

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Arūnas
KRIKŠTAPONIS

7-Hidroksikumarino katabolizmo
Pseudomonas mandelii 7HK4
bakterijose tyrimas

DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA

Gamtos mokslai,
Biochemija (N 004)

VILNIUS 2021

Disertacija rengta 2016–2020 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos institute, Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje. Mokslinius tyrimus rėmė ES bendroji mokslinių tyrimų ir inovacijų programa Horizon 2020 [BlueGrowth: Unlocking the potential of Seas and Oceans] pagal dotacijos sutartį Nr. 634486 (projekto akronimas INMARE) ir Europos regioninės plėtros fondas (projekto Nr. 01.2.2-LMT-K-718-03-0082) pagal dotacijos sutartį su Lietuvos mokslų taryba (LMTLT).

Mokslinis vadovas – prof. dr. Rolandas Meškys (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – **doc. dr. Eglė Lastauskienė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Nariai:

dr. Arūnas Lagunavičius (Thermo Fisher Scientific, gamtos mokslai, biochemija – N 004);

dr. Mantas Mališauskas (Merck Group, gamtos mokslai, biochemija – N 004);

dr. Inga Matijošytė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004);

dr. Milda Plečkaitytė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2021 m. birželio mėn. 30 d. 10 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro (Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius) R-401 auditorijoje ir/arba nuotoliniu būdu.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje (Universiteto g. 3, LT-01122 Vilnius) ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>.

VILNIUS UNIVERSITY

Arūnas
KRIKŠTAPONIS

Investigation of the catabolism of 7-
hydroxycoumarin in *Pseudomonas*
mandelii 7HK4 bacteria

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Natural sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2021

This dissertation was written between 2016–2020 at the Department of Molecular Microbiology and Biotechnology, Institute of Biochemistry, Life Sciences Center, Vilnius University. The research was supported by the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program [BlueGrowth: Unlocking the potential of Seas and Oceans] under grant agreement No. 634486 (project acronym INMARE) and by European Regional Development Fund (project No 01.2.2-LMT-K-718-03-0082) under grant agreement with the Research Council of Lithuania (LMTLT).

Academic supervisor:

Prof. Dr. Rolandas Meškys (Vilnius University, natural sciences, biochemistry – N 004).

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

Chairman – Assoc. Prof. Dr. Eglė Lastauskienė (Vilnius University, natural sciences, biology – N 010).

Members:

Dr. Arūnas Lagunavičius (Thermo Fisher Scientific, natural sciences, biochemistry – N 004);

Dr. Mantas Mališauskas (Merck Group, natural sciences, biochemistry – N 004);

Dr. Inga Matijošytė (Vilnius University, natural sciences, biochemistry – N 004).

Dr. Milda Plečkaitytė (Vilnius University, natural sciences, biochemistry – N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 10 am on 30th of June 2021 in Room R-401 of the Life Sciences Center, Vilnius University (Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius).

The dissertation can be viewed in Vilnius University Library (Universiteto str. 3, LT-01122 Vilnius) and on the VU website at: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>.

IVADAS

7-Hidroksikumarinas, taip pat dar žinomas kaip umbeliferonas, yra vienas iš gausiausiai natūraliai paplitusių augalinės kilmės antrinių metabolitų¹⁻³. Iki šiol yra tik vienas galimas paaiškinimas, kodėl šie junginiai taip stipriai paplitę augaluose. Įvairūs kumarinų junginiai yra gaminami augaluose, esant audinių pažeidimams, ir tai yra vienas iš apsaugos mechanizmų nuo vabzdžių, žolėdžių, taip pat grybelinių ir mikrobinių patogenų⁴. Pavyzdžiui, paprastieji hidroksikumarinai turi antibakterinį poveikį prieš *Ralstonia solanacearum*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ir *Pseudomonas aeruginosa* bakterijas⁴⁻⁸. Nepaisant toksinio kumarinų poveikio, įrodyta, kad mikroorganizmai evoliucionuoja ir įgauna galimybę metabolizuoti tokius junginius.

Ankstesnių tyrimų metu buvo įrodyta, kad nemažai dirvožemio mikroorganizmų, tokių kaip *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Penicillium* ir *Fusarium* spp. gali augti, panaudojant kumariną kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį⁹⁻¹⁶. Nustatyta, jog 3-(2-hidroksifenil) propano rūgštis yra pagrindinis tarpinis kumarino katabolizmo junginys šiuose mikroorganizmuose^{10,11,16}. Biokonversiją iš kumarino į 3-(2-hidroksifenil) propano rūgštį galima atlikti dviem skirtingais metaboliniais keliais. Bakterijos, priklausančios *Arthrobacter* genčiai, fermentiškai hidrolizuoja kumarino laktono žiedą, susidarant 3-(2-hidroksifenil)-2-propeno rūgščiai, ir tuomet pastarasis junginys, panaudojant nuo NADH priklausančią reduktazę, redukuojamas iki 3-(2-hidroksifenil) propano rūgšties¹¹. Tuo tarpu *Pseudomonas* sp. 30-1 ir *Aspergillus niger* ATCC 11394 mikroorganizmuose kumarinas iš pradžių yra redukuojamas iki 3,4-dihidroksikumarino, panaudojant nuo NADH priklausančią oksidoreduktazę, ir tik po to hidrolizuojamas^{9,10,14}. *Arthrobacter* bei *Pseudomonas* genties bakterijos gali oksiduoti 3-(2-hidroksifenil) propano rūgštį iki 3-(2,3-dihidroksifenil) propano rūgšties, panaudojant specifines flaviną rišančias aromatines

hidroksilazes ¹⁶. Tačiau nėra duomenų apie tolimesnę 3-(2,3-dihidroksifenil) propano rūgšties konversiją šiose bakterijose. Be to, iki šiol nebuvo nustatyta jokių mikroorganizmų ar fermentų, susijusių su bet kokio hidroksikumarino metabolizmu.

Taigi, siekiant išplėsti esamas fundamentines žinias apie hidroksikumarinų skaidymą bakterijose, **šio darbo tikslas** buvo nustatyti genus, koduojančius bakterinius 7-hidroksikumarino skaidymo fermentus, ir pirmą kartą aprašyti hidroksikumarinų katabolinį kelią bakterijose.

Pagrindinės šio darbo užduotys buvo:

- Nustatyti genus, koduojančius 7-hidroksikumarino skaidymo fermentus *Pseudomonas mandelii* 7HK4 bakterijose.
- Charakterizuoti fermentus, atsakingus už 7-hidroksikumarino skaidymą *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijose.
- Aprašyti 7-hidroksikumarino katabolinį kelią *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijose.

Mokslinis naujumas

Šiame darbe aprašytas 7-hidroksikumarino katabolizmo kelias *Pseudomonas mandelii* 7HK4 bakterijose. Buvo išskirti ir nustatyti nauji už 7-hidroksikumarino skaidymą atsakingi metabolitai bei genai. Rezultatai parodė, jog 7-hidroksikumarino skaidymas *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijose vyksta kitokiu metaboliniu keliu, lyginant su anksčiau aprašytais kumarino katabolizmo keliais *Pseudomonas*, *Arthrobacter* ir *Aspergillus* spp. mikroorganizmuose.

Identifikuotas ir aprašytas naujas genas, atsakingas už 7-hidroksikumarino laktono žiedo redukciją. Rezultatai parodė, jog 7-hidroksikumarino redukcija *Pseudomonas mandelii* 7HK4 bakterijose vyksta panašiu keliu, kaip ir anksčiau apibūdintuose kumarino katabolizmo keliuose *Pseudomonas* sp. 30-1 ir *Aspergillus niger* ATCC 11394 mikroorganizmuose. Tačiau 7HK4 bakterijos naudoja

unikalų nuo NADPH priklausomą alkoholio dehidrogenazės šeimos baltymą HcdE, kuris redukuoja 7-hidroksikumarino dvigubą C-3/C-4 ryšį, susidarant 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarinui. Šiame darbe aprašyta HcdE dehidrogenazė pasižymi labai žema struktūrine homologija anksčiau apibūdintiems fermentams, susijusiems su struktūriškai panašių substratų redukcija. Mūsų žiniomis, HcdE dehidrogenazė yra pirmoji MDR šeimos ene-reduktazė, dalyvaujanti kumarino junginių skaidyme *in vivo*.

Taip pat buvo įrodyta, kad *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijos naudoja ir dar vieną unikalų fermentą – flaviną rišančią *ipso*-hidroksilazę HcdA, kuri oksiduoja 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties aromatinį žiedą *ipso*-padėtyje, katalizuojant šoninės grupės migraciją į *ortho*-padėtį, susidarant 3-(2,3,5-trihidroksifenil) propano rūgščiai. Parodyta, kad vėliau ekstradiolinė dioksigenazė HcdB pastarąjį junginį paverčia į (2*E*,4*E*)-2,4-dihidroksi-6-oksonona-2,4-dienono dirūgštį. Ir galiausiai, HcdB baltymo katalizuojamos reakcijos produktas vėliau hidrolizuojamas, katalizuojant tariamai HcdC hidrosimukoninės semialdehido hidrolazei. Nei vienas iš šių naujai aprašytų baltymų neturi esminių pirminės baltymų aminorūgščių sekos panašumų su anksčiau apibūdintais fermentais, susijusiais su struktūriškai panašių substratų, tokių kaip 3-(2-hidroksifenil) propano rūgšties skaidymu *Rhodococcus* sp. V49 bakterijose, 3-(3-hidroksifenil) propano rūgšties ir 3-hidroksicinamono rūgšties skaidymu *E. coli* K-12, *Comamonas testosteroni* TA441 ir *Rhodococcus globerulus* PWD1 bakterijose, ar net 4-hidroksifenilacetato skaidymu *E. coli* W bakterijose.

Taigi, šio darbo rezultatai suteikia iš esmės naują supratimą apie hidroksikumarinų skaidymą dirvožemio mikroorganizmuose. Be to, atrastos naujos bakterijos ir fermentai gali būti toliau naudojami, kuriant naujus pramonei naudingus biokatalizinius procesus.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

- *Pseudomonas mandelii* 7HK4 bakterijų *hcd* genų sancaupa koduoja 7-hidroksikumarinui skaidyti reikalingus fermentus.
- Nuo NADPH priklausoma alkoholio dehidrogenazė HcdE redukuoja 7-hidroksikumariną iki 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarino.
- *Ips*-monooksigenazė HcdA oksiduoja 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštį iki 3-(2,3,5-trihidroksifenil) propano rūgšties.
- HcdB ekstradiolinė dioksigenazė oksiduoja 3-(2,3,5-trihidroksifenil) propano rūgštį į (2*E*,4*E*)-2,4-dihidroksi-6-oksonona-2,4-dienono dirūgštį.
- Tariama hidroksimukono semialdehido hidrolazė HcdC hidrolizuoja (2*E*,4*E*)-2,4-dihidroksi-6-oksonona-2,4-dienono dirūgštį.

Daktaro disertacijos turinys. Disertacija parašyta anglų kalba ir ją sudaro šios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai, diskusija, išvados, literatūros sąrašas (175 pozicijos), leidinių sąrašas, lentelės (3) ir paveikslai (47). Iš viso 117 puslapių.

MEDŽIAGOS IR METODAI

Bakterijų padermės, plazmidės ir reagentai

Pseudomonas sp. 7HK4 bakterijų padermė, galinti naudoti 7-hidroksikumariną kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį, buvo išskirta iš dirvožemio, praturtinant mineralinėje terpėje, kurioje buvo 0,05% 7-hidroksikumarino. Genų klonavimuose naudotos *E. coli* DH5 α bakterijos (ϕ 80 *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZY-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_K-m_K+) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1*) (Thermo Fisher Scientific, Lietuva). Genų raiškos eksperimentuose naudotos *E. coli* BL21 (DE3) bakterijos (F- *ompT gal dcm lon hsdSB*(r_B- m_B-) λ (DE3) [F- *ompT gal dcm lon hsdS*_B(r_B- m_B-) λ (DE3) [*lacI lacUV5-T7* gene 1, *ind1, sam7, nin5*]) (Novagen, Vokietija).

Visi šio tyrimo metu naudoti reagentai yra išvardinti 1 lentelėje, o plazmidės – 2 lentelėje.

1 lentelė. Tyrimuose naudotos medžiagos ir reagentai.

Cheminės medžiagos ir reagentai	Šaltinis
7-hidroksikumarinas, etilo acetatas, metanolis, dietilo eteris, dichlorometanas	Merk, Vokietija
Ampicilinas, streptomocinas, 3-(2-hidroksifenil)-2-propeno, 3-(4-hidroksifenil)-2-propeno, 3-(3-hidroksifenil)-2-propeno, 3-(2,4-dihidroksifenil)propano rūgštys, pirokatecholis, kumarinas, cinamilo alkoholis, 2-etilfenolis, kavos rūgštis, glicerolis, β -merkaptioetanolis, amonio acetatas, Na ₂ CO ₃ , Na ₂ HPO ₄ , NaOH druskos	Fluka, Vokietija
3-hidroksikumarinas, 4-hidroksikumarinas, 7-metilkumarinas, 3-metilkatecholis, 4-metilkatecholis, jodoacetamidas, trifluoracto rūgštis, kanamicino sulfatas, 3-(2-hidroksifenil)propano, <i>trans</i> -2,4-dihidroksicinamono, 3-(2-	Sigma-Aldrich (Merck), Vokietija

<p>bromofenil) propano, 3-(2-nitrofenil) propano, 3-fenilpropano, <i>trans</i>-cinamono rūgštys, 2-propilfenolis, 2-propenilfenolis, <i>o</i>-kresolis, <i>o</i>-tirozinas, rezorcinolis, 2,3-dihidroksipiridinas, 2-hidroksi-4-aminopiridinas, <i>N</i>-metil-2-piridonas, <i>N</i>-etil-2-piridonas, <i>N</i>-propil-2-piridonas, <i>N</i>-butil-2-piridonas, indolinas, indolas, pirogalolas, 3-metoksikatecholis, 2',3'-dihidroksi-4'-metoksiacetofenono hidratas, galacetofenonas, 3,4-dihidroksibenzeno, 2,3,4-trihidroksibenzeno rūgštys, 2,3,4-trihidroksibenzofenonas, 1,2,4-benzentriolis, 6,7-dihidroksikumarinas, acetonitrilas, dimetil sulfoksidai, chinolinas, izochinolinas, 7-metoksikumarinas, 4-metil-7-hidroksikumarinas, 7-etoksikumarinas, 3,4-dihidroksichinolin-(1<i>H</i>)-2-onas, 2-hidroksichinolinas, 3,4-dihidro-7-hidroksichinolin-(1<i>H</i>)-2-onas, natrio dodecil sulfatas (NDS)</p>	
<p><i>E</i>-2,4-dihidroksicinamono, 3-(2,3-dihidroksifenil) propano rūgštys, 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarinas</p>	<p>Šis darbas</p>
<p>Agaras, Brain Heart Infusion broth (Bhi), Lysogeny broth (LB)</p>	<p>Oxoid, JK</p>
<p>Restrikcijos endonuklezės, T4 DNR ligazė, Phusion High-Fidelity PGR mišinys su HF buferiu, izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozidas (IPTG), PageRuler Prestained baltymų standartas, RiboPure™ Bacteria RNR gryninimo rinkinys, High-Capacity kDNR atvirkštinės transkripcijos rinkinys, Fast SYBR™ Green PGR mišinys, Mass Ruler™ DNR standartas</p>	<p>Thermo Fisher Scientific, Lietuva</p>

RapidClean Resin	Advansta, JAV
C ₁₈ atvirkštinių fazių kolonėlė (12 g)	Grace, JAV
PGR pradmenys	Metabion, Vokietija
Etanolis	Vilniaus degtinė, Lietuva
Tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris), gintaro rūgštis, gliukozė	AppliChem, Vokietija
Agarozė, etidžio bromidas, chloramfenikolis	Serva, Vokietija
Akrilamidas, etilendiaminotetraacto rūgštis (EDTA), fenolio:chloroformo:izoamilio alkoholio 25:24:1 tirpalas	Roth, Vokietija
7-hidroksichnolin-(1 <i>H</i>)-2-onas	Biosynth Carbosynth, Šveicarija

2 lentelė. Tyrimuose naudotos plazmidės.

Plazmidės	Savybės	Šaltinis
pET21b(+)	Amp ^R , <i>lacI</i> , P _{T7lac} , 5442 bp	Novagen, Vokietija
pET28b(+)	Kan ^R , <i>lacI</i> , P _{T7lac} , 5368 bp	Novagen, Vokietija
pCDFDuet-1	Sm ^R , <i>lacI</i> , P _{T7lac} , 3781 bp	Novagen, Vokietija
pACYCDuet-1	Cm ^R , <i>lacI</i> , P _{T7lac} , 4008 bp	Novagen, Vokietija
pTHPPDO	<i>hcdB</i> genas, klonuotas į pET28b(+), <i>NcoI</i> ir <i>HindIII</i> restrikcijos sritys	Šis darbas

p4pmPmo	<i>hcdA</i> genas, klonuotas į pET21b(+), <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos sritys	Ankstesnis darbas ¹⁷
p4pmPmoH ^c	<i>hcdA</i> genas, klonuotas į pET21b(+), su C-galo His ₆ -žyme, <i>NdeI</i> ir <i>HindIII</i> restrikcijos sritys	Ankstesnis darbas ¹⁷
p2K4PH	<i>hcdC</i> genas, klonuotas į pET21b(+), <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos sritys	Šis darbas
pCDF-BC	<i>hcdB</i> ir <i>hcdC</i> genai, klonuoti į pCDFDuet-1, <i>NcoI</i> ir <i>HindIII</i> , arba <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos sritys	Šis darbas
p5Pmo	3-(2-hidroksifenil) propano rūgšties monooksigenazės genas iš <i>Rhodococcus</i> sp. K5, klonuotas į pET21b(+)	Ankstesnis darbas ¹⁷
p4XenA38	<i>XenA38</i> genas, klonuotas į pET21b(+), <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos sritys	Šis darbas
p4XenA45	<i>XenA45</i> genas, klonuotas į pET21b(+), <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos sritys	Šis darbas
p4XenA205	<i>XenA205</i> genas, klonuotas į pET21b(+), <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos sritys	Šis darbas
pHP4-10	3kb sritis, sudaryta iš <i>hcdD</i> , <i>hcdE</i> , <i>hcdF</i> ir <i>hcdG</i> genu, klonuota į pACYCDuet-1, <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos sritys	Šis darbas

pHP7	<i>hcdE</i> genas, klonuotas į pET21b(+), <i>NdeI</i> ir <i>XhoI</i> restrikcijos sritys	Šis darbas
------	--	------------

Bakterijų auginimo terpės

Mineralinė terpė (pH 7.2): 5 g/L NaCl, 1 g/L NH₄H₂PO₄, 1 g/L K₂HPO₄, 0,4 g/L MgSO₄·7H₂O. Minimali C-750501 terpė (pH 8.0) ¹⁸. LB terpė (pH 7.2): 20 g miltelių tirpinta 1 L vandens. BHI terpė (pH 7.4): 37 g miltelių tirpinta 1 L vandens. Agaro plokštelių gamybai į 1 L terpės pridedama 15 g agaro miltelių. Visos terpės buvo sterilizuotos 30 minučių 121 °C temperatūroje, 1 atm slėgyje.

E-2,4-dihidroksicinamono rūgšties sintezė

Pradinė medžiaga 7-hidroksikumarinas (3,24 g, 20 mmol) ištirpinta 2 M KOH tirpale (50 ml) ir maišyta 2 valandas 80–90 °C temperatūroje. Reakcijos pabaiga buvo nustatyta plonasluoksnės chromatografijos metodu (TLC, chloroformas/metanolis, 9/1 santykiu). Baigus reakciją, reakcijos mišinys praskiestas vandeniu (iki 100 ml) ir paskui parūgštintas iki pH 3–4 su HCl. Rūgštiniai junginiai ekstrahuoti etilo acetatu. Organinis tirpiklis išdžiovintas (Na₂SO₄) ir pašalintas sumažintame slėgyje. Liekana gryninta chromatografinėje kolonėlėje (silikagelis, chloroformo/metanolio mišinys). Tirpikliai pašalinti sumažintame slėgyje, gaunant 1,98 g (11 mmol, 55% išeiga) *E-2,4-dihidroksicinamono rūgšties*. MS (ESI+): *m/z* 181.00 [M+H]⁺; 179.00 [M-H]⁻. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ = 6.26 (dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 2H, CH), 6.28 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=CH), 6.36 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, CH), 7.38 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, CH), 7.71 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, CH=CH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ = 102.58, 108.15, 113.23, 115.26, 129.36, 140.14, 158.72, 161.11, 168.41.

7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarino sintezė

Analitinis 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarino mėginys buvo sintetintas termiškai ciklizuojant 3-(2,4-dihidroksifenil) propano

rūgštį¹⁹. Trumpai, 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštis (182 mg, 1 mmol) 3 valandas kaitinta krosnyje 135 °C temperatūroje. Gautas rudos spalvos lydinys atvėsintas iki kambario temperatūros ir ištirpintas karštame toluene. Tirpalas buvo apdorotas silicio dioksidu, nufiltruotas ir tirpiklis pašalintas vakuume. Tada liekana buvo kristalizuota iš nedidelio tolueno kiekio. Produktas nufiltruotas ir išdžiovintas vakuume. Išeiga: 112 mg (68%). MS (ESI⁺): m/z 163 [M-H]⁻. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.61 (s, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.52 (dd, *J* = 8.2, 2.4 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.86–2.82 (m, 2H), 2.74–2.70 (m, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.5, 157.1, 152.3, 128.7, 113.2, 111.2, 103.2, 29.0, 22.1.

