# TARTU ÜLIKOOL LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT GENEETIKA ÕPPETOOL

*Ewingella americana N*-atsetüülheksoosaminidaasi *Ea*Nah20 katalüüsivõime ja temperatuuristabiilsuse kindlakstegemine ning valitud mutatsioonide mõju hindamine ensüümi biokeemilistele omadustele

Bakalaureusetöö

12 EAP

**Enely Ernits** 

Juhendaja kaasprofessor Triinu Visnapuu, PhD

**TARTU 2022** 

# **INFOLEHT**

# *Ewingella americana N*-atsetüülheksoosaminidaasi *Ea*Nah20 katalüüsivõime ja temperatuuristabiilsuse kindlakstegemine ning valitud mutatsioonide mõju hindamine ensüümi biokeemilistele omadustele

*N*-atsetüülglükoosamiini või *N*-galaktoosamiini sisaldavad molekulid on looduses laialt levinud esinedes näiteks kitiinis ning need on olulised nii rakkude füsioloogias kui ka biotehnoloogias. *N*-atsetüülheksoosaminidaasid (Nah-id) on ensüümid, mis lagundavad glükosiidsidet *N*-atsetüülitud suhkrutes. Bakalaureusetöö põhieesmärk oli kindlaks teha bakteriaalse Nah-i *Ea*Nah20 kineetilised parameetrid ja temperatuuristabiilsus ning hinnata valitud punktmutatsioonide mõju ensüümi omadustele. Töös tehti kindlaks, et puhastatud *Ea*Nah20 on kõrge katalüütilise aktiivsusega, selle afiinsus sünteetilise substraadi suhtes on 0.35 mM ja ensüüm on stabiilne kuni temperatuurini 50°C. Aspartaadi asendus valgu positsioonis 166 inaktiveeris ensüümi. Proliini asendus positsioonis 248 vähendas ensüümi katalüütilist efektiivsust 25 korda ja alandas temperatuuristabiilsust ligi 6°C võrra.

Märksõnad: glükosiidi hüdrolaas, *N*-atsetüülglükoosaminidaas, katalüütiline aktiivsus, kitiini oligosahhariidid, temperatuuri mõju, struktuuri ja funktsiooni seosed

CERCS kood: P310 Proteiinid, ensümoloogia

# Determination of catalytic activity and temperature stability of *N*-acetylhexosaminidase *Ea*Nah20 from *Ewingella americana* and the effect of selected mutations on its biochemical properties

Molecules which contain *N*-acetylglucosamine or *N*-acetylgalactosamine are widely distributed in nature, for example occurring in chitin. They play a vital role for cell physiology and are important for biotechnology. The glyosidic bonds in *N*-acetylated sugars are hydrolysed by *N*acetylhexosaminidases (Nah-s). The aim of the study was to determine the catalytic activity and temperature stability of a bacterial Nah – *Ea*Nah20 – and to verify the effect of selected mutations on its biochemical parameters. It was confirmed that purified *Ea*Nah20 was catalytically highly active with the affinity towards synthetic substrate of 0.35 mM. The enzyme was stable up to 50°C. The enzyme was inactivated when aspartate was replaced in the position 166. The catalytic efficiency of *Ea*Nah20 was decreased 25 times and the temperature stability dropped 6°C when proline was replaced by alanine in the position 238.

Keywords: glycoside hydrolase, *N*-acetylglucosaimindase, catalytic activity, chitin oligosaccharides, effect of temperature, structure-function relationships

CERCS code: P310 Proteins, enzymology

# SISUKORD

INF	OLEHT.	
KAS	SUTATU	JD LÜHENDID5
SISS	SEJUHA	TUS6
1.	KIRJAN	NDUSE ÜLEVAADE7
1.1.	N-atse	etüülheksoosaminidaaside iseloomustus7
	2.1.2.	<i>N</i> -atsetüülheksoosaminidaaside substraadid ja biokeemilised omadused
	2.1.2.	N-atsetüülheksoosaminidaaside produktid ja transglükosüülimisvõime11
	2.1.2.	N-atsetüülheksoosaminidaaside struktuuri ja funktsiooni seosed11
1.2.	N-atse	etüülheksoosaminidaaside ja nende produktide kasutusalad13
2.	EKSPE	RIMENTAALOSA15
2.1.	Töö e	esmärgid15
2.2.	Mater	jal ja metoodika15
	2.2.1.	Kasutatud bakteritüvi, plasmiidid ja transformatsioon Escherichia coli
	ekspres	sioonitüvesse15
	2.2.2.	N-atsetüülheksoosaminidaasi variantide ekspresseerimine E. coli's,
	rakueks	traktide valmistamine ja valgusisalduse määramine16
	2.2.3.	<i>N</i> -atsetüülheksoosaminidaaside puhastamine ja SDS-geelelektroforees17
	2.2.4.	N-atsetüülheksoosaminidaaside ensümaatilise aktiivsuse määramine ja
	kineetili	iste parameetrite kindlakstegemine
	2.2.5.	Temperatuuristabiilsuse määramine
	2.2.6.	Arvutipõhised meetodid
2.3.	Tulen	nused ja arutelu
	2.3.1.	Ewingella americana N-atsetüülheksoosaminidaasi sarnasuse kindlakstegemine
	teiste N	-atsetüülheksoosaminidaasidega ja ensüümi 3D struktuuri modelleerimine20
	2.3.2.	His <sub>6</sub> -märgisega <i>E. americana N</i> -atsetüülheksoosaminidaasi variantide
	ekspres	seerimine ja puhastamine afiinsuskromatograafiaga24
	2.3.3.	N-atsetüülheksoosaminidaasi EaNah variantide biokeemilised omadused26

KOKKUVÕTE	
RESÜMEE	
TÄNUSÕNAD	35
KASUTATUD KIRJANDUS	
KASUTATUD VEEBILEHED	41
LISAD	42
LISA 1	42
LISA 2	43
LISA 3	47
LISA 4	
LIHTLITSENTS	49

# KASUTATUD LÜHENDID

- Ala alaniin, A
- Amp ampitsilliin
- Arg arginiin, R
- Asn asparagiin, N
- Asp-aspartaat, D
- BLAST Basic Local Alignment Search Tool
- CAZy Carbohydrate-active enzymes database
- Ea Ewingella americana
- EaNah20 Ewingella americana'st pärinev N-atsetüülheksoosaminidaas
- $\epsilon$  ekstinktsioonikoefitsent [(1/(M×cm)]
- GH glükosiidi hüdrolaas
- Glu glutamaat, E
- Hex kirjanduses kasutatud N-atsetüülheksoosaminidaasi sünonüüm
- His histidiin, H
- GalNAc N-atsetüülgalaktoosamiin
- GlcNAc N-atsetüülglükoosamiin
- IPTG isopropüül-β-D-1-tiogalaktopüranosiid
- k<sub>cat</sub> katalüütiline konstant (1/s)
- $k_{cat}/K_m katalüütiline efektiivsus [1/(mM \times s)]$
- K<sub>m</sub>-kineetiline aktiveerimiskonstant (mM)
- $M_w$  molekulmass
- Nag-N-atsetüülglükoosaminidaas
- Nah N-atsetüülheksoosaminidaas
- NCBI The National Center for Biotechnology Information
- PDB Protein Data Bank
- pNP-p-nitrofenüül
- pNP-GalNAc p-nitrofenüül N-atsetüülgalaktoosamiin
- pNP-GlcNAc p-nitrofenüül N-atsetüülglükoosamiin
- Pro proliin
- V<sub>max</sub> maksimaalne reaktsioonikiirus (U/mg)

#### SISSEJUHATUS

*N*-atsetüülheksoosaminidaasid (Nah-id) on potentsiaalselt olulised ensüümid toidutehnoloogia valdkonnas, et toota funktsionaalse toidu komponente nagu näiteks kasulikud oligosahhariidid. Samuti leiaksid Nah-id kasutust biotehnoloogias ja biomeditsiinis ravimite või inhibiitorite tootmisel ning võitluses taimepatogeenidega. Nah-id lagundavad ja ka modifitseerivad *N*-atsetüleeritud suhkruid, mida sisaldavad näiteks aju gangliosiidid, mutsiinid, histoonid ja veregrupi antigeenid. Samuti kuuluvad *N*-atsetüleeritud suhkrute hulka kitiin ja selle oligosahhariidid, mida leidub looduses suurtes kogustes näiteks putukate ja koorikloomade skelettides ning seente rakukestades.

Nah-id esinevad praktiliselt kõikides organismirühmades ning need osalevad mitmesugustes protsessides. Sarnase aktiivsusega ensüüme leidub mitmes glükosiidi hüdrolaaside (GH) perekonnas. Enamik teadaolevaid *N*-atsetüülheksoosaminidaasse aktiivsusega ensüüme on liigitatud GH20 perekonda ning sinna kuuluvad näiteks ka inimese ja hiire Nah-id. Kõige detailsemalt on uuritud seentest pärinevaid Nah-e võrreldes näiteks erinevate bakterite ja mereorganismide päritolu vastavate ensüümidega. Kirjeldatud on ligi kahesaja Nah-i omadusi ning paarikümne Nah-i 3D struktuurid on katseliselt kindlaks tehtud.

