



VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
DOVYDĖ ŽULPAITĖ

Mikrobiologijos studijų programa

Bakalauro baigiamasis darbas

## **TdsD nitroreduktazės mechanizmo tyrimai**

Darbo vadovas:

Dr. Benjaminas Valiauga

Vilnius, 2023

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	3
ĮVADAS .....	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	6
1.1. Nitroaromatiniai junginiai ir chinonai.....	6
1.1.1. Gamtoje aptinkami nitroaromatiniai junginiai.....	6
1.1.2. Sintetiniai nitroaromatiniai junginiai.....	7
1.2. Nitroreduktazės.....	9
1.2.1. Bakterinės A grupės deguoniui nejautrios nitroreduktazės.....	9
1.2.2. Bakterinės B grupės deguoniui nejautrios nitroreduktazės.....	13
1.3. Nitroaromatinių junginių panaudojimas į genus nukreiptoje fermentinėje provaistų terapijoje ( <i>angl. GDEPT</i> ).....	16
1.4. TdsD šeimos NAD(P)H-flavino oksidoreduktazės.....	17
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	19
2.1. Fermentai ir reagentai.....	19
2.2. Metodai.....	19
3. REZULTATAI.....	21
3.1. Nitroaromatinių junginių ir chinonų stacionarios redukcijos TdsD tyrimas.....	21
3.2. Reakcijos slopinimo NADP <sup>+</sup> , dikumarolu ir Cibakrono mėliu tyrimas.....	25
3.3. Dvielektroninė nitroaromatinių junginių ir chinonų redukcija TdsD.....	29
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	32
IŠVADOS.....	35
SANTRAUKA.....	36
SUMMARY.....	37
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	38
PADEKA.....	43

## SANTRUMPOS

**ArNO<sub>2</sub>** – nitroaromatinis junginys

**FAD** - flavino adenino dinukleotidas

**FMN** - flavino mononukleotidas

**NR** – nitroreduktazė

$k_{cat}$  – katalitinė konstanta

$k_{cat}/K_m$  – specifškumo (bimolekulinė reakcijos greičio) konstanta

$K_i$  – inhibicijos konstanta

$K_m$  – Michaelio konstanta

**NADH** - redukuotas nikotinamidadenindinukleotidas

**NADPH** - fosforilintas redukuotas nikotinamidadenindinukleotidas

**Frp** - *Vibrio harveyi* NADPH:flavino oksidoreduktazė

**NfsA** – *Escherichia coli* nitroreduktazė A

**NfsB** – *Escherichia coli* nitroreduktazė B

**NHE** - standartinis vandenilio elektrodas

**NMNH** – nikotinamido mononukleotidas

**NQO1** - NAD(P)H:chinonoksidoreduktazė

## IVADAS

Nitroaromatiniai junginiai ( $\text{ArNO}_2$ ) yra vieni iš didžiausių ir svarbiausių naudojamų industrinių chemikalų grupių. Jų naudojimas yra plačiai paplitęs pramonėje, farmacijoje (priešmikrobiniai ir antiparazitiniai agentai), žemės ūkyje (pesticidai) bei karyboje (sprogmenys). Šie junginiai yra organinės molekulės, kurios turi bent vieną nitro ( $-\text{N}+(\text{=O})\text{O}-$ ) grupę, prijungtą prie aromatinio arba heterociklinio žiedo. Svarbiausia  $\text{ArNO}_2$  savybė yra jų nitro grupių oksidacijos-redukcijos reakcijos, kurias vykdo fiziologiniai substratai. Vieni iš jų yra flavininiai fermentai, kurie aktyviajame centre turi flavino adenino dinukleotidą (FAD) arba flavino mononukleotidą (FMN). Būtent šios reakcijos ir nulemia toksinį arba terapinį nitroaromatinių junginių poveikį bei jų biodegradaciją.

$\text{ArNO}_2$  redukuoja FMN turinčios bakterinės nitroreduktazės (NR, I (2e- redukcija) ir II tipo (1e- redukcija)). Jos yra skirstomos į du tipus – deguoniui nejautrias nitroreduktazes (I tipas) ir deguoniui jautrias nitroreduktazes (II tipas). Deguoniui nejautrios nitroreduktazės naudoja NADH arba NADPH kaip redukuojančius substratus. Deguoniui nejautrios arba I tipo nitroreduktazės katalizuoja nuo NADPH priklausomą nitroaromatinių junginių dvielektroninę redukciją, susidarant nitrozo, hidroksilamino ir amino dariniams.

Bakterinės deguoniui nejautrios FMN turinčios nitroreduktazės ir jų katalizuojama  $\text{ArNO}_2$  redukcija paskutiniu metu susilaukė susidomėjimo dėl potencialaus jų panaudojimo aplinkos teršalų biodegradacijos bei GDEPT (*gene-directed enzyme prodrug therapy*) vėžio gydymo sistemoje. Tam tikslui ieškamos tinkamos nitroreduktazės, kurios galėtų vykdyti efektyvią provaisto, pavyzdžiui, CB1954, redukciją į jo aktyvią formą. Nenuostabu, kad paskutiniu metu itin padaugėjo tyrimų, kuriuose ieškoma bakterinių nitroreduktazių iš neatrastų šaltinių. Dėl to ir šio darbo tikslas yra ištirti nežinomos TdsD grupės nitroreduktazės oksidacijos-redukcijos savybes ir jos katalizuojamos įvairių substratų reakcijos mechanizmą.

*Darbo tikslas:*

Charakterizuoti menkai ištirtos TdsD nitroreduktazės katalizuojamos nitroaromatinių ir chinoninių junginių redukcijos mechanizmus.

*Darbo uždaviniai:*

1. Detalizuoti TdsD katalizuojamos nitroaromatinių ir chinoninių junginių redukcijos mechanizmą.
2. Nustatyti TdsD kiekybinius struktūros-aktyvumo ryšius nitroaromatinių ir chinoninių junginių redukcijoje, palyginti juos su *E. coli* NfsA specifiskumu.
3. Įvertinti TdsD slopiklių NADP<sup>+</sup> ir dikumarolo įtaką reakcijai.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

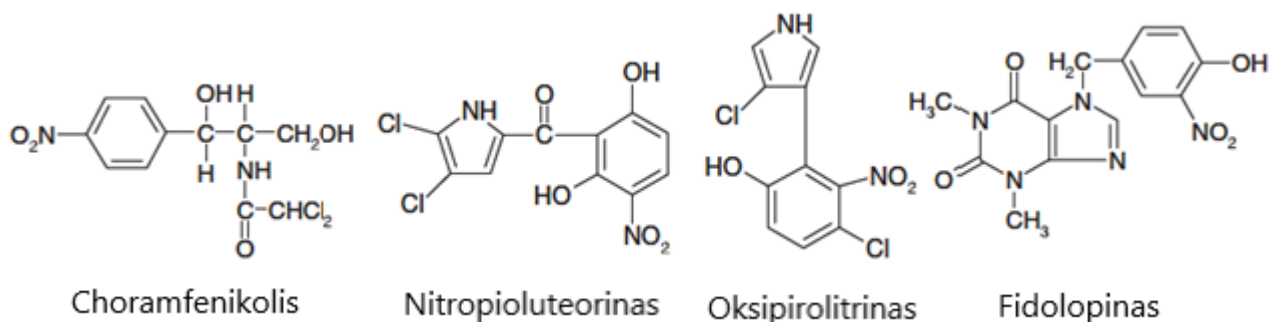
## 1.1. Nitroaromatiniai junginiai

### 1.1.1. Gamtoje aptinkami nitroaromatiniai junginiai

Nors dauguma nitroaromatinių junginių nėra sutinkami gamtoje, tačiau jų yra aptinkamų ir kaip bakterijų, grybų ar augalų metabolizmo šalutiniai produktai (Winkler ir Hertweck, 2007). Pavyzdžiui, *Streptomyces* genties nariai gamina daug įvairių antibiotikų, įskaitant tuos, kurių sudėtyje yra nitroaromatinė grupė. Geriausiai žinomas nitroaromatinis antibiotikas yra chloramfenikolis (2,2-dichlor-N-(1,3-dihidroksi-1-(4-nitrofenil))propan-2-il)acetamidas), kurį gamina *Streptomyces venezuelae* (1 pav.). Kiti antibiotikai turintys nitro grupę ir aptinkami šios genties bakterijose yra: aureotinas (*S. thioluteus*), neo-aureotinas (*S. spectabilis*), nitroimidazolas azomicinas (*S. eurocidicus*) (Ju ir Parales, 2010).

Kai kurios *Pseudomonas* ir *Burkholderia* rūšies bakterijos sintetina plataus profilio antibiotikus pirolnitriną ir pioluteoriną. Šie antibiotikai pasižymi priešgrybeliniu poveikiu (De Souza ir Raaijmakers, 2003). Tuo tarpu įvairūs pirolomicinai yra sintetinami aktinomicetos *Actinosporangium vitaminophilum*. Šie junginiai išsiskiria ne tik savo fungicidiniu aktyvumu, bet jie naikina ir kai kurias gramneigiamas ir gramteigiamas bakterijas (Ezaki ir kiti, 1981, 1983).

Tiesa, nitroaromatinių junginių metabolitų aptinkama ne tik bakterijose – nitro grupę turintį ksantiną fidolopiną sintetina į koralus panašūs samangyviai *Phidolopora pacifica* (1 pav.). Būtent šis junginys atsakingas už gynybą prieš parazitinius grybelius ir dumblius (Garcia ir kiti, 2018).



**1 pav.** Gamtoje aptinkamų nitroaromatinių junginių formulės.

Taip pat kai kurie *Astragalus* genties augalai taip pat sintetina nitroglikozidus kaip gynybos mechanizmą, kuriais apsinuodija daug galvijų kiekvienais metais (Anderson ir kiti, 1993).

### 1.1.2. Sintetiniai nitroaromatiniai junginiai

Dėl unikalių nitro grupės cheminių savybių keletas nitroaromatinių junginių yra naudojami didelės energijos sprogmensyze (2 pav.). Šioje oksidacijos būsenoje (+III) azoto atomas lengvai priima elektronus ir taip leidžia nitroareno sprogmensims veikti kaip savaiminiais oksidatoriais. Pikrino rūgštis (1,3,5-trinitrofenolis) pirmą kartą buvo susintetinta 1771 m., ir vėliau naudojama dažų, kitų sprogstamųjų medžiagų, vaistų gamyboje (Ju ir Parales, 2010). Tačiau dėl pikrino rūgšties korozijos, jos reaktyvumo su metalais, smūgiams jautrių druskų susidarymo, ir nepilno detonavimo jos naudojimas buvo ribotas.

Priešingai nei pikrino rūgštis, 2,4,6-trinitrotoluenas (TNT) yra chemiškai stabilus ir nejautrus smūgiams. Nors TNT buvo plačiai gaminamas nuosekliai nitrinant tolueną ir buvo plačiai naudojamas per abu pasaulinius karus, Šiaurės Amerikoje jis nebėra gaminamas dėl aplinkos užterštumo ir patvarumo gamybos vietose problemų. TNT yra toksiškas, ilgalaikis TNT poveikis pelėms ir žiurkėms sukėlė anemiją, kepenų pažeidimus, sumažėjusią eritrocitų koncentraciją, splenomegaliją ir vėžį (Dilley ir kiti, 1982; Wyman ir kiti, 1992; Levine ir kiti, 1984, 1990).

Iš vėliau susintetintų TNT analogų galima išskirti kelis: tetrilas (2,4,6-trinitrofenil-*N*-metilnitraminas) ir pentrilas (2,4,6-trinitrofenil-*N*-nitraminoetilnitratas), 1,3,6,8-tetranitrokarbazolas (TNC), 4,6-diamino-5,7-dinitrobenzofuroksanas (CL-14), 5-nitro-1,2,4-triazol-3-onas (NTO), 5-nitro-1,2,4-triazol-3-aminas (ANTA) ir 4,5,6,7-tetranitrobezimidazol-2-onas (TNBO) (Čėnas ir kiti, 2009).



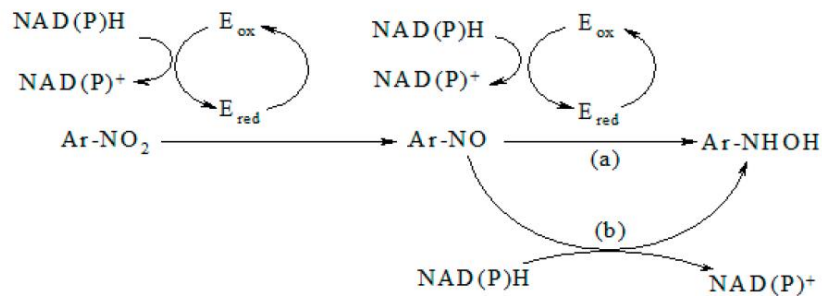
## 1.2. Nitroreduktazės

Bakterinės nitroreduktazės yra skirstomos į deguoniui nejautrius (I tipo) ir deguoniui jautrius (II tipo) fermentus, kurie  $\text{ArNO}_2$  atitinkamai redukuoja dvi- ir vienelektroniniu būdu. Viennelektroninė  $\text{ArNO}_2$  redukcija vyksta susidarant jų nitroanijono radikalams. Šie fermentai pirmiausiai buvo aptikti *E. coli* (Peterson ir kiti, 1979) ir keliose *Clostridium* rūšyse (Angermaier ir Simon, 1983), tačiau nėra gerai biochemiškai charakterizuoti. I tipo arba deguoniui nejautrios nitroreduktazės katalizuoja nuo NAD(P)H priklausomą  $\text{ArNO}_2$  dvielektroninę redukciją. Jos metu susidaro nitrozo, hidroksilamino ir amino dariniai (Peterson ir kiti, 1979). Šios nitroreduktazės yra charakterizuotos gerokai labiau nei II tipo arba deguoniui jautrūs fermentai. Pagal *E. coli* nitroreduktazių amino rūgščių sekas, jų homologai kitose bakterijose yra skirstomi į A, B ir C grupes, iš kurių C grupės nitroreduktazės yra itin menkai ištirtos, o jų redukcijos mechanizmai nėra gausiai detalizuoti (Bryant ir kiti, 1981). B grupės nitroreduktazės yra žinomos geriausiai, tačiau paskutiniu metu ir A grupės fermentų mechanizmai taip pat yra vis labiau detalizuojami.