Biokonversijų tyrimai, naudojant sveikas ląsteles

Pseudomonas sp. 7HK4 bakterijos buvo augintos mineralinėje terpėje su 0,05% 7-hidroksikumarinu arba gliukoze, kaip vieninteliais anglies ir energijos šaltiniais, 30 °C temperatūroje 48 valandas.

E. coli BL21 bakterijos, turinčios rekombinantinių genų, buvo augintos 30 ml BHI terpėje 30 °C temperatūroje per naktį. Didelio tankio bakterijų kultūra centrifuguota ir pakartotinai suspenduota 30 ml minimalioje C-750501 terpėje, kurioje ląstelės indukuotos, pridodant 1 mM IPTG po 1,5 val inkubacijos 20 °C temperatūroje. Inkubacija 20 °C temperatūroje buvo tęsiama dar 24 valandas.

Tiek *Pseudomonas* sp. 7HK4, tiek *E. coli* BL21 ląstelės nusodintos centrifuguojant (3220 × *g*, 15 min.). Surinktos ląstelės du kartus buvo plautos su 15 ml 0,9% NaCl tirpalu. Konversijos eksperimentams ląstelės iš 20 ml kultūros pakartotinai suspenduotos 1 ml 50 mM kalio fosfato buferyje (pH 7,2). Visos nedidelės skalės biokonversijos su sveikomis ląstelėmis buvo atliktos 50 mM kalio fosfato buferyje (pH 7,2), kuriame buvo 0,5–2 mM substrato. Reakcijų mišiniai buvo inkubuoti termobloke 30 °C (500 aps/min). Biokonversijų mišiniai centrifuguoti 2 minutes 10000 × *g*, o 100 μL supernatanto analizuota su UV-VIS spektrofotometru (200–600 nm diapazonas). Matavimai buvo pakartoti, kad būtų užfiksuoti absorbcijos intensyvumo pokyčiai

laike. Visi matavimai buvo atlikti naudojant PowerWave XS mikroplokštelių skaitytuvą.

Beląstelinių ekstraktų ruošimas

Ląstelių kultūra nusodinta centrifuguojant ($3220 \times g$, 15 min). Biomasa resuspenduota 3 ml 50 mM kalio fosfato buferyje (pH 7,2). Ląstelės buvo suardytos ultragarsu pulsiniu režimu (3 min trukmė ir 1 s ciklais) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Ląstelių liekanos pašalintos centrifuguojant ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $16100 \times g$, 15 min).

Baltymų gryninimas

His₆ žymėti baltymai buvo gryninti „Äkta purifier 900“ chromatografijos sistemomis (GE Healthcare, Suomija). Beląsteliniai ekstraktai suleisti į Ni²⁺ chelatinę HiTrap HP kolonėlę (1–5 ml) (GE Healthcare, Suomija), nulygsvarintą 50 mM kalio fosfato buferiu (pH 7,0–7,2), esant 1,0 ml/min tėkmės greičiui. Kolonėlė buvo plauta mažiausiai 3 tūrio dalimis to paties buferio. Tada surišti baltymai buvo eliuoti su 0,5 M imidazolu 50 mM kalio fosfato buferyje (pH 7,0–7,2). Frakcijos, kuriose buvo išgryninto fermento, buvo apjungtos ir dializuotos 50 mM kalio fosfato buferyje (pH 7,0–7,2) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje per naktį arba dializuotos, panaudojant HiTrap Desalting kolonėlę su Sephadex G-25 derva (GE Healthcare, Suomija) ir eliuotos 50 mM kalio fosfato buferiu (pH 7,0–7,2). Baltymų koncentracija buvo nustatyta Lowry metodu²⁰.

Baltymų paruošimas masių spektrometrijos analizei

Baltymai išfrakcionuoti NDS-poliakrilamidiniame gelyje. Gelis nudažytas Kumasi briliantiniu mėliu R-250. Išpjauta gelio juostelė, turinti analizuojamą baltymą, susmulkinta 1 mm^3 kubeliais. Toliau gelis plautas 2 kartus 200 μl plovimo tirpalu (25 mM NH₄HCO₃, 50% acetonitrilo), inkubuojant po 30 min $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Baltymas redukuotas su 40 μl 10 mM DTT tirpalu, inkubuojant 45 min $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Toliau alkilintas su 30 μl 100 mM jodoacetamidu 1 val

kambario temperatūroje tamsoje. Gelis vėl praplautas 2 kartus po 100 μ l plovimo tirpalu, inkubuojant po 15 min 37 °C temperatūroje. Gelis 15 min dehidratuotas su 50 μ l 100% acetonitrilo. Pašalinus tirpiklį, gelis išdžiovintas. Užpilta 20 μ l aktyvinto tripsino (10 ng/ μ l) ir inkubuota 15 min 37 °C temperatūroje. Įpilta dar aktyvinto tripsino tiek, kad gelis būtų pilnai apsemtas ir inkubuota per naktį 37 °C temperatūroje. Kitą dieną supernatantas nusiurbtas (išsaugotas) ir baltymai iš gelio ekstrahuoti 2 kartus su 50 μ l 5% trifluoracto rūgšties ir 50% acetonitrilo tirpalu, inkubuojant 1 val 37 °C temperatūroje. Skystis nuo gelio ir abu ekstraktai sujungti. Peptidai liofilizuoti 30 °C temperatūroje. Liofilizuoti peptidai ištirpinti 20 μ l 0,1% trifluoracto rūgšties tirpale. Peptidai išgryninti ir sukonzentruoti naudojantis automatinio dozatoriaus C₁₈ ZipTip antgaliais pagal gamintojo pateiktą metodiką. Peptidų sekoskaita MALDI TOF masių spektrometru atlikta VU Proteomikos centre. Peptidų masių spektrai analizuoti GPS Explorer De Novo Explorer programa.

Rekombinantinių baltymų aktyvumų matavimai

3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties HcaA hidroksilazės aktyvumas buvo matuotas spektrofotometriškai, stebint reakcijos mišinio absorbcijos pokyčius, esant 340 nm bangos ilgiui dėl NADH arba NADPH oksidacijos ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), pridėjus substrato. Aktyvumo matavimai buvo atlikti su beląsteliniiais ekstraktais arba išgrynintu baltymu. Visi fermento aktyvumo matavimai buvo atlikti 22 °C temperatūroje 1 ml reakcijos mišinyje, kuriame buvo 25–50 mM tricino arba kalio fosfato buferio (pH 7,8), 100 μ M NAD(P)H ir 150 μ M aromatinio substrato. Vienas aktyvumo vienetas buvo apibrėžtas kaip fermento kiekis, kuris katalizavo 1 μ mol NAD(P)H oksidaciją per minutę 7,8 pH buferyje 22 °C temperatūroje.

Redukcinis HcdE baltymo aktyvumas buvo matuotas spektrofotometriškai, stebint bimolekulinės reakcijos absorbcijos pokyčius prie 340 nm bangos ilgio dėl NADPH oksidacijos ir įvairių kumarino darinių redukcijos ($\epsilon_{340} = 5580 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (7-

hidroksikumarinui), $\epsilon_{340} = 4780 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (6-hidroksikumarinui), $\epsilon_{340} = 4440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (6-metilkumarinui), $\epsilon_{340} = 8500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (6,7-dihidroksikumarinui), $\epsilon_{340} = 3690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (kumarinui)), pridėjus fermento. Aktyvumo matavimai buvo atlikti su beląstelinius ekstraktais arba išgrynintu baltymu. Standartiniai fermento aktyvumo matavimai buvo atlikti 22 °C temperatūroje 0,8 ml reakcijos mišinyje, kuriame buvo 50 mM kalio fosfato buferio (pH 7,0), 160 μM NADPH ir 60 μM aromatinio substrato.

Kinetiniai HcdE baltymo tyrimai buvo atlikti, stebint reakcijos mišinio absorbcijos pokyčius prie 365 nm bangos ilgio dėl NADPH oksidacijos ($\epsilon_{365} = 3500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), pridėjus fermento. Fermento aktyvumo matavimai buvo atlikti 22 °C temperatūroje 0,8 ml reakcijos mišinyje, kuriame buvo 50 mM kalio fosfato buferio (pH 7,0), 5–200 μM NADPH, 5–150 μM 7-hidroksikumarino ir 99 nM HcdE baltymo. Kiekvienas matavimas buvo atliekamas tris kartus. Kinetiniai duomenys buvo išanalizuoti panaudojant Wolfram Mathematica programinę įrangą.

3-(2,4-Dihidroksifenil) propano rūgšties biokonversija in vivo

E. coli BL21 bakterijos, turinčios p4pmPmo ir pTHPPDO plazmidės, buvo augintos 200 ml BHI terpėje 30 °C temperatūroje per naktį. Didelio tankio bakterijų kultūra centrifuguota ir pakartotinai suspenduota 200 ml minimalioje C-750501 terpėje, kurioje baltymų sintezė buvo indukuota su 1 mM IPTG, esant 20 °C temperatūrai¹⁸. Po 24 valandų indukcijos pridėta 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties iki galutinės 4 mM koncentracijos. Biokonversijos mišinys dar 3 dienas buvo inkubuotas 30 °C temperatūroje. Ląstelės pašalintos centrifuguojant 30 min 3220 $\times g$ greičiu, o supernatantai laikyti 4 °C temperatūroje.

3-(2,4-Dihidroksifenil) propano rūgšties biokonversijos produkto gryninimas

Supernatantas, turintis 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties oksidacijos produktą, buvo inkubuotas su 1,2 M amonio chloridu kambario temperatūroje per naktį^{21,22}. Reakcijos mišinys sukonzentruotas iki ~100 ml tūrio ir su konc. HCl priversta iki pH 1. Substrato likučiai buvo ekstrahuoti penkis kartus iš eilės su 25 ml etilacetatu, o po ekstrakcijos likusi vandeninė frakcija išvalyta, naudojant atvirkštinių fazių C₁₈ kolonėlę, nulygsvarintą vandeniui. Kolonėlė buvo plauta mažiausiai 100 ml vandens ir tada eliuota linijiniu 0–60% metanolio tirpalo gradientu 2 ml/min greičiu. Vandeninės frakcijos buvo sujungtos ir išgarintos vakuume (40 °C). Rusvos spalvos kristalai buvo ištirpinti 0,1% skruzdžių rūgšties tirpale ir vėl įkrauti į atvirkštinių fazių C₁₈ kolonėlę, nulygsvarintą 0,1% skruzdžių rūgšties tirpalu. Kolonėlė buvo plauta mažiausiai 30 ml 0,1% skruzdžių rūgšties tirpalu ir tada eliuota 60% metanolio tirpalu. Pikolino rūgšties darinys buvo eliuotas 0,1% skruzdžių rūgšties tirpalu. Produkto frakcijos surinktos, sujungtos ir išgarintos vakuume (40 °C). Pikolininės rūgšties išeiga iš 145 mg 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties fermentacijos buvo 34 mg, 24% teorinės išeigos. Produkte buvo skruzdžių rūgšties priemaišų, kurios padėjo junginį ištirpinti D₂O, kad būtų atlikta BMR analizė.

7-Hidroksikumarino biokonversija in vivo

E. coli BL21 ląstelės, turinčios pHP7 plazmidę, buvo augintos 6 × 200 ml LB terpėje 30 °C temperatūroje per naktį. Didelio tankio bakterijų kultūros buvo indukuotos su 0,5 mM IPTG ir inkubuota 20 °C temperatūroje. Po 48 valandų indukcijos ląstelės centrifuguotos ir resuspenduotos atitinkamu 50 mM kalio fosfato buferio (pH 7,2) tūriu. Tada pridėta 7-hidroksikumarino iki galutinės 0,3 mM koncentracijos. Biokonversijos mišinys buvo inkubuotas 30 °C temperatūroje, purtant per naktį. Ląstelės pašalintos centrifuguojant 40 min 3220 × g greičiu, o supernatantai buvo naudoti produkto gryninimui.

7-Hidroksikumarino biokonversijos produkto gryninimas

Biokonversijos produktas buvo grynintas, kaip aprašyta Serra et al. su nedideliais pakeitimais²³. Biotransformacijos supernatantas buvo paveiktas konc. HCl, privedant pH iki 4–5. Tirpalas buvo prisotintas NaCl ir ekstrahuotas CH₂Cl₂ (4 x 100 ml). Sujungtos organinės fazės buvo išdžiovintos (Na₂SO₄) ir sukonzentruotos sumažintame slėgyje, gaunant 7-hidroksikumarino liekanas (MS (ESI+): m/z 161 [M-H]⁻). Tada į vandeninį tirpalą buvo pridėta etilo acetato (100 ml) ir mišinys filtruotas ant celito padėklo. Fazės buvo atskirtos ir vandeninė fazė ekstrahuota papildomai etilo acetatu (100 ml). Sujungtos organinės fazės išdžiovintos (Na₂SO₄) ir sukonzentruotos sumažintame slėgyje. Gautas šviesiai geltonas nuosėdas sudarė 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštis. MS (ESI+): m/z 181 [M-H]⁻; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 11.97 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.26 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.11 (dd, *J* = 8.1, 2.4 Hz, 1H), 2.63 (dd, *J* = 8.6, 6.9 Hz, 2H), 2.40 (dd, *J* = 8.5, 6.9 Hz, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 174.73, 157.00, 156.23, 130.41, 117.79, 106.33, 102.84, 34.63, 25.37. Pateikti BMR spektrai atitinka žinomo 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties standarto spektrus (¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 11.98 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.26 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.11 (dd, *J* = 8.1, 2.4 Hz, 1H), 2.63 (dd, *J* = 8.5, 6.9 Hz, 2H), 2.40 (dd, *J* = 8.5, 6.9 Hz, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 174.73, 157.00, 156.23, 130.41, 117.79, 106.33, 102.83, 34.63, 25.36). 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties išeiga iš 59 mg pradinės medžiagos buvo 50 mg (75,7% teorinės išeigos).

3-(2,3-Dihidroksifenil) propano rūgšties biosintezė

E. coli BL21 bakterijos, turinčios p5Pmo plazmidę, buvo augintos 200 ml LB terpėje 30 °C temperatūroje per naktį. Didelio tankio bakterijų kultūra centrifuguota ir pakartotinai resuspenduota 200 ml minimalioje C-750501 terpėje, kurioje baltymų sintezė buvo

indukuota su 1 mM IPTG, esant 20 °C temperatūrai¹⁸. Po 24 valandų indukcijos ląstelės centrifuguotos ir resuspenduotos 200 ml kalio fosfato buferyje (pH 7,2). Pridėta 3-(2-hidroksifenil) propano rūgštis iki galutinės 2 mM koncentracijos. Biokonversijos mišinys dar 12 valandų inkubuotas 30 °C temperatūroje, purtant. Ląstelės pašalintos centrifuguojant 30 min 3220 × g greičiu, ir supernatantas buvo nedelsiant panaudotas.

Genominės DNR gryninimas

Pseudomonas mandelii 7HK4 bakterijos buvo augintos per naktį 20 ml LB terpėje, kurioje buvo papildomai pridėta 1% glicerolio. Ląstelės 10 minučių centrifuguotos (3220 × g) ir plautos su 3 ml 50 mM citrato buferiu (pH 8,2). Ląstelės buvo padalintos į 6 dalis, kiekviena iš jų suspenduota 600 µl lizės buferyje (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA, 3% NDS, 1% merkaptoetanolio, 0,2 M NaCl)²⁴, taip pat pridėdant po 15 µL 20 mg/ml proteinazės K ir inkubuota 2 val 65 °C temperatūroje. Tada lizatai centrifuguoti 15 min 16100 × g greičiu, ir į supernatantą pridėta 300 µl 7,5 M amonio acetato (pH 6,0), po to kelis kartus apverčiant išmaišyta ir 20 minučių centrifuguota (16100 × g). DNR išsodinta 2 tūriais etanolio per naktį -20 °C temperatūroje, po to nucentrifuguojant. DNR nuosėdos buvo ištirpintos ir apjungtos į 60 µl 20 mM Tris-HCl buferį (pH 8,0) ir inkubuotos su 10 µg RNazės A. Genominė DNR buvo išvalyta, panudojant Rapid Clean baltymų šalinimo dervą.

Plazmidinės DNR gryninimas

Plazmidinė DNR buvo skiriama standartiniu šarminės lizės metodu²⁴. *E. coli* bakterijos buvo augintos per naktį 20 ml LB terpėje. Ląstelės centrifuguotos 10 minučių (3220 × g) ir resuspenduotos 1 tūryje I lizės tirpalo (50 mM gliukozės, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)). Pridėjus 2 tūrius šviežiai pagaminto II lizės tirpalo (0,2 N NaOH, 1% NDS), mėginiai atsargiai sumaišyti kelis kartus apverčiant ir inkubuoti ant ledo iki 5 minučių. Vėliau į lizatą buvo pridėta 1,5 tūrio 7,5 M

amonio acetato, po to pakartotinai švelniai kelis kartus apverčiant, ir inkubuota ant ledo iki 3 minučių. Lizatas 5 min centrifuguotas (16100 × g) ir į supernatantą įpilta 2 tūriai šalto etanolio, po to kruopščiai išmaišius, pDNR išsodinta po 2 valandų arba po naktinės inkubacijos –20 °C temperatūroje, centrifuguojat. pDNR nuosėdos buvo ištirpintos 35 µl vandens.

DNR padauginimas

Genų padauginimas buvo atliktas naudojant Phusion High-Fidelity PGR mišinius su HF buferiu, vadovaujantis reagentų gamintojo pateiktais vartotojo vadovais. PGR sąlygos:

HcdA genui: pradinis denatūravimas 1 min 98 °C temperatūroje, po to 40 ciklų 10 s 98 °C temperatūroje, 20 s 69 °C temperatūroje ir 50 s 72 °C temperatūroje, galutinė reakcija 5 min 72 °C temperatūroje;

HcdB ir *hcdC* genams: pradinis denatūravimas 1 min 98 °C temperatūroje, po to 40 ciklų 10 s 98 °C temperatūroje, 15 s 60 °C temperatūroje ir 30 s 72 °C temperatūroje, galutinė reakcija 5 min 72 °C temperatūroje;

XenA38, *xenA45* ir *xenA205* genams: pradinis denatūravimas 1 min 98 °C temperatūroje, 30 ciklų 10 s 98 °C temperatūroje, 15 s 68.5 °C temperatūroje ir 60 s 72 °C temperatūroje, galutinė reakcija 5 min 72 °C temperatūroje;

3kb ilgio *hcdDEFG* genų srities: pradinis denatūravimas 1 min 98 °C temperatūroje, po to 35 ciklai 20 s 98 °C temperatūrai, 8 min 72 °C temperatūroje, galutinė reakcija 7 min 72 °C temperatūroje;

HcdE genui: pradinis denatūravimas 30 s 98 °C temperatūroje, po to 35 ciklai 10 s 98 °C temperatūroje, 10 s 65 °C temperatūroje ir 45 s 72 °C temperatūroje, galutinė reakcija 3 min 72 °C temperatūroje.

Elektrokompetentinių ląstelių paruošimas ir elektroporacija

E. coli kompetentinės ląstelės buvo ruoštos pagal Sharma ir Schimke aprašytą metodą²⁵. Plazmidinė DNR buvo sumaišoma su 100 µl lede laikomų kompetentinių ląstelių. Perkeliama į

elektroporacijos kiuvetę (100 µL talpos) ir paveikiama 20 kV/cm elektros impulsu, naudojant Eppendorf 2510 elektroporatorių. Ląstelės buvo nedelsiant praskiestos 1 ml LB terpės ir inkubuotos 30–60 min 37 °C temperatūroje. Po gaivinimo ląstelės išsėtos ant lėkštelių su mitybine terpe, kurioje buvo atitinkamas antibiotikas ir/ar substratas.

RNR gryninimas

P. mandelii 7HK4 bakterijos kultivuotos per naktį mineralinėje terpėje, kurioje kaip vienintelis anglies šaltinis buvo 0,05% gliukozė. Tada ląstelės nusodintos centrifuguojant (3220 × g, 10 min.) ir resuspenduotos 50 mM kalio fosfato buferyje (pH 7,2). *P. mandelii* 7HK4 ląstelės buvo indukuotos su 1 mM įvairiais kumarinų dariniais ir dar 3 val inkubuotos 30 °C temperatūroje purtant. Bendra RNR buvo išskirta naudojant RiboPure Bacteria RNR gryninimo rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas.

Kiekybinis realaus laiko PGR

kDNR sintezė buvo atlikta naudojant High-Capacity kDNR atvirkštinės transkripcijos rinkinį, nuo 340 ng pradinės RNR. Kiekybinis PGR (RT-PGR) buvo atliktas naudojant Fast SYBR Green reakcijos mišinį pagal gamintojo rekomendacijas 7500 Fast RealTime PGR sistemoje (Thermo Fisher Scientific). RT-PGR buvo atliktas 20 µl reakcijos mišinyje, kuriame buvo 10 µl Fast SYBR Green reakcijos mišinio, 500 nM kiekvieno pradmens ir 2 µl kDNR mėginio. Visi eksperimentai buvo atlikti su trimis pakartojimais. Norint patikrinti, ar DNR nėra visuose RNR mėginiuose, RT-PGR buvo atliktas tiesiogiai nuo RNR mėginių. Slenkstinio ciklo (C_T) (slenksčio vertė, 5% aukščiausios kreivės) vertės buvo gautos naudojant 7500 Fast RealTime PCR Software v2.0 (Thermo Fisher Scientific) programą.