On hästi teada, et Nah-id on olulised *N*-atsetüleeritud suhkrute ja glükoproteiinide hüdrolüüsil. Osad Nad-id ka transglükosüülivad ning toodavad uudseid oligosahhariide. Samas on oluliselt vähem katseliselt näidatud erinevate aminohappe positsioonide olulisust ensüümreaktsiooni katalüüsi läbiviimisel ja substraadi eelistusel. Samuti on vähe uuritud, kuidas erinevad aminohappe positsioonid mõjutavad ensüümi stabiilsuse parameetreid. Nah-ide laialdasemaks kasutuselevõtuks erinevates tehnoloogiates on oluline leida või disainida ensüümi variante, millel oleks lisaks soovitud aktiivsusele ka suurem stabiilsus.

Käesolev bakalaureusetöö keskendub Gröönimaalt isoleeritud *N*-atsetüülheksoosaminidaaspositiivsest bakterist *Ewingella americana* pärineva *Ea*Nah20 uurimisele. Töö jaoks on kasutatud Innovation Fund Denmark koostööprojekti OliGram raames Taani Tehnikaülikoolis konstrueeritud plasmiide.

Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärk oli kindlaks teha puhastatud *Ea*Nah20 kineetilised parameetrid ja temperatuuristabiilsus ning hinnata kolme valitud punktmutatsiooni mõju ensüümi katalüüsivõimele ja stabiilsusele.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

#### 1.1. N-atsetüülheksoosaminidaaside iseloomustus

β-*N*-atsetüülheksoosaminidaasid (Nah-id; EC 3.2.1.52) on ekso-aktiivsusega glükosidaasid, mis lagundavad ja modifitseerivad *N*-atsetüleeritud heksoose sisaldavaid ühendeid (Mark *et al.*, 1998). Ensüümreaktsiooni käigus eralduvad molekuli mitteredutseerivast otsast *N*atsetüülglükoosamiini (GlcNAc) või *N*-atsetüülgalaktoosamiini (GalNAc) suhkrujäägid (Mark *et al.*, 1998; Slamova ja Bojarova, 2017). Mõned *N*-atsetüülheksoosaminidaasid võivad lisaks substraadi hüdrolüüsile ka transglükosüülida, kus GlcNAc kantakse üle sobivale aktseptorile ja moodustuvad oligosahhariidid (Tsujibo *et al.*, 1999; Nyffenegger *et al.*, 2015; Visnapuu *et al.*, 2020). Nah-id kuuluvad glükosiidi hüdrolaaside hulka ning valdav osa neist ensüümidest paigutatakse CAZy andmebaasi (<u>http://www.cazy.org;</u> Lombard *et al.*, 2014) alusel glükosiidi hüdrolaaside perekonda 20 (GH20), kuid selle aktiivsusega ensüüme leidub ka GH3, GH5, GH84, GH109 ja GH116 perekondades (Slamova *et al.*, 2010; Visnapuu *et al.*, 2020).

*N*-atsetüleeritud sahhariidid, näiteks kitiin ja erinevad oligosahhariidid, on looduses väga laialt levinud molekulid. Kitiin on koorikloomade ja putukate välisskeleti ja seente rakukestade põhikomponent. Lisaks esineb GlcNAc või GalNAc paljudes glükoproteiinides ja -lipiidides, millel on üliolulisi funktsioone organismi toimimiseks (Slamova *et al.*, 2010; Varki *et al.*, 2017). Näiteks veregrupi antigeenid (Heggelund *et al.*, 2017), aju gangliosiidid (Sipione *et al.*, 2020), mutsiinid (Vitiazeva *et al.*, 2015) ja histoonid (Sakabe *et al.*, 2010) sisaldavad *N*atsetüleeritud suhkruid (Varki *et al.*, 2017).

Loomade puhul on *N*-atsetüülheksoosaminidaasidel leitud palju erinevaid ja olulisi funktsioone. Näiteks esmane gameetide kontakt viljastumise käigus toimub Nah-i abil, kus need ensüümid asuvad imetaja spermide pinnal. Viljastumisel oluline funktsioon, mida täidavad ka Nah-id, on multispermia vältimine. Ensüüm muudab spermi retseptorite glükoproteiine munaraku pinnal peale esimest spermiga kokkupuudet, takistades seeläbi järgnevatel spermidel munarakuga seondumist (Zitta *et al.*, 2006; Slamova *et al.*, 2010).

*N*-atsetüülheksoosaminidaase on leitud enamikest elusorganismidest. Nah-e on tuvastatud nii prokarüootidest kui ka eukarüootidest, kuid arhedest ei ole seni katseliselt kindlakstehtud funktsiooniga *N*-atsetüülheksoosaminidaase kirjeldatud. Lisaks laiale levikule erinevates organismirühmades, on ensüümil mitmekesine funktsionaalsus, sest erinevate ensüümide substraadid ja osalus protsessides on mõnevõrra varieeruvad. On näidatud, et konkreetse Nahi aktiivsus ja toime sõltub peremeesorganismist ja ka ensüümi asukohast hulkraksetes organismides (Slamova *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2018; Visnapuu *et al.*, 2020). Mitmetes organismides, eriti bakterites, osaleb Nah kitiini oligosahhariidide lagundamise rajas (Beier ja Bertilsson, 2013; Mazurkewich *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2022).

2019. aasta lõpus saadud andmetel oli The National Center for Biotechnology Information (NCBI) andmebaasis (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>) kindlakstehtud funktsiooniga või ennustatavate Nah-i järjestuste kohta üle 112 000 kirje ning iseloomustatud oli rohkem kui 200 EC 3.2.1.52 aktiivsusega ensüümi (Visnapuu *et al.*, 2020). Seega on tegemist praeguseks üsna hästi kirjeldatud ensüümidega, kuid erinevatest keskkondadest pärinevate organismide Nah-e on uuritud varieeruva põhjalikkusega. Näiteks mereorganismidest ja ka bakteritest pärinevaid Nah-e on pigem vähe uuritud (Visnapuu *et al.*, 2020).

#### 2.1.2. N-atsetüülheksoosaminidaaside substraadid ja biokeemilised omadused

*N*-atsetüülheksoosaminidaasidele on iseloomulik toimimine mitut tüüpi *N*-atsetüleeritud heksoosidele, millele viitab ka ensüümi nimetus. Nah substraatideks võivad olla nii glüko- kui ka galakto-konfiguratsioonidega molekulid, mida hüdrolüüsitakse substraadiseoselise (*substrate-assisted*) mehhanismiga (Prag *et al.*, 2000; Mark *et al.*, 2001; Slamova ja Bojarova, 2017; Zhang *et al.*, 2018). Nah-ide substraatideks sobivad üldiselt 4. positsioonis hüdroksüülrühmaga atsetüleeritud sahhariidid, kuid on nii kitsa kui ka laiema substraadispetsiifikaga ensüüme. Looduslikeks substraatideks on erinevad glükokonjugaadid (nt glükolipiidid või glükosüleeritud valgud), aga ka kitiini oligosahhariidid ja piima oligosahhariidid näiteks *N*,*N*'-diatsetüülkitobioos ja lakto-*N*-trioos II (Slamova *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2018; Visnapuu *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2022).

Nah-ide iseloomustamiseks ning katalüütilise aktiivsuse ja kineetiliste parameetrite kindlakstegemiseks kasutatakse kas kromo- või fluorogeenseid substraate, sest tekkinud produkti saab hõlpsasti spektromeetriliselt kvantiteerida. Kõige levinumad on p-nitrofenüül Natsetüülglükoosamiin (pNP-GlcNAc) ja p-nitrofenüül N-atsetüülgalaktoosamiin (pNP-GalNAc), mille hüdrolüüsi korral vabaneb aluselises keskkonnas kollase värvusega pnitrofenool (Slamova ja Bojarova, 2017; Zhang et al., 2018; Visnapuu et al., 2020). Nende substraatide kasutamise alusel saab määrata, kas tegu on laiema substraadispetsiifikaga Nahvõi substraati hüdrolüüsiva spetsialiseerunud iga, ainult üht ensüümiga. Natsetüülglükoosaminidaas (Nag) kasutab kas ainult pNP-GlcNAc-i või on selle substraadi kasutamine oluliselt eelistatud võrreldes pNP-GalNAc-iga (Drouillard et al., 1997; Slamova et al., 2010; Zhang et al., 2018).

Substraadi eelistuste varieeruvus võib sõltuda ensüümi päritolust, ensüümi struktuurist ja ka reaktsioonitingimustest (Slamova et al., 2010; Zhang et al., 2018). Tabelis 1 on toodud valik põhjalikumalt uuritud Nah-ide kineetilisi parameetreid. Suurem osa iseloomustatud GH20 ensüüme eelistavad substraadina pNP-GlcNAc-i ja bakteriaalse päritoluga Nah-id on seega valdavalt N-atsetüülglükoosaminidaasid. Näiteks Serratia marcescens'i Chb ensüümil oli pNP-GalNAc-i puhul alles ainult 28% aktiivsusest võrreldes pNP-GlcNAc-il mõõdetud aktiivsusega (Kurakake et al., 2003) ja näiteks Bifidobacterium bifidumi BbhI ei hüdrolüüsigi pNP-GalNAci (Miwa et al., 2010). Eukarüootide Nah-idel on saadud mitmesuguseid tulemusi, näiteks haigustekitaja Entamoeba histolytica (düsenteeria siseamööb) HexA ensüümil määrati pNP-GlcNAc-i substraadina kasutades 62% suurem aktiivsus kui pNP-GalNAc puhul (Flockenhaus et al., 2004), aga limaku Dictyostelium discoideum Nah-i afiinsus mõlema substraadi suhtes oli väga sarnane (1.5 mM) (Dimond ja Loomis, 1974) (vt Tabel 1). Samas on erandlikult näidatud, et mõne Nah-i puhul pNP-GlcNAc-i substraadina ei kasutata. Näiteks Hex99 bakterist sp. O-7 hüdrolüüsis *N*,*N*'-diatsetüülkitobioosi, aga mitte Alteromonas suurema polümerisatsiooniastmega kitiini oligosahhariide ega ka pNP-GlcNAc-i (Tsujibo et al., 1999).