### 1.2.1. Bakterinės A grupės deguoniui nejautrios nitroreduktazės

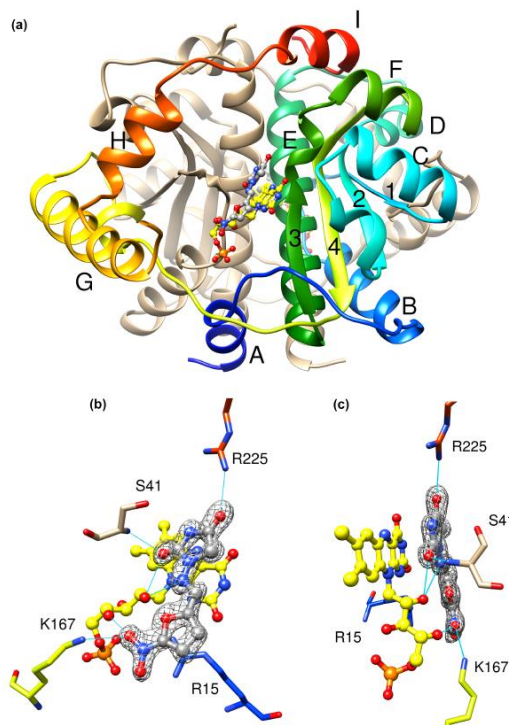
Tarp A grupės nitroreduktazių geriausiai ištirtas narys yra *E. coli* NfsA. NfsA gali redukuoti platų substratų spektrą – pavyzdžiui, flavinus (FAD, FMN ir riboflavina), nitroaromatinis junginius (nitrofurazoną, nitrofurantoiną, nitrobenzenus, 4-nitroaniliną), fericianidą, chinonus, azo dažus, metileno mėlį (Zenno ir kiti, 1996). Šis fermentas taip pat redukuoja ir potencialų priešnavikinį agentą CB1954 į 4-hidroksilaminą, kuris sukelia navikinių ląstelių žūtį „surišdamas“ DNR. NfsA katalizuojama nitrofurazono redukcija vyksta pagal „ping-pong“ mechanizmą, o šioje reakcijoje greitį limituoja oksidacinė pusiaureakcija (Zenno ir kiti, 1996).

Buvo nustatyta, kad NfsA nitroaromatinių junginių redukciją vykdo dviem žingsniais iki hidroksilamino darinio (3 pav.), susiformuojant tarpiniam nitrozo junginiui bei antrajai stadijai vykstant nefermentiškai (Valiauga ir kiti, 2018).



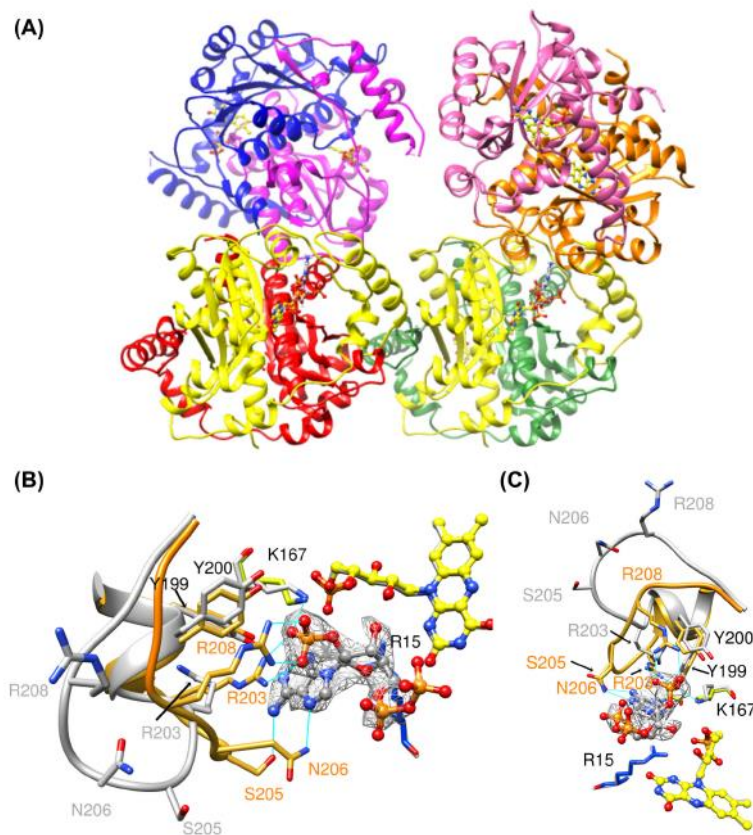
**3 pav.** Ar-NHOH fermentinio (a) ir nefermentinio (b) susidarymo iš Ar-NO keliai.

Neseniai buvo gauti 1.09 Å rezoliucijos rentgenostruktūriniai NfsA duomenys su substratu nitrofurantoinu (Day ir kiti, 2021), kurie atskleidė, kad kiekviename fermento subvienete yra du domenai. Pagrindinis domenas yra sudarytas iš 4 beta juostų, kurios yra apsuptos alfa spiralių, o kitas domenas, kurį sudaro 165-210 baltymo sekoje esančios aminorūgštys turi vieną ilgesnę spiralę G ir vieną trumpesnę H. Šalia kiekvieno subvieneto ilgiausios spiralės E yra ir FMN kofaktoriai. Šie du FMN kofaktoriai yra 27 Å atstumu vienas nuo kito hidrofobinėje kišenėje, apsupti teigiamai įkrautų grupių (Day ir kiti, 2021). Abu FMN kofaktoriai sąveikauja su abiem subvienetais vandenilniais ryšiais ir van der Waalso sąveikomis. Nitrofurantoinas jungiasi statmenai FMN žiedui, o jo imidazolidino žiedas, bet ne redukuojama nitro grupė atsiduria virš centrinio FMN žiedo (3 pav.). Taip pat vandenilinių ryšių tinklas susiformuoja tarp ligando, FMN ribitilo grandinės ir abiejų subvienetų, kuriame dalyvauja Arg15, Lys167 ir Arg225 aminorūgštys iš vieno subvieneto ir Ser41 iš kito subvieneto. Prisijungus aktyviajame centre nitrofurantonui stebimi menki fermento konformaciniai pokyčiai, išskyrus vieną paviršinę kilpą (203-211 aminorūgštys) tarp G ir H spiralių (Day ir kiti, 2021).



**4 pav.** NfsA kristalinė struktūra su nitrofurantoinu. (a) NfsA struktūra esant nitrofurantoinui (b, c) Nitrofurantoino sąveikos su NfsA aktyviuoju centru (Day ir kiti, 2021).

Tuo tarpu 2.1 Å rezoliucijos NfsA rentgenostruktūriniuose duomenyse su NADP<sup>+</sup> (White ir kiti, 2022) matoma, kad šio kofaktoriaus adenosino grupė rišasi sąveikauja stipriai su fermentu, kai nikotinamido pusė yra gana mobili. Abu B ir D subvienetai su NADP<sup>+</sup> persikloja 0.17 Å atstumu vienas nuo kito (5 pav.). Pirofosfatinė grupė su pačiu baltymu nesąveikauja, o adenosinribozės žiedas sudaro tik kelias van der Waalso sąveikas, daugiausiai su Arg15. 2' fosfato grupė ir adenino žiedas sąveikauja tik su keliomis aminorūgštimis iš 202-211 kilpos. 2' fosfatinė grupė taip pat užmezga vandenilinius ryšius su Arg203, Arg208 ir Lys167 aminorūgštimis. Adenino žiedas suformuoja vandenilinius ryšius su Ser205 ir Asn206 molekulėmis, o su Tyr199 ir Arg203 – van der Waalso sąveikas. Aminorūgštys sąveikauja ir tarpusavyje – Tyr199, Ser205 ir Asn206 sudaro vandenilinius ryšius su Arg203, o Tyr200 su Arg208 užmezga van der Waalso sąveiką su NADP<sup>+</sup> 2' fosfatine grupe.



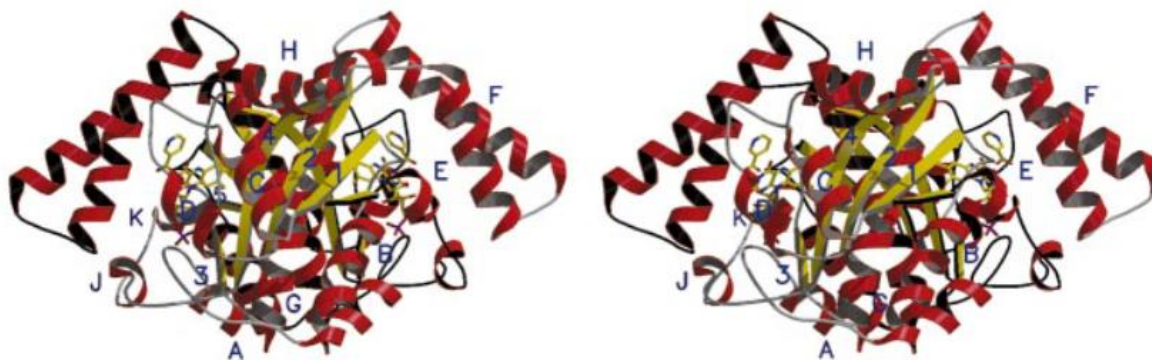
**5 pav.** NfsA struktūra su NADP<sup>+</sup>. (A) Juostos diagrama, rodanti NfsA pagrindą ir subvienetų orientaciją struktūroje, kurioje yra NADP<sup>+</sup>. (B ir C) Dvi NADP<sup>+</sup> struktūros orientacijos, susietos su NfsA, parodytos uždengtos ant struktūros, nesant ligandų (White ir kiti, 2022).

Dar vienas gerai ištirtas A grupės nitroreduktazių atstovas yra bioluminescuojančių bakterijų *Vibrio harveyi* 26 kDa NADPH:flavino oksidoreduktazė (Frp). Dėl to spėjama, kad šių *E. coli* nitroreduktazių šeima yra evoliuciškai gimininga liuminescuojančių bakterijų flavino reduktazių šeimai. Šių baltymų funkcija yra naudojant NADPH kaip kofaktorių katalizuoti flavino redukciją į dihidroflaviną, kuris po to dalyvauja liuciferazės katalizuojamoje liuminescencijoje (Lei ir kiti, 1994). Analogiškai NfsA, šis fermentas redukuoja nitroaromatinius junginius, chinonus ir FMN (Zenno ir kiti, 1996, 1998), tiesa, Frp atveju FMN yra žymiai greičiau redukuojamas nei lyginant su kitais fermentais. NfsA ir Frp struktūrinį ir funkcinį artumą demonstruoja tai, kad NfsA Glu99Gly mutantas FMN redukuoja net 50 kartų greičiau, kai tuo tarpu kiti oksidatoriai redukuojami panašiu greičiu (Zenno ir kiti, 1998). Taip pat yra nustatytas ir Frp oksidacijos redukcijos potencialas,  $E^{\circ}_7 = -0.255$  V (Lei ir kiti, 2005), kuris gali būti kaip atskaitos taškas ir kitiems šios grupės fermentams.

Nustatyta, kad galima šio fermento oksidacijos redukcijos pusiausvyra su  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  pora, t.y., fermentas gali būti reoksiduotas  $\text{NADP}^+$ , tačiau neaišku kokių greičiu (Lei ir kiti, 2005).

### 1.2.2. Bakterinės B grupės deguoniui nejautrios nitroreduktazės

Geriausiai ištirtas bakterinių nitroreduktazių B grupės atstovas yra *Escherichia coli* NfsB. Šis fermentas yra FMN turintis 2 x 24 kDa homodimeras, kurio monomeras yra sudarytas iš 5  $\beta$  juostų, apsuptų  $\alpha$  spiralėmis (6 pav.). NfsB išsiskiria tuo, kad redukcijai gali naudoti tiek NADH, tiek NADPH (Lovering ir kiti, 2001). Fermentas redukuoja nitroaromatinius junginius pagal „ping-pong“ mechanizmą, o maksimalus greitis viršija  $500 \text{ s}^{-1}$  esant pH 7.0 ir  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  (Race ir kiti, 2005). Substrato nitrofurazono redukcijos maksimalus greitis, gautas ekstrapolijuojant prie begalinės NADH koncentracijos, yra lygus  $255 \text{ s}^{-1}$  (Race ir kiti, 2005), kas rodo, kad oksidacinė pusiaureakcija yra limituojanti stadija. Esant fiksuotai NADH koncentracijai, įvairių elektronų akceptorių redukcijos maksimalūs greičiai skiriasi keliasdešimt kartų (Zenno ir kiti, 1996). Nitrobenzeno ir nitrozobenzeno redukcijos *E. coli* NfsB tyrimai parodė, kad pastarasis yra redukuojamas  $2\text{-}3 \times 10^4$  greičiau, nei nitrobenzenas (Race ir kiti, 2005). Todėl ši reakcija turi vykti spontaniškai, o limituojančia stadija turi būti  $\text{ArNO}_2$  redukcija į  $\text{ArNO}$ . NfsB taip pat redukuoja įvairius substratus – fericianidą, 1,4-benzochinoną ir menadioną, nitrofuranus ir flavino darinius (Zenno ir kiti, 1996).