Tandeminė skysčių chromatografija ir masių spektrometrija

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

Chromatografinis frakcionavimas atliktas naudojant YMC – Pack Pro C₁₈, 150×3 mm kolonėlę (YMC, Japonija), esant 40 °C temperatūrai, vandens ir acetonitrilo gradiente nuo 5 % iki 95 %.

Masių spektrai buvo užrašyti nuo m/z 10 iki m/z 500, esant 350 °C temperatūrai ir ±4500 V įtampai (neutrali DL/Qarray įtampa), naudojant N₂ kaip purškiamąsias ir džiovinamąsias dujas. Masių spektrometrijos analizė buvo atlikta taikant tiek teigiamos, tiek neigiamos jonizacijos režimą. Duomenys analizuoti naudojant LabSolutions LC/MS programinę įrangą.

Branduolio magnetinio rezonanso spektroskopija

¹H BMR ir ¹³C BMR spektrai buvo užfiksuoti D₂O arba DMSO-*d*₆ tirpikliuose ant Avance III 400 BMR spektrometro, esant 400 MHz ¹H ir 100 MHz ¹³C, cheminiai poslinkiai pateikti ppm, palyginti su tirpiklio rezonanso signalu kaip vidiniu etalonu (¹H BMR: δ (DMSO-*d*₆) = 2,50 ppm; ¹³C BMR: δ (DMSO-*d*₆) = 39,52 ppm).

Baltymų MS-MS analizė

Peptidams buvo atlikta *de novo* sekoskaita, remiantis matricos pagalba lazerio dezorbcijos jonizacijos skrydžio laiku (MALDI-TOF /TOF) masių spektrometrija (MS) ir vėlesne skaičiavimo analize Vilniaus universiteto Proteomikos centre, Gyvybės mokslų centre. (Vilnius, Lietuva). Mėginys buvo grynintas kaip aprašyta anksčiau. 0,5 μl mėginio buvo perkelta į 384 šulinėlių MALDI plokštelę su 0,5 μl 4 mg/ml α-ciano-4-hidroksicinamono rūgšties (CHCA) matrica

50% acetonitrile su 0,1% trifluoracto rūgštimi ir analizuota naudojant Applied Biosystems/MDS SCIEX 4800 MALDI TOF/TOF masių spektrometru. Spektrai buvo gauti teigiamo reflektoriaus režimu nuo 800 iki 4000 m/z su fiksuoto lazerio intensyvumu 3700 (lazerio šūviai: 400; masės tikslumas: ± 50 ppm). Intensyviausios kiekvieno tyrimo skenavimo (MS) smailės buvo fragmentuotos sekos analizei atlikti (susidūrimo energija: 1 keV; CID: nenaudojamas CID arba vidutinio oro slėgio CID; lazerio intensyvumas: 4200–4400; lazerio kadrai: 500–1000; fragmento masė tikslumas: $\pm 0,1$ Da). Sekos analizė ir smailių sąrašai buvo sukurti naudojant GPS Explorer De Novo Explorer programą.

DNR ir baltymų sekų bioinformatinė analizė

DNR ir baltymų sekos FASTA formatu analizuotos VectorNTI Advance 9.0 ir MEGA 5.0 versijos programomis ²⁶. Homologų paieška buvo atlikta BlastN arba BlastP programomis iš NCBI BLAST internetinio tinklalapio. DNR ir baltymų sekos filogenetiniams medžiams sulygiuotos pasinaudojus MEGA 5.0 versijos programos ClustalW įrankiu ^{27,28} ir filogenetiniai medžiai buvo sukonstruoti pasinaudojus artimiausių grupių apjungimo (N–J) metodu ²⁹ pagal didžiausio tikėtimumo modelį nukleotidams arba pagal Poissono modelį aminorūgštims ³⁰. Atstumai tarp homologų galėjo būti apskaičiuoti pasinaudojus Kimura matrica, o filogenetinių medžių stabilumas paremtas pagal įkėlos analizę (1000 kopijų).

Šiame darbe identifikuotų genų identifikaciniai numeriai

Dalinės *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijų 16S ribosominės RNR geno sekos numeris yra MH346031. *HcdA*, *hcdB* ir *hcdC* genų sekų numeriai yra atitinkamai MH346032, MH346033, MH346034. *HcdE*, *XenA38* ir *XenA45* genų sekų identifikaciniai numeriai yra atitinkamai MW310254, MW310255, MW310256. Visą *P. mandelii* 7HK4 bakterijų genomo fragmentą, kuriame yra *hcd* genų sanaupa, galima rasti numeriu MW310253.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

7-hidroksikumariną skaidančių mikroorganizmų atranka ir identifikavimas

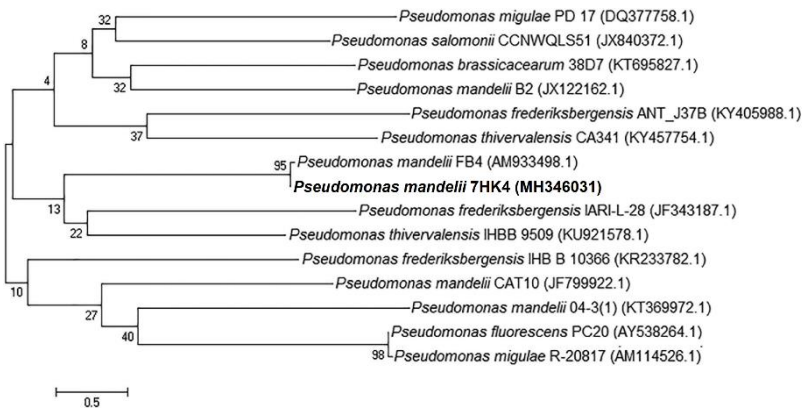
Ankstesnių tyrimų metu, panaudojant įvairius kumarino darinius, iš Lietuvoje surinktų dirvožemio pavyzdžių buvo išskirta aerobinė 7HK4 padermė, skaidanti 7-hidroksikumariną (DSMZ registracijos numeris DSM 107615)³¹. Patikrinome šių bakterijų gebėjimą skaidyti ir kitus kumarino darinius. Šios bakterijos buvo auginamos minimalioje terpėje su skirtingais kumarino dariniais, tokiais kaip kumarinas, 3-hidroksikumarinas, 4-hidroksikumarinas, 6-hidroksikumarinas, 6-metilkumarinas, 6,7-dihidroksikumarinas ir 7-metilkumarinas, kaip vieninteliais anglies ir energijos šaltiniais. Tačiau iš visų minėtų junginių tiriama 7HK4 padermė galėjo panaudoti tik 7-hidroksikumariną. Šios bakterijos naudojo ir gliukozę, kuri buvo naudojama kaip kontrolinis substratas visuose tyrimuose.

Sekoskaitos metodu buvo nustatyta dalinė 16S rRNR geno nukleotidų seka. Remiantis 16S rDNR sekos rezultatais 7HK4 padermė priklausė *Pseudomonas* genties bakterijoms ir pagal filogenetinę analizę buvo artimiausia *Pseudomonas mandelii* rūšiai (1 pav.).

Biokonversijų eksperimentai, panaudojant sveikas *Pseudomonas* sp. 7HK4 ląsteles

Biokonversijų eksperimentai, panaudojant sveikas *Pseudomonas* sp. 7HK4 ląsteles, užaugintas su 7-hidroksikumarinu kaip mitybiniu substratu, parodė, kad ląstelės konvertuoja ne tik 7-hidroksikumariną, bet ir kumariną, 6-hidroksikumariną bei 6,7-dihidroksikumariną, remiantis UV-VIS spektrų pokyčiais (2 pav.). UV absorbcijos maksimumai laikui bėgant mažėjo, nors 6-hidroksikumarino, 6,7-dihidroksikumarino ir kumarino biotransformacijos greičiai buvo atitinkamai penkis ir dešimt kartų mažesni. Biokonversijų pabaigoje, reakcijų mišiniuose su 7-hidroksikumarinu nebuvo matoma

aromatinio junginio likučių, išskyrus reakcijas su 6-hidroksikumarinu, 6,7-dihidroksikumarinu ir kumarinu, kuriuose neišnyko UV

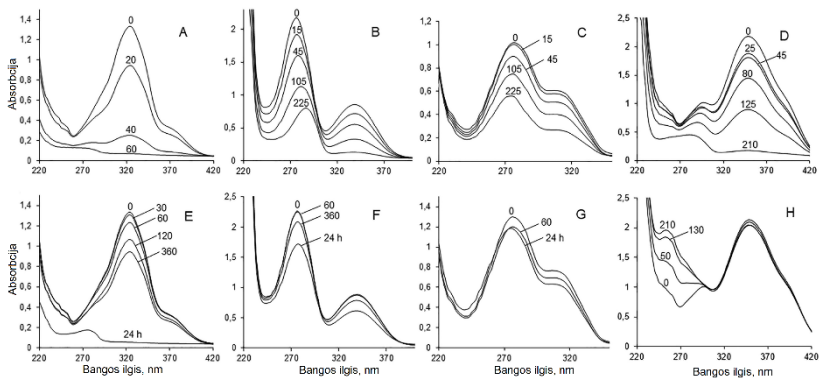


1 pav. *Pseudomonas mandelii* 7HK4 bakterijų ir homologų filogenetinis medis, paremtas dalinėmis 16S rDNR sekomis. Medis sudarytas palyginant dalines 16S rRNR genų sekas (1400 bp), naudojant artimiausių grupių apjungimo metodą.

absorbcijos maksimumai ties 260–270 nm bangos ilgiais. Šie spektrai yra panašūs į 3-fenilpropano rūgšties UV spektrą, o tai rodo, kad 7-hidroksikumarinu indukuotos 7HK4 ląstelės gali katalizuoti kumarino, 6-hidroksikumarino ir 6,7-dihidroksikumarino tik laktono žiedo redukciją ir/arba hidrolizę, susidarant 3-(2-hidroksifenil)propano, 3-(2,5-dihidroksifenil)propano ir 3-(2,4,5-trihidroksifenil)propano rūgštims, panašiai kaip ir kitų mikroorganizmų biotransformacijose^{9-11,14,16}.

Be to, neindukuotos *Pseudomonas* sp. 7HK4 ląstelės, užaugintos su gliukoze kaip vieninteliu anglies ir energijos šaltiniu, parodė uždelstą ir lėtesnę 7-hidroksikumarino konversiją. Biokonversijos procesas prasidėjo tik po 0,5 val po substrato pridėjimo, o tai rodo, kad šiose bakterijose 7-hidroksikumarino metabolizmas yra indukuojamas. Taip pat, neindukuotos ląstelės nekatalizavo jokios

konversijos arba rodė uždelstas ir daug lėtesnės kumarino, 6,7-dihidroksikumarino ir 6-hidroksikumarino biotransformacijas.

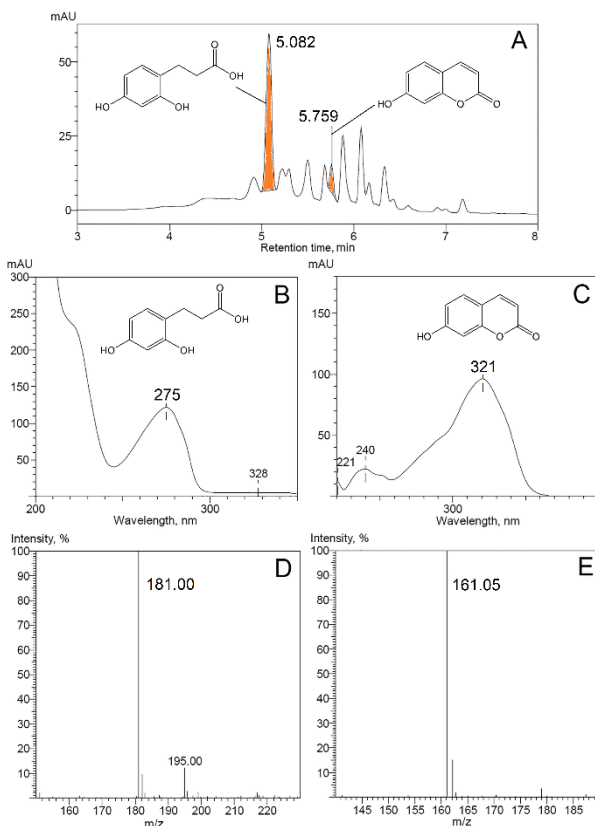


2 pav. 7-hidroksikumarino (A ir E), 6-hidroksikumarino (B ir F), kumarino (C ir G) ir 6,7-dihidroksikumarino (D ir H) biokonversijos sveikomis *Pseudomonas mandelii* 7HK4 ląstelėmis. Ląstelės buvo užaugintos su 7-hidroksikumarinu (A–D) arba gliukoze (E–H). Biotransformacijos buvo atliktos su bakterijų kultūra ($OD_{600} \sim 2$) 50 mM kalio fosfato buferyje (pH 7,2) 30 °C temperatūroje su 0,5 mM substrato. Inkubacijų laikai nurodyti min. 24 h – inkubuota 24 val.

Tai patvirtina, kad *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijose 7-hidroksikumarino metabolizmas yra indukuojamas procesas.

Ankstesnių tyrimų metu jau buvo nustatyta, kad 3-(2-hidroksifenil)-2-propeno ir 3-(2-hidroksifenil) propano rūgštys yra kumarino metabolizmo tarpiniai junginiai ir kituose mikroorganizmuose^{9-11,14,16}. Pagal analogiją buvo pasiūlyta, kad 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštis gali būti tarpinis 7-hidroksikumarino metabolizmo metabolitas. 7HK4 padermės ląstelės, užaugintos su 7-hidroksikumarinu, nekatalizavo 3-(2-hidroksifenil)-2-propeno arba 3-(2-hidroksifenil) propano rūgščių konversijų, tačiau 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštis buvo suvartota kaip vienintelis anglies ir energijos šaltinis. Biokonversijų mišinių HPLC-MS analizė

parodė, kad *Pseudomonas* sp. 7HK4 ląstelės, augintos su 7-hidroksikumarinu, gamina 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštį kaip tarpinį metabolitą (3 pav.). 7HK4 bakterijose, augintose su gliukoze, prieš tai minėtas junginys nebuvo aptiktas, tai įrodo, kad 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštis yra tarpinis junginys 7-hidroksikumarino skaidymo metu.



3 pav. 7-Hidroksikumarino biokonversijos *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijomis mišinio metabolitų analizė HPLC-MS metodu. UV 254 nm metabolitų pėdsakai (a). Smailių, kurių sulaukymo laikai yra 5,082 min (b ir d) ir 5,759 min (c ir e) UV ir MS spektrai.

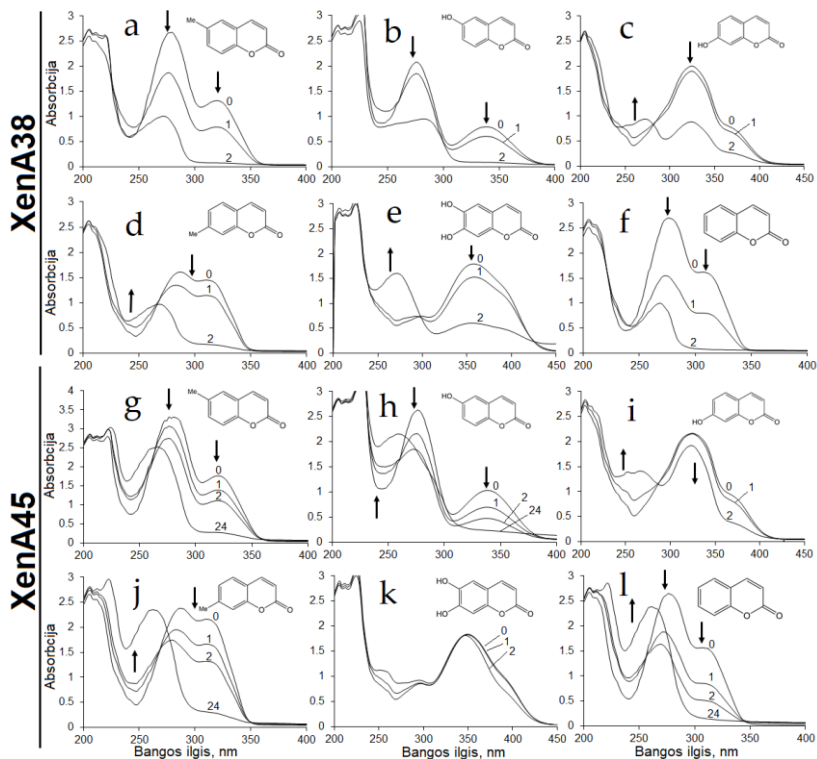
***XenA* reduktazės homologų paieška *P. mandelli* 7HK4 genome**

Kumarino laktono žiedo aktyvintą C=C jungties redukciją gali katalizuoti ene-reduktazės (ER) ³². Nustatyta, kad OYE šeimos ksenobiotinė reduktazė A (XenA) iš *Pseudomonas putida* 86 bakterijų, gali redukuoti dvigubą C-3/C-4 ryšį, esantį 8-hidroksikumarino molekulėje ³³. Norint patikrinti, ar *P. mandelii* 7HK4 ląstelės taip pat naudoja ER fermentus 7-hidroksikumarino katabolizmui, žinoma XenA baltymo aminorūgščių seka buvo panaudota ieškant homologų, užkoduotų ir *P. mandelii* 7HK4 genome ³⁴. Tokiu būdu buvo rasti trys genai, žymimi kaip *xenA38*, *xenA45* ir *xenA205*, koduojantys hipotetines reduktazes, labai panašias į žinomus XenA baltymus. *XenA38*, *xenA45* ir *xenA205* genų produktai priklauso mikofaktocino sistemos FadH/OYE oksidoreduktazių šeimai. Pirmieji du baltymai labiausiai panašūs atitinkamai į tariamą NADH oksidoreduktazę iš *Pseudomonas fluorescens* SBW25 ir 2,4-dienoil-CoA reduktazę iš *Pseudomonas fluorescens* F113. XenA205 baltymas yra panašus į 2,4-dienoil-CoA reduktazę iš *Pseudomonas* sp. ok602. Visi trys genai yra išsibarstę po *P. mandelii* 7HK4 genomą ir nepriklauso jokiai tariamai genų sankaupai.

Hipotetinių ksenobiotinių reduktazių aktyvumų tyrimas

E. coli BL21 ląstelės, transformuotos plazmide, turinčioje *xenA38*, *xenA45* arba *xenA205* geną, buvo naudojamos atitinkamo fermento aktyvumams tirti biokonversijos eksperimentais. *E. coli* BL21 bakterijos, turinčios *xenA38* geną, parodė kumarino, 6-hidroksikumarino, 6-metilkumarino, 7-hidroksikumarino, 7-metilkumarino ir 6,7-dihidroksikumarino biokonversijas, remiantis šių junginių UV-VIS spektrų pokyčiais laike (4 pav., a–f). Sveikos *E. coli* BL21 ląstelės su indukuota XenA45 reduktaze parodė panašų poveikį šiems substratams, išskyrus reakciją su 6,7-dihidroksikumarinu, kurio UV-VIS spektrai laikui bėgant nepakito (4 pav., g–l). *o*-Kumaro ir 2,4-dihidroksicinamono rūgščių biokonversijos XenA38 ir XenA45 fermentais nebuvo stebėtos. *E.*

coli ląstelės, turinčios *xenA205* geną arba neturinčios nei vieno iš šių genų, neparodė jokio poveikio prieš tai minėtiems kumarinių junginiams. Šie rezultatai parodė, jog *P. mandelii* 7HK4 bakterijos koduoja dvi hipotetines ksenobiotines reduktazes, kurios galėtų panaudoti įvairius kumarinus kaip savo substratą.



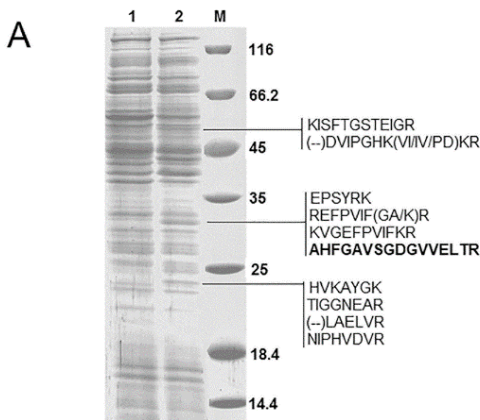
4 pav. 6-metilkumarino (a ir g), 6-hidroksikumarino (b ir h), 7-hidroksikumarino (c ir i), 7-metilkumarino (d ir j), 6,7-dihidroksikumarino (e ir k) ir kumarino (f ir l) biokonversijos sveikomis *E. coli* BL21 ląstelėmis, turinčiomis *xenA38* (a–f) arba *xenA45* (g–l) geną. Biotransformacijos buvo atliktos 50 mM kalio fosfato buferyje (pH 7,2), 30 °C temperatūroje su 0,5 mM substrato. Rodyklės rodo absorbcijos pokyčius laike.

