$$\frac{[E]}{V} = \frac{1}{k_4} + \left(1 + \frac{k_{-3}}{k_4}\right) \frac{1}{k_3[Q]} + \frac{1}{k_1k_2[S]} \quad (4)$$

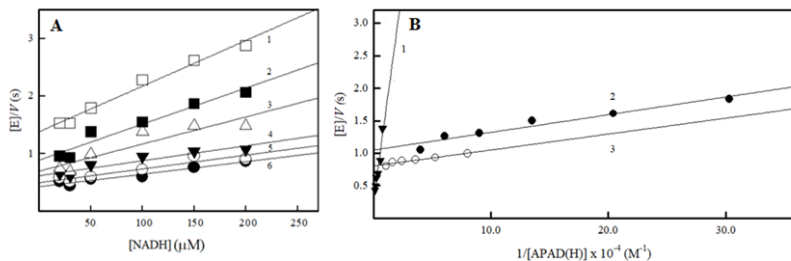
Remiantis lygtimi (3) galima teigti, kad oksidatoriaus  $k_{cat}/K_m$ , lygi  $k_3k_4/k_{-4}$ , turi priklausyti nuo NADH ir NAD<sup>+</sup> santykio ([S]/[P]). Pagal Nernsto lygtį, šis santykis atspindi tarpės oksidacijos-redukcijos potencialą ( $E_h$ ). Jei tarp oksiduotos ir redukuotos fermento formos bei NADH ir NAD<sup>+</sup> nusistovi greita pusiausvyra, tai oksidatoriaus  $k_{cat}/K_m$  turi 50% sumažėti, kai  $E_h$  lygus fermento aktyviojo centro standartiniam potencialui. Apibendrinus 16A,B ir 17A,B Pav. duomenis gauta, kad naftazarino  $k_{cat}/K_m$  sumažėja perpus, kai  $E_h = -0,31 \pm 0,03$  V (duomenys nepateikti), t.y., tokia turi būti TmTR FAD oksidacijos-redukcijos potencialo vertė. Tačiau nustatyta, kad terpėje esant oksidacijoje-redukcijoje nedalyvaujančiai ADP-ribozei, Lineweaver-Burk koordinatėse taip pat gaunama serija nelygiagrečių tiesių kaip ir 17B Pav. atveju (duomenys nepateikti). Be to, apskaičiuotoji FAD  $E^0_7$  vertė neatitinka tolesnių tyrimų (2.2.5) duomenų. Todėl galima teigti, kad schema (3) ir lygtis (3) tik dalinai aprašo chinonreduktazinės TmTR reakcijos mechanizmą. Greičiausiai, reakcijoje lygiagrečiai dalyvauja kelios fermento oksidacijos-redukcijos formos (15B Pav.), o NAD<sup>+</sup> ir ADP-ribozė ne vien konkuruoja su elektronų akceptoriumi, bet ir sukelia sudėtingesnius konformacinius pokyčius (Lentelė 2).

### 2.2.5. *T. maritima* TR flavino kofaktoriaus oksidacijos-redukcijos potencialo nustatymas

TmTR oksidacijos-redukcijos potencialas taip pat buvo nustatytas pagal Haldane principą, tiriant fermento reakcijas su 3-acetilpiridino adenino dinukleotidu (APAD<sup>+</sup>/APADH,  $E^0_7 = -0.258$  V). TmTR katalizuojamoje APAD<sup>+</sup> redukcijoje NADH buvo pastebėta inhibicija NADH, t.y. reakcijų greičiai mažėjo didėjant NADH koncentracijai (18A Pav.). Duomenų linearizacija Clelando grafike leido nustatyti NADH substrato inhibicijos konstantas ( $K_i$ ). Jų didėjimas didėjant APAD<sup>+</sup> koncentracijai rodo konkurentinį inhibicijos pobūdį. Tai reiškia, kad NADH po TmTR redukcijos pakartotinai rišasi prie redukuotos fermento formos, taip konkuruodamas su APAD<sup>+</sup>. Reikia pažymėti tai, kad NADH substrato inhibicija nepasireiškia chinonų redukcijos metu. Kai  $[APAD^+] = 0$ , NADH  $K_i$  yra lygi  $140 \pm 15 \mu\text{M}$ . TmTR oksidacija APAD<sup>+</sup> yra aprašoma  $k_{cat} = 2.7 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$  ir  $k_{cat}/K_m = 3.8 \pm 0.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (18B Pav.). Naudojant formiato/formiato dehidrogenazės regeneracinę sistemą, APADH buvo susintetintas *in situ*. Naudojant elektronų akceptoriumi fericianidą, stacionari APADH oksidacijos TmTR kinetika aprašoma  $k_{cat} = 1.0 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$  ir o  $k_{cat}/K_m = 3.2 \pm 0.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Šie parametrai yra artimi gautiesiems tiriant nestacionarią TmTR FAD redukcijos APADH kinetiką, stebint 460 nm absorbcijos pokyčius