**6 pav.** *Escherichia coli* NfsB erdvinė struktūra (Lovering ir kiti, 2001)

Rentgenostruktūriniais *E. coli* NfsB duomenimis, FMN izoaloksazino žiedas yra lokalizuotas tarpsubvienetiniame domene. Kai prie fermento prisijungia  $\text{NAD(P)H}$ , iš vienos pusės nikotinamido

žiedas sąveikauja su Phe124' iš kito subvieneto, o iš kitos – su izoaloksazino žiedu. Su nikotinamido, ir izoaloksazino žiedais sąveikauja ir aminorūgštis Ser39(40) (Johansson ir kiti, 2003).

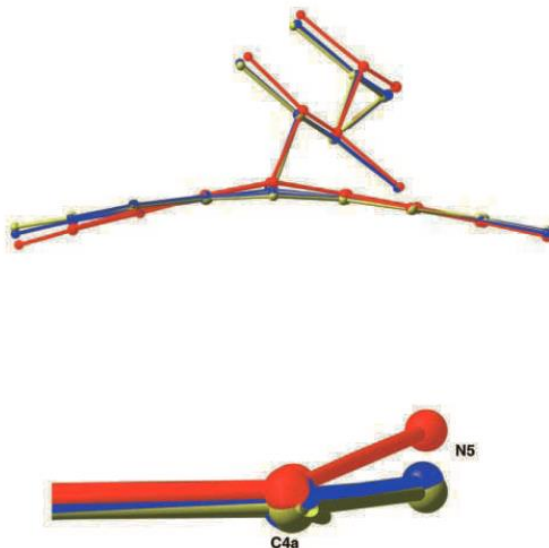
Oksiduojantys substratai FMN izoaloksazino žiedą gali pasiekti dviem kanalais: (A) – Lys14, 74, Ser12 srityje, ir (B) – Phe124, Asn71, Gly166 srityje. CB1954 prisijungimo kompiuterinio modeliavimo tyrimai parodė, kad šis nitroaromatinis junginys priartėja prie FMN per kanalą B, o jo  $\pi$ - $\pi$  sąveika su izoaloksazinu turėtų būti stabilizuojama papildomos sąveikos su kitoje CB1954 pusėje atsiduriančiu Phe124 (Parkinson ir kiti, 2000).

Taip pat buvo pastebėta, kad NfsB Phe124Ser mutante gerokai padidėja riboflavino redukcijos greitis, kai nitro grupės ar chinonų redukcijos greitis beveik nekinta (Zenno ir kiti, 1996). Tai rodo, didelio tūrio substratams Phe124 liekana blokuoja priėjimą prie fermento aktyviojo centro (Parkinson ir kiti, 2000; Race ir kiti, 2005). Universalus nitroreduktazių inhibitorius dikumarolas slopina NfsB kaip konkurentinis slopiklis NADH 10  $\mu$ M (0.01 M Tris-HCl, pH 7.0 (Race ir kiti, 2005) arba ( $K_i = 2 \mu$ M (0.1 M fosfatas, pH 7.0 (Anlezark ir kiti, 1992) ir kaip bekonkurentinis slopiklis nitrofurazonui arba menadionui. Iš to galima padaryti išvadą, jog dikumarolas efektyviau jungiasi prie oksiduotos NfsB formos.

Dar viena gerai ištirta B grupės nitroreduktazė yra 27 kDa molekulinės masės *Enterobacter cloacae* NR. Įdomu, jog šis fermentas gali naudoti kaip elektronų donorą ne tik NADPH ir NADH, bet ir NMNH, nors NMNH yra net 10 kartų mažiau efektyvesnis nei NADH (Koder ir Miller, 1998). Dėl to manoma, kad ši nitroreduktazė tik silpnai sąveikauja su NAD(P)H adenino grupe. Tai patvirtina ir fermento nejautrumas slopinimui ADP-riboze. *E. cloacae* NR taip pat pasižymi ir plačiu substratų spektru, redukuodama flavino darinius, įvairius nitroaromatinis junginius ir chinonus. Taip pat nustatyta, kad fermentas redukuoja TNT į jo dihidroksilamino darinį, o nitroaromatinųjų junginių redukcijos log  $k_{cat}/K_m$  didėja, didėjant jų redukcijos potencialui ( $E^{17}$ ) arba jų laisvųjų radikalų ar hidrido aduktų ( $ArN(OH)O^-$ ) reakcijų susidarymo entalpijoms. Tuo tarpu chinonų, išskyrus 2-hidroksi-1,4-naftochinono darinius, reakingumas yra mažesnis nei nitroaromatinųjų junginių su tomis pačiomis  $E^{17}$  vertėmis (Nivinskas ir kiti, 2001, 2002). Fermento stacionarios reakcijos vyksta pagal „ping-pong“ mechanizmą, o kai kada  $k_{cat}$  prie begalinių NADPH koncentracijų viršija 1000  $s^{-1}$ , t.y., „sustabdytosios srovės“ galimybes (Nivinskas ir kiti, 2001). Esant fiksuotoms NAD(P)H koncentracijoms įvairių elektronų akceptorų atveju  $k_{cat}$  yra skirtingos (Nivinskas ir kiti, 2001). Tai rodo, kad limituojanti stadija yra oksidacinė pusiaureakcija. Tuo tarpu analizuojant fermento

slopinimo mechanizmus, buvo atrasta, kad dikumarolas veikia kaip konkurentinis slopiklis NAD(P)H atžvilgiu ( $K_i = 62 \text{ nM}$ ) (Nivinskas ir kiti, 2001).

Įdomu ir tai, kad yra nustatytas *E. cloacae* nitroreduktazės FMN standartinis oksidacijos redukcijos potencialas pH 7.0 ( $E^{\circ}_7$ ), kuris lygus  $-0.19 \text{ V}$ , o jo semichinoninė forma yra ypatingai nestabili,  $\sim 0.01\%$  pusiausvyroje (Haynes ir kiti, 2002). Rentgenostruktūrinės analizės duomenimis, unikalus šio fermento bruožas yra lenkta per N5-N10 ašį FMN izoaloksazino struktūra, nukrypstanti nuo plokštumos per  $16^\circ$  (Haynes ir kiti, 2002). Redukuotoje būsenoje šis išsilenkimas padidėja iki  $25^\circ$  (7 pav.).



---

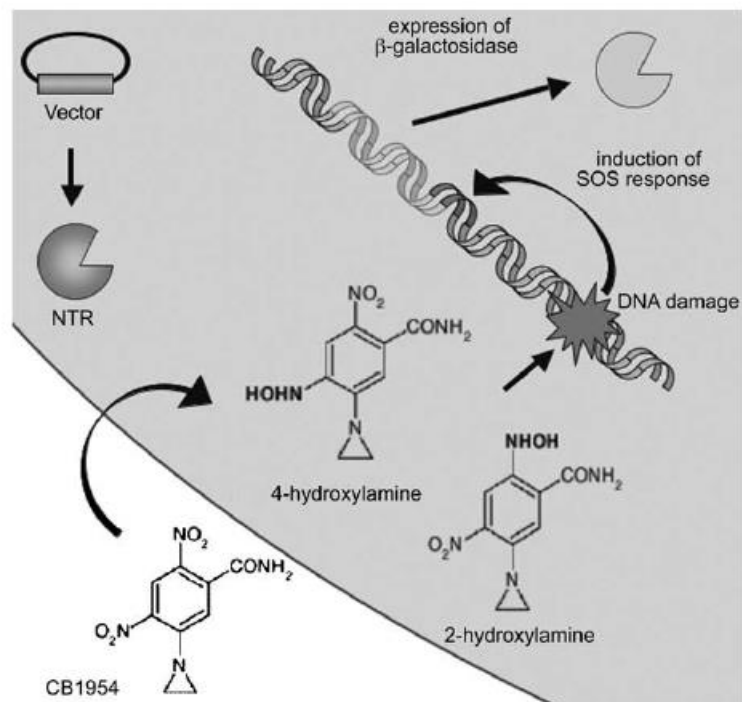
7 pav. *E. cloacae* NR FMN grupės padėtis trijose fermento struktūrose. Raudona spalva žymi redukuotą būseną (Haynes ir kiti, 2002).

---

Manoma, kad ši plokščios konformacijos destabilizacija lemia ypatingai didelį šio fermento semichinono nestabilumą. Būtent tai galimai ir nulemia dvielektroninę nitroaromatinių ir chinoninių junginių redukcija šiuo fermentu, o taip pat galimai ir kitomis nitroreduktazėmis.

### 1.3. Nitroaromatinių junginių panaudojimas į genus nukreiptoje fermentinėje provaistų terapijoje (angl. GDEPT).

*Gene-directed enzyme prodrug therapy* (GDEPT) - į genus nukreipta fermentinė provaistų terapija. Tai vėžio terapijos rūšis, apimanti genetiškai modifikuotų ląstelių naudojimą, siekiant selektyviai aktyvuoti provaistą navikinėse ląstelėse, kad naviko ląstelės mirtų ir būtų išsaugomos normalios ląstelės. GDEPT veikia įvedant į naviko ląsteles arba netoliese esančias normalias ląsteles geną, koduojantį fermentą, pavyzdžiui, bakterinę nitroreduktazę. Fermentas netoksišką provaistą paverčia aktyvia citotoksine medžiaga, kuri naikina naviko ląsteles (8 pav.) (Prosser ir kiti, 2009).



8 pav. CB1954 redukcijos iki genotoksinio 2-hidroksilamino darinio ir jo sukeltos DNR pažaidos schema (Prosser ir kiti, 2009).

Susidomėjimas CB1954 (5-(aziridin-1-il)-2,4-dinitrobenzamidais) kaip galimu GDEPT agentu pakilo po to, kai buvo pastebėta, jog *Escherichia coli* NfsB gali jį redukuoti 100 kartų greičiau nei kitas flavininis fermentas - NAD(P)H:chinono oksidoreduktazė (NQO1 arba DT-diaforazė) (Anlezark ir kiti, 1992). Tokiu atveju būtų galima padidinti vėžio ląstelių jautrumą CB1954, į jas pristačius vektorių su *E. coli nfsB* genu ir po to leidžiant provaistą.

Šis metodas pasiekė ir ikiklinikinius tyrimus (Djeha ir kiti, 2000; Lukashev ir kiti, 2005), tačiau NfsB vis tiek rodė gana žemą efektyvumą kaip CB1954 redukuojantis fermentas. Be to, CB1954 koncentracijos kraujo plazmoje klinikiniuose tyrimuose (Chung-Faye ir kiti, 2001) buvo 100-500 kartų mažesnės nei anksčiau nustatytos NfsB  $K_m$  vertės (Anlezark ir kiti, 1992). Dėl to buvo pradėta ieškoti naujų metodų, kurie galėtų padidinti šios terapijos efektyvumą: buvo sintetini nauji nitroaromatiniai provaistai, kurie turėjo būti geresni substratai NfsB (Anlezark ir kiti, 1995; Hu ir kiti, 2003), buvo vystomi labiau augliams tinkami vektoriai (Johnson ir kiti, 2002; Lemmon ir kiti, 1997) ir vykdomos specifinės fermento mutacijos. Labai aukšta CB1954  $K_m$  su laukinio tipo NfsB reiškia, kad pagerinus kinetinius parametrus gali gerokai būti padidinama ArNO<sub>2</sub> klinikinių tyrimų sėkmė GDEPT terapijoje. NfsB mutantai po mutagenezės rodydavo gerokai didesnę aktyvumą CB1954 ir geresnes kinetines konstantas nei laukinio tipo fermentas ir buvo stebimas 17 kartų didesnis vėžio ląstelių jautrumas CB1954 (Jaberipour ir kiti, 2009). NfsB homologai iš kitų bakterijų taip pat pasižymėdavo didesniu aktyvumu nei *E. coli* fermentas (Emptage ir kiti, 2009; Theys ir kiti, 2006).

Nors NfsB ir buvo pagrindinis taikinyas ArNO<sub>2</sub> GDEPT tyrimams, tačiau buvo pradėta tirti ir kitos fermentų šeimos. *Bacillus amyloliquefaciens* NR YwrO yra viena iš jų, kuri pasižymėjo dideliu efektyvumu CB1954 redukcijoje ir vėžinių ląstelių žūtyje (Theys ir kiti, 2006; Anlezark ir kiti, 2002). *E. coli* chromato reduktazė YieF ir NbzA, NR iš *Pseudomonas pseudoalcaligenes* taip pat buvo išbandomos kaip alternatyva NfsB fermentui (Barak ir kiti, 2006; Berne ir kiti, 2006). Tiesa, paskutiniu metu daugiausiai dėmesio susilaukė *E. coli* NfsA (Vass ir kiti, 2009).