Toliau C-gale His₆ žyme žymėti XenA38 ir XenA45 baltymai buvo susintetinti *E. coli* BL21 bakterijose ir išgryninti afininės chromatografijos metodu. Abu išgryninti fermentai NDS-PAGE migravo kaip ~40 kDa juostos, XenA45 fermento tirpalas buvo bespalvis, priešingai nei ryškiai geltonos spalvos baltymas XenA38, kas leido padaryti išvadą, kad pastarasis baltymas riša flaviną. Tačiau visi bandymai išmatuoti fermentinius XenA38 ir XenA45 baltymų aktyvumus aerobinėmis sąlygomis nedavė rezultatų.

7-Hidroksikumarinu indukuojamų baltymų identifikavimas

Norėdami išsiaiškinti kokie fermentai dalyvauja 7-hidroksikumarino metabolizme, *Pseudomonas* sp. 7HK4 ląstelės buvo auginamos mineralinėje terpėje, papildytoje 7-hidroksikumarinu (0,3 mM) arba gliukoze (0,3 mM) kaip vieninteliais anglies ir energijos šaltiniais. Keli 7-hidroksikumarinu indukuojami skirtingos molekulinės masės baltymai buvo atrinkti, panaudojant NDS-PAGE metodą ir analizuojant beląstelinius ekstraktus iš *Pseudomonas* sp. 7HK4 (5 pav., a).

Trys juostos, atitinkančios 23, 32 ir 50 kDa indukuojamus baltymus (5 pav., a), buvo išpjautos iš NDS-PAGE gelio ir analizuojamos MS-MS *de novo* sekoskaitos metodu. Norint identifikuoti atitinkamus šių indukuojamų baltymų genus, identifikuotų peptidų genų sekos buvo ieškomos 7HK4 padermės genomo sekoje. Taigi taip buvo aptiktas genomo fragmentas (5 pav., b), koduojantis 31,2 kDa baltymą, kuriame yra 16 aminorūgščių ilgio seka (5 pav., a – paryškinta seka), identiška 7-hidroksikumarino indukuojamame ~32 kDa baltyme. Greta 31,2 kDa baltymą koduojančio geno buvo nustatyti dar du atviri skaitymo rėmeliai. Visi trys genai yra išsidėstę toje pačioje DNR grandinėje ir yra atskirti trumpais tarpgeniniais regionais, o tai rodo, kad šie genai yra organizuoti į operoną (5 pav., b). Tariamas operonas buvo pavadintas *hcdABC* (hidroksikumariną skaidantis operonas), kur *hcdC* koduoja 31,2 kDa baltymą.



5 pav. (A) *Pseudomonas* sp. 7HK4. bakterijų bėlastelinių ekstraktų NDS-PAGE analizė. Bakterijos buvo augintos su gliukoze (1 takelis) arba 7-hidroksikumarinu (2 takelis). M – molekulinės masės standartas (kDa). Rodyklės rodo 7-hidroksikumarinu indukuotus 23, 32 ir 50 kDa baltymus. MS-MS metodu nustatytos peptidų sekos nurodytos dešinėje. Paryškintos sekos genas buvo nustatytas *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijų genome. (B) *Hcd* genų išsidėstymas *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijose. Rodyklės nurodo atvirus skaitymo rėmelius, koduojančius HcdA, HcdB ir HcdC baltymus. 7-hidroksikumarinu indukuojamo 31,2 kDa baltymo genas pažymėtas žvaigždute.

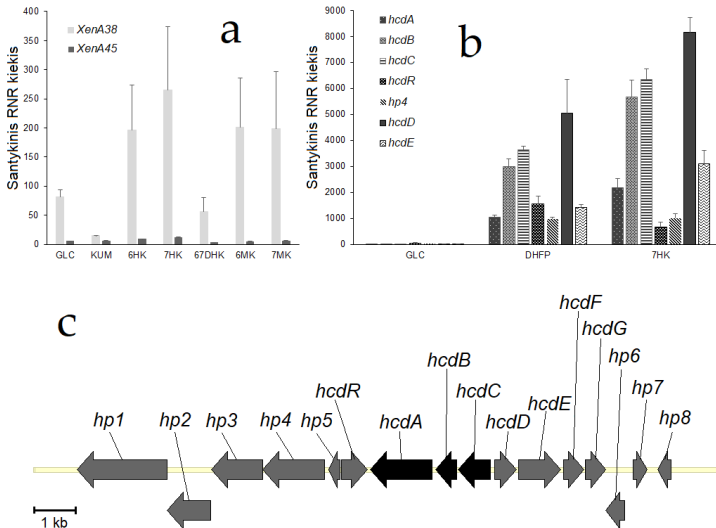
Kumariniais indukuojamų Pseudomonas mandelii 7HK4 transkriptų kiekybinė RT-PGR analizė

Norint ištirti, ar *hcdABC* genų ir hipotetinių reduktazių genų raiška *Pseudomonas mandelii* 7HK4 ląstelėse yra priklausoma nuo 7-hidroksikumarino, buvo atlikta kiekybinė PGR analizė. *Pseudomonas mandelii* 7HK4 ląstelės buvo indukuotos įvairiais kumarino dariniais

ir išskirta bendra RNR, kaip aprašyta medžiagose ir metoduose. Genų raiškos tyrimo rezultatai atskleidė, jog abiejų *xenA38* ir *xenA45* genų raiška nebuvo ženkliai pakitusi, kai *P. mandelii* 7HK4 buvo kultivuojamos su 7-hidroksikumarinu, arba kitais kumarino dariniais (6 pav., a). Be to, *xenA45* genas nebuvo indukuotas jokiomis išbandytomis sąlygomis, nors *xenA38* geno raiškos lygis buvo didesnis nei jo homologo. Hidroksikumarinu indukuotų 7HK4 ląstelių *xenA38* mRNR sintezės lygis buvo lygintas su gliukozėje išaugintomis (neindukuotomis) ląstelėmis, kas parodė, kad *xenA38* geno transkripcija padidėjo du kartus, ląsteles indukavus 6-hidroksikumarinu ir tris kartus – indukavus 7-hidroksikumarinu. *XenA38* geno raiška taip pat buvo palyginta su *hcdABC* genų raiškos lygiais. Nustatyta, kad *hcdABC* genų mRNR sintezės lygiai padidėjo 1000 kartų, kai 7HK4 ląstelės buvo indukuojamos su 7-hidroksikumarinu arba 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštimi (6 pav., b). Iš to sekė išvada, kad *hcdABC* genų sanauja yra priklausoma nuo 7-hidroksikumarino, tačiau *xenA38* mRNR lygis buvo per mažas, kad būtų galima teigti, jog *xenA38* genas yra indukuojamas kumarino dariniais. *XenA38* galėtų būti labiau kaip konstitucinis fermentas, turintis platų redukcinį potencialą *P. mandelii* 7HK4 ląstelėse.

Tolesniems tyrimams atlikome genų, esančių greta *hcdABC* operono, raiškos kiekybinę PGR analizę (6 pav., c). Rezultatai atskleidė, kad atsitiktinai parinkti tariami *hp4*, *hcdR*, *hcdD* ir *hcdE* genai taip pat buvo indukuojami *P. mandelii* 7HK4 ląstelėse (6 pav., b). *HcdR*, *hp4*, *hcdD* ir *hcdE* genų raiškos lygis padidėjo maždaug 1000 kartų ir buvo panašus į *hcdABC* genų raiškos lygį tomis pačiomis sąlygomis. Kiekvienas *hcdABC*, *hp4*, *hcdD* ir *hcdE* genas buvo specifiskai indukuotas, kuomet *P. mandelii* 7HK4 bakterijos buvo indukuotos su 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštimi arba 7-hidroksikumarinu. Be to, pastebėta 100 kartų padidėjusi šių genų mRNR sintezė ir *P. mandelii* 7HK4 ląstelėse, indukuotose su 7-metilkumarinu. Analizuotų genų raiškos nepastebėta *P. mandelii*

7HK4 ląstelėse, indukuotose su kumarinu, 6-hidroksikumarinu, 6-metilkumarinu, 6,7-dihidroksikumarinu, *o*-kumaro, *p*-kumaro, 2,4-dihidroksicinamono rūgštimis, chinolinu ir izochinolinu.



6 pav. *Pseudomonas mandelii* 7HK4 transkriptų kiekybinė RT-PGR analizė. 7HK4 padermė buvo kultivuota minimalioje terpėje, papildytoje 1 mM įvairiais kumarinų dariniais (indukcinės sąlygos) arba gliukoze (kontrolinė sąlyga) kaip vieninteliais anglies šaltiniais. a) *xenA38* ir *xenA45* genų transkripcijos RT-PGR analizė. b) *hcdABCDEF* ir *hp4* genų transkripcijos RT-PGR analizė. Duomenys pateikiami kaip santykiniai mRNR kiekiai. Pateikti trijų nepriklausomų matavimų vidurkiai. GLC – gliukozė; KUM – kumarinas; 6HK – 6-hidroksikumarinas; 7HK – 7-hidroksikumarinas; 6MK – 6-metilkumarinas; 7MK – 7-metilkumarinas; 67DHK – 6,7-dihidroksikumarinas; DHFP – 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštis. (c) *hcdABCDEF* genų išsidėstymas *P. mandelii* 7HK4 bakterijų genome. Juodos rodyklės nurodo HcdA, HcdB, HcdC baltymų genus, o pilkos rodyklės rodo *hcdDEF* genus ir kitus atvirus skaitymo rėmelius, koduojančius hipotetinius baltymus (hp).

Genomo lokuso, koduojančio 7-hidroksikumarinu indukuojamą baltymą, analizė

Pseudomonas sp. 7HK4 bakterijų genomo sekos analizė parodė, jog indukuojamas 31,2 kDa baltymas (HcdC) priklauso fumarilacetoacetato (FAA) hidrolazių šeimai, kuriai priklauso tokie fermentai kaip 2-keto-4-pentenoato hidratazė, 2-oksohepta-3-ene-1,7-dikarboksi rūgšties hidratazė, 2-hidroksi-6-okso-6-fenilheksa-2,4-dienoato hidrolazė arba bifunkcinės izomerazės/dekarboksilazės (catecholinių junginių metabolinis kelias). FAA šeimos baltymai paprastai dalyvauja paskutiniuose aromatinių junginių metabolizmo bakterijose etapuose³⁵⁻³⁷, o tai leidžia teigti, kad 31,2 kDa baltymas iš *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijų greičiausiai dalyvauja paskutiniuose 7-hidroksikumarino metabolizmo etapuose po oksidacinio aromatinio žiedo skėlimo.

HcdA ir hcdB baltymų aminorūgščių sekų BLAST analizė parodė, kad šie baltymai atitinka hipotetines FAD rišančią hidroksilazę ir aromatinio žiedo skėlimo dioksigenazę. HcdA baltymas nėra priskiriamas nei vienai baltymų šeimai, tačiau yra panašiausias į tariamą 2-poliprenil-6-metoksifenolio hidroksilazę. Šio tipo fermentai priklauso FAD rišančių monooksigenazių A klasei, kurios dalyvauja aromatinių junginių skaidyme bakterijose³⁸⁻⁴¹. *HcdB* geno produktas priklauso cl14632 superšeimai, jungiančiai įvairius struktūriškai susijusius metaloproteinus, įskaitant I tipo ekstradiolines dioksigenazes. I tipo ekstradiolinės dioksigenazės katalizuoja abiejų molekulinio deguonies atomų įterpimą į aromatinis substratus, skeliant aromatinių junginių žiedą^{42,43}.

HcdA hidroksilazės raiška ir substrato specifiškumas

Tolesniam HcdA hidroksilazės apibūdinimui *hcdA* genas buvo padaugintas PGR metodu ir klonuotas į pET21b genų raiškos vektorių. Seka buvo patvirtinta Sanger sekoskaitos būdu. Rekombinantinis C-gale His₆ žyme pažymėtas baltymas buvo susintetintas *E. coli* BL21 bakterijose ir išgrynintas afininės chromatografijos būdu. Išgrynintas

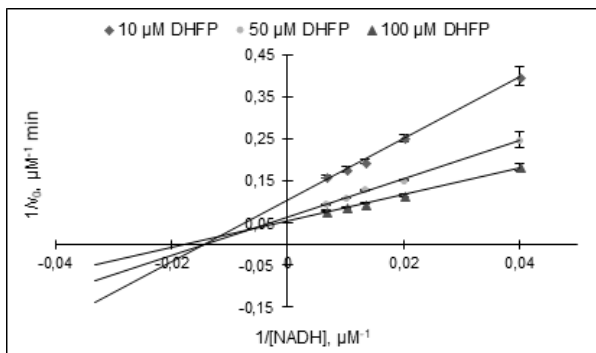
fermentas migruoja kaip ~62 kDa baltymas, analizuojant NDS-PAGE, ir yra ryškiai geltonos spalvos su absorbcijos maksimumu ties 380 ir 450 nm bangos ilgiais, kas rodo, kad baltymas riša flaviną⁴⁴⁻⁴⁶. Dydžių išskyrimo chromatografijos metodu nustatyta, kad išgrynintas HcdA baltymas yra monomeras.

Ištirtas HcdA baltymo specifiškumas tiek flavino, tiek nikotinamido kofaktoriams. HcdA hidroksilazė gali panaudoti tiek NADH, tiek NADPH, nors su NADPH kofaktoriumi oksidacijos greitis buvo beveik dvigubai mažesnis. FAD arba FMN kofaktoriaus pridėjimas į reakcijų mišinius reikšmingų NADPH oksidacijos pokyčių neparodė, tačiau papildomi pridėjus FAD arba FMN, NADH oksidacijos greitis padidėjo atitinkamai nuo 6 iki 12%. Nustatyta, kad optimalios HcdA aktyvumo reakcijos sąlygos yra žemo joninio stiprumo 25 mM tricino buferis (pH 7,8–8,0) ir 18–25 °C temperatūra.

Kinetiniams HcdA parametrams nustatyti buvo matuojamas pradinis NADH oksidacijos greitis. NADH kofaktoriaus K_m reikšmė, apskaičiuota pagal pradinio greičio lygtį, yra $50,10 \pm 3,50 \mu\text{M}$, esant $500 \mu\text{M}$ 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties koncentracijai, o 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties K_M reikšmė yra $13,00 \pm 1,20 \mu\text{M}$ prie $300 \mu\text{M}$ NADH koncentracijos. Tuo tarpu reakcijos katalizinė konstanta k_{cat} yra $7,91 \pm 0,17 \text{ s}^{-1}$. Taip pat, pradiniai HcdA fermento reakcijos greičiai buvo matuojami, keičiant tiek NADH, tiek 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties koncentracijas, bei naudojant FMN perteklių. Remiantis pastovios būsenos kinetikos teorija atvirkštinių NADH oksidacijos greičių priklausomybė nuo substrato ir kofaktoriaus skirtingų koncentracijų parodė, jog HcdA katalizuojamos reakcijos metu susidaro trinaris kompleksas, kadangi reakcijos greičio priklausomybė nuo substratų koncentracijos atvaizduojančios linijos nebuvo lygiagrečios, o susikertančios viršutiniame kairiajame kvadrante (7 pav.)⁴⁷.

HcdA fermento aktyvumas buvo tiriamas su įvairiais substratais, panaudojant NADH kofaktorių. Didžiausias NADH oksidacijos greitis buvo užfiksuotas su 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštimi.

Kai substratu buvo naudojama *trans*-2,4-dihidroksicinamono rūgštis, pastebėta 40 kartų mažesnis reakcijos greitis. Tačiau HcdA nebuvo aktyvus su *trans*-cinamono, *cis*-2,4-dihidroksicinamono, 3-(2-hidroksifenil) propano, 3-(2-hidroksifenil) 2-propeno, 3-(4-hidroksifenil) 2-propeno, 3-(3-hidroksifenil) 2-propeno, 3-(2-bromfenil) propano, 3-(2-nitrofenil) propano ir 3-fenilpropano rūgštimis, cinamilo alkoholiu, pirokatecholiu, 3-metilkatecholiu, 4-metilkatecholiu, 2-propilfenoliu, 2-propenilfenoliu, 2-etilfenoliu, *o*-krezoliu, *o*-tirozinu, rezorcinoliu, 2,3-dihidroksipiridinu, 2-hidroksi-4-aminopiridinu, *N*-metil-2-piridonu, *N*-etil-2-piridonu, *N*-propil-2-piridonu, *N*-butil-2-piridonu, indolinu ir indolu. Šie duomenys rodo, kad HcdA monooksigenazė yra labai specifiška 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgščiai. Baltymo C-gale esanti His₆ žymė neturėjo įtakos HcdA baltymo fermentiniam aktyvumui.

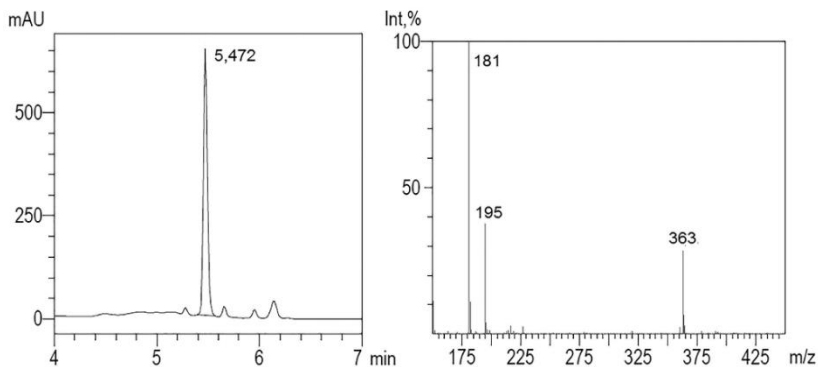


7 pav. Atvirkštinio NADH oksidacijos greičio priklausomybės nuo NADH koncentracijos, esant skirtingoms substrato koncentracijoms grafikas. Trinario FMN-rišančio HcdA fermento komplekso susidarymas su NADH ir 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštimi. Naudotos 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties koncentracijos buvo 10 μM (užpildyti deimantai), 50 μM (užpildyti apskritimai) ir 100 μM (užpildyti trikampiai). NADH oksidacijos greitis buvo stebimas prie 340 nm bangos ilgio. Eksperimentas buvo atliktas tris kartus, nurodant standartines paklaidas.

HcdA yra funkciškai panašus į anksčiau gerai aprašytas hidroksilazes, tokias kaip OhpB monooksigenazė iš *Rhodococcus* sp. V49⁴⁸, MhpA monooksigenazės iš *E. coli* K-12⁴⁹ ir *Comamonas testosteroni* TA441⁵⁰, HppA monooksigenazė iš *Rhodococcus globerulus* PWD1⁵¹ ir *para*-hidroksibenzoato hidroksilazė (PHBH) iš *P. Fluorescens*⁵². Panašu, kad HcdA specifiška tik 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgščiai, paverčiant ją trihidroksifenil propano rūgštimi. Kitų struktūriškai susijusių substratų HcdA nenaudoja. Skirtingai nei HcdA, kitos funkciškai susijusios FMO turi platesnį specifškumą substratams. Pavyzdžiui, OhpB hidroksilazė gali oksiduoti 2-hidroksi-, 3-hidroksifenilpropano ir cinamono rūgštis⁴⁸. HppA fermentas yra labiau būdingas 3-hidroksifenilpropano rūgščiai, tačiau 4-chlorfenoksiacto ir 4-metil-2-chlorfenoksiacto rūgštys taip pat yra oksiduojamos⁵¹. Kita vertus, visos aprašytos FMO, įskaitant HcdA, priklauso nuo NAD(P)H, kurį panaudoja flavinų redukcijai substrato hidroksilinimo metu³⁸⁻⁴¹. Siauras HcdA specifškumas substratui yra būdingas A klasės flavoproteinams ir parodo HcdA fermento svarbą metabolizuojant 7-hidroksikumariną. Literatūroje nepateikti jokie OhpB, MhpA ir HppA hidroksilazių kinetiniai parametrai, kuriuos galėtume palyginti su HcdA kinetiniais duomenimis. Yra žinoma, kad PHBH k_{cat} yra 22,83 s⁻¹, kas yra 3 kartus daugiau už HcdA fermento apsisukimų skaičių.

HcdA hidroksilazės katalizuojamos reakcijos produktas buvo analizuojamas UV-VIS absorbcijos spektroskopijos ir HPLC-MS metodais. Į reakcijos mišinį pridėdant 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštis, buvo pastebėtas naujas UV absorbcijos maksimumas ties 340 ir 490 nm bangos ilgiais. Buvo matoma raudona reakcijos mišinio spalva, rodanti, kad susidaro *para*- arba *orto*-chinonas, greičiausiai po atitinkamo hidrochinono autooksidacijos. Ta pati spalva pastebėta ir *in vivo*, kai *Pseudomonas* sp. 7HK4 ląstelės buvo auginamos su 7-hidroksikumarino pertekliumi, arba kai *E. coli* BL21 ląstelės, turinčios p4pmPmo plazmidę, buvo auginamos su 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštimi. *In vitro* ir *in vivo* biokonversijų mišinių HPLC-MS

analizė patvirtino 3-(trihidroksifenil) propano rūgšties ir chinono susidarymą. Rastos $[M-H]^-$ jonų masės buvo atitinkamai 197 (pėdsakai matomi tik *in vivo*) ir 195 (8 pav.).



8 pav. 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties *in vitro* biokonversijos mišinio HPLC-MS analizė. UV 254 nm metabolitų pėdsakai, 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštis ir jos hidroksilinto produkto pėdsakai matomi toje pačioje chromatogramos smailėje, kurios sulaikymo trukmė 5,472 min (kairėje) ir šios smailės MS spektras (dešinėje). Susidariusių neigiamų jonų $[M-H]^-$ m/z yra 181 (3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties), 195 (3-(trihidroksifenil) propano rūgšties autooksidacijos produktas).