charakteristikoms (18B Pav.). Tokiu būdu, reakcijos  $K = 8.68 \pm 1.54$ , o TmTR FAD  $E^0_7$ , apskaičiuotas pagal Nernsto lygtį, lygus  $-0,230 \pm 0,003$  V.



**18 Pav.** A) TmTR katalizuojamos APAD<sup>+</sup> redukcijos su NADH Cleland koordinatėse. APAD<sup>+</sup> koncentracijos: 1,0 mM (1), 0,67 mM (2), 0,44 mM (3), 0,30 mM (4), 0,20 mM (5), ir 0,13 mM (6). B) TmTR katalizuojamų reakcijų su APAD<sup>+</sup>/APADH greičiai: TmTR katalizuojama APAD<sup>+</sup> redukcija su NADH (1), TmTR katalizuojama APADH oksidacija naudojant oksidatoriumi fericianidą (2), ir greita TmTR redukcija su APADH (3).

Ši reikšmė yra panaši, nors kiek ir aukštesnė nei *E. coli* TR FAD  $E^0_7$ ,  $-0.242 \div -0.258$  V (O'Donnell ir Williams, 1984) ar *A. thaliana* TR,  $-0.244$  V (Bironaitė *et al.*, 1998). Galima pastebėti, kad šis potencialas yra gerokai aukštesnis nei TmTR katalitinio disulfido  $E^0_7$ ,  $-0.295$  V (Couturier *et al.*, 2013). Nors TmTR katalizės mechanizmas nėra pakankamai gerai iširtas, galima manyti, kad termodinamiškai nepalanki hidrido pernaša iš redukuotojo FAD į katalitinį disulfido yra viena iš priežasčių,

dėl ko vyksta labai lėta Grx1 ir kitų disulfidinių baltymų redukcija.

Visi šie duomenys rodo, kad FADH•, o ne FADH<sub>2</sub> oksidacija gali būti reakciją limituojanti stadija. Tai galėtų paaiškinti TmTR inhibicijos NAD<sup>+</sup> ir ADP-riboze dėsningumus, kai ligandas rišasi prie oksiduotos ir redukuotos fermento formos ir galima reoksidacija NAD<sup>+</sup>. Verta atkreipti dėmesį į tai, kad nors ir priskiriamos H-TR grupei, žiurkių TR ir struktūriškai panaši TryR redukuoja chinonus mišriu vieno ir dviejų elektronų būdu nesusiformuojant FAD semichinonui (Čėnas *et al.*, 1994,2004). Dėl to L-TR atstovių *E. coli* ir *T. maritima* fermentuose FAD kofaktorių semichinonai gali būti pakankamai stabilūs, nors šie fermentai ir vykdo fiziologinių disulfidinių oksidatorių dviejų elektronų redukciją. Taip pat mūsų rezultatai paneigia hipotezę dėl būtino raudono (anijoninio) flavino semichinono susiformavimo dehidrogenazėse-transhidrogenazėse.