#### 1.4. TdsD šeimos NAD(P)H-flavino oksidoreduktazės

TdsD šeimos nitroreduktazės yra itin mažai ištirti fermentai, kurie ir patraukė susidomėjimą kaip alternatyva GDEPT terapijoje. *Paenibacillus* bakterijose aptikta oksidoreduktazė buvo klonuota į *E. coli* ir nustatyta jos molinė masė – 22 kDa (Ishii ir kiti, 2000). Šis fermentas pasižymėjo menka homologija su kitomis B grupės nitroreduktazėmis – atitinkamai 30 %, 27 % ir 26 % su *E. cloacae* NR, *Salmonella typhimurium* NR ir *E. coli* NfsB. Yra žinoma, kad šiose NR yra išlaikomos dvi aminorūgščių sekos (I ir II regionai) (Zenno ir kiti, 1994), ir pastebėta, kad šis TdsD fermentas taip pat turi homologišką seką I regionui, tačiau neturi II regionui (Ishii ir kiti, 2000). Kitas išsaugotas Gly-X-Gly-X-X-Gly motyvas (Bryant ir kiti, 1991) yra svarbus NAD(P)H rišimėsi prie aktyvaus centro, tačiau šiame TdsD fermente jis taip pat nebuvo išsaugotas. Šios TdsD NR substratų spektras

irgi nebuvo plačiai ištirtas, bet buvo gauta, kad fermentas gali redukuoti dibenzotiofeną ir jo darinius (Ishii ir kiti, 2000).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Fermentai ir reagentai

- Nežinoma TdsD nitroreduktazė buvo išskirta iš Naujosios Zelandijos vulkaninės kilmės dirvožemio mėginių ir klonuota į *E. coli* plazmides, po to auginant kultūras su antibiotiku niklozamidu, kuris yra inaktyvuojamas bakterinių nitroreduktazių. Šis fermentas yra gautas iš Dr. David Ackerley (Viktorijos universitetas, Velingtonas, Naujoji Zelandija). Fermento koncentracija buvo nustatyta spektrofotometriškai pagal  $\epsilon_{460} = 10.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .
- Nitroaromatiniai junginiai 2,4,6-trinitrofenilmetil-*N*-nitraminas (tetrilas), 2,4,6-trinitrotoluenas (TNT) ir 2,4,6-trinitrofenil-*N*-metilaminas (*N*-metilpikramidas) susintetinti dr. Jono Šarlausko (VU Biochemijos institutas); CB1954 buvo susintetinta dr. Vandos Miškinienės (VU Biochemijos institutas); *p*-, *o*-, *m*-dinitrobenzenai, nifuroksimas, nitrofurantoinas, *p*-nitroacetofenonas, *p*-nitrobenzaldehydas, *p*-nitrobenzenkarboksi rūgštis ir nitrobenzenas gauti iš Sigma-Aldrich.
- Chinoniniai junginiai fenantrenchinonas, 2-hidroksinaftochinonas, 2-metilbenzochinonas, 2,6-dimetilbenzochinonas, juglonas, naftazarinas, naftochinonas, benzochinonas, 2,3-dichlor-naftochinonas, 1,8-dihidroksiantrochinonas, antrachinon-2-sulfoksi rūgštis, 3-metil-2-hidroksinaftochinonas, durochinonas, 1,4-dihidroksiantrachinonas gauti iš Sigma-Aldrich.
- NADP<sup>+</sup>, NADPH, dikumarolas, Cibakrono mėlis, gliukozės 6-fosfatas, gliukozės 6-fosfato dehidrogenazė gauti iš Sigma-Aldrich.

### 2.2. Metodai

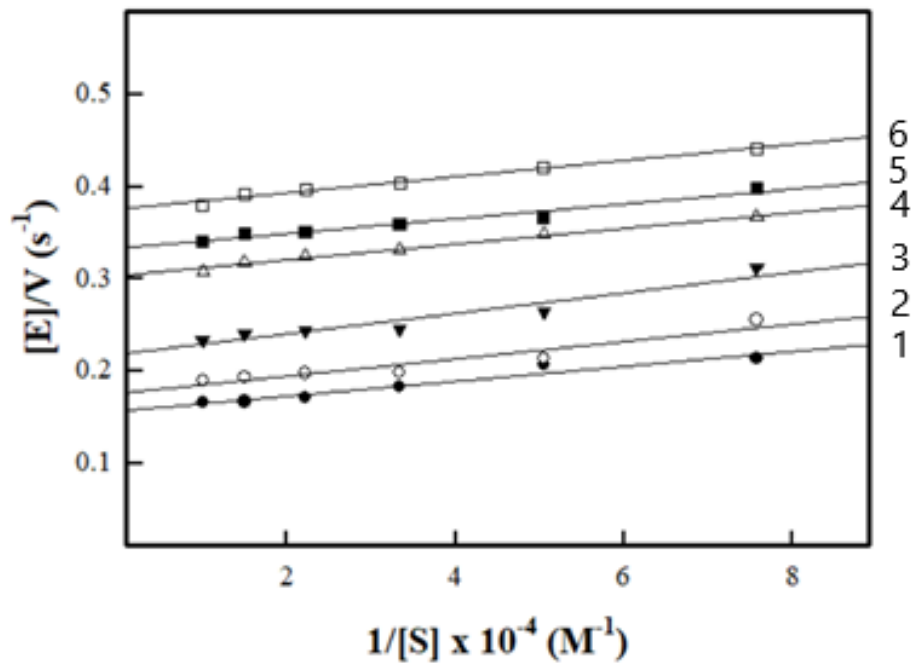
- Nitroaromatinių ir chinoninių junginių redukcija TdsD buvo stebima spektrofotometru Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies) 0.1 M K-fosfato buferiniame tirpale (pH 7.0) 25 °C, esant 1 mM EDTA. Buvo matuojami NADPH (100 μM) oksidaciniai greičiai ( $\Delta\epsilon_{340} = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Kad juos pamatuoti buvo keičiamos nitroaromatinių ir chinoninių junginių koncentracijos (iš viso 6 koncentracijos, kiekviena iš jų mažesnė už buvusiąją 1.5 karto) ir stebima fermentinės reakcijos greičio priklausomybė nuo nitroaromatinių ir chinoninių junginių koncentracijų. Kinetiniai reakcijų parametrai,  $k_{cat}$  ir  $k_{cat}/K_m$ , atitinkantys Lineweaver-Burk grafiko ( $[E]/V$  nuo  $1/[S]$ , kur  $V$  yra reakcijos greitis,  $[E]$  – fermento koncentracija ir  $[S]$  - substrato koncentracija) susikirtimą su  $y$ -ašimi ir atvir-kštinių tiesės pasvirimo kampą, buvo skaičiuoti naudojant Sigmoidplot 11.0 programą.  $k_{cat}$  parodo NADPH molekulių skaičių, oksiduotų fermento aktyvaus centro (FMN) per 1 s.

- Nustatant ar reakcija vyksta nuosekliu ar „ping-pong“ mechanizmu, buvo keičiamos tiek tetrilo ar TNT, tiek NADPH (iš viso 6 koncentracijos, iš kurių kiekviena 1.5 karto mažesnė už pradinę 100  $\mu\text{M}$  NADPH koncentraciją) koncentracijos ir stebima fermentinės reakcijos greičio priklausomybė.
- Nustatant reakcijos produkto  $\text{NADP}^+$ , dikumarolo ar Cibakrono mėlio inhibicijos pobūdį NADPH atžvilgiu, buvo keičiama NADPH koncentracija (mažinant koncentraciją po 1.5 karto) esant pastoviam tetrilo kiekiui (100  $\mu\text{M}$ ) ir didinant dikumarolo (0 - 30  $\mu\text{M}$ ),  $\text{NADP}^+$  (0 – 750  $\mu\text{M}$ ) ar Cibakrono mėlio (0 - 2  $\mu\text{M}$ ) koncentraciją.
- Nustatant reakcijos produkto  $\text{NADP}^+$  ar dikumarolo inhibicijos pobūdį tetrilo atžvilgiu, buvo keičiama tetrilo koncentracija (mažinant koncentraciją po 1.5 karto) esant pastoviam NADPH kiekiui (100  $\mu\text{M}$ ) ir didinant dikumarolo (0 - 30  $\mu\text{M}$ ) ar  $\text{NADP}^+$  (0 – 750  $\mu\text{M}$ ) koncentraciją.
- Tetrilo redukcija TdsD buvo atliekama esant NADPH regeneracijos sistemai (10 mM gliukozės 6-fosfato, ir 2 mg/ml gliukozės 6-fosfato dehidrogenazės), registruojant absorbcijos spektrą 200-700 nm intervale kas 5 min.

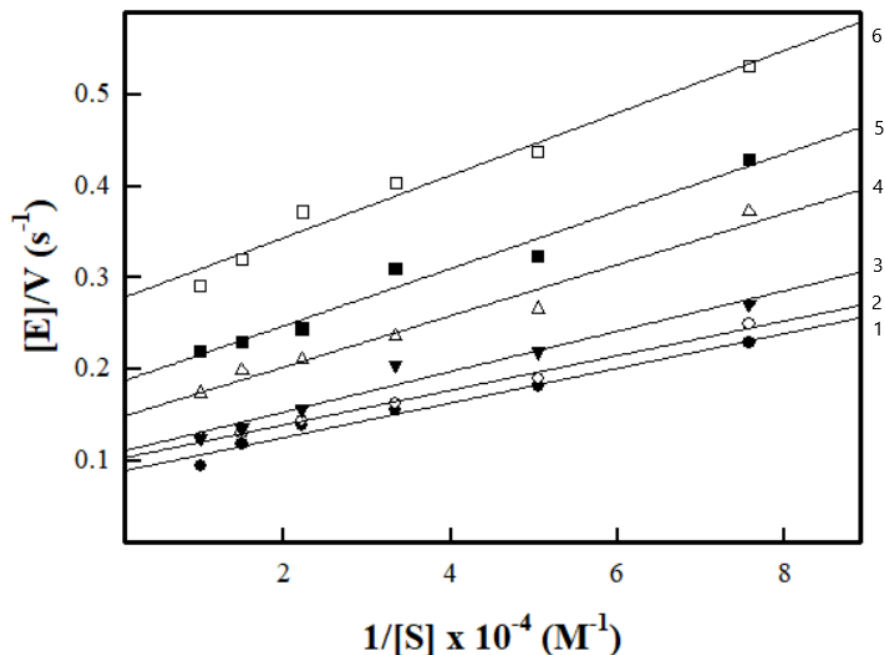
### 3. REZULTATAI

#### 3.1. Nitroaromatinių junginių ir chinonų stacionarios redukcijos TdsD tyrimas

Naudojant oksidatoriais vienus iš reaktingiausių nitroaromatinių junginių - 2,4,6-trinitrofenilmetilnitraminą (tetrilą) arba 2,4,6-trinitrotolueną (TNT) ir keičiant jų koncentracijas esant pastovioms NADPH koncentracijoms, buvo gauta lygiagrečių tiesių serija Lineweaver-Burk koordinatėse (9 ir 10 pav.). Tai rodo, kad reakcija vyksta pagal „ping-pong“ mechanizmą. Šiuo atveju gauta, kad tetrilo  $k_{cat}/K_m$  lygi  $5.7 \pm 0.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , TNT  $k_{cat}/K_m$  lygi  $6.6 \pm 0.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , o NADPH  $k_{cat}/K_m$  lygi  $2.3 \pm 0.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , o  $k_{cat}$  lygi  $5.7 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$  (tetrilas), ir  $11.7 \pm 1 \text{ s}^{-1}$  (TNT).



**9 pav.** 40 nM TdsD vykdomos reakcijos greičiai, naudojant kintamas tetrilo (S) ir NADPH koncentracijas. NADPH koncentracijos: (1) 200  $\mu\text{M}$ , (2) 150  $\mu\text{M}$ , (3) 100  $\mu\text{M}$ , (4) 50  $\mu\text{M}$ , (5) 30  $\mu\text{M}$ , ir (6) 20  $\mu\text{M}$ .



**10 pav.** 40 nM TdsD vykdomos reakcijos greičiai, naudojant kintamas TNT (S) ir NADPH koncentracijas. NADPH koncentracijos: (1) 200  $\mu\text{M}$ , (2) 150  $\mu\text{M}$ , (3) 100  $\mu\text{M}$ , (4) 50  $\mu\text{M}$ , (5) 30  $\mu\text{M}$ , ir (6) 20  $\mu\text{M}$ .

Taip pat šiame darbe buvo siekiama išaiškinti galimus nitroaromatinių junginių ir chinonų redukcijos TdsD nitroreduktaze kiekybinius struktūros-aktyvumo ryšius ir jų galimą substratinį specifiškumą. Tam buvo naudoti įvairias funkcines grupes turintys abiejų grupių oksidatoriai, turintys skirtingas vienelektroninės redukcijos potencialo ( $E^1_7$ ) reikšmes. Šis parametras atspindi oksidacijos redukcijos porų chinonas/semichinono radikalas arba  $\text{ArNO}_2/\text{ArNO}_2^{\cdot-}$  oksidacinį pajėgumą. Iš viso buvo ištirta 12 nitroaromatinių junginių, kurių potencialas kito nuo -0.16 V iki -0.49 V ir 15 chinonų, kurių potencialas kito nuo -0.46 V iki +0.09 V. Buvo gauta, kad didėjant nitroaromatinių junginių  $E^1_7$  taip pat auga ir reakcijos bimolekulinės greičio konstantos ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) (1 ir 2 lentelės, 11 pav.), ir nėra stebima žymi pakaitų įtaka oksidatoriaus reakingumui. Be to, nitroaromatiniai junginiai tipiška yra reakingesni nei chinonai su tokiu pat  $E^1_7$  (11 pav.). Taip pat svarbu yra tai, kad 2-hidroksi-1,4-naftochinono ir 3-metil-2-hidroksi-1,4-naftochinono  $k_{\text{cat}}/K_m$  TdsD katalizuojamoje reakcijoje yra anomaliai aukšta (11 pav.).