Huvitavate omadustega Nah on merebakteri *Paraglaciecola hydrolytica* ensüüm *Ph*Nah20A, millel on katalüütilised efektiivsused mõlema kromogeense substraadi suhtes praktiliselt ühesugused (Tabel 1) ning substraatidena kasutab ensüüm lisaks ka *N*,*N*'-diatsetüülkitobioosi ja lakto-*N*-bioos II (Visnapuu *et al.*, 2020). *Ph*Nah20A fülogeneesi uurides selgus, et selle ensüümi valgujärjestus on erinev võrreldes teiste bakteriaalset päritolu Nah-idega ning valk paigutus uuritud Nah-ide valgujärjestustest koostatud fülogeneesipuul bakteriaalsete ja eukarüootsete ensüümide vahepeale (Visnapuu *et al.*, 2020). Siiski oli tegu puhastatud kujul mõnevõrra ebastabiilse ensüümiga, mis lahjendades ja temperatuuri tõustes kiiresti katalüütilist aktiivsust kaotas ning vajas lisandeid aktiivsuse säilitamiseks (Visnapuu *et al.*, 2020).

Tabelist 1 on näha, et Nah-ide afiinsus *pNP-GlcNAc* suhtes kõigub vahemikus 0.053 mM (*Cf*Hex20 puhul bakterist *Cellulomonas fimi*) (Mayer *et al.*, 2006) kuni 120 mM (BbhI *B. bifidum*'ist) (Miwa *et al.*, 2010). Suurema katalüütilise efektiivsusega on tõhusalt sahhariide lagundava aktinobakteri *Cellulomonas fimi* ensüüm (Mayer *et al.*, 2006) ja efektiivse kitiini hüdrolüüsija *Chitinibacter* sp. GC72 Nah (Chen *et al.*, 2022).

**Tabel 1.** Biokeemiliselt iseloomustatud N-atsetüülheksoosaminidaaside kineetilised parameetrid kromogeensetel substraatidel pNP-GlcNAc ja pNP-GalNAc. Modifitseeritud artiklist Visnapuu *et al.* (2020).

Ensüüm	Substraat	<b>K</b> <sub>M</sub> ( <b>mM</b> )	k <sub>cat</sub> (1/s)	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> [1/(mM×s)]	Viide
PhNah20A	pNP-GlcNAc	0.43	146.8	341	Visnapuu <i>et al.</i> , 2020
	<i>p</i> NP-GalNAc	0.56	192.7	344	
SmChb	pNP-GlcNAc	56.7	111.0	1.95	Drouillard et al., 1997
AhNag20A	pNP-GlcNAc	0.52	Х	Х	Lan et al., 2004;
	<i>p</i> NP-GalNAc	0.5	Х	Х	Lan <i>et al.</i> , 2008
AhNagB	pNP-GlcNAc	8.6	X	X	
	<i>p</i> NP-GalNAc	11.1	Х	Х	
BbhI	pNP-GlcNAc	120	213	178	Miwa <i>et al.</i> , 2010
	<i>p</i> NP-GalNAc	0	0	0	
CfHex20	pNP-GlcNAc	0.053	482.3	9090	Mayer et al., 2006
	<i>p</i> NP-GalNAc	0.066	129.1	1950	
Hex2	pNP-GlcNAc	0.48	60	Х	Nyffenegger <i>et al.</i> , 2015
<i>Eh</i> HexA	pNP-GlcNAc	0.1	Х	X	Flockenhaus <i>et al.</i> , 2004
TrNag1	pNP-GlcNAc	69.4	Х	1023	Chen et al., 2015

X – ei ole publikatsioonis märgitud; 0 – määratav aktiivsus puudus

Ph – Paraglaciecola hydrolytica; Sm – Serratia marcescens; Ah – Aeromonas hydrophila; Bb – Bifidobacterium bifidum; Cf – Cellulomonas fimi; Eh – Entamoeba histolytica; Tr – Trichoderma reesei.

#### 2.1.2. N-atsetüülheksoosaminidaaside produktid ja transglükosüülimisvõime

*N*-atsetüülheksoosaminidaasid suudavad *in vivo* katalüüsida substraatides glükosiidsidemete hüdrolüüsi. On kindlaks tehtud, et *in vitro* suudavad Nah-id katalüüsida uue glükosiidsideme sünteesi, milleks kasutatakse kas transglükosüülimist või kondenseerumisreaktsiooni (nn vastupidist hüdrolüüsi) (Kurakake *et al.*, 2003; Slamova *et al.*, 2010). Sobivateks transglükosüülimise substraatideks on näiteks kitiini oligosahhariidid, modifitseeritud glükosiidid ja/või ka reaktiivne vaheühend NAG-oksasoliin [2-metüül-(1,2-dideoksü-Dglükopürano)-oksasoliin] (Rauvolfová *et al.*, 2004; Tsujibo *et al.*, 1999; Nyffenegger *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Visnapuu *et al.*, 2020; Kurakake ja Amai, 2022).

Transglükosüülimise toimumiseks on vaja kõrgemat substraadi/aktseptormolekuli kontsentratsiooni või reaktsioonisegus vähendatud vaba vee osakaalu. Sel juhul kasutatakse aktseptorina veest erinevat molekuli ning tekivad oligosahhariidid (Tsujibo *et al.*, 1999; Rauvolfová *et al.*, 2004; Nyffenegger *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Visnapuu *et al.*, 2020; Muschiol *et al.*, 2020; Kurakake ja Amai, 2022). Transglükosüülimise võimekust on püütud tõsta ka ensüümide koht-spetsiifilise mutageneesi abil (Slamova ja Bojarova, 2017; Muschiol *et al.*, 2020).

Kuigi GlcNAc-i sisaldavate oligosahhariididel võiks olla mitmeid tehnoloogilisi rakendusi toiduainetööstuses näiteks funktsionaalse toidu komponentide ning piima oligosahhariidide tootmisel ning ravimi- ja keemiatööstuses ensüümide inhibiitoritena, on seda võimekust suhteliselt vähe uuritud. Rinnapiima oligosahhariidide prekursori  $\beta$ -1,3 sidet sisaldava lakto-*N*-trioos II sünteesi on näidatud *P. hydrolytica Ph*Nah20, *Streptomyces plicatus*'e Hex-i (Visnapuu *et al.*, 2020), metagenoomsest isolaadist pärineva Hex-i (Nyffenegger *et al.*, 2015) ja *B. bifidum*'i BbhI (Chen *et al.*, 2016) puhul, kui kasutati aktseptorina laktoosi. Omapärase produktide spektriga on kitobiaas Hex99 bakterist *Alteromonas sp.* tüvest O-7 (praegu klassifitseeritud *Pseudoalteromonas piscicida*'ks), mis toodab kitobioosist disahhariidi  $\beta$ -GlcNAc-1,6-GlcNAc, mis võib osaleda ka signaaliülekandes. Seentest pärinevate Nah-ide puhul on näidatud mitmete erinevate sidemetüüpidega oligosahhariidide sünteesi (Rauvolfová *et al.*, 2004; Slamova ja Bojarova, 2017; Kurakake ja Amai, 2022).

## 2.1.2. N-atsetüülheksoosaminidaaside struktuuri ja funktsiooni seosed

*N*-atsetüülheksoosaminidaaside 3D struktuure on kindlaks tehtud ja struktuuri ning funktsiooni seoseid on uuritud imetajates (nt inimese ensüümi puhul), aga ka bakterite, seente ja ka putukate Nah-idel (<u>http://www.cazy.org/GH20\_structure.html</u>). Siiski katseliselt on erinevate

positsioonide olulisust ensüümi katalüüsivõimele ning muudele biokeemilistele parameetritele pigem vähe uuritud.

Pikka aega arvati, et imetajate rakkudes on kaks *N*-atsetüülheksoosaminidaasi – HexA ja HexB. 2009. aastal aga avastati hiirtes, et on olemas ka HexD, mis eelistab substraadina GalNAc-i (Gutternigg *et al.*, 2009; Slamova *et al.*, 2010). HexA koosneb nii alfa- kui ka beeta-subühikutest, HexB koosneb kahest beeta-subühikust ja leitud on ka HexS, mis koosneb kahest alfa-subühikust (Alteen *et al.*, 2016). Inimese HEXA ja HEXB geenides olevad mutatsioonid toovad kaasa tõsiseid metabolismi häireid ja põhjustavad Tay-Sachs ning Sandhoffi haigusi. Mõlema haiguse korral tõuseb G<sub>M2</sub> gangliosiidide kontsentratsioon neuraalsetes lüsosoomides ja haigus võib viia isegi surmava neurodegeneratsioonini (Mark *et al.*, 2003; Lemieux *et al.*, 2006). Inimese HexA ja HexB ensüümid kristallstruktuurid on kindlaks tehtud (Mark *et al.*, 2003; Lemieux *et al.*, 2006).