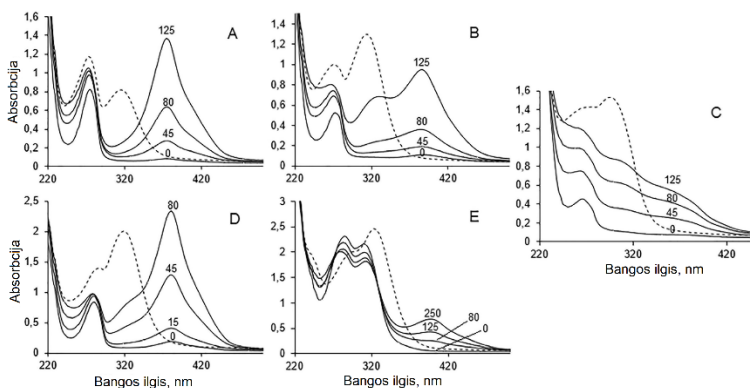
Tačiau šiame etape produkto struktūra dar nebuvo patvirtinta atliekant cheminę analizę, nes nebuvo įmanoma produkto chromatografiškai išgryninti iš reakcijos mišinio. Pradinis reakcijos substratas ir produktas turi panašias struktūras ir chemines savybes, todėl abu junginiai aptinkami toje pačioje HPLC-MS chromatogramos smailėje, kurios sulaikymo trukmė ~ 5,5 min.

HcdB dioksigenazės raiška ir substrato specifiškumas

HcdB dioksigenazė buvo susintetinta *E. coli* BL21 bakterijose, panaudojant pTHPPDO plazmidę. Visi bandymai išsigryninti HcdB

baltymą aerobinėmis sąlygomis lėmė fermentinio aktyvumo praradimą, net ir pridėjus organinių tirpiklių, tokių kaip glicerolis, etanolis ar acetonas, kurie buvo žinomi kaip panašių fermentų stabilizatoriai^{51,53,54}. Ditionitritolio ir geležies sulfato pridėjimas išgryninto baltymo aktyvumo taip pat neatstatė, nors yra žinoma, kad tai suaktyvina ir (arba) stabilizuoja kitas ekstradiolines dioksigenazes.

Todėl dėl labai nestabilaus HcdB fermento pobūdžio visi aktyvumo matavimai buvo atlikti *in vivo*, panaudojant sveikas *E. coli* BL21 ląsteles, transformuotas pTHPPDO plazmide. Atliekant pirokatecholio, 3-metilkatecholio, 3-metoksikatecholio, 4-metilkatecholio, 3-(2,3-dihidroksifenil) propano ir kavos rūgščių konversijas, kiekvienu atveju susidarė geltono atspalvio produktai, kurių stebimas absorbcijos maksimumas yra būdingas katecholių *meta*-skėlimo produktams (9 pav., ištisinė linija)⁵⁵⁻⁵⁷.



9 pav. Pirokatecholio (A), 3-metilkatecholio (B), 3-metoksikatecholio (C), 4-metilkatecholio (D) ir kavos rūgšties (E) biotransformacijos sveikomomis *E. coli* BL21 ląstelėmis, turinčiomis *hcdB* geną. Biotransformacijos buvo atliktos 50 mM kalio fosfato buferyje (pH 7,5) (vientisa linija), esant 30 °C, naudojant 0,5–1 mM substrato. Inkubacijų laikai nurodyti minutėmis. Brūkšninės linijos parodo smailių poslinkius į trumpesnių bangos ilgių sritį po reakcijos mišinių parūgštinimo.

Reakcijų mišinių spalvų pokyčiai neįvyko, tačiau absorbcijos maksimumų pokyčiai buvo pastebėti biokonversijose su pirogalolu, galacetofenonu, 2',3'-dihidroksi-4'-metoksiacetofenono hidratu, 3,4-dihidroksibenzenkarboksi ir 2,3,4-trihidroksibenzoine rūgštimis bei 2,3,4-trihidroksibenzofenonu. Reakcijų mišiniuose panaudojus 1,2,4-benzenetrolį ir 6,7-dihidroksikumariną jokių aktyvumų nepastebėta. *E. coli* ląstelės, neturinčios *hcdB* geno, neparodė jokio poveikio su minėtais junginiais. Reakcijos produktų UV-VIS spektrų maksimumų poslinkis į trumpesnių bangos ilgių sritį pastebėtas parūgštinus reakcijos mišinius, kuriuose yra pirokatecholio, 3-metilkatecholio, 3-metoksikatecholio, 4-metilkatecholio ir kavos rūgšties (9 pav., brūkšninė linija) ^{58,59}. Šie rezultatai parodė, kad *hcdB* koduoja ekstradiolinę dioksigenazę, kuri gali panaudoti daug skirtingai pakeistų katecholių.

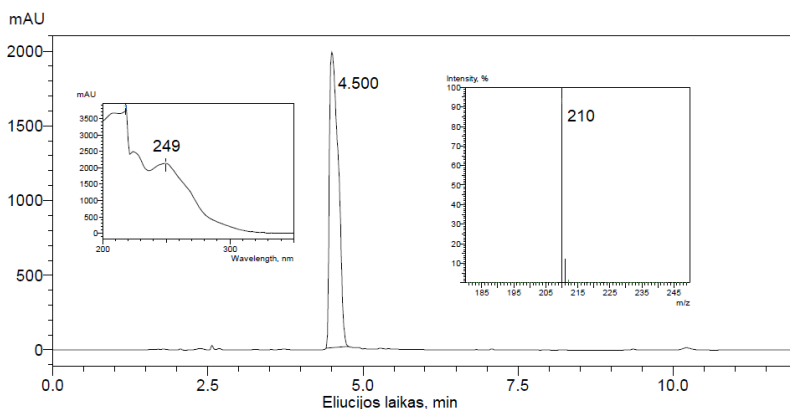
Be to, HcdB dioksigenazė buvo susintetinta kartu su HcdA hidroksilaze *E. coli* BL21 ląstelėse. Buvo analizuojamas šių ląstelių aktyvumas 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties substrato atžvilgiu. Inkubuojant ilgiau nei 72 valandas, jokių reakcijos mišinio spalvos pokyčių neatsirado, palyginus su *E. coli* ląstelėmis, turinčiomis tik *hcdA* geną, kuriose susidarė rausvos spalvos biokonversijos produktas. 3-(2,4-Dihidroksifenil) propano rūgšties konversijos su HcdA ir HcdB fermentais produktas buvo analizuojamas HPLC-MS metodu. 181, 195 ir 197 Da masių jonai ($[M-H]^-$) nebuvo aptikti, kas parodo visišką substrato ir jo hidroksilintų formų konversiją. Be to, nei vienas iš tikėtinų jonų ($[M-H]^-$ 229 Da arba $[M+H]^+$ 231 Da) nebuvo pastebėtas tariamam 3-(trihidroksifenil) propano rūgšties oksidacinio skėlimo produktui.

Ištyrus ekstradiolinę dioksigenazę HcdB nustatyta, kad šis fermentas turi mažesnę specifiskumą substratams. HcdB gali oksiduoti pirokatecholį, 3-metilkatecholį, 3-metoksikatecholį, 4-metilkatecholį, 3-(2,3-dihidroksifenil) propano ir kavos rūgštis *meta*-skėlimo mechanizmu, susidarant geltonos spalvos produktams. HcdB priklauso I tipo II klasės ekstradiolinėms dioksigenazėms ir yra

funkciškai susijęs su OhpD katecholio 2,3-dioksigenaze iš *Rhodococcus* sp. V49⁴⁸, MhpB ekstradiolio dioksigenaze iš *E. coli* K-12^{49,60}, MpcI ekstradiolio dioksigenaze iš *Alcaligenes eutrophus*⁶⁰, HppB ekstradiolio dioksigenaze iš *Rhodococcus globerulus* PWD1⁵¹ ir DbfB 2,2',3-trihidroksibifenildioksigenaze iš *Sphingomonas* sp. RW1⁵³.

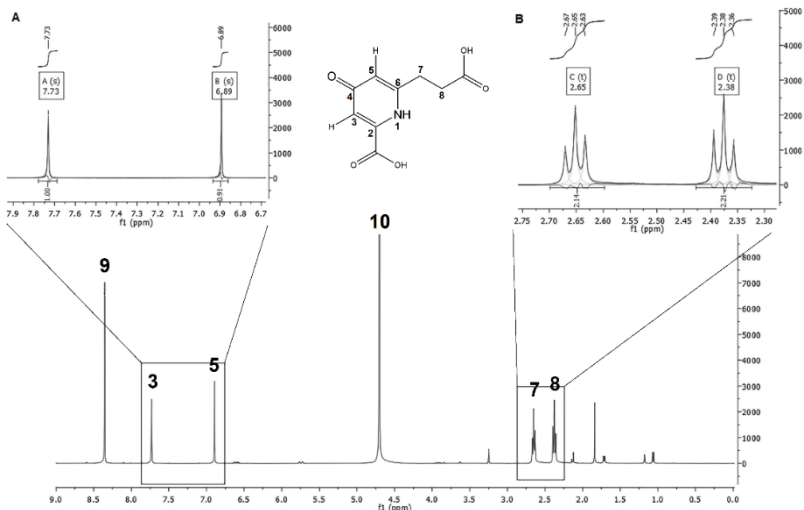
3-(2,4-Dihidroksifenil) propano rūgšties biokonversijos produkto išskyrimas ir identifikavimas

Dėl sunkumų aptikti bespalvį katecholio darinio *meta* skaidymo produktą, ir kadangi nebuvo galima užregistruoti pagrįstų masių spektrų, nusprendėme skėlimo produktą transformuoti į pikolino rūgšties darinį, inkubuojant su NH₄Cl, kaip aprašyta metoduose. Pikolino rūgšties darinio susidarymas buvo įrodytas atliekant HPLC-MS analizę, kuri patvirtino [M-H]⁻ jono 210 Da masės susidarymą (10 pav.), atitinkantį NH₃ pridėjimą prie katecholinio darinio *meta* skėlimo produkto ir dviejų H₂O molekulių praradimą.



10 pav. 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties biokonversijos mišinio HPLC-MS analizė *in vivo*. Pikolino rūgšties darinio UV 254 nm pėdsakai, sulaikymo trukmė 4,5 min, dominuojančios smailės UV ir MS spektras. Susidaręs neigiamas jonas [M-H]⁻ yra m/z 210.

Šio darinio ^1H BMR spektras [δ 7,73 (s, 1H), 6,89 (s, 1H), 2,65 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,38 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H)] parodė rinkinį dviejų arilo protonų, kurie priklausomai nuo sujungimo modelio (singletas + singletas), yra aromatiniame žiede vienas kito *meta*- arba *para*-padėtyse (11 pav.). Dviejų tripletų, kurių cheminis poslinkis siekė 2,38 ir 2,65 ppm, spektras parodė, kad yra keturi metileno protonai.

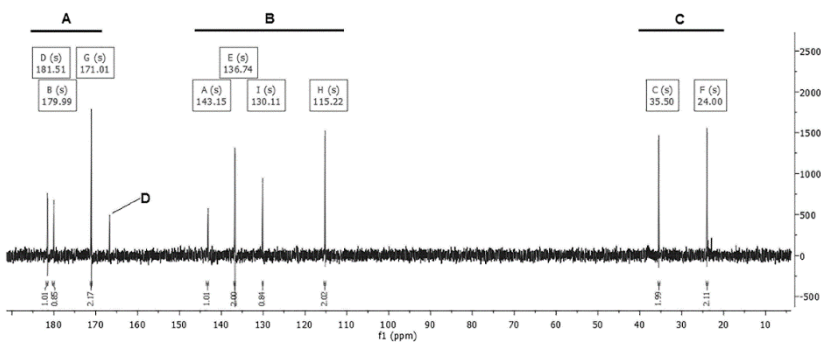


11 pav. 6-(2-karboksietil)-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksi rūgšties ^1H BMR spektras (400 MHz, D_2O). Arilo (A) ir metileno (B) protonų identifikavimas. 9 – skruzdžių rūgšties priemaišos; 10 – tirpiklio likutinė smailė.

^{13}C BMR spektras [δ 181,51, 179,99, 171,01, 143,14, 136,74, 130,11, 115,22, 35,50, 24,00] parodė du sp^3 anglies atomus, kurių cheminis poslinkis buvo 24,00 ir 35,50 ppm, ir tris karbonilo grupių sp^2 anglies atomus, kurių cheminiai poslinkiai buvo atitinkamai 171,01, 179,99 ir 181,51 ppm (12 pav.). Dar keturi sp^2 anglies signalai buvo aromatinių anglies atomų regione. Trečiosios karbonilo grupės buvimas parodė okso-piridino susidarymą, kuriam buvo numatytos

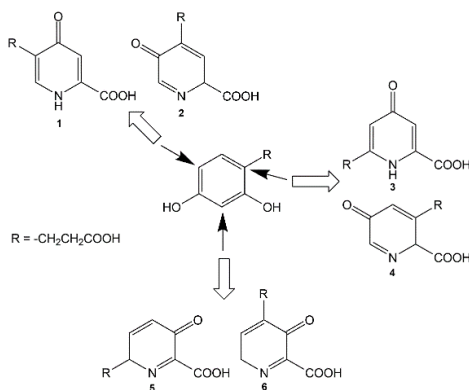
šėšios galimos teorinės okso-pikolino rūgšties darinio struktūros (13 pav.).

Kadangi ^1H BMR spektras parodė dviejų singletinių arilo protonų rinkinį *meta* arba *para* padėtyje vienas kito atžvilgiu, toliau buvo analizuojamos tik 3 ir 5 struktūros (13 pav.). Be to, piridino aromatiniai anglies atomai paprastai yra diferencijuojami į du aukštesnio rezonansinio lauko (C-3/5, *meta* padėtis) ir tris į žemesnio rezonansinio lauko (C-2/6, *orto* padėtis; C-4, *para* padėtis), kur azoto atomas veikia kaip elektronų donoras.



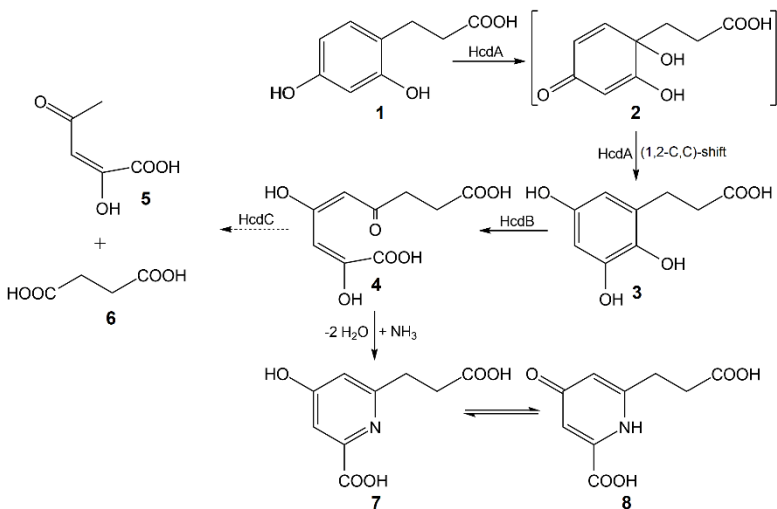
12 pav. 6-(2-karboksietil)-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksi rūgšties ^{13}C BMR spektras (101 MHz, D_2O). Karbonilo (A), arilo (B) ir metileno (C) anglies atomų atpažinimas. D – skruzdžių rūgšties priemaišos.

Cheminis 115,22 ppm poslinkis parodė, kad analizuojamas junginys turėjo gana stipriai apsaugotą nepakeistą aromatinę anglį, kuri turėtų būti *meta* padėtyje nuo azoto, *orto* padėtyje nuo karbonilo grupės ir *meta* arba *para* padėtyje nuo karboksilo grupės. Tai leido padaryti išvadą, kad 3 struktūra (13 pav.) 6-(2-karboksietil)-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksi rūgštis susidarė, inkubuojant katecholio darinio *meta* skėlimo produktą su NH_4Cl kaip parodyta 14 paveiksle.



13 pav. Siūlomos okso-pikolino rūgšties darinio struktūros, susidariusios oksiduojant 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties žiedą ir konvertuojant žiedo skėlimo produktą. Pilnavidurės rodyklės rodo galimas hidroksilinimo vietas HcdA fermentu.

Šie duomenys leido atkurti 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties oksidacijos metabolinį kelią, katalizuojamą HcdA ir HcdB fermentais. Taigi 3-(2,3,5-trihidroksifenil) propano rūgštis buvo 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties oksidacijos HcdA hidroksilaze produktas. 198 Da 3-(2,3,5-trihidroksifenil) propano rūgšties molekulinė masė ir galimybė sudaryti *para*-chinoną atitiko UV-VIS ir HPLC-MS duomenis, surinktus iš 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties biokonversijų su HcdA hidroksilaze. 3-(2,3,5-trihidroksifenil) propano rūgšties susidarymas iš 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties yra įmanomas tik oksidacinio *ipso* pertvarkymo mechanizmu, tai yra unikalioji reakcija, kai vyksta 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties *ipso*-hidroksilinimas, tuo pačiu metu propiono rūgštis grupei pasislinkus į *orto*-padėtį (14 pav.)⁶¹⁻⁶⁴. Toliau HcdB ekstradiolinė dioksigenazė 3-(2,3,5-trihidroksifenil) propano rūgštį oksiduoja *meta*-padėtyje, susidarant (2*E*,4*E*)-2,4-dihidroksi-6-oksonona-2,4-dieno dirūgščiai. Dalyvaujant amonio jonams susidaro iminas ir įvyksta tautomerizacija, kas lėmė 6-(2-karboksietil)-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksi rūgšties susidarymą (14 pav.).



14 pav. Siūlomas 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties metabolizmas *Pseudomonas* sp. 7HK4 ląstelės. Inkubuojant **4** junginį su NH₄Cl, gaunamas pikolino rūgšties darinys. 1 – 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštis; 2 – 3-(1,2-dihidroksi-4-oksocikloheksa-2,5-dienil) propano rūgštis; 3 – 3-(2,3,5-trihidroksifenil) propano rūgštis; 4 – (2E,4E)-2,4-dihidroksi-6-oksonona-2,4-dieno dirūgštis; 5 – (E)-2-hidroksi-4-okso-2-pentenoic rūgštis; 6 – gintaro rūgštis; 7 – 6-(2-karboksietil)-4-hidroksipikolino rūgštis; 8 – 6-(2-karboksietil)-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksi rūgštis; HcdA – 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties 1-monooksigenazė; HcdB – 3-(2,3,5-trihidroksifenil) propano rūgšties 1,2-dioksigenazė; HcdC – tariama (2E,4E)-2,4-dihidroksi-6-oksonona-2,4-dieno dirūgšties hidrolazė. Brūkšninė rodyklė rodo hipotetinę reakciją.

Mes parodėme, kad 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties hidroksilinimas vyksta fenolio žiedo *ipso* padėtyje, po kurio seka vidumolekuliniai pertvarkymai, kai propano rūgšties dalis pasislenka (1,2-C,C) į *orto* poziciją (NIH poslinkis), susidarant 3-(2,3,5-

trihidroksifenil) propano rūgščiai (14 pav.). Tai paaiškintų ir aukštą HcdA fermento specifiškumą substratams su *para*-pakeistu fenoliu, ir tai, kad *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijos nenaudoja kitų kumarino darinių, išskyrus 7-hidroksikumariną, kaip vienintelį anglies ir energijos šaltinį. Tik kelios fermentų klasės sugeba katalizuoti *ipso* reakcijas: lakazės, peroksidazės, dioksigenazės, glutationo S-transferazės (GST), nuo citochromo P₄₅₀ priklausomos monooksigenazės (CYP) ir nuo flavino priklausomos monooksigenazės (FMO). Tarp žinomų *ipso* fermentų pavyzdžių yra dioksigenazių iš *Comamonas testosteroni* T2 ir *Sphingomonas* sp. RW1, kurios dalyvauja desulfoninant 4-sulfobenzoatą^{65,66}. Žiurkių kepenų CYP sistema gali paversti *p*-chloro-, *p*-bromo-, *p*-nitro-, *p*-ciano-, *p*-hidroksimetil-, *p*-formil- ir *p*-acetilfenolius į hidrochinonus, atliekant *ipso* hidroksilinimo reakcijas⁶⁷. GST gali katalizuoti sulfonilfuropiridino junginių desulfoninimą nukleofilinės atakos metu ant glutationo sieros atomo *ipso*-padėtyje⁶⁸. Tai yra elektrofilinių ar nukleofilinių *ipso*-pakeitimo reakcijų pavyzdžiai, tačiau kai kuriais atvejais pirminė *ipso* grupė nėra pašalinama, vietoj to ji perkeliama į *orto* poziciją. NIH poslinkis stabilizuoja cikloheksadienono tarpinį junginį, kas sukelia rearomatizaciją⁶¹⁻⁶⁴. Mes parodėme, kad panašiai kaip ir nuo flavino priklausomos monooksigenazės iš *Sphingomonas* sp. TTNP3 ir *Sphingobium xenophagum* padermės, kurios yra atsakingos už alkilfenolių, tokių kaip bisfenolis A, oktilfenolis, *t*-butilfenolis, *n*-oktiloksifenolis ir *t*-butoksifenolis, degradaciją, HcdA katalizuojama reakcija irgi vyksta su NIH poslinkio mechanizmu. Paprastai NIH poslinkio produktai susidaro šalutinių reakcijų metu, o šie vidiniai alkilo grupės pertvarkymai, įvykę po *ipso*-hidroksilinimo *Sphingomonas* sp. bakterijose vyksta spontaniškai (nekatalizuojant fermentams)^{62,69}. Įdomu tai, kad HcdA hidroksilazė katalizuoja tik vieno produkto, kurio *ipso* grupė migruoja į *orto*-poziciją, susidarymą. Todėl darome plielaidą, kad HcdA atveju NIH poslinkis vyksta fermentinės katalizės metu, o ne spontaniškai ar dienono-fenolio pertvarkymo mechanizmu, nes visos biokonversijos buvo atliekamos

neutraliomis ar bazinėmis sąlygomis. Tačiau norint nustatyti tikslų HcdA fermento katalizės mechanizmą, reikalingi detalesni tyrimai.