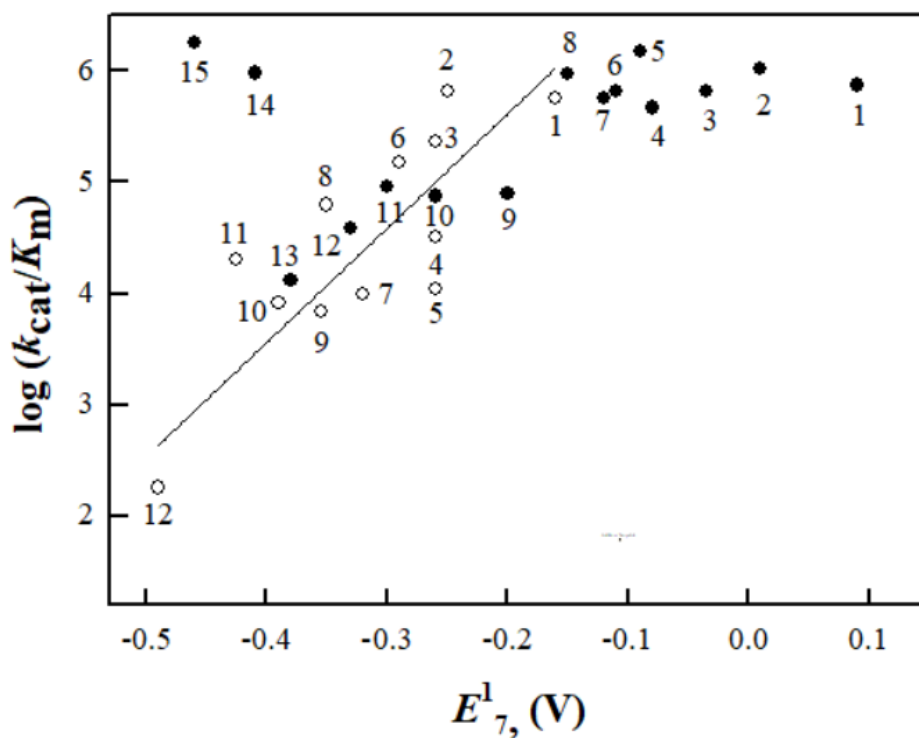
**1 lentelė.** Nitroaromatinių junginių redukcijos kinetinės konstantos reakcijose su TdsD esant 100  $\mu$ M NADPH (pH 7.0).

Junginys	$E^1_7$ (V)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
1. 2,4,6-Trinitrofenilmetilnitraminas (tetrilas)	-0.16	5.9 $\pm$ 1.0	5.7 $\pm$ 0.6 x 10 <sup>5</sup>
2. 2,4,6-trinitrotoluenas (TNT)	-0.25	5.6 $\pm$ 0.8	6.6 $\pm$ 0.4 x 10 <sup>5</sup>
3. Nifuroksimas	-0.26	9.3 $\pm$ 1.4	2.3 $\pm$ 0.7 x 10 <sup>5</sup>
4. Nitrofurantoinas	-0.26	8.6 $\pm$ 2.0	3.2 $\pm$ 0.3 x 10 <sup>4</sup>
5. <i>p</i> -dinitrobenzenas	-0.26	5.3 $\pm$ 1.6	1.1 $\pm$ 0.2 x 10 <sup>3</sup>
6. <i>o</i> -dinitrobenzenas	-0.29	5.3 $\pm$ 1.8	1.5 $\pm$ 0.4 x 10 <sup>5</sup>
7. <i>p</i> -nitrobenzaldehydas	-0.32	2.2 $\pm$ 0.5	9.8 $\pm$ 0.6 x 10 <sup>3</sup>
8. <i>m</i> -dinitrobenzenas	-0.35	6.5 $\pm$ 0.8	6.3 $\pm$ 0.5 x 10 <sup>4</sup>
9. <i>p</i> -nitroacetofenonas	-0.36	3.6 $\pm$ 0.5	7.0 $\pm$ 0.5 x 10 <sup>3</sup>
10. CB1954	-0.39	1.8 $\pm$ 0.4	8.2 $\pm$ 0.9 x 10 <sup>3</sup>
11. <i>p</i> -nitrobenzenkarboksirūgštis	-0.43	3.4 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.5 x 10 <sup>4</sup>
12. Nitrobenzenas	-0.49	0.85 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1 x 10 <sup>3</sup>

**2 lentelė.** Chinonų redukcijos kinetinės konstantos reakcijose su TdsD esant 100  $\mu$ M NADPH (pH 7.0).

Junginys	$E^1_7$ (V)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
1. 1,4-benzochinonas	0.09	5.8 $\pm$ 0.8	7.5 $\pm$ 0.8 x 10 <sup>5</sup>
2. 2-metil-1,4-benzochinonas	0.01	5.5 $\pm$ 0.7	1.1 $\pm$ 0.3 x 10 <sup>6</sup>
3. 2,3-dichlor-1,4-naftochinonas	-0.04	5.6 $\pm$ 0.7	6.5 $\pm$ 0.9 x 10 <sup>5</sup>
4. 2,6-dimetil-1,4-benzochinonas	-0.08	6.7 $\pm$ 0.7	4.7 $\pm$ 0.6 x 10 <sup>5</sup>
5. 5-hidroksi-1,4-naftochinonas (juglonas)	-0.09	10 $\pm$ 1.5	1.5 $\pm$ 0.2 x 10 <sup>6</sup>
6. 5,8-dihidroksi-1,4-naftochinonas	-0.11	6.3 $\pm$ 0.8	6.6 $\pm$ 0.4 x 10 <sup>5</sup>
7. 9,10-fenantrenchinonas	-0.12	3.9 $\pm$ 0.6	5.7 $\pm$ 0.7 x 10 <sup>5</sup>
8. 1,4-naftochinonas	-0.15	6.4 $\pm$ 0.8	9.3 $\pm$ 1.0 x 10 <sup>5</sup>
9. 2-metil-1,4-naftochinonas (menadionas)	-0.26	4.5 $\pm$ 0.8	8.0 $\pm$ 0.4 x 10 <sup>4</sup>

10. 2,3,5,6-tetrametil-1,4-benzochinonas (durochinonas)	-0.26	8.0±0.3	7.5±0.7 x 10 <sup>4</sup>
11. 1,4-dihidroksi-9,10-antrachinonas	-0.3	0.2±0.05	9.1±0.5 x 10 <sup>4</sup>
12. 1,8-dihidroksi-9,10-antrachinonas	-0.33	0.075±0.01	3.8±0.7 x 10 <sup>4</sup>
13. 9,10-antrachinon-2-sulfoksi rūgštis	-0.38	0.39±0.02	1.3±0.4 x 10 <sup>4</sup>
14. 2-hidroksi-1,4-naftochinonas	-0.41	3.7±0.6	9.6±0.9 x 10 <sup>5</sup>
15. 3-metil-2-hidroksi-1,4-naftochinonas	-0.46	4.0±0.5	1.8±0.5 x 10 <sup>6</sup>

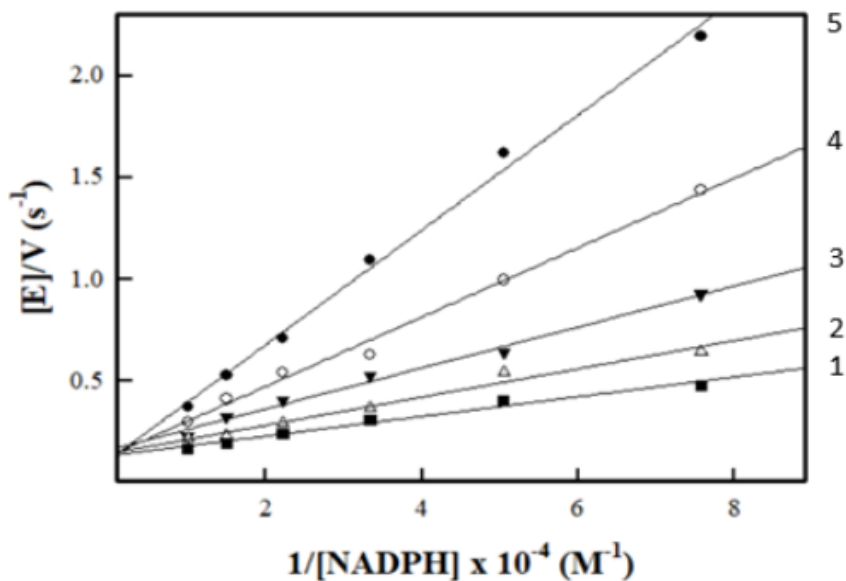


**11 pav.** Nitroaromatinių junginių (balti taškai) ir chinonų (juodi taškai)  $k_{cat}/K_m$  priklausomybė nuo jų  $E_7^1$  (V). Skaičiai atitinka junginių numerius, paimtus iš 1 ir 2 lentelės.

2-hidroksi-1,4-naftochinonų substratinio specifiškumo, kaip ir aukštesnio nitroaromatinių junginių reaktingumo palyginus su chinonais, priežastys yra analogiškos A grupės *E. coli* NfsA ir *E. cloacae* B grupės nitroreduktazės kinetiniams dėsningumams (Valiauga ir kiti, 2017; Nivinskas ir kiti, 2002). Taigi, galima teigti kad TdsD pasižymi panašiu substratinio specifiškumu į šias nitroreduktazes.

### 3.2. Reakcijos slopinimo NADP<sup>+</sup>, dikumarolu ir Cibakrono mėliu tyrimas

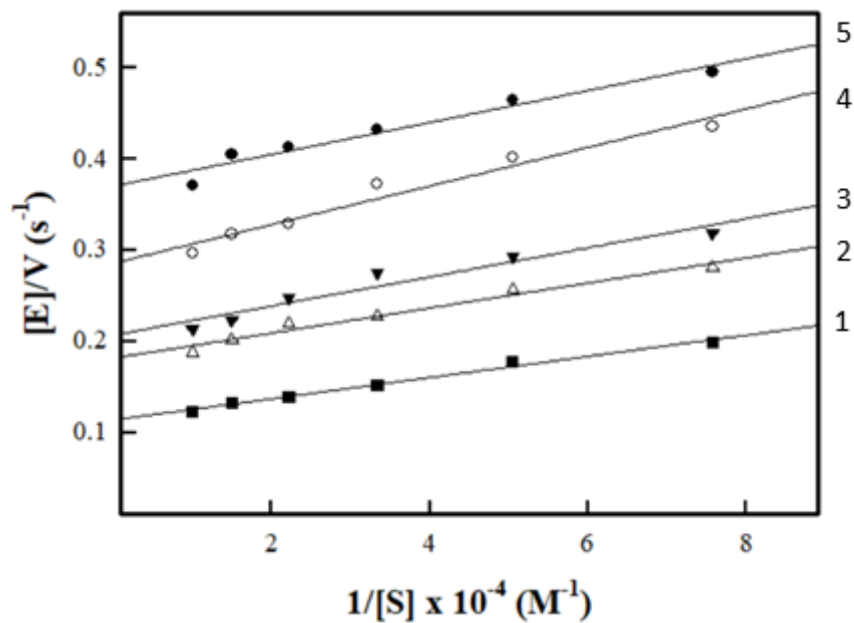
Siekiant detalizuoti TdsD katalizuojamos reakcijos mechanizmą, buvo atlikta ir reakcijos slopinimo analizė, slopinant dikumarolu (klasikiniu B grupės nitroreduktazių slopikliu), ir reakcijos produktu NADP<sup>+</sup>. Abiem atvejais tiek NADP<sup>+</sup>, tiek dikumarolas yra konkurentiniai slopikliai NADPH atžvilgiu (12 ir 14 pav.) esant fiksuotai tetrilo koncentracijai. Jų  $K_i$  yra  $900 \pm 60 \mu\text{M}$  ir  $4.3 \pm 0.5 \mu\text{M}$ , atitinkamai. Tai rodo, kad šių junginių slopinantį poveikį daugiausiai lemia jų rišimasis prie oksiduotosios fermento formos konkuruojant su NADPH. Esant fiksuotai NADPH koncentracijai šie junginiai veikia kaip bekonkurentinio tipo slopikliai (13 ir 15 pav.) tetrilo atžvilgiu. Tai irgi rodo, kad abu šie inhibitoriai daug efektyviau rišasi prie oksiduotos fermento formos palyginus su redukuotąja fermento forma.



---

**12 pav.** Slopinimo mechanizmo tyrimas, esant  $100 \mu\text{M}$  tetrilo ir  $40 \text{ nM}$  TdsD. (1)  $0 \mu\text{M}$  dikumarolo (2)  $5 \mu\text{M}$  dikumarolo (3)  $10 \mu\text{M}$  dikumarolo (4)  $20 \mu\text{M}$  dikumarolo (5)  $30 \mu\text{M}$  dikumarolo, varijuojama NADPH koncentracija.