Põhjalikumalt on mutatsioonanalüüsiga uuritud maisikahjurputuka *Ostrinia furnacalis Of*Hex1 valku ning avastati, et glutamaat positsioonis 328 (Glu328) ning trüptofaan 490 (Trp490) mõjutavad suurel määral katalüütilist aktiivsust ning need aminohapped on olulised substraadi sidumiseks aktiivtsentrisse, sest Glu328Ala ja Trp490Ala positsioonide mutantidel langes kordades afiinsus substraadi suhtes ja vähenes seetõttu katalüütiline efektiivsus. Ka valiinil positsioonis 327 on oluline roll, sest *Of*Hex1 seondumisel ensüümi inhibiitoriga (TMG-kitotriomütsiin), liigub Val327 isopropüülrühm vertikaalsest asendist paralleelseks Trp490-ga ning aktiivtsentri ava suureneb 7.25 Å-st kuni 8.26 Å-ni (Liu *et al.*, 2012).

Bakterist *S. plicatus* pärineva ensüümi *Sp*Hex kristallstruktuuri analüüs näitas, et GH20 perekonna ensüümidel on konserveerunud ja katalüüsiks äärmiselt olulised kaks happelist aminohapet – aspartaat (Asp246) ja glutamaat (Glu314). Nendest esimene stabiliseerib vesiniksideme moodustumisega substraati aktiivtsentrisse ja teine on prootoni doonoriks (Mark *et al.*, 1998; Mark *et al.*, 2001). Glu314 positsiooni mutatsioon glutamiiniks (Gln) vähendas  $V_{max}$  väärtust 294-kordselt ning afiinsus vähenes 7 korda (Mark *et al.*, 1998). Lisaks leiti, et arginiin 162 (Arg162) aitab substraati aktiivtsentrisse siduda, sest Arg162His mutandil suurenes K<sub>m</sub> 40-kordselt võrreldes *Sp*Hex metsiktüübiga (Mark *et al.*, 1998).

S. marcescens'i kitobiaasi SmGH20 (Prag et al., 2000) ja Flavobacterium johnsoniae Natsetüülheksoosaminidaasi FjGH20 (Mazurkewich et al., 2020) struktuuride alusel tehti kindlaks bakteriaalsete Nah-ide peamised domeenid ja aktiivtsentrit moodustavad aminohapped (vt Joonis 1). Katalüütiline domeen on  $\beta$ -ahelatest ja  $\alpha$ -heeliksitest koosneva TIM struktuuriga (TIM-barrel) ning konserveerunud on  $\beta$ -lehe struktuuriga N-terminaalne domeen (Prag et al., 2000; Mazurkewich et al., 2020). Jooniselt 1 on näha, et bakteriaalsete Nah-ide aktiivtsentrid on sarnased, kuid põhiline erinevus FjGH20 ja SmGH20 on aminohappes türosiin (Y538), mis asub FjGH20 heeliksite domeenis ning ulatub ka aktiivtsentrit ümbritsema. SmGH20 puhul on samas asukohas TIM domeenis asuv trüptofaan (W685), mille ülesandeks on seonduda N,N'-kitobioosi GlcNAc jäägiga (Mazurkewich *et al.*, 2020).



**Joonis 1.** *Flavobacterium johnsoniae N*-atsetüülheksoosaminidaasi *Fj*GH20 strukruur ja aktiivtsenter võrdlusena *Serratia marcescens*'i GH20 ensüümiga. (a) Ensüümi üldine struktuur, kus erinevad domeenid on näidatud värvidega; (b) *Fj*GH20 aktiivtsentri detailne vaade; (c) *Sm*GH20 aktiivtsenter koos *N*,*N*'-kitobioosiga (oranž). Näidatud on substraadi äratundmises ja katalüüsis olulised aminohapped. Modifitseeritud artiklist Mazurkewich *et al.*, 2020.

### 1.2. N-atsetüülheksoosaminidaaside ja nende produktide kasutusalad

*N*-atsetüülheksoosamiini katalüüsivatel ensüümidel on mitmeid kasutusalasid molekulaarses biotehnoloogias, meditsiinis, ravimitööstuses ja bioloogilises uurimistöös. Mikroobseid Nah-e saab koos kitinaasidega kasutada, et tõhusalt hüdrolüüsida kitiini sisaldavaid substraate. Produktiks on *N*-atsetüülglükoosamiin, mida on edasi võimalik kasutada fermentatsioonides ja keemiatööstuse toorainena (Slamova ja Bojarova, 2017).

Bakteriaalset päritolu *N*-atsetüülheksoosaminidaase on põhjalikult uuritud väga tähtsa füsioloogilise rolli tõttu – Nah-ide abil suudavad bakterid rakuseina valke taaskasutada, mis aitab rakkudel ressursse kokku hoida. Seentest pärinevad Nah-id osalevad kitiini metabolismis. Samuti osalevad need ensüümid seenerakkude autolüüsi protsessis, mis toimub fermenteerimise käigus. Seentes leiduvaid Nah-e seostatakse ka putukatel haiguste põhjustamisega. Kuna seente rakuseinad sisaldavad samuti kitiini, indutseerib seentega kokkupuude *N*-atsetüülheksoosaminidaaside sünteesi, luues seega efektiivse biokontrolli vahendi taimepatogeenidega võitluseks (Slamova *et al.*, 2010; Kurakake ja Amai, 2022).

Nah-i aktiivsust saab mitmetel organismidel kasutada ka määramistunnusena. Näiteks on Nahpositiivsed enamik *Candida albicans*'i ja *C. dubliniensis*'e tüvesid, kuid mitte teised pärmiliigid. See võimaldab kiirmeetodil eristada *C. albicans*'i teistest pärmidest (Niimi *et al.*, 2001).

Nah-ide transglükosüülimise produkte, näiteks piima oligosahhariidide prekursoreid, saab kasutada toidutehnoloogias prebiootiliste ja funktsionaalsete komponentidena. Lisaks võivad GlcNAc-sisaldavad molekulid olla antibiootilise, antioksüdantse või vähivastase toimega (Muschiol *et al.*, 2020).

Uurimistööks ja erinevate kasutusalade testimiseks on müügil kaks Nah preparaati. Megazyme (Iirimaa) turustab rekombinantset prokarüootset Nah-i, mille aktiivsuseks on 260 U 1 mg valgu kohta (<u>https://www.megazyme.com/beta-n-acetylhexosaminidase</u>). New England Biolabs (USA) toodab rekombinantselt *S. plicatus*'e Nah-i, mis sobib muuhulgas ka epigeneetilisteks uuringuteks, sest eemaldab O-GlcNAc-i transkriptsioonifaktoritelt, histoonidelt ja RNA-le seonduvatelt valkudelt ja on transglükosüüliv ensüüm, kuid on madala katalüütilise aktiivsusega (Visnapuu *et al.*, 2020; <u>https://international.neb.com/products/p0721-n-acetylhexosaminidase-f#Product%20Information</u>).

Hiljuti on näidatud ka seda, et Nah-e on võimalik kasutada ensüümide kromogeensete substraatide kemo-ensümaatilisel sünteesil. *Penicillium oxalicum*'i Hex (Nah) kasutati  $\alpha$ -*N*-atsetüülgalatoosaminidaasi substraadi *p*NP- $\alpha$ -GalNAc efektiivseks sünteesiks (Hronska *et al.*, 2022).

#### 2. EKSPERIMENTAALOSA

#### 2.1. Töö eesmärgid

Töö eesmärkideks oli 1) kindlaks teha bakterist Ewingella americana pärineva metsiktüüpi Natsetüülheksoosaminidaasi (EaNah20) ja selle mutantsete variantide biokeemilisi omadusi, 2) mutatsioonide hinnata valitud mõju ensüümi kineetilistele parameetritele ja temperatuuristabiilsusele ning 3) modelleerida EaNah20 3D struktuuri uuritud punktmutatsioonide asukohtade ennustamiseks.

Töö koostamiseks seatud eesmärkide täitmiseks püstitati järgmised ülesanded:

1. Heteroloogiliselt ekspresseerida *Escherichia coli* BL21(DE3) tüves N-terminaalse His<sub>6</sub>märgisega *Ea*Nah20 valk ja *Ea*Nah20 mutantsed variandid, kus punktmutatsioonid asuvad positsioonides Asp166, Pro243, Pro248;

3. Puhastada EaNah20 metsiktüüpi ja mutantsed valgud afiinsuskromatograafiaga;

4. Kindlaks teha puhastatud ensüümidel biokeemilisi parameetreid – katalüütiline aktiivsus ja efektiivsus, afiinsus ja temperatuuritundlikkus – kasutades sünteetilist kromogeenset substraati *p*NP-GlcNAc ning võrrelda saadud tulemusi algse valgu omadustega;

5. Joondada *Ea*Nah20 valgujärjestus varasemalt uuritud *N*-atsetüülheksoosaminidaaside valgujärjestustega ning *in silico* modelleerida *Ea*Nah20 3D struktuur ja ennustada uuritud mutatsioonide asukohti.