HcdC baltymo raiška

HcdC geno raiška buvo atlikta nuo p2K4PH plazmidės *E. coli* BL21 bakterijose. Į 3-(2,3-dihidroksifenil) propano rūgšties, pirokatecholio, 3-metilkatecholio arba 4-metilkatecholio biokonversijos su HcdB ekstradioline dioksigenaze mišinius pridėjus *E. coli* belastelinių ekstraktų, kuriuose yra HcdC baltymo, *meta* skėlimo produktų geltona spalva nepasikeitė. Be to, NAD(P)⁺ kofaktoriaus pridėjimas į tuos pačius reakcijos mišinius irgi nesukėlė *meta* skėlimo produktų geltonos spalvos išblukimo ⁷⁰. Norint patvirtinti HcdC funkciją, *E. coli* BL21 ląstelės buvo transformuotos p4pmPmo ir pCDF-BC plazmidėmis. Visų trijų *hcdA*, *hcdB* ir *hcdC* genų raiška *E. coli* ląstelėse buvo patvirtinta NDS-PAGE metodu, fermentai migravo atitinkamai kaip 62, 31 ir 20 kDa juostos.

3-(2,4-Dihidroksifenil) propano rūgšties biokonversija buvo atlikta *E. coli* ląstelėse, kuriose buvo visi trys rekombinantiniai baltymai. Vėliau reakcijos mišinys buvo inkubuotas su NH₄Cl, o reakcijos produktai buvo analizuoti HPLC-MS metodu. Jonai [M-H]⁻ ir [M+H]⁺, kurių masės buvo atitinkamai 210 ir 212 Da, nebuvo aptikti, palyginus su biokonversijos mišiniu su *E. coli* ląstelėmis, turinčiomis tik *hcdAB* genus. Tai parodė visišką katecholinio darinio *meta*-skėlimo produkto konversiją, todėl nebuvo galima gauti pikolino rūgšties darinio. HcdC baltymo – (2*E*,4*E*)-2,4-dihidroksi-6-oksonona-2,4-dieno dirūgšties hidrolizės – reakcijos produktai nebuvo nustatyti. Mes siūlome, kad galimai susidarantys junginiai – gintaro rūgštis ir (*E*)-2-hidroksi-4-oksopent-2-enoinė rūgštis toliau galėjo būti konvertuoti *E. coli* ląstelėse, taip apsunkinant šių reakcijos produktų gryninimą. Nepaisant to, galima daryti išvadą, kad visi trys fermentai, kuriuos koduoja *hcdABC* operonas, yra atsakingi už 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties katabolizmą *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijose.

Be to, HcdC fermentas turi mažą sekos homologiją su bet kuriuo iš anksčiau aprašytu fermentu iš *Rhodococcus* sp. V49⁴⁸, *E. coli* K-12⁴⁹, *Comamonas testosteroni* TA441⁵⁰ arba *Rhodococcus globerulus* PWD1⁵¹, todėl reiktų atlikti detalesnius tyrimus, norint išsiaiškinti tikslų hidrolizės mechanizmą bei HcdC fermento specifiskumą substratams.

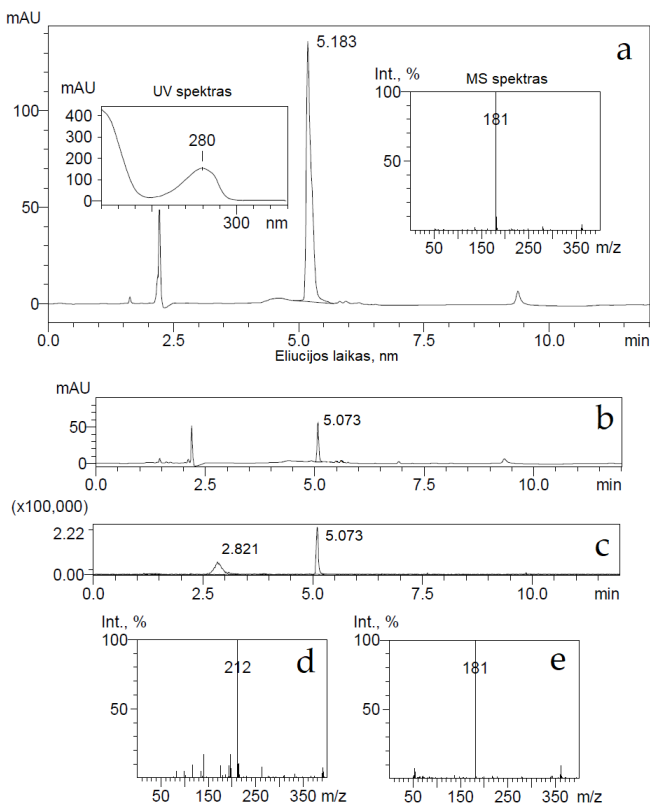
Genomo lokuso, esančio greta 7-hidroksikumarinu indukuojamo hcdABC operono, analizė

Genomo sritis, maždaug 3 kb ilgio ir esanti *hcdABC* operono 5' gale, turinti *hcdD*, *hcdE*, *hcdF* ir *hcdG* genus, buvo padauginta PGR ir klonuota į pACYCDuet-1 ekspresijos vektorių. Rekombinantiniai HcdD, HcdE, HcdF ir HcdG baltymai buvo susintetinti *E. coli* BL21 ląstelėse, o genų raišką buvo patvirtinta NDS-PAGE metodu. Sveikos *E. coli* BL21 ląstelės, transformuotos pHP4-10 plazmide, buvo naudojamos konvertuojant kumariną, 6-hidroksikumariną, 6-metilkumariną, 7-hidroksikumariną, 7-metilkumariną, 7-metoksikumariną, 4-metil-7-hidroksikumariną ir 6,7-dihidroksikumariną. Laiko eigos eksperimentai parodė, kad laikui bėgant sumažėjo šių substratų UV absorbcijos maksimumai. Baigus biokonversijas, UV absorbcijos maksimumas ties 260–280 nm bangos ilgiais, buvo neišnykęs ir panašus į 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties UV sugerties spektrą. Tai rodo, kad *E. coli* BL21 ląstelės, transformuotos pHP4-10 plazmide, gali katalizuoti kumarino darinių laktono dalies redukciją ir (arba) hidrolizę. Palyginus aktyvumo rodiklius, 7-hidroksikumarino konversija buvo greičiausia, o visų metil ir metoksi pakeistų kumarinų – mažiausia. Be to, jokio aktyvumo nepastebėta su 3-hidroksikumarinu, 4-hidroksikumarinu, 7-etoksikumarinu, *o*-kumaro ir 2,4-dihidroksicinamono rūgštimis, 7-hidroksichinolino-(1*H*)-2-onu, 3,4-dihidrochinoliną-(1*H*)-2-onu, 2-hidroksichinolinu arba 3,4-dihidro-7-hidroksichinoln-(1*H*)-2-onu, o tai reiškė, kad vienas ar visi kartu tirti hipotetiniai baltymai buvo specifiniai kumarino dariniams, turintiems nepakeistą ir

nehidrolizuota laktono dalį. *E. coli* ląstelės be *hcdD*, *hcdE*, *hcdF* ir *hcdG* genų neparodė jokio aktyvumo aukščiau minėtiems junginiams.

Be to, rekombinantiniai HcdD, HcdE, HcdF ir HcdG baltymai buvo ekspresuojami kartu su HcdA hidroksilaze ir HcdB dioksigenaze *E. coli* BL21 ląstelėse, kurios buvo naudojamos 7-hidroksikumarino biokonversijai. Konversijos produktai buvo analizuojami HPLC-MS metodu. 161 Da (7-hidroksikumarinui) ir 163 Da (7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarinui) jonų ($[M-H]^-$) neaptikta, kas indikavo visišką substrato ir jo redukuotos formos konversiją. Tačiau buvo aptiktos $[M-H]^-$ 181 Da (3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgščiai) ir $[M+H]^+$ 212 Da (6-(2-karboksietil)-4-okso-1-(4-dihidropiridin-2-karboksi rūgščiai) jonų masės, kas parodo, kad substratas buvo redukuotas ir hidrolizuotas iki 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties, kurią toliau oksidavo HcdA ir HcdB fermentai. Tam tikra dalis susidariusios (2*E*,4*E*)-2,4-dihidroksi-6-oksonona-2,4-dieno dirūgšties sureagavo su amonio jonais, esančiais biokonversijos mišinyje, susidarant pikolino rūgšties dariniui (15 pav.). Šie rezultatai buvo palyginti su 7-hidroksikumarino biokonversija *E. coli* ląstelėse, turinčiose tik *hcdD*, *hcdE*, *hcdF* ir *hcdG* genus, kas parodė tik vieno reakcijos produkto su $[M-H]^-$ 181 Da jono masę. Tai leido padaryti išvadą, kad hipotetinius HcdD, HcdE, HcdF ir HcdG baltymus ankstyvosiose 7-hidroksikumarino metabolizmo stadijose gali naudoti *P. mandelii* 7HK4 bakterijos, gamindamos 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštį, kuri vėliau gali būti kaip substratas baltymams, kuriuos koduoja *hcdABC* operonas.

Atlikus *hcdE* ir *hcdG* sekų BLAST analizę paaiškėjo, kad šie genai atitinkamai koduoja tariamą nuo cinko priklausomą alkoholio dehidrogenazę ir nuo NAD(P)H priklausomą FMN reduktazę. Tačiau kiti du HcdD ir HcdF baltymai priklauso mažiau apibūdintoms baltymų grupėms, panašūs atitinkamai į *Bacillus* chorizmato mutazių ir kupinų šeimos baltymus.



15 pav. (a) 7-hidroksikumarino biokonversijos *E. coli* BL21 bakterijose, turinčiose pHP4-10 plazmidę, metabolitų analizė. Metabolitų UV 280 nm pėdsakai, UV ir MS spektrai, kai sulaikymo trukmė 5,183 min. Susidaręs neigiamas jonas $[M-H]^-$ yra m/z 181 (3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties). (b-c) 7-Hidroksikumarino biokonversijos, atliekamos *E. coli* BL21 bakterijose, turinčiose pHP4-10, p4pmPmo ir pTHPPDO plazmidės, mišinio HPLC ir MS chromatogramos. Metabolitų MS spektrai, kai sulaikymo trukmė – 2,821 min (d) ir 5,073 min (e). Susidarę neigiamas jonas $[M-H]^-$ yra m/z 181 (3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties), ir teigiamas jonas $[M+H]^+$ yra m/z 212 (6-(2-(karboksietil)-4-okso-1,4-dihidropiridin-2-karboksi rūgšties).

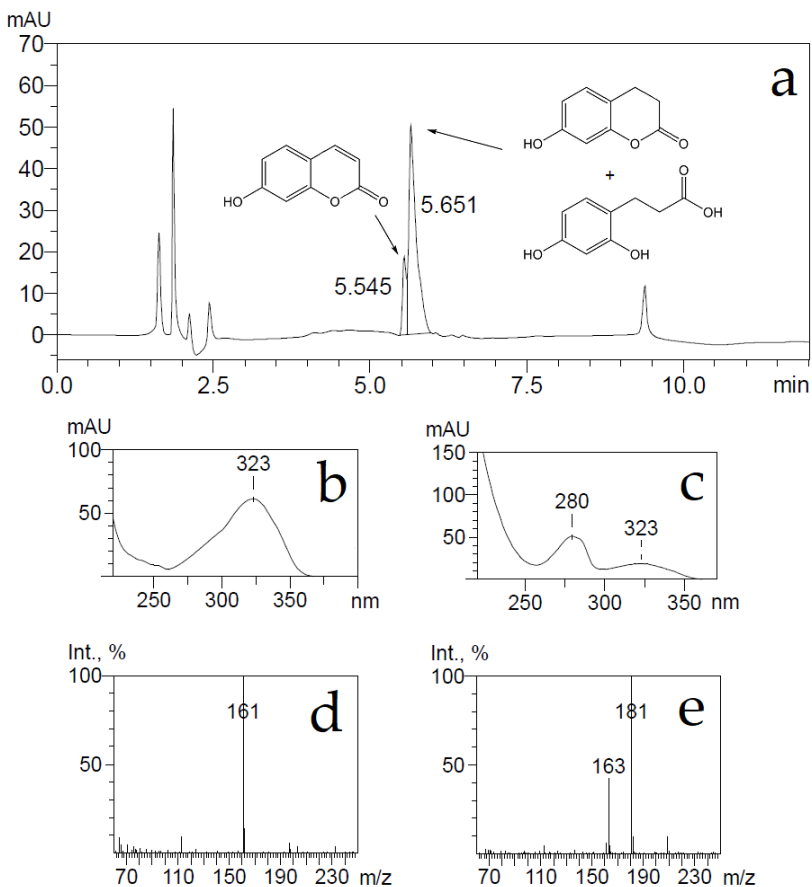
Buvo tikėtasi aptikti genus, koduojančius į hidrolazę panašius fermentus, kuriuos 7HK4 padermė galėtų panaudoti kumarinų hidrolizei. *P. mandelii* 7HK4 ląstelių transkripcijos analizė parodė, kad kaip ir *hcdE*, *hcdD* genas taip pat buvo indukuotas šiose bakterijose, indukuotose su 7-hidroksikumarinu. *HcdD* ir *hcdE* kartu su *hcdF* ir *hcdG* genais yra išsidėstę toje pačioje DNR grandinėje ir yra atskirti trumpais tarpgeniniais regionais, o tai rodo, kad šie genai gali būti organizuoti į operoną. HcdD baltymas yra panašus į *Bacillus* chorizmato (BCM tipo) šeimos baltymus ir atitinka pirmuosius Pfam šeimos atstovus (DUF1185) ⁷¹. Manome, kad šis baltymas galėtų stimuliuoti tariamos HcdE dehidrogenazės veiklą panašiai kaip homologiškas baltymas TgnF, kuris stimuliuoja nuo TgnE priklausomą gintaro rūgšties semialdehido oksidaciją *Acinetobacter baylyi* ADP1 bakterijose ⁷². Toliau, HcdF yra į kupiną panašus baltymas, kurį galima priskirti RmlC tipo kupinų superšeimai. Ją sudaro baltymai, kurių nariai turi įvairias funkcijas, pradedant fermentine veikla, pvz., dioksigenazėmis, hidrolazėmis ir epimerazėmis, ir nefermentinėmis funkcijomis ⁷³⁻⁷⁵. Manome, kad HcdF galėtų veikti kaip kumarinų hidrolazė, tačiau norint nustatyti tikslią jo funkciją *P. mandelii* 7HK4 padermėje, reikia atlikti tolesnius tyrimus. Paskutinis HcdG baltymas iš *hcdDEFG* genų sankaupos priklauso nuo NAD(P)H priklausomos FMN reduktazės superšeimai. Flavodoksinai plačiai dalyvauja elektronų pernešimo reakcijose ⁷⁶⁻⁷⁸.

7-Hidroksikumarino biokonversijos produkto išskyrimas ir identifikavimas

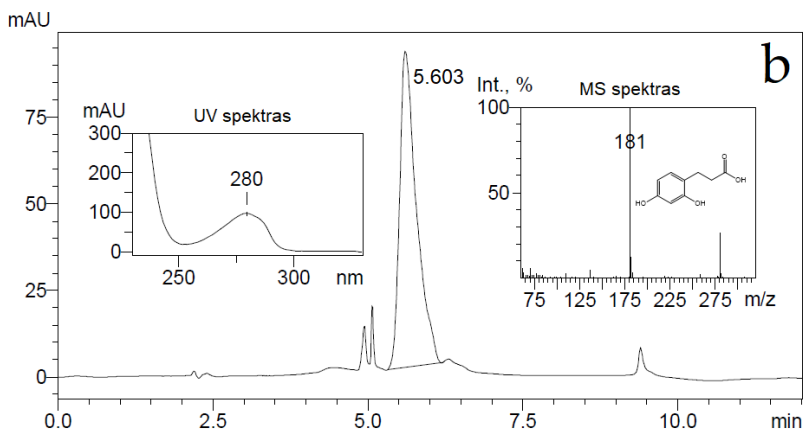
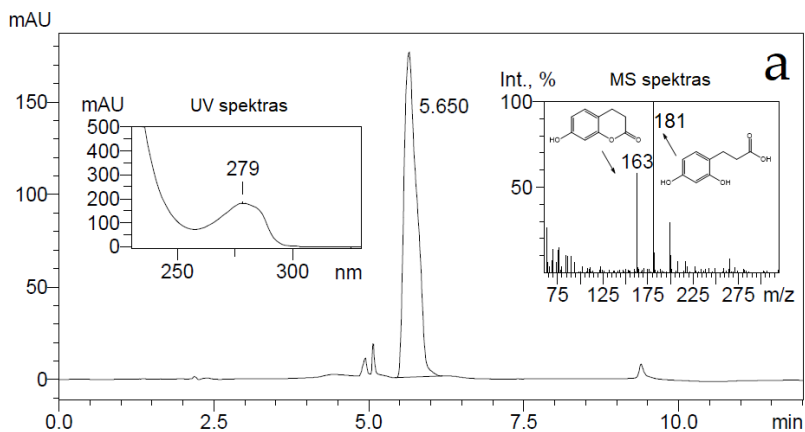
Anksčiau buvo parodyta, kad *Pseudomonas* sp. 30-1 ir *Aspergillus niger* ATCC 11394 mikroorganizmai naudoja hipotetines cinką rišančias ir nuo NADH priklausomas oksidoreduktazes kumarino redukcijai iki dihidrokumarino ^{10,14}. Todėl nusprendėme detaliau paanalizuoti HcdE baltymą, kuris labiausiai panašus į alkoholio dehidrogenazes.

E. coli BL21 ląstelės, turinčios pHP7 plazmidę, buvo naudojamos 7-hidroksikumarinui konvertuoti, kaip aprašyta metoduose. Substrato sunaudojimas buvo tikrinamas UV-VIS absorbcijos matavimais ir HPLC-MS. UV absorbcijos maksimumas pasikeitė nuo 340 nm iki 270 nm, taip pat HPLC-MS analizė po konversijos parodė, kad susikaupė reakcijos produktai su $[M-H]^-$ 163 ir 181 Da jonų masėmis, nors dar buvo aptikta ir substrato likučių, kurių jonų $[M-H]^-$ masė yra 161 Da (16 pav.). Aptiktos $[M-H]^-$ 181 ir 161 Da jonų masės reiškė, kad biokonversijos reakcija nebuvo baigta galimai dėl substrato slopinimo, o tariamas reakcijos produktas 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarinas galėjo hidrolizuotis, susidarant 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgščiai.

Konversijos produktas buvo išgrynintas, gaunant tik 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštį, struktūrą nustatius pagal HPLC-MS, 1H ir ^{13}C BMR analizių duomenis. Norint patikrinti, ar konversijos metu galimai susidaręs 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarinas galėjo hidrolizuotis, 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarinas buvo chemiškai susintetintas, kaip aprašyta metodų dalyje, ir ištirtas imituojant biokonversijos sąlygas. Maži kiekiai (iki 2 mM koncentracijos) 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarino arba 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties buvo ištirpinti 50 mM kalio fosfato buferyje (pH 7,2) ir inkubuoti kelias valandas. Vėliau šie junginiai buvo ekstrahuoti iš vandeninio tirpalo dichlormetanu arba etilo acetatu, po to pašalinant tirpiklį ir ištirpinus nuosėdas acetonitrile. Šių mėginių HPLC-MS analizė patvirtino, kad dichlormetano tirpiklis gali ekstrahuoti tik 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumariną, kita vertus, ekstrahavimas etilo acetatu veikia vienodai abiemis analizuojamoms medžiagoms. Išgrynintuose 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarino mėginiuose, po ekstrakcijos etilo acetatu, buvo aptiktos dvi $[M-H]^-$ 163 ir 181 Da jonų masės (17 pav.). Be to, 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarino mėginio eliuacijos laikas chromatogramoje buvo toks pat kaip ir 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties mėginio.



16 pav. 7-Hidroksikumarino biokonversijos *E. coli* BL21 bakterijose, turinčiose indukuotą *hcdE* geną, metabolitų analizė HPLC-MS metodu. UV 280 nm metabolitų pėdsakai (a). Smailių, kurių sulaikymo laikas buvo 5,545 min (b ir d) ir 5,651 min (c ir e), UV ir MS spektrai. Susidariusių neigiamų jonų $[M-H]^-$ m/z yra 181 (3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties), 161 (7-hidroksikumarino) ir 163 (7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarino).