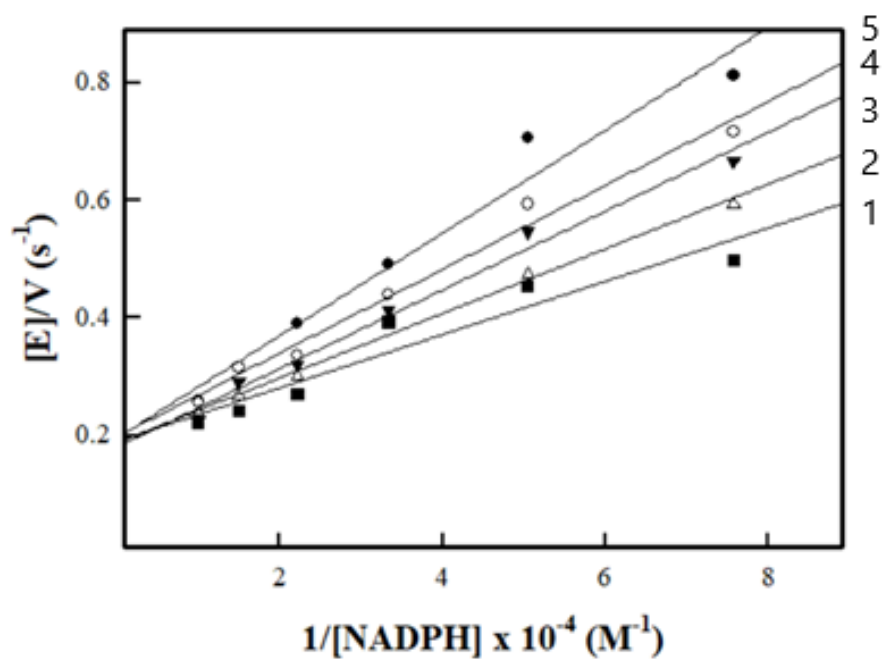
---



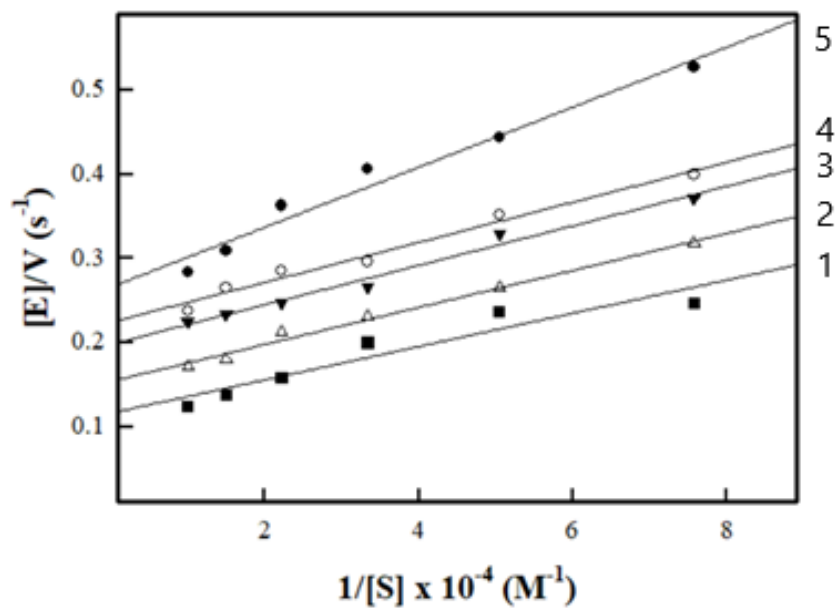

---

**13 pav.** Slopinimo mechanizmo tyrimas, esant 100  $\mu\text{M}$  NADPH ir 40 nM TdsD. (1) 0  $\mu\text{M}$  dikumarolo (2) 5  $\mu\text{M}$  dikumarolo (3) 10  $\mu\text{M}$  dikumarolo (4) 20  $\mu\text{M}$  dikumarolo (5) 30  $\mu\text{M}$  dikumarolo, varijuojama tetrilo koncentracija.

---

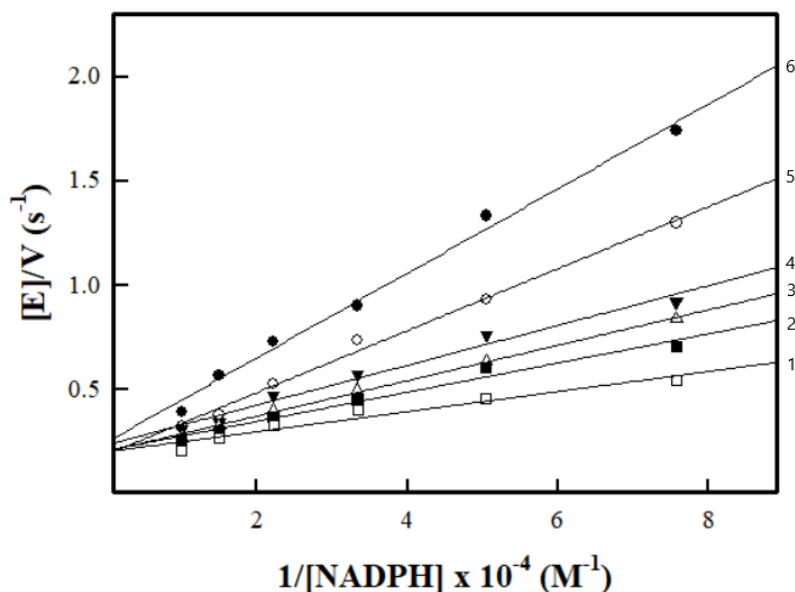


**14 pav.** Slopinimo mechanizmo tyrimas esant terpėje 100  $\mu M$  tetrilo ir 40 nM TdsD. (1) 0  $\mu M$  NADP<sup>+</sup>, (2) 125  $\mu M$  NADP<sup>+</sup>, (3) 250  $\mu M$  NADP<sup>+</sup>, (4) 500  $\mu M$  NADP<sup>+</sup>, (5) 750  $\mu M$  NADP<sup>+</sup>, varijuojama NADPH koncentracija.



**15 pav.** Slopavimo mechanizmo tyrimas, terpėje esant 100 μM NADPH ir 40 nM TdsD. (1) 0 μM NADP<sup>+</sup>, (2) 125 μM NADP<sup>+</sup>, (3) 250 μM NADP<sup>+</sup>, (4) 500 μM NADP<sup>+</sup> ir (5) 750 μM NADP<sup>+</sup>, varijuojama tetrilo koncentracija.

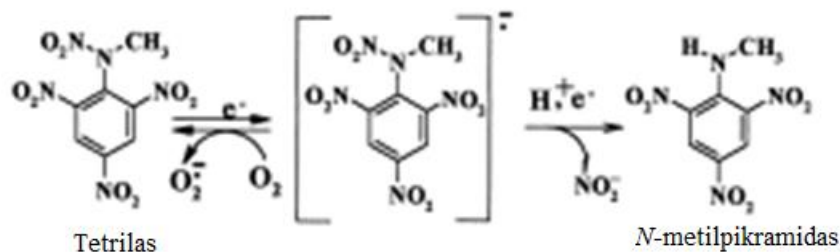
Galiausiai taip pat buvo nustatyta, kad Cibakrono mēlis slopina TdsD kaip konkurentinis slopiklis NADPH atžvilgiu, o  $K_i$  yra lygi  $0.82 \pm 0.1 \mu\text{M}$  (16 pav.)



**16 pav.** Cibakrono mėlio slopinimo mechanizmo tyrimas, esant terpėje 100  $\mu\text{M}$  tetrilo ir 40 nM TdsD. (1) 0  $\mu\text{M}$  Cibakrono mėlio, (2) 0.25  $\mu\text{M}$  Cibakrono mėlio, (3) 0.5  $\mu\text{M}$  Cibakrono mėlio, (4) 1  $\mu\text{M}$  Cibakrono mėlio, (5) 1.5  $\mu\text{M}$  Cibakrono mėlio, (6) 2  $\mu\text{M}$  Cibakrono mėlio, varijuojama NADPH koncentracija.

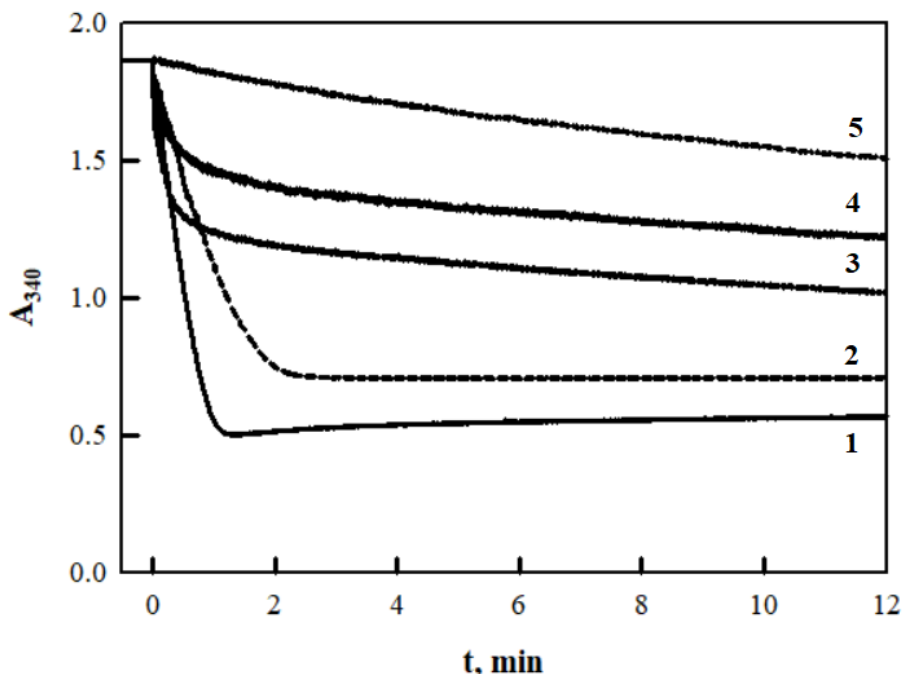
### 3.3. Dvielektroninė nitroaromatinių junginių ir chinonų redukcija TdsD

Nors deguoniui nejautrios nitroreduktazės redukuoja  $\text{ArNO}_2$  dvielektroniniu būdu susidarant jų  $\text{ArNO}$  ir  $\text{ArNHOH}$  dariniams, šis mechanizmas buvo nustatytas naudojant nedidelį skaičių junginių. Tačiau 2,4,6-trinitrofenilmetil-*N*-nitraminui (tetrilui) yra būdinga ir vienelektroninė redukcija žinduolių NAD(P)H:chinonoksidoreduktaze (DT-diaforaze, NQO1) (Misevičienė ir kiti, 2006), nors pastarasis fermentas kitus  $\text{ArNO}_2$  redukuoja tik dvielektroniniu būdu:



**17 pav.** Vienelektroninės tetrilo redukcijos schema.

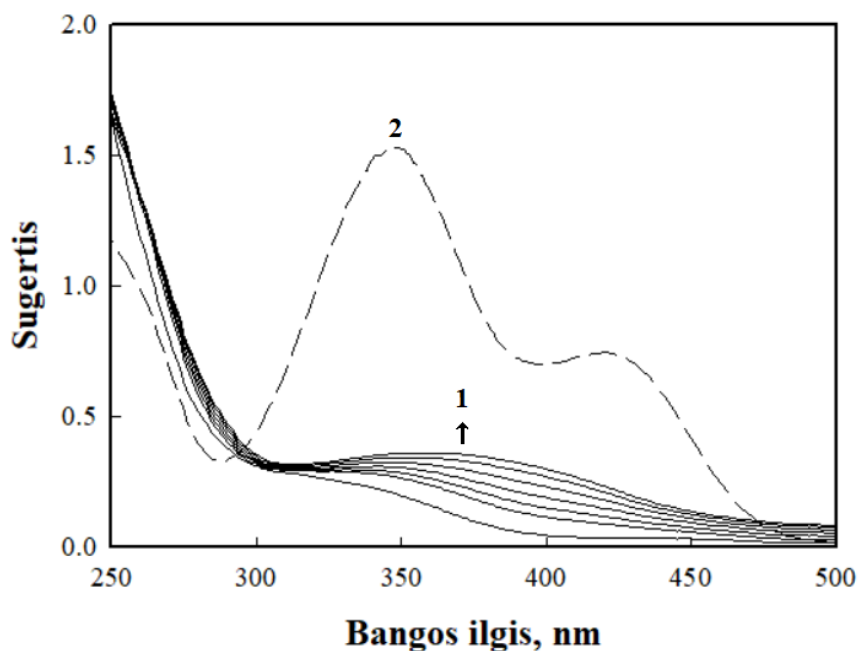
Dėl to nitroreduktazių katalizuojamos reakcijos mechanizmas irgi turi būti patikrinamas. Mes nustatėme, kad esant NADPH pertekliui (300  $\mu\text{M}$ ), TdsD katalizuojamoje reakcijoje 50  $\mu\text{M}$  TNT oksiduoja apie 100  $\mu\text{M}$  NADPH ( $\Delta A_{340} \sim -0.6$ ) (18 pav.). Po to seka lėtesnė oksidacijos fazė, artima fermento NADPH oksidaciniam aktyvumui (18 pav.).



**18 pav.** 300  $\mu\text{M}$  NADPH kinetika (stebima 340 nm), esant terpėje 50  $\mu\text{M}$  tetrilo (1, 2) arba 50  $\mu\text{M}$  TNT (3,4) ir 400 nM TdsD. (1) 50  $\mu\text{M}$  tetrilo, (2) 50  $\mu\text{M}$  tetrilo ir 2 mM askorbo rūgšties, (3) 50  $\mu\text{M}$  TNT, (4) 50  $\mu\text{M}$  TNT ir 2 mM askorbo rūgšties, (5) TdsD oksidacinis aktyvumas.

Šie duomenys yra analogiški A grupės nitroreduktazės *E. coli* NfsA duomenims (Valiauga ir kiti, 2017), ir rodo, kad TdsD redukuoja TNT į monohidroksilaminą vykstant  $4e^-$  pernašai ir susidarant tarpiniam nitrozo ( $\text{ArNO}$ ) produktui. Šis tarpinis junginys po to gali būti redukuojamas fermentiniu būdu arba nefermentiškai, tiesiogiai reaguojant su NADH. Kadangi askorbo rūgštis redukuoja nitrozobenzeną žymiai didesniu greičiu  $k = 2800 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (pH 7.0 (Uršič ir kiti, 1998)) nei NAD(P)H ( $k \sim 120 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Race ir kiti, 2005)), todėl ji lėtina pradinį fermentinį NADPH oksidacijos greitį TNT, ir lemia 1:1 TNT/NADPH reakcijos stochiometriją ( $\Delta A_{340} \sim -0.3$ , 18 pav.). 18 Pav.

duomenys rodo, kad tokie patys dėsningumai ir askorbato poveikis yra būdingi ir fermentiškai oksiduojant 300  $\mu\text{M}$  NADPH su 50  $\mu\text{M}$  tetrilo. Todėl tetrilo redukcijai TdsD irgi turi būti būdingas pradinis ArNO susidarymas, bet ne jo vienelektroninis *N*-denitrinimas (17 pav.), kas buvo pastebėta ir A grupės *E. coli* NfsA nitroreduktazės atveju (Valiauga ir kiti, 2018). Taip pat apie redukcinio tetrilo *N*-denitrinimo nebuvimą liudija ir tetrilo redukcijos produktų spektrai naudojant TdsD ir NADPH regeneracijos sistemą, kurie nesutampa su *N*-metilpikramido sugerties spektru (19 pav.).