Apibendrinant, šio disertacijos darbo rezultatai praplečia turimas negausias žinias apie flavininių dehidrogenazių-transhidrogenazių katalizuojamos chinonų ir nitroaromatinių junginių redukcijos mechanizmą ir substratinį specifiškumą. Labiausiai tikėtinas chinonų ir, tikėtina, nitroaromatinių junginių redukcijos NfsA mechanizmas yra vienos stadijos (H<sup>-</sup>) hidrido pernaša, kuri taip pat galimai stebima ir B grupės

nitroreduktazės iš *E. cloacae* atveju (Nivinskas *et al.*, 2001). Tačiau labiausiai tikėtinas šių junginių redukcijos mechanizmas su žinduolių NQO1 yra tristadinė ( $e^-$ ,  $H^+$ ,  $e^-$ ) hidrido pernaša (Anusevičius *et al.*, 1998, 2002; Misevičienė *et al.*, 2006). Tai gali būti paaiškinama sąlyginai stabilesne NQO1 anijoninio FAD semichinono būseną (Tedeschi *et al.*, 1995; Haynes *et al.*, 2002). Tuo tarpu mišri vien- ir dvielektroninė redukcija, kurią katalizuoja TmTR, gali būti paaiškinama didesniu neutralaus FAD semichinono stabilumu mažos molekulinės masės TR fermentuose (Zanetti *et al.*, 1968). Toks priešingas NR ir NQO1 substratinis specifiškumas (Anusevičius *et al.*, 2002, ir nuorodos ten) gali būti nulemtas to fakto, kad chinonai ir nitroaromatiniai junginiai rišasi netoli šių fermentų izoaloksazino žiedo, dėl ko gerokai pasikeičia kai kurių amino rūgščių padėtis aktyviajame centre ir pasireiškia sąveika tarp aromatinių žiedų (Faig *et al.*, 2000). Iš kitos pusės, TmTR ir jai artimos *A. thaliana* TR (Bironaitė *et al.*, 1998; Miškinienė *et al.*, 1998) rezultatai su chinonais ir nitroaromatiniais junginiais leidžia daryti išvadą apie svarbesnę geresnių elektronakceptorinių savybių vaidmenį lyginant su jų struktūriniais faktoriais ar galimai silpnesne elektronine sąveika. Visi šie duomenys parodo, kad dviem elektronais redukuojamų fiziologinių oksidatorių buvimas nebūtinai reiškia chinonų ir nitroaromatinių junginių redukciją dviem elektronais. Ši mechanizmų įvairovė galimai praplečia dehidrogenazių-

transhidrogenazių pritaikymo svarbą biomedicinoje ir ekotoksikologijoje.

## IŠVADOS

1. Dvielektroninė chinonų ir nitroaromatinių junginių redukcija *E. coli* nitroreduktaze A (NfsA) vyksta pagal „ping-pong“ mechanizmą su greitį limituojančia oksidacine pusiaureakcija.

2. Labiausiai tikėtinas chinonų redukcijos NfsA mechanizmas yra vienstadijinė ( $H^-$ ) hidrido pernaša. Fermento substratinis specifiškumas (selektyvumas 2-hidroksi-1,4-naftochinonams, aukštesnis nitroaromatinių junginių reakingumas palyginus su chinonais) yra artimas *Enterobacter cloacae* B grupės nitroreduktazei.

3. Antroje nitroaromatinių junginių redukcijos į hidroksilaminus stadijoje (nitrozo tarpinio junginio redukcijoje) pagrindinis vaidmuo tenka tiesioginei nitrozo junginio redukcijai NADPH, bet ne jo redukcijai NfsA.

4. NfsA fotoredukcijos metu nepastebėtas FMN semichinono susidarymas. Fermento standartinis oksidacijos-redukcijos potencialas,  $-0,215$  V, yra pakankamai artimas *E. cloacae* NR oksidacijos-redukcijos potencialui.

5. *Thermotoga maritima* tioredoksino reduktazė (TmTR) katalizuoja mišrią vien- ir dvielektroninę chinonų ir nitroaromatinių junginių redukciją pagal „ping-pong“ mechanizmą su greitį limituojančia oksidacine pusiaureakcija.