17 pav. 7-Hidroksi-3,4-dihidroksifeni (a) ir 3-(2,4-dihidroksifeni) propano rūgštis (b) HPLC chromatogramos esant 280 nm bangos ilgiui. 2 mM šių junginių inkubuota 50 mM kalio fosfato buferyje (pH 7,2) keletą valandų ir ekstrahuota etilo acetatu. Pateikti atitinkami pagrindinių smailių UV ir MS spektrai. Susidariusių neigiamų jonų $[M-H]^-$ m/z yra 181 (3-(2,4-dihidroksifeni) propano rūgštis) ir 163 (7-hidroksi-3,4-dihidroksifeni).

Ilgesnės nei 24 valandų 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarino inkubacijos vandeniniuose buferiniuose tirpaluose lemia $[M-H]^-$ 163 Da jonų masės išnykimą, atliekant HPLC-MS analizę. Šis eksperimentas patvirtino, kad 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarinas hidrolizuojasi, inkubuojant vandeniniame tirpale bei ekstrahuojant organiniais tirpikliais.

Padaryta išvada, kad 7-hidroksikumariną redukuoja HcdE fermentas, susidarant 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarinui. Tačiau dėl galimo stipraus HcdE fermento slopinimo substratu, konversijos greitis yra pakankamai mažas, ir ilgesnis konversijos laikas gali paveikti reakcijos produktą 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumariną, kuris yra linkęs hidrolizuotis vandeniniuose tirpaluose.

HcdE baltymo apibūdinimas

HcdE geno raiška ir rekombinantinio C gale His₆ žyme žymėto baltymo sintezė buvo atlikta *E. coli* BL21 bakterijose. Tirpus ir bespalvis HcdE baltymas buvo išgrynintas afininės chromatografijos metodu ir analizuotas NDS-PAGE, fermentas migravo kaip ~ 40 kDa juosta. Buvo tirtas fermento specifiškumas keliems skirtingiems kofaktoriams. Tačiau HcdE fermentas galėjo naudoti tik NADPH. FAD arba FMN pridėjimas prie reakcijos mišinių neparodė nei NADH, nei NADPH oksidacijos greičio pokyčių. Nustatyta, kad optimalios HcdE aktyvumo reakcijos sąlygos yra mažos joninės jėgos fosfato-citrato buferis, kurio pH 7,0 kambario temperatūroje.

HcdE fermento aktyvumas buvo tiriamas panaudojant NADPH kofaktorių su įvairiais kumarino substratais. Didžiausias fermentinis aktyvumas buvo užfiksuotas, esant 7-hidroksikumarinui. Kai substratais buvo naudojami atitinkamai 6,7-dihidroksikumarinas, 6-hidroksikumarinas, 6-metilkumarinas ir kumarinas, užfiksuoti 1,6, 2, 3,4 ir 17 kartų mažesni reakcijų greičiai. HcdE fermentas nebuvo aktyvus su 7-metilkumarinu, 7-metoksikumarinu, 7-etoksikumarinu, 4-metil-7-hidroksikumarinu, 3-hidroksikumarinu, 4-hidroksikumarinu, *trans*-cinamono, *trans*-2,4-dihidroksicinamono, *o*-kumaro,

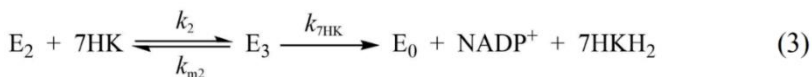
m-kumaro, *p*-kumaro ir kavos rūgštimis, cinamilo alkoholiu, 7-hidroksichinolin-(1*H*)-2-onu, 3,4-dihidrochinolin-(1*H*)-2-onu, 2-hidroksichinolinu, 3,4-dihidro-7-hidroksichinolin-(1*H*)-2-onu ir indolu. HcdE fermento aktyvumas *in vitro* nežymiai skirėsi nuo rezultatų, kuriuos parodė sveikos *E. coli* BL21 ląstelės, turinčios pHP7 plazmidę. Pastarosios ląstelės parodė tam tikrą aktyvumą su 7-metilkumarinu, 7-metoksikumarinu ir net 4-metil-7-hidroksikumarinu. Tai reiškė, kad šie substratai pasižymi stipriomis fermentą slopinančiomis savybėmis, kurias galima apeiti *E. coli* BL21 ląstelėse, ribojant substrato pernešimą per ląstelės membraną, taip išlaikant mažą substrato koncentraciją ląstelės viduje.

Norint nustatyti HcdE fermento kinetines savybes, buvo išmatuoti pradiniai HcdE baltymo aktyvumo greičiai, kintant NADPH ir 7-hidroksikumarino koncentracijoms. Kinetinių parametrų įvertinimas buvo atliktas reakcijos greičių duomenis pritaikius prie Michaelio-Menten bimolekulinės reakcijos greičio išraiškos (1 lygtis):

$$v = \frac{[E_0]k_{bim}k_{NADPH}[NADPH][7HK]}{k_{NADPH}[NADPH] + k_{bim}[7HK](K_M^{NADPH} + [NADPH] + K_i[NADPH][7HK])} \quad (1)$$

kur [NADPH] yra NADPH koncentracija; [7HK] yra 7-hidroksikumarino koncentracija; v yra stebimas greitis; k_{bim} yra 7-hidroksikumarino redukcijos bimolekulinė greičio konstanta, išreikšta k_{7HK}/K_M^{7HK} (kur $K_M^{7HK} = (k_{m2} + k_{7HK})/k_2$); k_{NADPH} yra NADPH oksidacijos greičio konstanta; K_M^{NADPH} yra NADPH K_M esant prisotintai 7-hidroksikumarino koncentracijai (kur $K_M^{NADPH} = (k_{m1} + k_{NADPH})/k_1$); ir K_i yra 7-hidroksikumarino slopinimo konstanta. Siūloma reakcijos schema atspindi 7-hidroksikumarino redukcijos ir NADPH oksidacijos poveikį (18 pav.).

Redukcinė reakcijos dalis buvo modeliuojama, kaip parodyta 2 lygtyje, kur E_0 yra oksiduoto hcdE fermento forma, E_1 yra hcdE_{ox}-NADPH krūvio perdavimo kompleksas, o E_2 yra redukuota hcdE fermento forma, rišanti NADP⁺.

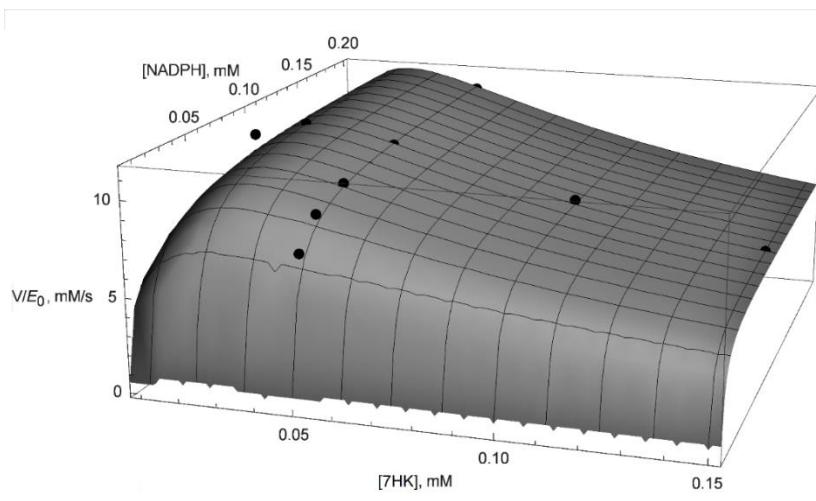


18 pav. Siūloma HcdE reakcijos schema

Oksidacinė reakcijos dalis buvo modeliuojama, kaip parodyta 3 lygtyje, kur 7HK yra 7-hidroksikumarinas, E_3 yra hcdE_{red}-7HK krūvio perdavimo kompleksas, rišantis NADP^+ , o 7HKH_2 yra 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarinas.

Taip pat buvo įrodyta, kad 7-hidroksikumarinas veikia kaip stiprus hcdE fermento inhibitorius, esant didesnėms substrato koncentracijoms (19 pav.). Remiantis bimolekulinės reakcijos greičio lygtimi (1 lygtis), siūlome, kad slopinimas vyksta, kai 7-hidroksikumarinas prisijungia prie hcdE_{ox}-NADPH krūvio perdavimo komplekso (E_1), o ne oksiduoto HcdE fermento formos (E_0) (4 lygtis). Todėl 7-hidroksikumarinas labiau yra pseudokonkurentinis slopiklis, kuriam būdinga slopinimo konstanta K_i (išreikšta k_d/k_a), ir lygi 22 mM 7-hidroksikumarino. Nustatyta 7-hidroksikumarino redukcijos HcdE k_{bim} reikšmė yra lygi $1490 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Be to, nustatyta NADPH oksidacijos greičio konstanta (k_{cat}) yra lygi 27 s^{-1} , o K_M^{NADPH} yra 20 μM .

Iki šiol paskelbti vos keli darbai kumarinų redukcijos mikroorganizmuose tema. Tačiau nebuvo publikuoti nei genetiniai duomenys, nei atitinkamų fermentų veikimo mechanizmai. Šiame tyrime mes aprašėme HcdE baltymą, kurio sintezė indukuojama *P. mandelii* 7HK4 bakterijose, kai pastarosios yra auginamos su 7-hidroksikumarinu kaip vieninteliu anglies ir energijos šaltiniu.



19 pav. HcdE fermento kinetinio titravimo 3D diagrama. Fermentinio aktyvumo tyrimai buvo atlikti 50 mM kalio fosfato buferyje (pH 7,0) su 5–200 μM NADPH ir 5–150 μM 7-hidroksikumarino koncentracijomis 22 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. HcdE koncentracija buvo pastovi 99 nM. Bimolekulinės reakcijos greitis buvo stebimas prie 365 nm bangos ilgio. Juodos sferos rodo trijų pradinio reakcijos greičio pakartojimų vidutines vertes. Diagramos paviršius atspindi pritaikytą funkciją.

Ir šis fermentas katalizuoja nuo NADPH priklausomą kelių kumarino darinių redukciją. Panašu, kad HcdE yra labai specifiškas kumarino dariniams, turintiems nepakeistų ir nehidrolizuotų laktono žiedo fragmentų, todėl kiti struktūriškai panašūs substratai, tokie kaip chinolin-2-(1H)-onas arba 7-hidroksichinolin-2-(1H)-onas, nėra redukuojami HcdE fermentu.

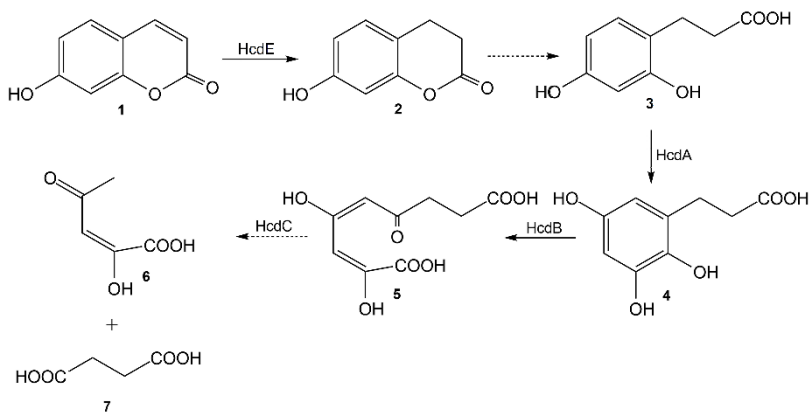
HcdE dehidrogenazė, mūsų žiniomis, yra pirmoji MDR šeimos ene-reduktazė, susijusi su kumarino junginių skaidymu *in vivo*. Žinomas tik vienas funkciškai susijęs fermentas, pvz., XenA reduktazė iš *Pseudomonas putida* 86³³. XenA reduktazė turi gerai aprašytas pirmines ir antrines struktūras, tačiau ji priklauso kitai ER

šeimai – OYE, katalizuojančiai nuo FMN ir NAD(P)H priklausomas kumarino ir 8-hidroksikumarino redukcijos reakcijas. Nustatyta 7-hidroksikumarino redukcijos su HcdE dehidrogenaze k_{bim} reikšmė yra lygi $1490 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. O nustatyta 27 s^{-1} NADPH oksidacijos greičio konstanta (k_{cat}) yra beveik 10 kartų mažesnė, lyginant su 215 s^{-1} greičio konstanta, kai NADPH yra oksiduojamas su XenA reduktaze iš *Pseudomonas putida* 86. NADPH oksidacijos greičių skirtumas tarp dviejų funkciškai panašių hcdE ir XenA reduktazių galėjo atsirasti dėl stebimo konkurencinio HcdE fermento slopinimo jo substratu, tuo tarpu XenA reduktazė nėra slopinama substratu.

Remiantis HPLC-MS ir BMR analizėmis, taip pat lyginant su chemiškai susintetintais junginiais, nustatėme, kad HcdE redukuoja 7-hidroksikumariną iki 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarino. Tačiau dėl stipraus HcdE fermento slopinimo substratu, konversijos greitis yra per mažas, kad ilgesnė konversijos trukmė paveiktų reakcijos produktą 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumariną. Pastarasis junginys yra ciklinis laktono esteris, kuris yra daug reaktyvesnis nei jo acikliniai analogai. Be to, jis turi prijungtą fenilo žiedą ir tai, kad jis yra fenolio esteris, 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarinas yra žymiai reaktyvesnis su hidroksilo anijonais, dėl kurių mūsų analizuojamas reakcijos produktas hidrolizuojasi, susidarant 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgščiai.

Apibendrinant, šiame darbe pateikiame 7-hidroksikumarino katabolizmo kelią *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijose (20 pav.). Buvo išskirti ir nustatyti nauji metabolitai ir genai, atsakingi už 7-hidroksikumarino skaidymą. Mūsų rezultatai rodo, kad 7-hidroksikumarino skaidymas *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijose sudaro atskirą metabolizmo kelią, lyginant su anksčiau aprašytais kumarino katabolizmo keliais *Pseudomonas*, *Arthrobacter* ir *Aspergillus* mikroorganizmuose⁹⁻¹⁵. Buvo išskirtas ir identifikuotas naujas už 7-hidroksikumarino redukciją atsakingas genas. Nustatėme, kad 7-hidroksikumarino redukcija *P. mandelii* 7HK4 bakterijose

vyksta pagal panašų metodą, kaip ir anksčiau apibūdintuose kumarino katabolizmo keliuose *Pseudomonas* sp. 30-1 ar *Aspergillus niger* ATCC 11394 10,14. Tačiau 7HK4 bakterijos naudoja unikalų, nuo NADPH priklausomą alkoholio dehidrogenazės šeimos baltymą HcdE 7-hidroksikumarino laktono žiedo C-3/C-4 dvigubo ryšio redukcijai, susidarant 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarinui. Šiame darbe aprašyta HcdE dehidrogenazė turi mažai giminingą pirminę seką su anksčiau apibūdintu fermentu, susijusio su struktūriškai panašaus substrato 8-hidroksikumarino skaidymu *P. putida* 86 bakterijose.



20 pav. 7-Hidroksikumarino metabolizmas *Pseudomonas* sp. 7HK4 ląstelės. 1 – 7-hidroksikumarinas; 2 – 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarinas; 3 – 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštis; 4 – 3-(2,3,5-trihidroksifenil) propano rūgštis; 5 – (2E,4E)-2,4-dihidroksi-6-oksonona-2,4-dieno dirūgštis; 6 – (E)-2-hidroksi-4-oksopent-2-enoinė rūgštis; 7 – gintaro rūgštis; HcdA – 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties 1-monooksigenazė; HcdB – 3-(2,3,5-trihidroksifenil) propano rūgšties 1,2-dioksigenazė; HcdC – tariama (2E,4E)-2,4-dihidroksi-6-oksonona-2,4-dieno dirūgšties hidrolazė; HcdE – 7-hidroksikumarino reduktazė. Brūkšninė rodyklė nurodo hipotetinę reakciją.

Be to, buvo įrodyta, kad *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijos naudoja unikalią flaviną surišančią *ipso*-hidroksilazę 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgšties aromatinio žiedo oksidacijai. Nei vienas iš šiame tyrime aprašytų baltymų neturi aukštos sekų homologijos su anksčiau apibūdintais fermentais, susijusiais su struktūriškai panašių substratų, tokių kaip 3-(2-hidroksifenil) propano rūgšties skaidymu *Rhodococcus* sp. V49 bakterijose ⁴⁸, 3-(3-hidroksifenil) propano ir 3-hidroksicinamono rūgščių skaidyme *E. coli* K-12 ⁴⁹, *Comamonas testosteroni* TA441 ⁵⁰ ir *R. globerulus* PWD1 bakterijose ⁵¹, ar net 4-hidroksifenilacetato skaidyme *E. coli* W bakterijose ⁷⁹. Mūsų rezultatai suteikia iš esmės naują supratimą apie hidroksikumarinų skaidymo kelius dirvožemio mikroorganizmuose. Be to, atrastos naujos bakterijos ir fermentai gali būti toliau naudojami, kuriant naujus pramonei naudingus biokatalizinius procesus.

IŠVADOS

1. *Pseudomonas mandelii* 7HK4 bakterijų *hcd* genų sancaupa koduoja 7-hidroksikumarinui skaidyti reikalingus fermentus.
2. Nuo NADPH priklausoma alkoholio dehidrogenazė HcdE redukuoja 7-hidroksikumariną iki 7-hidroksi-3,4-dihidroksikumarino.
3. *Ips*-monooksigenazė HcdA oksiduoja 3-(2,4-dihidroksifenil) propano rūgštį iki 3-(2,3,5-trihidroksifenil) propano rūgšties.
4. HcdB ekstradiolinė dioksigenazė oksiduoja 3-(2,3,5-trihidroksifenil) propano rūgštį į (2*E*,4*E*)-2,4-dihidroksi-6-oksonona-2,4-dieno dirūgštį.
5. Tariama hidroksimukono semialdehido hidrolazė HcdC hidrolizuoja (2*E*,4*E*)-2,4-dihidroksi-6-oksonona-2,4-dieno dirūgštį.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Publikacijos

Krikštaponis A, Meškys R. Biodegradation of 7-Hydroxycoumarin in *Pseudomonas mandelii* 7HK4 via ipso-Hydroxylation of 3-(2,4-Dihydroxyphenyl)-propionic Acid. *Molecules* **2018**, 23(10), 2613.

Krikštaponis A, Urbelis G, Meškys R. The First Step of Biodegradation of 7-Hydroxycoumarin in *Pseudomonas mandelii* 7HK4 Depends on an Alcohol Dehydrogenase-Type Enzyme. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22(4), 1552.

Stendiniai pranešimai konferencijose

Krikštaponis A, Meškys R. Biodegradation of 7-hydroxycoumarin in *Pseudomonas mandelii* 7HK4. The 15th International Conference of Lithuanian Biochemical Society. 26-29 June, 2018 in Dubingiai, Lithuania.

PADĖKA

Pirmiausia noriu padėkoti savo vadovui Prof. dr. Rolandui Meškiui už stiprų pasitikėjimą ir galimybę atlikti šį darbą, už vertingus patarimus, motyvaciją ir palaikymą mano doktorantūros studijų metu.

Esu labai dėkingas dr. Daivai Tauraitei ir dr. Gintarui Urbeliui už sintezuotus junginių etalonus, dr. Ritai Bukšnaitienei už BMR analizes, dr. Rasai Rutkienei už baltymo chromatografinę analizę, dr. Audriui Laurynėnui už fermento kinetinius modelius.

Taip pat esu dėkingas visam kolektyvui iš Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus. Ypatingai noriu padėkoti kolegoms dr. Jonitai Stankevičiūtei, dr. Renatai Gasparavičiūtei, Justui Vaitekūnui, dr. Vytautui Petkevičiui, dr. Daivai Tauraitei, Ritai Meškienei už vertingus patarimus, pamokymus ir sąžiningą kritiką.

Dėkoju Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus laborantėms Virginijai Dzekevičienei ir Nijolei Uždavinienei.

Esu dėkingas savo šeimai ir draugams už palaikymą.

SUMMARY

Coumarins are well known secondary metabolites widely found in various plants. However, a degradation of those compounds in the environment is not studied in detail. A soil isolate *Pseudomonas mandelii* 7HK4 is able to degrade 7-hydroxycoumarin (umbelliferone), but the enzymes catalyzing its transformations have not been characterized. To elucidate the pathway of catabolism of 7-hydroxycoumarin, 7-hydroxycoumarin-inducible genes *hcdA*, *hcdB*, *hcdC*, *hcdD*, *hcdE*, *hcdF*, and *hcdG* have been identified by an RT-qPCR analysis and protein MS-MS analysis. The DNA fragment encoding a putative alcohol dehydrogenase HcdE has been cloned, and the recombinant protein catalyses the NADPH-dependent reduction of 7-hydroxycoumarin both *in vivo* and *in vitro*. The reaction product has been isolated and characterized as 7-hydroxy-3,4-dihydrocoumarin, which proceeded through hydrolysis in aqueous solution resulting in formation of 3-(2,4-dihydroxyphenyl) propionic acid based on HPLC-MS and NMR analyses. Further, bioinformatic analysis has shown that the *hcdABC* genes encodes a flavin-binding hydroxylase (HcdA), an extradiol dioxygenase (HcdB), and a putative hydroxymuconic semialdehyde hydrolase (HcdC). The analysis of the recombinant HcdA activity *in vitro* has confirmed that this enzyme belongs to the group of *ipso*-hydroxylases. The activity of the proteins HcdB and HcdC has been analysed by using recombinant *E. coli* cells. Identification of intermediate metabolites allowed us to confirm the predicted enzyme functions and to describe the downstream catabolic pathway of 7-hydroxycoumarin via 3-(2,4-dihydroxyphenyl) propionic acid pathway. HcdA catalyses the conversion of 3-(2,4-dihydroxyphenyl) propionic acid to 3-(2,3,5-trihydroxyphenyl) propionic acid through an *ipso*-hydroxylation followed by an internal (1,2-C,C)-shift of the alkyl moiety. Then, in the presence of HcdB, a subsequent oxidative *meta*-cleavage of the aromatic ring occurs, resulting in the corresponding linear product (2*E*,4*E*)-2,4-dihydroxy-

6-oxonona-2,4-dienedioic acid. Here, we have described a *Pseudomonas mandelii* strain 7HK4 capable of degrading 7-hydroxycoumarin via 3-(2,4-dihydroxyphenyl) propionic acid pathway.