---

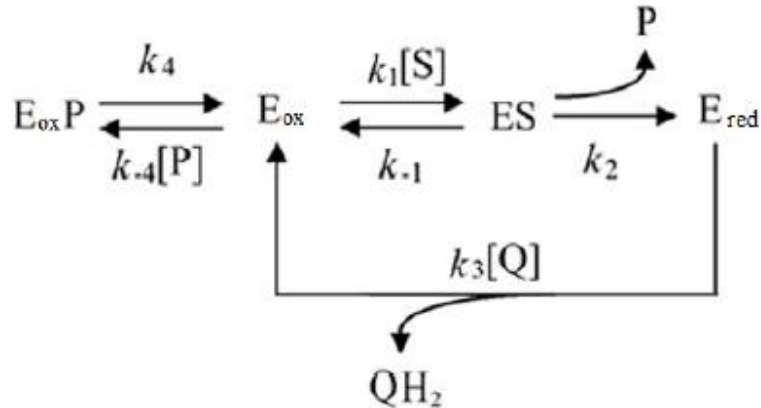
**19 pav.** 100  $\mu\text{M}$  tetrilo redukcijos spektriniai pokyčiai (1), esant 20  $\mu\text{M}$  NADPH, 80 nM TdsD ir NADPH regeneracijos sistemai (pH 7.0, 25  $^{\circ}\text{C}$ ). Spektrai rašyti 120 min, pateiktas ir 100  $\mu\text{M}$  *N*-metilpikramido UV-VIS spektras (2).

---

## REZULTATŲ APTARIMAS

Mūsų duomenys parodė, kad TdsD atlieka dvielektroninę nitroaromatinių junginių ir chinonų redukciją, kas yra būdinga ir anksčiau ištirtai *E. coli* NfsA (Valiauga ir kiti, 2017). Šis fermentas katalizuoja reakciją pagal „ping-pong“ mechanizmą“ (9 ir 10 pav.). Be to, TdsD katalizei nėra būdingas redukcinis tetrilo *N*-denitrinimas susidarant *N*-metilpikramidui (19 pav.). Kaip ir *E. coli* NfsA nitroreduktazės atveju, buvo gauta, kad nitroaromatinių junginių ( $\text{ArNO}_2$ ) reakingumas ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) didėjo didėjant jų  $E^{1/7}$  (11 pav.). Tai rodo, kad nitroaromatinių junginių redukcija priklauso tik nuo jo oksidacinio aktyvumo ir jų reakingumas nepriklauso nuo junginio struktūros. Tai gali būti suderinama su daugiastadijiniu ( $e^-$ ,  $\text{H}^+$ ,  $e^-$ ) hidrido pernašos mechanizmu ir greitį limituojančia pirmojo elektrono pernaša (Marcus ir Sutin, 1985). TdsD redukuoja nitroaromatinius junginius ir chinonus 6-8 kartus (1 ir 2 lentelės) lėčiau nei A grupės nitroreduktazė NfsA (Valiauga ir kiti, 2017). Be to, abiem atvejais egzistuoja anomaliai aukštas 2-hidroksi-1,4-naftochinonų reakingumas. Šie rezultatai nėra suderinami su „išorinės sferos“ elektronų pernašos modeliu (Marcus ir Sutin, 1985), nes tokiu atveju chinonų reakingumas turi būti didesnis nei nitroaromatinių junginių dėl jų žymiai didesnės vidumolekulinės elektronų mainų konstantos ( $10^8$  prieš  $10^5$ ) (Meotner ir Neta, 1986). Be to, GDEPT terapijoje svarbaus CB1954 junginio  $k_{\text{cat}}/K_m$  redukcijos greitis su TdsD ( $8.2 \pm 0.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) buvo gerokai mažesnis nei lyginant *E. coli* NfsA ( $6.5 \pm 0.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), dėl ko TdsD panaudojimas šioje terapijoje kelia abejonių ir verta ieškoti kitų nitroreduktazių, kurios efektyviau redukuotų CB1954. Apibendrinus rezultatus galime teigti, kad TdsD galioja ir kitoms nitroreduktazėms būdingas oksiduojančių substratų specifiskumas.

Kalbant apie TdsD chinonų ir nitroaromatinių junginių redukcijos mechanizmą, reikia pažymėti fermento slopinimą reakcijos produktu  $\text{NADP}^+$  (12 ir 14 pav.). Anot mūsų duomenų  $\text{NADP}^+$  inhibicinis poveikis yra labiausiai lemiamas jo konkurencijos su  $\text{NADPH}$  dėl rišimosi vietos oksiduotoje fermento formoje. Todėl fermento stacionari kinetika gali būti aprašoma Schema 1:




---

**1 schema.** TdsD stacionarios kinetikos schema.

---

kur  $E_{ox}$ ,  $E_{ox}P$ ,  $ES$ ,  $E_{red}$  yra atitinkamai oksiduotas fermentas, jo kompleksas su produktu ( $NADP^+$ ), fermento-substrato kompleksas ir redukuotasis fermentas. Kadangi prie fiksuotos  $NADPH$  koncentracijos reakcijos  $k_{cat}$  yra skirtingos (1 ir 2 lentelės), limituojanti stadija greičiausiai yra oksidacinė pusiaureakcija. Šios schemos pagrindu gauta stacionariosios kinetikos lygtis (1 lygtis) rodo, kad  $P$  ( $NADP^+$ ) turi veikti kaip bekonkurentinio tipo slopiklis oksidatoriaus ( $Q$ ) atžvilgiu, ir kaip konkurentinis slopiklis  $S$  (t.y.  $NADPH$ ) atžvilgiu:

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

---

**1 lygtis.** TdsD stacionarios kinetikos lygtis.

---

Nesant terpėje  $NADP^+$  ( $[P] = 0$ ), 1 lygtis supaprastėja į 2 lygtį, aprašančią paprastą „ping-pong“ kinetinę schemą:

$$\frac{[E]}{V} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3[Q]} + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1k_2[S]}$$

---

**2 lygtis.** TdsD stacionarios kinetikos lygtis, kai [P]=0.

---

Mūsų tyrime taip pat buvo išsiaiškinta, ar ši nitroreduktazė yra slopinama klasikiniu NR inhibitoriumi dikumarolu. Buvo parodyta, kad slopinimas vyksta (12 ir 13 pav.), bet gautoji dikumarolo  $K_i$  (4.3  $\mu\text{M}$ ) yra didesnė, nei kitose bakterijų nitroreduktazėse, pavyzdžiui, *E. cloacae* nitroreduktazėje (0.062  $\mu\text{M}$  (Koder ir Miller, 1998), *Thermotoga maritima* peroksiredoksino nitroreduktazėje (0.7  $\mu\text{M}$  (Anusevičius ir kiti, 2012)), ir *E. coli* NfsB (2.0  $\mu\text{M}$  (Anlezark ir kiti, 1992)). Tiesa, ji yra gerokai mažesnė už NfsA atveju gautą  $K_i$  (18  $\mu\text{M}$  (Valiauga ir kiti, 2017)). Anksčiau buvo nustatyta, kad dikumarolui koordinuojantis *V. fischeri* FRazės I aktyviajame centre pagrindinės sąveikos sudaromos su Phe124 ir Ser42 (Koike ir kiti, 1998), tačiau šios amino rūgštys yra išsilaikiusios tiek NfsB, tiek *E. cloacae* NR, nors jų  $K_i$  vertės skiriasi 30 kartų. Todėl tikslus dikumarolo rišimosi mechanizmas nėra išsiaiškintas iki galo.

## IŠVADOS

1. Nustatyta, kad TdsD chinonus ir nitroaromatinius junginius redukuoja pagal „ping-pong“ mechanizmą.
2. Nustatyta, kad nitroaromatinių junginių redukcija nepriklauso nuo junginių struktūrinių ypatybių, o priklauso nuo jų  $E^{17}$ . Chinonai yra blogesni elektronų akceptorai nei nitroaromatiniai junginiai. Todėl galima teigti, kad TdsD substratų specifiškumas yra artimas *E. coli* NfsA specifiškumui.
3. Nustatyta, kad  $\text{NADP}^+$  ir dikumarolas yra konkurenciniai slopikliai TdsD katalizuojamose reakcijose  $\text{NADPH}$  atžvilgiu. Tetrilo atžvilgiu  $\text{NADP}^+$  ir dikumarolas yra bekonkurenciniai slopikliai.

## SANTRAUKA

Nitroreduktazės (NR) – bakterijose aptinkami flavininiai fermentai. Jos yra skirstomos į du tipus – deguoniui nejautrias nitroreduktazes (I tipas) ir deguoniui jautrias nitroreduktazes (II tipas). Paskutiniu metu deguoniui nejautrios bakterinės nitroreduktazės tapo įdomiu tyrimu objektu kaip fermentai, kurių katalizuojamos reakcijos su nitroaromatiniais junginiais ar chinonais gali būti pritaikomas naujų biologiškai aktyvių junginių kūrimui, biodegradacijos bei priešvėžinės terapijos GDEPT (*gene-directed enzyme prodrug therapy*) tyrimams.

Šio darbo pagrindinis tikslas buvo ištirti TdsD katalizuojamos nitroaromatinių junginių ir chinonų redukcijos mechanizmą. Buvo nustatyta, kad ši reakcija vyksta pagal „ping-pong“, o ne pagal nuoseklų mechanizmą. Taip pat buvo ištirta ir šio fermento substratinis specifiškumas. Buvo gauta parabolinė nitroaromatinių junginių ir chinonų  $\log(k_{cat}/K_m)$  priklausomybė nuo šių junginių vienciloninės redukcijos potencialo ( $E^1_7$ ). Taip pat buvo pastebėta, kad nitroaromatiniai junginiai yra geresni elektronų akceptoriai už chinonus. Taip pat gauta, kad TdsD, kaip ir įprasta I tipo nitroreduktazėms, vykdo  $2e^-$  nitroaromatinių junginių ir chinonų redukciją.

Ištyrus reakcijos produkto  $NADP^+$  ir dikumarolo slopinimo mechanizmą, buvo gauta, kad jie abu yra konkurentiniai slopikliai  $NADPH$  atžvilgiu, ir bekonkurentiniai tetrilo atžvilgiu.

## SUMMARY

Nitroreductases (NR) are members of flavoenzymes, which are found in many bacteria. There are two types of NR – oxygen insensitive nitroreductases (Type I) and oxygen sensitive nitroreductases (Type II). Recently, oxygen insensitive nitroreductases have become a target for scientific investigation, as its catalyzed reduction of nitroaromatic compounds and quinones can be used for the creation of novel bioactive compounds, in the investigation of their biodegradation and in anticancer therapy GDEPT (*gene-directed enzyme prodrug therapy*).

The main aim of this study was to investigate the mechanism of TdsD nitroreductase catalyzed reduction of nitroaromatic compounds and quinones. It was found that this reaction follows “ping-pong“, but not a sequential scheme. We also investigated the substrate specificity of the above reactions. The parabolic  $\log(k_{cat}/K_m)$  dependence on the  $1e^-$  reduction potential ( $E^{17}$ ) of aromatic nitrocompounds and quinones was observed. Also the nitroaromatic compounds were more efficient electron acceptors than quinones. Moreover, TdsD, just like other Type I nitroreductases, performs two-electron reduction of the above compounds.

Investigation of the inhibitor  $NADP^+$  and dicoumarol showed that they perform competitive inhibition with respect to NADPH and uncompetitive inhibition with respect to tetryl.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

Anderson RC, Rasmussen MA, Allison MJ. **Metabolism of the plant toxins nitropropionic acid and nitropropanol by ruminal microorganisms.** *Appl. Environ. Microbiol.* (1993) 3056–3061.

Angermaier L, Simon H. **On the reduction of aliphatic and aromatic nitro compounds by *Clostridia*, the role of ferredoxin and its stabilization.** *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* (1983) 364(8):961-75.

Anlezark G, Melton R, Sherwood R, Coles B, Friedlos F, Knox R. **The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB-1954)--I. Purification and properties of anitroreductase enzyme from *Escherichia coli*--a potential enzyme for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT).** *Biochem Pharmacol.* (1992) 44(12):2289-95.

Anlezark G, Melton R, Sherwood R, Wilson W, Denny W, Palmer B, Knox R, Friedlos F, Williams A. **Bioactivation of dinitrobenzamide mustards by an *E. coli* B nitroreductase.** *Biochem Pharmacol.*, (1995) 50(5):609-18.

Anlezark G, Vaughan T, Fashola-Stone E, Michael N, Murdoch H, Sims M, Stubbs S, Wigley S, Minton N. ***Bacillus amyloliquefaciens* orthologue of *Bacillus subtilis* ywrO encodes a nitroreductase enzyme which activates the prodrug CB 1954.** *Microbiology.* (2002) 148(Pt 1):297-306.

Anusevičius Ž, Misevičienė L, Šarlauskas J, Rouhier N, Jacquot J, Čėnas N. **Quinone- and nitroreductase reactions of *Thermotoga maritima* peroxiredoxin-nitroreductase hybrid enzyme.** *Arch Biochem Biophys.* (2012) 528(1):50-6.