6. Chinonų ir nitroaromatinių junginių reakingumas TmTR katalizuojamose reakcijose auga didėjant jų vienelektroninės redukcijos potencialui. Mažesnis nitroaromatinių junginių reakingumas palyginus su chinonais gali būti paaiškintas jų mažesnėmis vidinių elektronų mainų greičio konstantomis. Chinonų redukcijos metu stebimas FAD semichinono (FADH•) susidarymas rodo, kad limituojančia proceso stadija gali būti FADH• oksidacija.

7. TmTR FAD oksidacijos-redukcijos potencialas, -0,230 V, yra artimas kitų žemos molekulinės masės tioredoksino reduktazių oksidacijos-redukcijos potencialams.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Anusevičius Ž, Misevičienė L, Medina M, Martinez-Julvez M, Gomez-Moreno C, Čėnas N. FAD semiquinone stability regulates single- and two-electron reduction of quinones by *Anabaena* PCC7119 ferredoxin:NADP<sup>+</sup> reductase and its Glu301Ala mutant. *Arch Biochem Biophys*. 2005. 437:144-50. doi: 10.1016/j.abb.2005.03.015.
2. Anusevičius Ž, Soffers AE, Čėnas N, Šarlauskas J, Martinez-Julvez M, Rietjens IM. Quantitative structure activity relationships for the electron transfer reactions of *Anabaena* PCC 7119 ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase with nitrobenzene and nitrobenzimidazolone derivatives: mechanistic implications. *FEBS Lett*. 1999. 450:44-8. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00464-0.
3. Bironaitė D, Anusevičius Ž, Jacquot JP, Čėnas N. Interaction of quinones with *Arabidopsis thaliana* thioredoxin reductase. *Biochim Biophys Acta*. 1998. 1383:82-92. doi: 10.1016/s0167-4838(97)00190-8.
4. Bironaitė D, Čėnas N, Kulys J. The rotenone-insensitive reduction of quinones and nitrocompounds by mitochondrial NADH:ubiquinone reductase. *Biochim Biophys Acta*. 1991. 1060:203-9. doi: 10.1016/s0005-2728(09)91008-8.
5. Čėnas N, Arscott D, Williams CH Jr, Blanchard JS. Mechanism of reduction of quinones by *Trypanosoma congolense*

trypanothione reductase. *Biochemistry*. 1994. 33:2509-15. doi: 10.1021/bi00175a021.

6. Čėnas N, Nivinskas H, Anusevičius Ž, Šarlauskas J, Lederer F, Arnér ES. Interactions of quinones with thioredoxin reductase: a challenge to the antioxidant role of the mammalian selenoprotein. *J Biol Chem*. 2004. 279:2583-92. doi: 10.1074/jbc.M310292200.

7. Cleland W. Steady State Kinetics. *The Enzymes*. 1970. 2:1-65

8. Couturier J, Prosper P, Winger AM, Hecker A, Hirasawa M, Knaff DB, Gans P, Jacquot JP, Navaza A, Haouz A, Rouhier N. In the absence of thioredoxins, what are the reductants for peroxiredoxins in *Thermotoga maritima*? *Antioxid Redox Signal*. 2013. 18:1613-22. doi: 10.1089/ars.2012.4739.

9. Dai S, Saarinen M, Ramaswamy S, Meyer Y, Jacquot JP, Eklund H. Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* NADPH dependent thioredoxin reductase at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol*. 1996. 264:1044-57. doi: 10.1006/jmbi.1996.0695.

10. Grampp G, Jaenicke W. ESR-spectroscopic investigation of the parallel electron and proton exchange between quinones and their radicals: Part I. Measurements at 298 K. *J. Electroanal. Chem*. 1987. 229:297-303.

11. Haïdour A, Ramos JL. Identification of Products Resulting from the Biological Reduction of 2,4,6-Trinitrotoluene,

2,4-Dinitrotoluene, and 2,6-Dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. *Environ. Sci. Technol.* 1996. 30:2365–2370

12. Hargreaves RH, Hartley JA, Butler J. Mechanisms of action of quinone-containing alkylating agents: DNA alkylation by aziridinylquinones. *Front Biosci.* 2000. 5:172-80. doi: 10.2741/hargreav.