GYVENIMO APRAŠYMAS

Vardas ir Pavardė: Arūnas Krikštaponis
Gimimo data ir vieta: 1990-07-21, Vilnius, Lietuva
Darbo adresas: Biochemijos institutas,
Gamtos mokslų centras,
Vilniaus universitetas
Saulėtekio al. 7,
LT-10223 Vilnius, Lietuva

Telefonas: +370 616 17187
El. paštas: a.krikstaponis@gmail.com

Išsilavinimas:

2016-2020	Doktorantūra, Biochemija, Vilniaus universitetas, Lietuva
2013-2015	Magistras, Biochemija, Vilniaus universitetas, Lietuva
2009-2013	Bakalauras, Biochemija, Vilniaus universitetas, Lietuva

Darbo patirtis:

2019-dabar	Grupės vadovas, Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva
2015-2019	Biotechnologas, Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva
2014-2015	Jaunesnysis biotechnologas, Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva

Mokslinių tyrimų kryptis: Taikomoji mikrobiologija ir
biotechnologija, prokariotų
biochemija

Mokslinės publikacijos:

1. Krikštaponis A, Meškys R. Biodegradation of 7-Hydroxycoumarin in *Pseudomonas mandelii* 7HK4 via ipso-Hydroxylation of 3-(2,4-Dihydroxyphenyl)-propionic Acid. *Molecules* 2018, 23(10), 2613.
2. Krikštaponis A, Urbelis G, Meškys R. The First Step of Biodegradation of 7-Hydroxycoumarin in *Pseudomonas mandelii* 7HK4 Depends on an Alcohol Dehydrogenase-Type Enzyme. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(4), 1552.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- (1) Sarker SD, Nahar L. Progress in the Chemistry of Naturally Occurring Coumarins. 2017, pp 241–304.
- (2) Bourgaud F, Hehn A, Larbat R, Doerper S, Gontier E, Kellner S, Matern U. Biosynthesis of Coumarins in Plants: A Major Pathway Still to Be Unravelling for Cytochrome P450 Enzymes. *Phytochemistry Reviews*, 2006, pp 293–308.
- (3) Murray RDH, Méndez J, Brown SA. The natural coumarins: occurrence, chemistry, and biochemistry. Chichester, New York, Wiley, 1982.
- (4) Mazid, Ta K, Mohammad F. Role of Secondary Metabolites in Defense Mechanisms of Plants. 2011, Vol. 3.
- (5) Kayser O, Kolodziej H. Antibacterial Activity of Simple Coumarins: Structural Requirements for Biological Activity. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 1999, 54(3–4), pp 169–174.
- (6) de Souza SM, Delle Monache F, Smâ A. Antibacterial Activity of Coumarins. 2005, Vol. 60.
- (7) Yang L, Ding W, Xu Y, Wu D, Li S, Chen J, Guo B. New Insights into the Antibacterial Activity of Hydroxycoumarins against *Ralstonia Solanacearum*. *Molecules*, 2016, 21(4).
- (8) Serghini K, Pérez de Luque A, Castejón-Muñoz M, García-Torres L, Jorrín JV. Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) Response to Broomrape (*Orobanche Cernua* Loefl.) Parasitism: Induced Synthesis and Excretion of 7-Hydroxylated Simple Coumarins. *Journal of experimental botany*, 2001, 52(364).
- (9) Shieh HS, Blackwood AC. Use of Coumarin by Soil Fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 1969, 15, pp 647–648.
- (10) Nakayama Y, Nonomura S, Tatsumi C. The Metabolism of Coumarin by a Strain of *Pseudomonas*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1973, 37(6), pp 1423–1437.

- (11) Levy CC, Weinstein GD. The Metabolism of Coumarin by a Microorganism. II. The Reduction of *o*-Coumaric Acid to Melilotic Acid. *Biochemistry*, 1964, 3(12), pp 1944–1947.
- (12) Bellis DM. Metabolism of Coumarin and Related Compounds in Cultures of *Penicillium* Species. *Nature*, 1958, 182(4638), pp 806–807.
- (13) Bocks SM. Fungal Metabolism-I. The Transformations of Coumarin, *o*-Coumaric Acid and *Trans*-Cinnamic Acid by *Aspergillus Niger*. *Phytochemistry*, 1967, 6(1), pp 127–130.
- (14) Aguirre-Pranzoni C, Orden AA, Bisogno FR, Ardanaz CE, Tonn CE, Kurina-Sanz M. Coumarin Metabolic Routes in *Aspergillus* Spp. *Fungal Biology*, 2011, 115(3), pp 245–252.
- (15) Marumoto S, Miyazawa M. Microbial Reduction of Coumarin, Psoralen, and Xanthyletin by *Glomerella Cingulata*. *Tetrahedron*, 2011, 67(2), pp 495–500.
- (16) Levy CC, Frost P. The metabolism of coumarin by a microorganism. Melilotate hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 1966, 241, pp 997–1003.
- (17) Krikštaponis A. *Pseudomonas* sp. 7HK4 bakterijose 7-Hidroksikumarino metabolizme dalyvaujančių monooksigenazių tyrimas. Vilniaus universitetas, Vilnius, 2015.
- (18) Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. Practical Protocols for Production of Very High Yields of Recombinant Proteins Using *Escherichia Coli*. *Protein Science*, 2009, 18 (5), pp 936–948.
- (19) Langley WD, Adams R. Condensation of Certain Nitriles and Various Poly-Hydroxyphenols to Form Phenolic Acids. *Journal of the American Chemical Society*, 1922, 44 (10), pp 2320–2330.
- (20) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of biological chemistry*, 1951, 193 (1), pp 265–275.

- (21) Müller R, Lingens F. Oxidative Ring-Cleavage of Catechol in Meta-Position by Superoxide. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 1989, 44 (3–4), pp 207–211.
- (22) Riegert U, Heiss G, Fischer P, Stolz A. Distal Cleavage of 3-Chlorocatechol by an Extradiol Dioxygenase to 3-Chloro-2-Hydroxymuconic Semialdehyde. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(11), pp 2849–2853.
- (23) Serra S, Castagna A, Valentino M. Biocatalytic Synthesis of Natural Dihydrocoumarin by Microbial Reduction of Coumarin. *Catalysts*, 2019, 9 (8), pp 665.
- (24) Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.
- (25) Sharma RC, Schimke RT. Preparation of Electro-Competent *E. Coli* Using Salt-Free Growth Medium. *BioTechniques*, 1996, 20 (1), pp 42–44.
- (26) Gorelenkov V, Antipov A, Lejnine S, Daraselina N, Yuryev A. Set of Novel Tools for PCR Primer Design. *BioTechniques*, 2001, 31 (6), pp 1326–1330.
- (27) Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22), pp 4673–4680.
- (28) Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular biology and evolution*, 2011, 28 (10), pp 2731–2739.
- (29) Saitou N, Nei M. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4 (4), pp 406–425.

- (30) Zuckerkandl E, Pauling L. Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. In *Evolving Genes and Proteins*. Elsevier, 1965, pp 97–166.
- (31) Krikštaponis A. Kumarinus skaidančių bakterijų tyrimas. Vilniaus universitetas, Vilnius, 2013.
- (32) Stuermer R, Hauer B, Hall M, Faber K. Asymmetric Bioreduction of Activated C=C Bonds Using Enoate Reductases from the Old Yellow Enzyme Family. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2007, pp 203–213.
- (33) Griese JJ, Jakob RP, Schwarzingler S, Dobbek H, Jakob R, Biochemie L. Xenobiotic Reductase A in the Degradation of Quinoline by *Pseudomonas Putida* 86: Physiological Function, Structure and Mechanism of 8-Hydroxycoumarin Reduction. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 361, pp 140–152.
- (34) Krikštaponis A, Meškys R. Biodegradation of 7-Hydroxycoumarin in *Pseudomonas Mandelii* 7HK4 via Ipso-Hydroxylation of 3-(2,4-Dihydroxyphenyl)-Propionic Acid. *Molecules*, 2018, 23 (10).
- (35) Roper DI, Cooper RA. Purification, Nucleotide Sequence and Some Properties of a Bifunctional Isomerase/Decarboxylase from the Homoprotocatechuate Degradative Pathway of *Escherichia Coli* C. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 217 (2), pp 575–580.
- (36) Diaz E, Timmis KN. Identification of Functional Residues in a 2-Hydroxymuconic Semialdehyde Hydrolase. A New Member of the α/β Hydrolase-Fold Family of Enzymes Which Cleaves Carbon-Carbon Bonds. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (11), pp 6403–6411.
- (37) Lim JC, Lee J, Jang JD, Lim JY, Min KR, Kim CK, Kim Y. Characterization of the PcbE Gene Encoding 2-Hydroxypenta-2,4-Dienoate Hydratase in *Pseudomonas* Sp. DJ-12. *Archives of pharmacal research*, 2000, 23 (2), pp 187–195.

- (38) Chaiyen P. Flavoenzymes Catalyzing Oxidative Aromatic Ring-Cleavage Reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, pp 62–70.
- (39) Crozier-Reabe K, Moran GR. Form Follows Function: Structural and Catalytic Variation in the Class a Flavoprotein Monooxygenases. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, pp 15601–15639.
- (40) Lle M, Moonen JH, Fraaije MW, Rietjens IMCM, Laane C, van Berkel WJH. Flavoenzyme-Catalyzed Oxygenations and Oxidations of Phenolic Compounds. *Advanced synthesis and catalysis*, 2002, 344 (10), pp 1023–1035.
- (41) Romero E, Gómez Castellanos JR, Gadda G, Fraaije MW, Mattevi A. Same Substrate, Many Reactions: Oxygen Activation in Flavoenzymes. *Chemical Reviews*. American Chemical Society, 2018, pp 1742–1769.
- (42) Abu-Omar MM, Loaiza A, Hontzeas N. Reaction Mechanisms of Mononuclear Non-Heme Iron Oxygenases. *Chemical Reviews*, 2005, pp 2227–2252.
- (43) Cho HJ, Kim K, Sohn SY, Cho HY, Kim KJ, Kim MH, Kim D, Kim E, Kang BS. Substrate Binding Mechanism of a Type I Extradriol Dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285 (45), pp 34643–34652.
- (44) van Berkel WJH, Kamerbeek NM, Fraaije MW. Flavoprotein Monooxygenases, a Diverse Class of Oxidative Biocatalysts. *Journal of Biotechnology*, 2006, pp 670–689.
- (45) MacHeroux P, Kappes B, Ealick SE. Flavogenomics - A Genomic and Structural View of Flavin-Dependent Proteins. *FEBS Journal*, 2011, pp 2625–2634.
- (46) Nakamura S, Nakamura T, Ogura Y. Absorption Spectrum of Flavin Mononucleotide Semiquinone. *Journal of Biochemistry*, 1963, 53, pp 143–146.
- (47) Cornish-Bowden A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Wiley-Blackwell, 2012.

- (48) Powell JAC, Archer JAC. Molecular Characterisation of a *Rhodococcus Ohp* Operon. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 74(1-3), pp 175–188.
- (49) Diaz E, Ferrandez A, Prieto MA, Garcia JL. Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia Coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65 (4), pp 523–569.
- (50) Arai H, Yamamoto T, Ohishi T, Shimizu T, Nakata T, Kudo T. Genetic Organization and Characteristics of the 3-(3-Hydroxyphenyl) Propionic Acid Degradation Pathway of *Comamonas Testosteroni* TA441. *Microbiology*, 1999, 145 (Pt 10), pp 2813-2820.
- (51) Barnes MR, Duetz WA, Williams PA. A 3-(3-Hydroxyphenyl) Propionic Acid Catabolic Pathway in *Rhodococcus Globerulus* PWD1: Cloning and Characterization of the Hpp Operon. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(19), pp 6145-6153.
- (52) Muller F, Voordouw G, Berkel WJH, Steennis PJ, Visser S, Rooijen PJ. A Study of P-Hydroxybenzoate Hydroxylase from *Pseudomonas Fluorescens*. Improved Purification, Relative Molecular Mass, and Amino Acid Composition. *European Journal of Biochemistry*, 1979, 101 (1), pp 235–244.
- (53) Happe B, Eltis LD, Poth H, Hedderich R, Timmisi KN. Characterization of 2,2',3-Trihydroxybiphenyl Dioxygenase, an Extradial Dioxygenase from the Dibenzofuran-and Dibenzo-p-Dioxin-Degrading Bacterium *Sphingomonas* Sp. Strain RW1. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(22), pp 7313-7320.
- (54) Vaillancourt FH, Haro MA, Drouin NM, Karim Z, Maaroufi H, Eltis LD. Characterization of Extradial Dioxygenases from a Polychlorinated Biphenyl-Degrading Strain That Possess Higher Specificities for Chlorinated Metabolites. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (4), pp 1253–1260.
- (55) Burlingame R, Chapman PJ. Catabolism of Phenylpropionic Acid and Its 3-Hydroxy Derivative by *Escherichia Coli*. *Journal of Bacteriology*, 1983, 155(1), pp 113–121.

- (56) Bayly RC, Dagley S, Gibson DT. The Metabolism of Cresols by Species of *Pseudomonas*. The Biochemical journal, 1966, 101 (2), pp 293–301.
- (57) Duggleby CJ, Williams RA. Purification and Some Properties of the 2-Hydroxy-6-Oxohepta-2,4-Dienoate Hydrolase (2-Hydroxymuconic Semialdehyde Hydrolase) Encoded by the TOL Plasmid PWW0 from *Pseudomonus Putida* Mt-2. Microbiology society, 1986, Vol. 132.
- (58) Riegert U, Heiss G, Fischer P, Stolz A. Distal Cleavage of 3-Chlorocatechol by an Extradiol Dioxygenase to 3-Chloro-2-Hydroxymuconic Semialdehyde. Journal of Bacteriology, 1998, 180(11), pp 2849–2853.
- (59) Wieser M, Eberspacher J, Vogler B, Lingens F. Metabolism of 4-Chlorophenol by *Azotobacter* Sp. GPI: Structure of Cleavage Product of 4-Chlorocatechol the Meta. FEMS Microbiology Letters, 1994, 116(1), pp 73-78.
- (60) Spence EL, Kawamukai M, Sanvoisin J, Braven H, Bugg TDH. Catechol Dioxygenases from *Escherichia Coli* (MhpB) and *Alcaligenes Eutrophus* (MpcI): Sequence Analysis and Biochemical Properties of a Third Family of Extradiol Dioxygenases. Journal of Bacteriology, 1996, 178(17), pp 5249-5256.
- (61) Ricken B, Kolvenbach BA, Corvini PF. Ipso-Substitution-the Hidden Gate to Xenobiotic Degradation Pathways. Current Opinion in Biotechnology, 2015, pp 220–227.
- (62) Kolvenbach BA, Corvini PF. The Degradation of Alkylphenols by *Sphingomonas* Sp. Strain TTNP3 - a Review on Seven Years of Research. New Biotechnology, 2012, pp 88–95.
- (63) Martin G, Dijols S, Capeillere-Blandin C, Artaud I. Hydroxylation Reaction Catalyzed by the *Burkholderia Cepacia* AC1100 Bacterial Strain. Involvement of the Chlorophenol-4-Monooxygenase. European Journal of Biochemistry, 1999, 261 (2), pp 533–539.

- (64) Gabriel FLP, Heidlberger A, Rentsch D, Giger W, Guenther K, Kohler HPE. A Novel Metabolic Pathway for Degradation of 4-Nonylphenol Environmental Contaminants by *Sphingomonas Xenophaga Bayram*: Ipso-Hydroxylation and Intramolecular Rearrangement. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 (16), pp 15526–15533.
- (65) Locher HH, Leisinger T, Cook AM. 4-Sulphobenzoate 3,4-Dioxygenase. Purification and Properties of a Desulphonative Two-Component Enzyme System from *Comamonas Testosteroni* T-2. *Biochemical Journal*, 1991, 274 (3), pp 833–842.
- (66) Bunz P, Cook AM. Dibenzofuran 4,4a-Dioxygenase from *Sphingomonas* Sp. Strain RW1: Angular Dioxygenation by a Three-Component Enzyme System. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175 (20), pp 6467–6475.
- (67) Vatsis KP, Coon MJ. Ipso-Substitution by Cytochrome P450 with Conversion of p-Hydroxybenzene Derivatives to Hydroquinone: Evidence for Hydroperoxo-Iron as the Active Oxygen Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 397 (1), pp 119–129.
- (68) Zhao Z, Koeplinger KA, Peterson T, Conradi RA, Burton PS, Suarato A, Heinrikson RL, Tomasselli AG. Mechanism, Structure-Activity Studies, and Potential Applications of Glutathione S-Transferase-Catalyzed Cleavage of Sulfonamides. *Drug Metabolism and Disposition*, 1999, 27 (9).
- (69) Corvini PFX, Meesters RJW, Schäffer A, Schröder HF, Vinken R, Hollender J. Degradation of a Nonylphenol Single Isomer by *Sphingomonas* Sp. Strain TTNP3 Leads to a Hydroxylation-Induced Migration Product. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (11), pp 6897–6900.
- (70) Sala-Trepat JM, Murray K, Williams PA. The Metabolic Divergence in the Meta Cleavage of Catechols by *Pseudomonas*

Putida NCIB 100 15 Physiological Significance and Evolutionary Implications, 1972, Vol. 28.

- (71) Bakolitsa C, Kumar A, Jin KK, McMullan D, Krishna SS, Miller MD, Abdubek P, Acosta C, Astakhova T, Axelrod HL, Burra P, Carlton D, Chen C, Chiu HJ, Clayton T, Das D, Deller MC, Duan L, Elias Y, Ellrott K, Ernst D, Farr CL, Feuerhelm J, Grant JC, Grzechnik A, Grzechnik SK, Han GW, Jaroszewski L, Johnson HA, Klock HE, Knuth MW, Kozbial P, Marciano D, Morse AT, Murphy KD, Nigoghossian E, Nopaku A, Okach L, Paulsen J, Puckett C, Reyes R, Rife CL, Sefcovic N, Tien HJ, Trame CB, Trout C, van den Bedem H, Weekes D, White A, Xu Q, Hodgson KO, Wooley J, Elsliger MA, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Wilson IA. Structures of the First Representatives of Pfam Family PF06684 (DUF1185) Reveal a Novel Variant of the Bacillus Chorismate Mutase Fold and Suggest a Role in Amino-Acid Metabolism. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2010, 66 (10), pp 1182–1189.
- (72) Perchat N, Saaidi PL, Darii E, Pellé C, Petit JL, Besnard-Gonnet M, de Berardinis V, Dupont M, Gimbernat A, Salanoubat M, Fischer C, Perret A. Elucidation of the Trigonelline Degradation Pathway Reveals Previously Undescribed Enzymes and Metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115 (19), pp E4358–E4367.
- (73) Dunwell JM, Culham A, Carter CE, Sosa-Aguirre CR, Goodenough PW. Evolution of Functional Diversity in the Cupin Superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, pp 740–746.
- (74) Agarwal G, Rajavel M, Gopal B, Srinivasan N. Structure-Based Phylogeny as a Diagnostic for Functional Characterization of Proteins with a Cupin Fold. *PLoS One*, 2009, 4(5), pp 5736.

- (75) Dunwell JM, Purvis A, Khuri S. Cupins: The Most Functionally Diverse Protein Superfamily? *Phytochemistry*, 2004, 65 (1), pp 7–17.
- (76) Agarwal R, Bonanno JB, Burley SK, Swaminathan S. Structure Determination of an FMN Reductase from *Pseudomonas Aeruginosa* PA01 Using Sulfur Anomalous Signal. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2006, 62 (4), pp 383–391.
- (77) Liger D, Graille M, Zhou CZ, Leulliot N, Quevillon-Cheruel S, Blondeau K, Janin J, van Tilbeurgh H. Crystal Structure and Functional Characterization of Yeast YLR011wp, an Enzyme with NAD(P)H-FMN and Ferric Iron Reductase Activities. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (33), pp 34890–34897.
- (78) Sancho J. Flavodoxins: Sequence, Folding, Binding, Function and Beyond. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, pp 855–864.
- (79) Mari M, Prieto MA, Di'az E, Di'az D, Garcí'a JL, Garcí'a G. Molecular Characterization of the 4-Hydroxyphenylacetate Catabolic Pathway of *Escherichia Coli* W: Engineering a Mobile Aromatic Degradative Cluster. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(1), 111-120.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p.: info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 11 egz.