# 2.2. Materjal ja metoodika

# 2.2.1. Kasutatud bakteritüvi, plasmiidid ja transformatsioon *Escherichia coli* ekspressioonitüvesse

*N*-atsetüülheksoosaminidaas-positiivne *Ewingella americana* isoleeriti Gröönimaa mullaproovist prof. Peter Stougaardi laboris Kopenhaageni Ülikoolis (Taani). *E. americana* genoomist kloneeriti ilma N-terminaalse signaalpeptiidita Nah-i kodeeriv järjestus ekspressioonivektorisse pURI3TEV (Curiel *et al.*, 2011), mis sisaldab valgu ekspresseerimisel N-terminaalset His<sub>6</sub>-jääki kodeerivat järjestust. Bakteritüve isoleeris, identifitseeris, genoomse DNA eraldas ja *N*-atsetüülheksoosaminidaasi *Ea*Nah20 kloneeris Taani Tehnikaülikoolis T. Visnapuu. Algset *Ea*Nah20 DNA järjestust sisaldav plasmiid nimetati pURI3TEV-EaNah (Lisa 1). Valgujärjestuse konserveerunud positsioonidesse disainis punktmutatsioonid ja vastavad plasmiidid konstrueeris Taani Tehnikaülikooli järeldoktorant D. Teze. Töös kasutati mutantseid

*Ea*Nah-e kodeerivaid plasmiide pURI3TEV-EaNahD166N, pURI3TEV-EaNahP243A ja pURI3TEV-EaNahP248A.

Uuritavate valkude ekspresseerimiseks *Escherichia coli* BL21(DE3) tüves (Studier ja Moffatt, 1986) kasutati varem valmistatud kompetentseid rakke (valmistanud T. Visnapuu ja K. Ernits. Transformatsiooniks lisati keemiliselt kompetentseteks muudetud ja  $-80^{\circ}$ C hoiustatud *E. coli* BL21(DE3) 1 µl (~50 ng) plasmiidset DNA-d rakkudele ja hoiti 20 min jääl. Plasmiidse DNA rakkudesse sisenemise soodustamiseks tehti temperatuurišokk, kus temperatuur tõsteti üheks minutiks 42°C. Seejärel hoiti rakke 5 minutit jääl ning rakud pandi kasvama loksutisse 1 tunniks 1.5 ml LB vedelsöötmesse temperatuurile 37°C. Kasutatud plasmiididel on ampitsilliini (Amp) resistentsuse geen (vt Lisa 1) ning plasmiidi kandvate kolooniate selekteerimiseks plaaditi rakud kasvatamise järel 150 µg/ml Amp sisaldavale LB selektiivsöötmele ja kasvatati 20 h temperatuuril 37°C. Kasvanud kolooniad külvati edasi LB-Amp söötmeplaatidele ning plasmiidi olemasolu kolooniates kontrolliti PCR analüüsiga.

Transformatsiooni edukuse kontrolliks tehti valitud kolooniatele PCR analüüs kasutades praimereid T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') ja EaNAHRev (5'-AGCCCTGATCGTCAGTCA-3') ning Taq DNA polümeraasi. DNA fragmendi pikkuseks oli 684 aluspaari ja praimerite seondumise temperatuuriks oli 53°C. PCR-reaktsioonisegu sisaldas 1 × Taq puhvrit, 6.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.05 U/µl Taq DNA polümeraasi ja mõlemat praimerit 0.1 pmol/µl. Kolooniatest suspendeeriti rakke reaktsioonisegusse steriilse tikuga. Positiivseks kontrolliks kasutati pURI3TEV-EaNah plasmiidset DNA-d. Produktide olemasolu ja nende suurust kontrolliti elektroforeesiga 1% agaroosgeelil 0.5 × TAE puhvris. Geel sisaldas etiidiumbromiidi 0.5 µg/ml ning geelelektroforees toimus pingel 10 V/cm. DNA fragmendid visualiseeriti UV valguses.

# 2.2.2. *N*-atsetüülheksoosaminidaasi variantide ekspresseerimine *E. coli*'s, rakuekstraktide valmistamine ja valgusisalduse määramine

*Ea*Nah variante ekspresseeriti heteroloogiliselt ja puhastati analoogselt nagu on näidanud Visnapuu *et al.* (2020). Plasmiide pURI3TEV-EaNah, pURI3TEV-EaNahD166N, pURI3TEV-EaNahP243A ja pURI3TEV-EaNahP248A kandvaid *E. coli* transformante kasvatati 5 ml Amp-LB vedelsöötmes loksutil 37°C 20 h. Saadud kultuuridest tehti 10-kordsed lahjendused LB söötmesse ning mõõdeti optiline tihedus lainepikkusel 600 nm (OD<sub>600</sub>). Kultuurid külvati 200 ml Amp-LB vedelsöötmesse algtihedusega OD<sub>600</sub> = 0.05 ning kasvatati loksutil (160 pööret/min) temperatuuril 37°C ligikaudu 2.5 h kuni kultuuride OD<sub>600</sub> väärtused jäid vahemikku 0.38–0.51. *Ea*Nah variantide ekspressiooni käivitamiseks lisati kultuuridele 0.5 mM

IPTG-d (isopropüül- $\beta$ -D-1-tiogalaktopüranosiid) ning *Ea*Nah üle ekspressooniks inkubeeriti rakke loksutil 20 h temperatuuril 22°C. Rakumassi söötmest eraldamiseks kanti kultuur tuubidesse ning tsentrifuugiti 20 minutit 2400 × g, 4°C. Sööde eemaldati rakkudelt ning rakud säilitati sügavkülmas (–20°C) kuni edasiste etappideni.

Rakuekstraktide valmistamiseks külmutatud rakud sulatati ning suspendeeriti 10 ml 4°C sonikeerimispuhvris A (10 mM imidasool, 300 mM NaCl, 50 mM Na-fosafaatpuhver, pH 6.0). Rakud purustati sonikaatorit kasutades (Ultrasonic Homogenizer, Cole-Parmer, USA), kus neid töödeldi ultraheliga 10 korda 5 sekundi jooksul. Purustatud rakud tsentrifuugiti 4°C 30 min jooksul 2400 × g ja supernatant filtreeriti läbi 0.45 µm poorisuurusega süstlafiltri (Minisart NML, Sartorius, Saksamaa). Osa rakulüsaadist säilitati temperatuuril 4°C valgusisalduse ja Nah ensümaatilise akiivsuse määramiseks. Rakulüsaadist puhastati *Ea*Nah variandid nagu on näidatud peatükis 2.2.3.

Valgu kontsentratsiooni määramiseks rakulüsaatidest kasutati BCA valgu kontsentratsiooni määramise komplekti (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, USA) ja kontsentratsioonid arvutati vastava veise seerumalbumiiniga koostatud kaliibergraafiku alusel. Puhastatud valkude kontsentratsiooni määrati spektrofotomeetriliselt ekstinktsioonikoefitsiendi (ɛ) järgi mikroplaadil (NanoQuantPlate; Tecan Group Ltd., Šveits), kasutades Tecan infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd.) mikroplaadilugejat. Andmed koguti Tecan'i i-control tarkvara abil. Valgukontsentratsioonide arvutamiseks kasutati valemit  $A = \varepsilon \times C \times L$ , kus A on optiline tihedus lainepikkusel 280 nm (OD<sub>280</sub>),  $\varepsilon$  on ekstinktsioonikoefitsient,  $\varepsilon = 146790 \ 1/(M \times cm)$ , mis vastab 1 mg/ml puhul vastavalt EaNah neeldumise väärtusele 1.665, C on valgu kontsentratsioon (mg/ml) ja L on lahuse kihi paksus (cm). Sellest valemist tuleneb kontsentratsiooni arvutamise valem,  $C = A/(\epsilon \times L)$ . Ekstinktsioonikoefitsient ja EaNah arvutuslik molekulmass ExPASy ProtParam saadi programmi (https://web.expasy.org/protparam/) abil. Saadud valgukontsentratsiooni kasutati, et arvutada valgu biokeemilisi parameetreid.

#### 2.2.3. N-atsetüülheksoosaminidaaside puhastamine ja SDS-geelelektroforees

Valkude puhastamiseks kasutati vedelikkromatograafia süsteemi ÄKTAprime plus ja 1 ml Ni<sup>2+</sup>-afiinsuskromatograafia kolonne HisTrap FF (GE Healthcare Bio-Sciences, Rootsi). Valgud puhastati kasutades vastavat programmi (Affinity purification any HisTrap; vt Lisa 2) ning ühte puhastustsüklisse võeti kuni 5 ml rakulüsaati, mis oli valmistatud A puhvris (peatükk 2.2.2.). Töös ekspresseeritud *Ea*Nah variantidel on N-terminaalses otsas His<sub>6</sub>-järjestus, mis seondub kolonnis Ni-ioonidega. Valk elueeriti kolonnist kasutades puhvrit B (500 mM

imidasool, 300 mM NaCl, 50 mM Na-fosfaatpuhver, pH 6.0). Valgu ekspressiooni ning kolonnist väljunud fraktsioonides *Ea*Nah olemasolu ja sisaldust kontrolliti denatureeriva polüakrüülamiid-geelelektroforeesi abil 10% SDS-polüakrüülamiidgeelil (Sambrook *et al.*, 1989). Geelile kantud rakuekstraktid või puhastatud fraktsioonid segati võrdses mahus 2 × Laemmli puhvriga. Proove kuumutati enne geelile kandmist 5 minuti 90°C. Geelid voolutati temperatuuril 22°C 150 minuti jooksul pingel 12 V/cm Mini-PROTEAN Tetra süsteemiga (BIORAD, USA). Geelid värviti Coomassie Brilliant Blue G250 (Merck, Saksamaa) värvilahusega (250 ml etanool 96%, 200 ml vesi, 50 ml äädikhape, 1 g Coomassie Brilliant Blue) ja pesti pesulahusega (50 ml metanool, 70 ml äädikhape, 880 ml vesi). Valgu asukohta geelil hinnati valkude suurusmarkeri Protein Ladder Blue Prestained (Naxo, Eesti) valkude liikumise alusel (Lisa 2).