13. Hemmerich P, Massey V. Flavin and 5-deazaflavin: a chemical evaluation of 'modified' flavoproteins with respect to the mechanisms of redox biocatalysis. *FEBS Lett.* 1977. 84(1):5-21. doi: 10.1016/0014-5793(77)81047-8.

14. Hemmerich P, Massey V. in Proceedings of the 3rd International Symposium on Oxidases and Related Systems (King, T.E., ed.), Albany, New York. 1979. 1-13.

15. Holtzman J, Crankshaw D, Peterson F, Polnaszek C. The kinetics of the aerobic reduction of nitrofurantoin by NADPH-cytochrome P-450 *c* reductase. *Mol Pharmacol.* 1981. 20:669-73.

16. Iyanagi T, Watanabe S, Anan KF. One-electron oxidation-reduction properties of hepatic NADH-cytochrome b5 reductase. *Biochemistry.* 1984. 23:1418-25. doi: 10.1021/bi00302a013.

17. Iyanagi T, Yamazaki I. One-electron-transfer reactions in biochemical systems. V. Difference in the mechanism of quinone reduction by the NADH dehydrogenase and the NAD(P)H dehydrogenase (DT-diaphorase). *Biochim Biophys Acta.* 1970. 216:282-94. doi: 10.1016/0005-2728(70)90220-3.



18. Jarrom D, Jaberipour M, Guise CP, Daff S, White SA, Searle P, Hyde E. Steady-state and stopped-flow kinetic studies of three *Escherichia coli* NfsB mutants with enhanced activity for the prodrug CB1954. *Biochemistry*. 2009. 48:7665-72. doi: 10.1021/bi900674m.
19. Kaplan N, Ciotti M. Chemistry and properties of the 3-acetylpyridine analogue of diphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem*. 1956. 221:823-32.
20. Knox R, Friedlos F, Sherwood R, Melton R, Anlezark G. The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)--II. A comparison of an *Escherichia coli* nitroreductase and Walker DT diaphorase. *Biochem Pharmacol*. 1992. 44:2297-301. doi: 10.1016/0006-2952(92)90672-6.
21. Koder R, Haynes C, Rodgers M, Rodgers D, Miller AF. Flavin thermodynamics explain the oxygen insensitivity of enteric nitroreductases. *Biochemistry*. 2002. 48:14197-205. doi: 10.1021/bi025805t.
22. Koder R, Miller AF. Steady-state kinetic mechanism, stereospecificity, substrate and inhibitor specificity of *Enterobacter cloacae* nitroreductase. *Biochim Biophys Acta*. 1998.1387:395-405. doi: 10.1016/s0167-4838(98)00151-4.
23. Kumagai Y, Nakajima H, Midorikawa K, Homma-Takeda S, Shimojo N. Inhibition of nitric oxide formation by neuronal nitric oxide synthase by quinones: nitric oxide synthase as

a quinone reductase. *Chem Res Toxicol.* 1998. 11:608-13. doi: 10.1021/tx970119u.

24. Lei B, Wang H, Yu Y, Tu SC. Redox potential and equilibria in the reductive half-reaction of *Vibrio harveyi* NADPH-FMN oxidoreductase. *Biochemistry.* 2005. 44:261-7. doi: 10.1021/bi047952s.

25. Lennon BW, Williams CH Jr, Ludwig ML. Crystal structure of reduced thioredoxin reductase from *Escherichia coli*: structural flexibility in the isoalloxazine ring of the flavin adenine dinucleotide cofactor. *Protein Sci.* 1999. 8:2366-79. doi: 10.1110/ps.8.11.2366.

26. Lennon BW, Williams CH Jr. *Reductive half-reaction of thioredoxin reductase from Escherichia coli.* *Biochemistry.* 1997. 36:9464-77. doi: 10.1021/bi970307j.

27. Leskovac V, Svircević J, Trivić S, Popović M, Radulović M. Reduction of aryl-nitroso compounds by pyridine and flavin coenzymes. *Int J Biochem.* 1989. 21:825-34. doi: 10.1016/0020-711x(89)90279-6.