Barak Y, Ackerley D, Dodge C, Banwari L, Alex C, Francis A, Martin A. **Analysis of novel soluble chromate and uranyl reductases and generation of an improved enzyme by directed evolution.** *Appl Environ Microbiol.* (2006) 72(11):7074-82.

Berne C, Betancor L, Lurckarift H, Spain J, **Application of a microfluidic reactor for screening cancer prodrug activation using silica-immobilized nitrobenzene nitroreductase,** *Biomacromolecules.* (2006) 7(9):2631-6.

Bryant C, DeLuca M, **Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase from *Enterobacter cloacae*.** *J Biol Chem.* (1991) 266(7):4119-25.

Bryant D, McCalla D, Leeksma M, Laneuville P. **Type I nitroreductases of *Escherichia coli*.** *Can J Microbiol.* (1981) 27(1):81-6.

Čėnas N, Nemeikaitė-Čėnienė A, Šarlauskas J, Anusevičius A, Nivinskas H, Misevičienė L, Marozienė A. **Mechanisms of the mammalian cell cytotoxicity of explosiveives.** *Ecotoxicology of Explosives.* (2009) 211-226.

Čėnas N, Nemeikaitė-Čėnienė A, Sergėdienė E, Nivinskas H, Ź, Šarlauskas J. **Quantitative structure-activity relationships in enzymatic single-electron reduction of nitroaromatic explosives: implications for their cytotoxicity.** *Biochim Biophys Acta.* (2001) 1528(1):31-8.

Chung-Faye G, Palmer D, Anderson D, Clark J, Downes M, Baddeley J, Hussain S, Murray P, Searle P, Seymour L, Harris P, Ferry D, Kerr D. **Virus-directed, enzyme prodrug therapy with nitroimidazole reductase: a phase I and pharmacokinetic study of its prodrug, CB1954.** *Clin Cancer Res.* (2001) 7(9):2662-8.

Day M, Jarrom D, Christofferson A, Graziano A, Anderson J, Searle P, Hyde E, White S. **The structures of *E. coli* NfsA bound to the antibiotic nitrofurantoin; to 1,4-benzoquinone and to FMN.** *Biochem J.* (2021) 478(13):2601-2617.

De Souza J, Raaijmakers J. **Polymorphisms within the *prnD* and *pltC* genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp.** *FEMS Microbiology Ecology.* (2003) 43(1):21-34.

Dilley J, Tyson C, Spangford R, Sasmore D, Newell G, Dacre J. **Short-term oral toxicity of a 2,4,6-trinitrotoluene and hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine mixture in mice, rats, and dogs.** *J Toxicol Environ Health.* (1982) 9(4):587-610.

Djeha A, Hulme A, Dexter M, Mountain A, Young L, Searle P, Kerr D, Wrighton C. **Expression of *Escherichia coli* B nitroreductase in established human tumor xenografts in mice results in potent antitumoral and bystander effects upon systemic administration of the prodrug CB1954.** *Cancer Gene Ther.* (2000) 7(5):721-31.

Emptage C, Knox R, Danson M, Hough D. **Nitroreductase from *Bacillus licheniformis*: a stable enzyme for prodrug activation.** *Biochem Pharmacol.* (2009) 77(1):21-9.

Ezaki N, Koyama M, Shomura T, Tsuruoka T, Inouye S. **Pyrrrolomycins C, D, and E, new members of pyrrrolomycins.** *J. Antibiot.* (1983) 36:1263–1267.

Ezaki N, Shomura T, Koyama M, Niwa T, Kojima M, Inouye S, Ito T, Niida T. **New chlorinated nitro-pyrrole antibiotics, pyrrrolomycin A and B (SF-2080 A and B).** *J. Antibiot.* (1981) 34:1363–1365.

García PA, Valles E, Díez D, Castro MA. **Marine Alkylpurines: A Promising Group of Bioactive Marine Natural Products.** *Mar Drugs.* (2018) 16(1):6.

Hartert D, Ramirez V. **Responsiveness of immature versus adult male rat hypothalami to dibutyryl cyclic AMP- and forskolin-induced LHRH release in vitro.** *Neuroendocrinology.* (1985) 40(6):476-82

Haynes C, Koder R, Miller A, Rodgers D. **Structures of nitroreductase in three states: effects of inhibitor binding and reduction.** *J Biol Chem.* (2002) 277(13):11513-20.

Hu L, Liu B. **5'-(2-Nitrophenylalkanoyl)-2'-deoxy-5-fluorouridines as potential prodrugs of FUDR for reductive activation.** *Bioorg Med Chem.* (2003) 11(18):3889-99.

Ishii Y, Konishi J, Suzuki M, Maruhashi K, **Cloning and expression of the gene encoding the thermophilic NAD(P)H-FMN oxidoreductase coupling with the desulfurization enzymes from *Paenibacillus* sp. A11-2.** *J Biosci Bioeng.* (2000) 90(6):591-9.

Jaberipour M, Jarrom D, Guise C, Daff S, White S, Searle P, Hyde E. **Steady-state and stopped-flow kinetic studies of three *Escherichia coli* NfsB mutants with enhanced activity for the prodrug CB1954.** *Biochemistry.* (2009) 48(32):7665-72.

Johansson E, Parkinson G, Denny W, Neidle S. **Studies on the nitroreductase prodrug-activating system. Crystal structures of complexes with the inhibitor dicoumarol and dinitrobenzamide prodrugs and of the enzyme active form.** *J Med Chem.* (2003) 46(19):4009-20.

Johnson M, Pollock V, Conover R, Barber M. **Bacterial expression of the molybdenum domain of assimilatory nitrate reductase: production of both the functional molybdenum-containing domain and the nonfunctional tungsten analog.** *Arch Biochem Biophys.* (2002) 403(2):237-48.

Ju K, Parales R. **Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation.** *Microbiol Mol Biol Rev.* (2010) 74(2):250-72.

Koder R, Miller A., **Overexpression, isotopic labeling, and spectral characterization of *Enterobacter cloacae* nitroreductase.** *Protein Expr Purif.* (1998) (1):53-60.

Koike H, Sasaki H, Kobori T, Zenno S, Saigo K, Murphy M, Adman E, Tanokura M. **1.8 Å crystal structure of the major NAD(P)H:FMN oxidoreductase of a bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri*: overall structure, cofactor and substrate-analog binding, and comparison with related flavoproteins.** *J Mol Biol.* (1998) 280(2):259-73.

Lei B, Liu M, Huang S, Tu S. ***Vibrio harveyi* NADPH-flavin oxidoreductase: cloning, sequencing and overexpression of the gene and purification and characterization of the cloned enzyme.** *J Bacteriol.* (1994) 176(12):3552-8

Lei B, Wang H, Yu Y, Shiao-Chun T. **Redox potential and equilibria in the reductive half-reaction of *Vibrio harveyi* NADPH-FMN oxidoreductase.** *Biochemistry.* (2005) 44(1):261-7.

Lemmon M, van Zijl P, Fox M, Mauchline M, Giaccia A, Minton N, Brown J. **Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment.** *Gene Ther.* (1997) 4(8):791-6.

Levine B, Furedi E, Gordon D, Barkley J, Lish P. **Toxic interactions of the munitions compounds TNT and RDX in F344 rats.** *Fundam Appl Toxicol.* (1990) 15(2):373-80.

Levine B, Furedi E, Gordon D, Lish P, Barkley J. **Subchronic toxicity of trinitrotoluene in Fischer 344 rats.** *Toxicology.* (1984) 32(3):253-65.

Lovering A, Hyde, Searle P, White S. **The structure of *Escherichia coli* nitroreductase complexed with nicotinic acid: three crystal forms at 1.7 Å, 1.8 Å and 2.4 Å resolution.** *J Mol Biol.* (2001) 309(1):203-13.

Lukashev A, Fuerer C, Chen M, Searle P, Iggo R. **Late expression of nitroreductase in an oncolytic adenovirus sensitizes colon cancer cells to the prodrug CB1954.** *Hum Gene Ther.* (2005) 16(12):1473-83.

Marcus R, Sutin N. **Electron Transfers in Chemistry and Biology.** *Biochim. Biophys. Acta* (1985) 811, 265-322

Meotner M, Neta P. **Kinetics of Electron Transfer from Nitroaromatic Radical Anions in Aqueous Solutions. Effects of Temperature and Steric Configuration.** *J. Phys. Chem.* (1986) 4648–4650.

Misevičienė L, Anusevičius Ž, Šarlauskas J, Čėnas N. **Reduction of nitroaromatic compounds by NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1): the role of electron-accepting potency and structural parameters in the substrate specificity.** *Acta Biochim Pol.* (2006) 53(3):569-76.

Nivinskas H, Staškevičienė S, Šarlauskas J, Koder R, Miller A, Čėnas N. **Two-electron reduction of quinones by *Enterobacter cloacae* NAD(P)H: nitroreductase: quantitative structure-activity relationships.** *Arch Biochem Biophys.* (2002) 403(2):249-58.

Parkinson G, Skelly J, Neidle S. **Crystal structure of FMN-dependent nitroreductase from *Escherichia coli* B: a prodrug-activating enzyme.** *J Med Chem.* (2000) 43(20):3624-31.

Peres C, Agathos S. **Biodegradation of nitroaromatic pollutants: from pathways to remediation.** *Biotechnol Annu Rev.* (2000) 6:197-220.

Peterson F, Mason R, Hovsepian J, Holtzman J. **Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes.** *J Biol Chem.* (1979) 254(10):4009-14.

Prosser G, Copp J, Syddall S, Williams E, Smaill J, Wilson W, Patterson A, Ackerley D. **Discovery and evaluation of *Escherichia coli* nitroreductases that activate the anti-cancer prodrug CB1954.** *Biochem Pharmacol.* (2009) 79(5):678-87.

Race P, Lovering A, Green R, Osson A, White S, Searle P, Wrighton C, Hyde E. **Structural and mechanistic studies of *Escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone. Reversed binding orientations in different redox states of the enzyme.** *J Biol Chem.* (2005) 280(14):13256-64.

Roldán M, Pérez-Reinado E, Castillo F, Moreno-Vivián C. **Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases.** *FEMS Microbiol Rev.* (2008) 32(3):474-500.

Spain J. **Biodegradation of nitroaromatic compounds.** *Annu Rev Microbiol.* (1995) 49:523-55.

Theys J, Pennington O, Dubois L, Anlezark G, Vaughan T, Mengesha A, Landuyt W, Anne J, Burke P, Durre P, Wouters B, Minton N, Lambin P. **Repeated cycles of *Clostridium*-directed enzyme prodrug therapy result in sustained antitumour effects in vivo.** *Br J Cancer.* (2006) 95(9):1212-9.

Uršič S, Vrčec V, Ljubaš D, Vinkovič I. **Interaction of L-ascorbate with substituted nitrosobenzenes. Role of the ascorbate 2-OH group in antioxidant reactions.** *New Journ of Chem* (1998) 3; 221-224

Valiauga B, Misevičienė L, Rich M, Ackerley D, Šarlauskas J, Čėnas N. **Mechanism of Two-/Four-Electron Reduction of Nitroaromatics by Oxygen-Insensitive Nitroreductases: The Role of a Non-Enzymatic Reduction Step.** *Molecules.* (2018) 23(7):1672.

Valiauga B, Williams E, Ackerley D, Čėnas N. **Reduction of quinones and nitroaromatic compounds by *Escherichia coli* nitroreductase A (NfsA): Characterization of kinetics and substrate specificity.** *Arch Biochem Biophys.* (2017) 614:14-22.

Vass S, Jarrom D, Wilson W, Hyde E, Searle P, *E. coli* NfsA: **an alternative nitroreductase for prodrug activation gene therapy in combination with CB1954.** *Br J Cancer.* (2009) 100(12):1903-11.

White S, Christofferson A, Grainger A, Day M, Jarrom D, Graziano A, Searle P, Hyde E. **The 3D-structure, kinetics and dynamics of the *E. coli* nitroreductase NfsA with NADP<sup>+</sup> provide glimpses of its catalytic mechanism.** *FEBS Lett.* (2022) 596(18):2425-2440

Winkler R, Hertweck C. 2007. **Biosynthesis of nitro compounds.** *Chembiochem.* (2007) 8(9):973-7

Wyman J, Serve M, Hobson D, Lee L, Uddin D. **Acute toxicity, distribution, and metabolism of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) in Fischer 344 rats.** *J Toxicol Environ Health.* (1992) 37(2):313-27.

Zenno S, Koike H, Kumar A, Jayaraman R, Tanokura M, Saigo K. **Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harveyi* flavin oxidoreductase.** *J Bacteriol.* (1996) 178(15):4508-14.

Zenno S., Saigo K. **Identification of the genes encoding NAD(P)H-flavin oxidoreductases that are similar in sequence to *Escherichia coli* Fre in four species of luminous bacteria: *Photobacterium luminescens*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, and *Vibrio orientalis*.** *J Bacteriol.* (1994) 176(12):3544-51.

## PADĖKA

Dėkoju habil. dr. Narimantui Čėnui už galimybę atlikti šį baigiamąjį bakalauro darbą jo vadujamame skyriuje bei už suteiktas žinias.

Labai noriu padėkoti dr. Benjaminui Valiaugai už kantrų ir nuoseklų vadovavimą, didelę pagalbą rašant bakalauro darbą, patarimus ir suteiktas žinias, taip pat už suteiktą pagalbą susipažindinant ir dirbant su spektrofotometriniais metodais.

Dėkoju visam likusiam VU BCHI Ksenobiotikų biochemijos skyriaus kolektyvui už patarimus bei draugišką aplinką.