Uuritavat valku sisaldavad fraktsioonid liideti. Puhver vahetati säilituspuhvri vastu, mis sisaldas 50 mM Na-fosfaatpuhvrit (pH 6) ja 300 mM NaCl ning *Ea*Nah variante sisaldavad fraktsioonid kontsentreeriti tsentrifuugimisega 1 ml-ni kasutades Millipore Amicon Ultra-15 filtertuube (*molecular-weight cut-off* – MWCO 30 kDa; Merck, Saksamaa). Puhtuseastme kontrollimiseks analüüsiti valgupreparaate SDS-geelil. Valgupreparaate säilitati 4°C.

# 2.2.4. N-atsetüülheksoosaminidaaside ensümaatilise aktiivsuse määramine ja kineetiliste parameetrite kindlakstegemine

EaNah variantide ensümaatiline aktiivsus määrati spektrofotomeetriliselt mõõtes substraadist vabanenud p-nitrofenooli (pNP) hulka sarnaselt nagu on varem näidatud (Visnapuu et al., 2020). Aktiivsused mõõdeti rakulüsaatidest ekspressiooni hindamiseks, puhastatud valgupreparaatidest kineetiliste parameetrite ning temperatuuristabiilsuse määramiseks. Substraadina kasutati *p*-nitrofenüül-β-*N*-atsetüül-D-glükoosamiini (*p*NP-GlcNAc; Megazyme, Iirimaa), mille kontsentratsioon reaktsioonisegus oli tavapäraselt 1 mM. Reaktsioonid lõppmahuga 500 µl viidi läbi kahekordselt lahjendatud McIlvaine'i puhvris, pH 6.0 (63 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 18 mM sidrunhape) temperatuuril 37°C. Reaktsioonisegu sisaldas 250 µl McIlvaine'i puhvrit (pH 6.0), 150 µl milliQ vett ja 50 µl pNP-GlcNAc (10 mM alglahus). Reaktsioon algatati 50 µl EaNah variandi valgulahusega (vajadusel lahjendatud McIlvaine'i puhvris) ning registreeriti reaktsiooni toimumise aeg. Kontrollsegus oli valk asendatud 50 µl McIlvaine'i puhvriga. Reaktsioon peatati 2-5 min möödumisel 500 Μ ul 1 naatriumkarbonaadiga ning mõõdeti OD<sub>400</sub> väärtus küvetis spektrofotomeetriga (Ultrospec 3100 Pro UV/Visible Spectrophotometer, GE Healthcare Pharmacia Biotech, UK). Sobivaks mõõtevahemikuks loeti OD400 väärtusi vahemikus 0.1-0.8, kus OD400 väärtuste ja pNP kontsentratsiooni vahel on lineaarne sõltuvus. Kõigist mõõtmistest tehti vähemalt kolm tehnilist paralleeli. *Ea*Nah variantide aktiivsus väljendati reaktsiooni algkiirusena 1 minuti jooksul vabanenud *p*NP hulgana mikromoolides 1 mg valgu kohta [ $\mu$ mol/(mg × min)]. Kalibreerimiseks kasutati standardina *p*NP lahust [ $\epsilon_{400} = 18\ 000\ 1/(M \times cm)$ ] ning kalibratsiooni oli teinud T. Visnapuu (Visnapuu *et al.*, 2020).

Km EaNah variantide (kineetiline aktiveerimiskonstant) ja V<sub>max</sub> (maksimaalne reaktsioonikiirus) väärtuste arvutamiseks mõõdeti pNP vabanemise kiirust erinevatel substraadi kontsentratsioonidel. Substraadiks kasutati pNP-GlcNAc lõppkontsentratsioonidega 0.05 mM, 0.1 mM, 0.15 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, 0.4 mM, 0.5 mM, 1 mM. EaNahAsp166Asn variandi aktiivsuste määramiseks kasutati substraadi kontsentratsioone 0.8 mM, 1 mM, 1.5 mM, 2 mM. Reaktsioon käivitati valgulahuse lisamisega reaktsioonisegusse ja määramised tehti analoogiliselt temperatuuril 37°C eelpoolnäidatud metoodikale. Valgusisaldus (lõppkontsentratsioon) reaktsioonisegudes oli vahemikus 0.2-3 µg/ml. EaNahAsp166Asn variandi valgusisaldus 1 mM pNP-GlcNAc kontsentratsiooniga proovides oli 24.4 µg/ml. Iga kontsentratsioonipunkti kohta tehti vähemalt kolm paralleeli. Kineetilised parameetrid arvutati arvutiprogrammi SigmaPlot 2001 (Systat Software Inc., USA) abil, kasutades ensüümikineetika moodulit (Enzyme Kinetics Module 1.1) ja Michaelis-Menten'i võrrandit.

### 2.2.5. Temperatuuristabiilsuse määramine

Temperatuuristabiilsuse määramiseks hoiti valgulahust McIlvaine'i puhvris pH 6.0 (63 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 18 mM sidrunhape) erinevatel temperatuuridel (37, 40, 45, 50, 53, 55°C) 30 minutit, siis jahutati 5 minutit jääl. Seejärel lisati substraat *p*NP-GlcNAc ja määrati ensümaatiline jääkaktiivsus 37°C, mõõtes *p*NP tekke algkiirust nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.4. *p*NP-GlcNAc lõppkontsentratsioon reaktsioonisegudes oli 1 mM. *Ea*Nah20 algse variandi ja variandi *Ea*NahPro243Ala valgusisaldus ehk valgu lõppkontsentratsioon reaktsioonisegudes varieerus 0.2–2 µg/ml. Variant *Ea*NahPro248Ala valgusisaldus oli vahemikus 3–63 µg/ml. Erinevatel temperatuuridel määratud ensümaatilise aktiivsuse väärtuste alusel hinnati ensüümide temperatuurist sõltuvat inaktivatsiooni, mille puhul võeti 100% väärtusteks 37°C saadud *Ea*Nah variantide aktiivsused.

## 2.2.6. Arvutipõhised meetodid

Erinevatest organismidest pärinevad *N*-atsetüülheksoosaminidaasi valgujärjestused joondati Clustal Omega programmi abil (<u>https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</u>) kasutades

standardparameetreid. *Ea*Nah20 valgujärjestust võrreldi 32 sarnase aktiivsusega (EC 3.2.1.52) GH20 valguga. Joondus visualiseeriti programmiga BioEdit 7.0 (Informer Technologies, Inc., USA).

Kõige sarnasemate järjestuste leidmiseks *Ea*Nah-ile andmebaasidest kasutati BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analüüsi, kus kõrvutati *Ea*Nah20 algset aminohappelist järjestust NCBI andmebaasis leiduvate valkude järjestustega (<u>https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</u>). Võrdlusena kasutati valkude andmebaasi refsec\_select\_prot. BLAST analüüsi päring NCBI andmebaasis sooritati 18.05.2022. Lisaks mainitud andmebaasipäringule võrreldi *Ea*Nah aminohappelist järjestust ka PDB (Protein Data Bank) andmebaasi vastu, mis sisaldab kindlakstehtud kristallstruktuuridega valkude järjestusi. Päring sooritati 21.05.2022.

*Ea*Nah 3D struktuuri modelleerimiseks kasutati SWISS-MODEL veebiplatvormi (<u>https://swissmodel.expasy.org/</u>) ning aluseks võeti *Flavobacterium johnsoniae* kitobiaasi struktuur (PDB: 6YHH). Ennustatud mudeli visualiseerimiseks ja aminohapete positsioonide märkimiseks kasutati programmi PyMOL (Schrödinger LLC, USA).

PCR fragmendi pikkuse kontrollimiseks ja plasmiidide visualiseerimiseks kasutati programmi pDRAW32 ver. 1.1.143 (<u>http://www.acaclone.com/</u>).

#### 2.3. Tulemused ja arutelu

# 2.3.1. *Ewingella americana N*-atsetüülheksoosaminidaasi sarnasuse kindlakstegemine teiste *N*-atsetüülheksoosaminidaasidega ja ensüümi 3D struktuuri modelleerimine

*E. americana* on *Enterobacteriales* seltsi kuuluv proteobakter hõimkonnast *Pseudomonadota* (https://lpsn.dsmz.de/species/ewingella-americana), mis isoleeriti Gröönimaa keskkonnaproovist. Kuna see bakter hüdrolüüsis mereagari tardsöötmel kasvades aktiivselt kromogeenset Nah substraati X-GlcNAc-i, siis otsustati uurida selle bakteri Nah-aktiivsusega ensüümi. Selleks eraldati genoomne DNA, millest kloneeriti Nah-i kodeeriv järjestus ekspressioonivektorisse pURI3 (vt Lisa 1). *In silico* ennustuse alusel oli algse peremehe *Ea*Nah järjestuses N-terminaalne signaalpeptiid, siis *E. coli*'s ekspresseerimiseks kloneeriti järjestus ilma signaalpeptiidita. Tüve isoleeris ja Nah järjestuse kloneeris ning geeni sekveneeris T. Visnapuu. Vastav CAZy klassifikatsiooni alusel GH20 perekonda kuuluv valk nimetati *Ea*Nah20.

Antud töö raames sooviti välja selgitada, millised andmebaasides olevad valgud on isoleeritud *Ea*Nah20 valgujärjestusega kõige sarnasemad. BLAST analüüsil võrreldi *Ea*Nah20 järjestust olemasolevate valkudega refsec\_select\_prot andmebaasis. Kõige suurema valgujärjestuse osas identsuse määraga Nah valgud on näidatud tabelis (Tabel 2). Andmebaasi sisestati *Ea*Nah20 järjestus ilma oletusliku N-terminaalse signaalpeptiidita ja kloneerimisel lisandunud Hismärgiseta.