28. Lind C, Cadenas E, Hochstein P, Ernster L. DT-diaphorase: purification, properties, and function. *Methods Enzymol.* 1990. 186:287-301. doi: 10.1016/0076-6879(90)86122-c.

29. Marcus R, Sutin, N. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. 811:265-322.

30. McKeown S, Cowen R, Williams K. Bioreductive drugs: from concept to clinic. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2007. 19:427-42. doi: 10.1016/j.clon.2007.03.006.
31. Meotner M, Neta P. Kinetics of Electron Transfer from Nitroaromatic Radical Anions in Aqueous Solutions. Effects of Temperature and Steric Configuration. *J. Phys. Chem.* 1986. 90:4648-4650.
32. Miškinienė V, Šarlauskas J, Jacquot JP, Čėnas N. Nitroreductase reactions of *Arabidopsis thaliana* thioredoxin reductase. *Biochim Biophys Acta*. 1998. 1366:275-83. doi: 10.1016/s0005-2728(98)00128-5.
33. Mulrooney S, Williams CH Jr. Evidence for two conformational states of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*: use of intrinsic and extrinsic quenchers of flavin fluorescence as probes to observe domain rotation. *Protein Sci*. 1997. 6:2188-95. doi: 10.1002/pro.5560061013.
34. Nivinskas H, Jacquot JP, Čėnas N. Conformational change of *Arabidopsis thaliana* thioredoxin reductase after binding of pyridine nucleotide and thioredoxin. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2001b. 56:188-92. doi: 10.1515/znc-2001-3-404.
35. Nivinskas H, Koder R, Anusevičius Ž, Šarlauskas J, Miller AF, Čėnas N. Quantitative structure-activity relationships in two-electron reduction of nitroaromatic compounds by *Enterobacter cloacae* NAD(P)H:nitroreductase. *Arch Biochem Biophys*. 2001a. 385:170-8. doi: 10.1006/abbi.2000.2127.

36. Nivinskas H, Staškevičienė S, Šarlauskas J, Koder RL, Miller AF, Čėnas N. Two-electron reduction of quinones by *Enterobacter cloacae* NAD(P)H:nitroreductase: quantitative structure-activity relationships. *Arch Biochem Biophys*. 2002. 403:249-58. doi: 10.1016/s0003-9861(02)00228-x.
37. Orna M, Mason R. Correlation of kinetic parameters of nitroreductase enzymes with redox properties of nitroaromatic compounds. *J Biol Chem*. 1989. 264:12379-84.
38. Peterson F, Mason R, Hovsepien J, Holtzman J. Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *J Biol Chem*. 1979. 254:4009-14.
39. Pitsawong W, Hoben JP, Miller AF. Understanding the broad substrate repertoire of nitroreductase based on its kinetic mechanism. *J Biol Chem*. 2014. 289:15203-14. doi: 10.1074/jbc.M113.547117.
40. Prosser G, Copp J, Syddall S, Williams E, Smaill J, Wilson W, Patterson A, Ackerley D. Discovery and evaluation of *Escherichia coli* nitroreductases that activate the anti-cancer prodrug CB1954. *Biochem Pharmacol*. 2010. 79:678-87. doi: 10.1016/j.bcp.2009.10.008.
41. Race P, Lovering A, Green R, Ossor A, White S, Searle P, Wrighton C, Hyde E. Structural and mechanistic studies of *Escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone. Reversed binding orientations in different redox states of the

enzyme. *J Biol Chem.* 2005. 280:13256-64. doi: 10.1074/jbc.M409652200.

42. Rakauskienė G, Čėnas N, Kulys J. A 'branched' mechanism of the reverse reaction of yeast glutathione reductase. An estimation of the enzyme standard potential values from the steady-state kinetics data. *FEBS Lett.* 1989. 243:33-6. doi: 10.1016/0014-5793(89)81212-8.

43. Rudolph FB, Baugher BW, Beissner RS. Techniques in coupled enzyme assays. *Methods Enzymol.* 1979. 63:22-42. doi: 10.1016/0076-6879(79)63004-5.