Tabel	<b>2</b> .	BLAST	analüüsi	alusel	NCBI	refsec	select	prot	andmebaasist	leitud	EaNah20
valgug	a ki	õige suur	ema ident	susega	järjestu	ised.					

Organism	Valgu nimetus	Andmebaasi kirje	Identsuse protsent
Ewingella americana	GH20 perekonna glükosüüli hüdrolaas	WP_034795370.1	87.5%
Rouxiella badensis	GH20 perekonna glükosüüli hüdrolaas	WP_165429821.1	82.3%
Rahnella inusitata	GH20 perekonna glükosüüli hüdrolaas	WP_213051874.1	79.2%
Rahnella victoriana	N-atsetüülheksoosaminidaas	WP_232770415.1	78.8%
Rahnella contaminans	GH20 perekonna glükosüüli hüdrolaas	WP_165058888.1	78.4%
Rahnella woolbedingensis	GH20 perekonna glükosüüli hüdrolaas	WP_120133239.1	78.1%

Tabelis 2 näidatud ensüümid on *Ea*Nah20 suhtes kõrge identsuse protsendiga, kuid nendest ei ole ühtegi ensüümi seni valgu tasemel biokeemiliselt iseloomustatud. BLAST-otsing tehti ka PDB andmebaasi suhtes, et võrrelda järjestuse identsusprotsenti teadaoleva kristallstruktuuriga ning põhjalikumalt uuritud ensüümidega. Kõige sarnasemad ensüümid EaNah20-le olid inimese lüsosoomne β-heksoosaminidaas (identsuse protsent 45.2%) ning bakteri Microbacterium sp. β-N-atsetüülheksoosaminidaas (identsus 41.6%). Samas valgujärjestuste omavaheline katvus oli väike ning esines alasid, kus valgujärjestus ei joondunud *Ea*Nah20-ga. Seega on EaNah20-ga sarnaseid N-atsetüülheksoosaminidaase vähe uuritud. Kuigi on lahendatud mitmete Nah-aktiivsusega ensüümide (sh kitobiaasid, Natsetüülglükoosaminidaasid) 3D struktuurid, siis eksperimentaalselt on mutatsioonianalüüsiga uuritud vaid mõnda neist valkudest (Mark et al., 1998; Mark et al., 2001; Liu et al., 2012). Vähem on teada ka bakteriaalsete Nah-ide omaduste ja struktuuri-funktsiooni seoste kohta (Visnapuu et al., 2020). Seega pakkus isoleeritud EaNah20 lähem uurimine huvi, et leida

võimalikke biotehnoloogilistes rakendustes kasutatavaid Nah-e ning kindlaks teha nende aktiivsust ja stabiilsust mõjutavaid tegureid.

CeHEX-4 C. elegans	8	CFLALLSVTFMLIFVLTTPYSNDRSSYAAYEGGIDPRKTRQFK-NIIVHLDLKGAPPRVEYLIEFFKLLS	76
GcnA S. gordonii	66	SAALRSGQDEVQIEEEAAYE-DL-AYMADCSRNAVLNLSSAKKMIEVLALMGYSTFE	120
BbhI B. bifidum	545	LQMTKQDANGFVIGSMRDYPRFT-TR-GLLLDVARKPV-SLEMMREITRTMRYYKMNDFQ	601
Hex99 P. piscicida	322	RQMIPTTVYKTAKNSATLSDNAVLPASTILDAPRFE-YR-GMMLDVSRNFQ-SKETVFKLLDLMAFYKLNKFE	391
Nah20A A. hydrophila	312	ISLLGVDD-KLVSQMSVEDAPRFE-YR-GMQTDVARHFR-SPETMKKLVDQMSAMKLNVLH	368
Chb S. marcescens	316	LSLVPSDGSGKIATLDASDAPRFP-YR-GIFLDVARNFH-KKDAVLRLLDQMAAYKLNKFH	373
Chb V. harveyi	310	FGLVDSQNADSLPQLSIKDAPRFD-YR-GVMVDVARNFH-SKDAILATLDQMAAYKMNKLH	367
FjGH20 F. johnsoniae	137	LQLLQNDSKRNLDALAAMKMNVFH	195
Nah20 E. americana	117	LQLLQNDGQRQLDCMAAAKLNVLH	175
Nah20A P. hydrolytica	140	LQLVNRTQRSIPAVDIDDKPRFA-WR-GLLIDSVRHFM-PVDTIKRQLRGMASAKLNVLH	196
Hex20A C. fimi	111	RQTVSSLGDGTLTVPALRVEDHPRYA-WR-GLSIDVARHFF-TVDDLKAIIGLLAHYKLNVLH	170
Hex1t Paenibacillus sp. TS12	128	LQLLPAGIEKNTVV-SGVQWVIPHSNISDKPEYE-YR-GLMLDVARHFF-TVDEVKRQIDLASQYKINKFH	194
Hex1 MK Actinomycetales	114	RQLLPAAVERRTVA-PG-PWTLPTGVLRDAPRFA-WR-GAMLDVARHFF-PVADVKRYLDLLAYYKFNVLH	179
HexA S. coelicolor A3	150	RQLLPAAVEKDSAQ-PG-PWLVAGGTIEDTPRYA-WR-SAMLDVSRHFF-SVDEVKRYIDRVALYKYNKLH	215
SpHex S. plicatus	121	RQLLPPAVEKDSAQ-PG-PWLVAGGTIEDTPRYA-WR-SAMLDVSRHFF-GVDEVKRYIDRVARYKYNKLH	186
ExoI V. furnissii	237	LQLVRPDGDNLLVPHIVIKDAPRFK-YR-GMMLDCARHFH-PLERVKRLINQLAHYKFNTFH	295
Am2301 A. muciniphila	87	RQLRDQLAGQPEGIPCGVITDKPRYP-WR-GLMVDPARHFI-PAADLKKFVDMMAYYKFNRLH	146
Hex2 MK Bacteroidetes	127	LQLLPAKLAEGSAAIPAVTITDYPRFA-WR-GMMLDVGRHFH-PVPDIKRFIDWMAFHKLNSFH	187
HexA E. histolytica	158	LQLIRISSNKFVISQLPIKISDAPRFK-WR-GLMVDPSRNPL-SPLMFKRIIDTLASVKANVLH	218
HexA H. sapiens	143	SQLVW-KSAEGTFFINKTEIEDFPRFP-HR-GLLLDTSRHYL-PLSSILDTLDVMAYNKLNVFH	202
HexA M. musculus	143	SQLVW-KSAEGTFFINKTKIKDFPRFP-HR-GVLLDTSRHYL-PLSSILDTLDVMAYNKFNVFH	202
HexB S. scrofa	150	SQLIY-QDSYGTFTVNESEIIDFPRFP-HR-GILIDTGRHFL-SVKTIFKTLDAMAFNKFNVLH	209
HexB H. sapiens	176	SQLVY-QDSYGTFTINESTIIDSPRFS-HR-GILIDTSRHYL-PVKIILKTLDAMAFNKFNVLH	235
NagA D. discoideum	130	KQLIVYNELENSYSIVCVSISDSPRYP-WR-GFMVDSARHYI-PKNMILHMIDSLGFSKFNTLH	190
AtHex1 A. thaliana	147	SQMIWGTSPDLCLPV-GIYIQDSPLFG-HR-GVLLDTSRNYY-GVDDIMRTIKAMSANKLNVFH	206
βHex C. annuum	144	SOLVYGNPTRVAA-GVYISDLPIFT-HR-GVMLDTSRNFY-GVDDLLRLIKAMSMNKLNVFH	201
Hex1 C. albicans	141	QQLIIHTS-EDKYVVPS-SVTISDFPNFK-HR-GLMIDSGRNFL-TVDSILEQIDIMALSKMNSLH	201
HexA A. oryzae	157	QQLVISDG-HGGLIIEE-PVNIKDSPLYP-YR-GIMLDTGRNFV-SLPKIFEQLEGMSLSKLNVLH	217
CpHEX1 C. posadasii	153	QQIVIFKRGRFLVEQ-PVDIKDYPLYP-VR-GIMIDTARNFI-SVKKIFEQLDGMALSKLNVLH	212
HexTF T. flavus	183	QQLVIYQDNSLIIEQ-PVHIEDSPLYP-WR-GVMIDTGRNFI-TVPKIKEQIDGMALSKLNILH	242
Hex1 D. melanogaster	188	AQLIVYDDIRREVQVTA-NATINDAPVYK-WR-GLLLDTSRNYY-SVKSIKRTLEGMALVKLNTFH	249
BmChiGlcNAcase B. mori	185	SQLIVYDDIRNNLLIVR-DVTIKDRFVYP-YR-GILLDTARNFY-SIDSIKRTIDAMAAVKLNTFH	246
Hex1 O. furnacalis	183	SQLFVFDDIRDHLLMVR-DVNISDKPVYP-YR-GILLDTARNYY-SIESIKRTIEAMAAVKLNTFH	244

**Joonis 2.** Clustal Omega veebitööriistaga joondatud ja BioEdit programmiga visualiseeritud valgujärjestuste joondus. Mustaga on märgitud muteeritud positsioon Asp166. MK tähistab ensüümi mittekultiveeritavat peremeesorganismi.