44. Rudolph FB. Product inhibition and abortive complex formation. *Methods Enzymol.* 1979. 63:411-36. doi: 10.1016/0076-6879(79)63018-5.

45. Sayama M, Mori M, Nakada Y, Kagamimori S, Kozuka H. Metabolism of 2,4-dinitrotoluene by *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA98NR and TA98/1,8-DNP6, and mutagenicity of the metabolites of 2,4-dinitrotoluene and related compounds to strains TA98 and TA100. *Mutat Res.* 1991. 264:147-53. doi: 10.1016/0165-7992(91)90132-n.

46. Spain J. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu Rev Microbiol.* 1995. 49:523-55. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.002515.

47. Uršič S, Vrčik V, Ljubas D, Vinkovič I. Interaction of L-ascorbate with substituted nitrosobenzenes. Role of the ascorbate

2-OH group in antioxidant reactions. *New J. Chem.* 1998. 22:221–223.

48. Vienožinskis J, Butkus A, Čėnas N, Kulys J. The mechanism of the quinone reductase reaction of pig heart lipoamide dehydrogenase. *Biochem J.* 1990. 269:101-5. doi: 10.1042/bj2690101.

49. Wang P, Veine D, Ahn S, Williams CH Jr. A stable mixed disulfide between thioredoxin reductase and its substrate, thioredoxin: preparation and characterization. *Biochemistry.* 1996. 35:4812-9. doi: 10.1021/bi9526793.

50. Weber M, Kaplan N. Flavoprotein-catalyzed pyridine nucleotide transfer reactions. *J Biol Chem.* 1957. 225:909-20.

51. Williams E, Little R, Mowday A, Rich M, Chan-Hyams J, Copp J, Smaill J, Patterson A, Ackerley D. Nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy: insights and advances toward clinical utility. *Biochem J.* 2015. 471:131-53. doi: 10.1042/BJ20150650.

52. Yamamoto K, Kimura S, Shiro Y, Iyanagi T. Interflavin one-electron transfer in the inducible nitric oxide synthase reductase domain and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch Biochem Biophys.* 2005. 440:65-78. doi: 10.1016/j.abb.2005.05.027.

53. Yang J, Zhan J, Bai J, Liu P, Xue Y, Yang Q. Residue Phe42 is critical for the catalytic activity of *Escherichia coli* major

nitroreductase NfsA. *Biotechnol Lett.* 2013. 35:1693-700. doi: 10.1007/s10529-013-1262-y.

54. Yang X, Ma K. Characterization of a thioredoxin-thioredoxin reductase system from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol.* 2010. 192:1370-6. doi: 10.1128/JB.01035-09.

55. Zanetti G, Williams CH Jr, Massey V. Influence of photoirradiation on the oxidation-reduction state of thioredoxin reductase. *J Biol Chem.* 1968. 243:4013-9.

56. Zeldes B, Keller M, Loder A, Straub C, Adams M, Kelly R. Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals. *Front Microbiol.* 2015. 6:1209. doi: 10.3389/fmicb.2015.01209.

## PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. B. Valiauga, N. Rouhier, J.P. Jacquot, N. Čėnas. Quinone- and nitroreductase reactions of *Thermotoga maritima* thioredoxin reductase. *Acta Biochimica Polonica*. 2015. 62:303-309.
2. B. Valiauga, E. Williams, D. Ackerley, N. Čėnas. Reduction of quinones and nitroaromatic compounds by *Escherichia coli* nitroreductase A (NfsA): Characterization of kinetics and substrate specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2017. 614:14-22.
3. B. Valiauga, L. Misevičienė, M. Rich, D. Ackerley, J. Šarlauskas, N. Čėnas. Mechanism of Two-/Four-Electron Reduction of Nitroaromatics by Oxygen-Insensitive Nitroreductases: The Role of a Non-Enzymatic Reduction Step. *Molecules*. 2018. 23:1672.
4. B. Valiauga, N. Rouhier, J.P. Jacquot, N. Čėnas. Characterization of redox properties of FAD cofactor of *Thermotoga maritima* thioredoxin reductase. *Chemija*. 2020. 31:191-195.



## KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

### STENDINIAI PRANEŠIMAI

1. B. Valiauga, E. Williams, D. Ackerley, N. Čėnas. Kinetic properties of nitroreductase A (NfsA) from *Escherichia coli*. 19th International Symposium on Flavins and Flavoproteins, liepos 2-6 d., 2017. Groningenas, Nyderlandai.

2. B. Valiauga, L. Misevičienė, M. Rich, D. Ackerley, J. Šarlauskas, N. Čėnas. Mechanism of Two-/Four-Electron Reduction of Nitroaromatics by Oxygen-Insensitive Nitroreductases: The Role of a Non-Enzymatic Reduction Step, XV LBD conference, birželio 26-29 d., 2018. Dubingiai, Lietuva.

3. B. Valiauga, M. Rich, D. Ackerley, N. Čėnas. Potentiometric properties and substrate specificity of *E. coli* nitroreductase A, a candidate for gene-directed enzyme prodrug anticancer therapy. 26th SCT Young Research Fellows Meeting, vasario 20-22 d., 2019. Paryžius, Prancūzija.

4. B. Valiauga, L. Misevičienė, A. Marozienė, J. Šarlauskas, Q. Cheng, E. S. J. Arnér, N. Čėnas. Tirapazamine derivatives as substrates of mammalian thioredoxin reductase. 27th SCT Young Research Fellows Meeting, sausio 29-31 d., 2020. Kanas, Prancūzija.

## PADĖKA

Aš esu nepaprastai dėkingas savo daktaro disertacijos vadovui Habil. Dr. Narimantui Čėnui, už galimybę dirbti Ksenobiotikų biochemijos skyriuje, taip pat ir už visus patarimus, pagalbą ir kantrybę, kuri buvo reikalinga viso šio proceso metu.

Taip pat norėčiau padėkoti ir Prof. David F. Ackerley, Dr. Michelle Rich ir Dr. Elsie Williams iš Viktorijos Universiteto Velingtone už *Escherichia coli* NfsA išskyrimą.

Nuoširdi padėka yra skirta ir Prof. Nicolas Rouhier bei Prof. Jean-Pierre Jacquot iš Lotaringijos universiteto už *Thermotoga maritima* tioredoksino reduktazės ir susijusių baltymų išskyrimą.

Aš taip pat esu didžiai dėkingas ir Dr. Jonui Šarlauskui už įvairių nitroaromatinių junginių ir chinonų sintezę.

Didelė padėka skirta ir Prof. Sauliui Klimašauskui už galimybę naudotis “sustabdytosios srovės“ spektrofotometru DNR modifikacijos tyrimų skyriuje.

Ir, žinoma, taip pat labai dėkoju visam Ksenobiotikų biochemijos skyriaus kolektyvui, be kurių pagalbos ši disertacija irgi būtų neįmanoma.

Finansavimas: Mes taip pat pažymime Europos Socialinio Fondo paramą (Measure No. 09.33-LMT-K-712, grant No. DOTSUT-34/09.3.3.-LMT-K712-01-0058/LSS-600000-58).

## TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĄ

Benjamins Valiauga

El. paštas: benjamins.valiauga@bchi.vu.lt

Studijos aukštojoje mokykloje:

2009-2013 m. – Biochemijos bakalauras, Vilniaus universitetas, Chemijos fakultetas, Vilnius, Lietuva.

2013-2015 m. – Chemijos magistras, Vilniaus universitetas, Chemijos fakultetas, Vilnius, Lietuva.

2015- m. – Biochemijos doktorantūra, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Vilnius, Lietuva.

Mokslinė veikla ir patirtis:

Flavininių fermentų kinetiniai tyrimai, darbas spektrofotometru ir „sustabdytosios srovės“ spektrofotometru, Klarko elektrodu, fluorimetru, SigmaPlot programa. Kinetinių lygčių išvedimas, straipsnių rengimas ir rašymas.

Stažuotės:

2014.11.02-16 – Baltymų išskyrimas ir gryninimas,  
Ląstelės biologijos institutas, Lvovas, Ukraina.

UŽRAŠAMS

## UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p.: [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Tiražas 12 egz.