CeHEX-4 C. elegans	98	EEIRRDLHYSENDIRRIIQAAEVHNLEVIPLIQSFGHLE-FVLKKSKFMGL	147
GcnA S. gordonii	137	FRGRYTVAELQEIEDYAADFDMSFVPCIQTLAHLSAFVKWGIKEVQ	183
BbhI B. bifidum	646	EDYSISKKTFKQFIQDERALGMNVVPEIDVPAHAN-SFTKIWPELMVKGRVSPI	699
Hex99 P. piscicida	471	FLGKGWGYYTVNDFKEILQYAADRHIDVIIEYDFPAHAR-AAIKAMEHRYNKYKD-SDPVEANRFRLIDPL	539
Nah20A A. hydrophila	414	-DNQGSGFYSKADYIDLVRYAKARGVTVIPEINMPAHAR-AAVVSMEARYKRLMSEGKETEANQFRLTDPA	483
Chb S. marcescens	419	YGGFFSRQDYIDIIKYAQARQIEVIPEIDMPAHAR-AAVVSMEARYKKLHAAGKEQEANEFRLVDPT	485
Chb V. harveyi	413	-DNFGSGYFSKADYVEILKYAKARNIEVIPEIDMPAHAR-AAVVSMEARYDRIMEEGKEAEANEYRIMDPQ	482
FjGH20 F. johnsoniae	219	$ DGLYYT_{\texttt{D}} \\ \texttt{EIRNIVKYADERGILIVPEIDVPGHGS-AILTAY} PEIGSKVITLTGGTSEKNIQGTAISTYR \\ \texttt{P}EIGSKVITLTGGTSEKNIQGTAISTYR \\ \texttt{P}FFFFFFFFFF$	288
Nah20 E. americana	199	DGEFYTVEQMKEVVAYATSLGIRVVEEIDMEGHAS-AIAVAYPELISAPGPYK	251
Nah20A P. hydrolytica	220	DGLFYTQQQIREVVQYAALLGIRVVPEFDVPGHAS-AIAVAYPELITQPGPYT	272
Hex20A C. fimi	200	GPGGFYNPAQLAEIVVARAARGIRVVPEIDVPGHVN-AATHAYGDLTPSGEPTD	253
Hex1t Paenibacillus sp. TS12	2 224	GPGGYYTQEQFKDIVSYAAERYIEVIPEIDMPGHTN-AALASYGELNPDGKRKA	277
Hex1 MK Actinomycetales	209	APGGYYTQEQYADLARYAAERYITIVPEIDMPSHTN-AALASYALLNCEGEAPA	262
HexA S. coelicolor A3	245	GPGGHYTKADYEEIVRYAASRHLEVVPEIDMPGHTN-AALASYAELNCDGVAPP	298
SpHex S. plicatus	216	GPGGYYTKAEYKEIVRYAASRHLEVVPEIDMPGHTN-AALASYAELNCDGVAPP	269
ExoI V. furnissii	334	-TEKHGGFYTQEEIREVIAYAAERGITVIPEIDIPGHSR-AAIKALPEWLFDEDDQSQYDDQSQYDDQSQYDDQSQYDDQSQYDQSQYDQSQYDQSQYDQSQYDQSQY	391
Am2301 A. muciniphila	178	-GIPHEGMYTKQELKELVAYCAARGIDVIPEIDMPGHNQ-ALHAAYPEFFCFPKPDMN	234
Hex2 MK Bacteroidetes	226	-GVRYGGFYTQEQLKDVVAYAAARHITVVPEIEMPGHAA-AAIAAYPELGNTDIPGYSPK	284
HexA E. histolytica	244	ESFVLTQSFLRELAQYGANRGVIVYGEIDTPAHTA-SWNLGYPGVVANCWDYIVSWDYIVSWDYIVS	298
HexA H. sapiens	229	VTHIYTAQDVKEVIEYARLRGIRVLAEFDTPGHTL-SWGPGIPGLLTPC	283
HexA M. musculus	229	VTHIYTAQDVKEVIEYARLRGIRVLAEFDTPGHTL-SWGPGAPGLLTPCYSGSHL	283
HexB S. scrofa	235	LSHVYTPNDVRMVIEYARIRGIRVMPEFDTPGHSR-SWGKGQKDLLTPCYRKQVL	289
HexB H. sapiens	261	LSHVYTPNDVRMVIEYARLRGIRVLPEFDTPGHTL-SWGKGQKDLLTPCYSRQNK	315
NagA D. discoideum	215	PSATFSHDDIQEVVAYAKTYGIRVIPEFDIPGHAA-AWGIGYPELVATCPDYAAN	269
AtHex1 A. thaliana	232	PDMVYTPEDVSKIVQYGFEHGVRVLPEIDTPGHTG-SWGEAYPEIV-TCANMFWWPA	287
βHex C. annuum	227	NEMMYSPADVEKIVEFGMEHGVRVLPEIDMPAHTG-SWAEAYPEII-TCANMFWWPA	282
Hex1 C. albicans	226	NDEVYSKNDLKYIVDYARARGVRVIPEIDMPGHARAGWKQVDPTIV-ECADAFWT	280
HexA A. oryzae	242	PHEIYSRNDVRNIVNYARARGIRVIPEIDMPSHSSSGWKQVDPEMV-TCTDSWWS	296
CpHEX1 C. posadasii	237	RETYGPSDIRKVIEYARARGIRVVPEIDMPGHSASGWRKIDPDIV-ACADSWWS	291
HexTF T. flavus	267	PWQTYSHEDIKDIIEYARARAVRVVPEVDMPGHSAAGWQQVDPSIV-ACAHSWWS	321
Hex1 D. melanogaster	275	Q R Q V Y T R R D V A E V V E Y G R V R G I R V M P E F D A P A H V G E G W Q HK N M T - A CF N A Q P WF N A Q P M A Q P WF N A Q P WF N A Q P M A Q P WF N A Q P M A	327
BmChiGlcNAcase B. mori	272	PTKVYTKQDIREVVEYGLERGVRVLPEFDAPAHVGEGWQDTGLT-VCFKAEPW	324
Hex1 O. furnacalis	270	PQKVYTKAAIREVVRFGLERGVRVLPEFDAPAHVGEGWQDTDLT-VCFKAEPW	322

**Joonis 3.** Clustal Omega veebitööriistaga joondatud ja BioEdit programmiga visualiseeritud valgujärjestuste joondus. Mustaga on märgitud muteeritud positsioon Pro243 ja Pro248. MK tähistab ensüümi mittekultiveeritavat peremeesorganismi.

Andmebaasidest valiti 32 erinevatest organismidest pärit varem iseloomustatud GH20 Nahaktiivsusega valgu järjestust ning valkude joondamiseks kasutati Clustal Omega veebitööriista (Sievers *et al.*, 2011) ja joondus visualiseeriti BioEdit programmiga.

Joonduse alusel valiti välja teatud konserveerunud positsioonid, mille puhul tehti punktmutatsioonid neisse positsioonidesse, et asendada vastavad aminohapped. Selles töös on kasutatud *Ea*Nah20 variante, kus punktmutatsioonid asuvad positsioonides Asp166, Pro243 ja Pro248 (Joonis 2 ja 3). Vastavad plasmiidid *Ea*Nah20 variantide ekspresseerimiseks (pURI3TEV-EaNahD166N, pURI3TEV-EaNahP243A ja pURI3TEV-EaNahP248A) konstrueeris D. Teze. Nagu on näha jooniselt 2 ja 3, siis töös käsitletud mutatsioonid asuvad ennustuslike aktiivtsentri aminohapete läheduses (Arg169, Asp246) ning mutatsioonide positsioonid olid erinevate organismide Nah-ides väga konserveerunud.

Ensüümi 3D struktuuri modelleerimiseks kasutati SWISS-MODEL veebirakendust (Waterhouse *et al.*, 2018). *Ea*Nah20 ensüümi 3D struktuuri mudel koostati homodimeerse *Flavobacterium johnsoniae* kitobiaasi (*Fj*GH20) struktuuri alusel, mille valgujärjestuse identsus oli ainult 35.8%, kuid järjestuste katvus oli võrreldes teiste andmebaasis leiduvate ensüümidega oluliselt parem (0.83). *Ea*Nah20 struktuuri mudel on toodud joonisel 4.

Koostatud 3D struktuuri mudelil on näha Nah struktuurile tüüpilisi elemente: TIMpõhistruktuuri,  $\beta$ -lehte sisaldav N-terminaalne domeen ja  $\alpha$ -heeliksite kimbud (vt Joonis 1) ning struktuuril on näha mutatsioonide ennustuslikud asukohad (Joonis 4). Kõik uuritud mutatsioonid asuvad aktiivtsentri läheduses TIM-domeeni keskosas. Valgu pinnamudelil olid need aminohapete positsioonid varjatud ehk need aminohapped asuvad seega suure tõenäosusega valgu sisemuses. Positsioon Asp166 asub *Ea*Nah20 mudeli TIM-struktuuri ühe  $\beta$ -lehe otsas, Pro243 asub TIM  $\beta$ -lehel ning Pro248 asub lühikesel lingul  $\beta$ -lehe ja  $\alpha$ -heeliksi vahel (Joonis 4, Lisa 3, Lisa 4).



**Joonis 4.** *Ea*Nah20 ensüümi 3D struktuuri mudel kasutades alusena *Flavobacterium johnsoniae* kitobiaasi (*Fj*GH20) struktuuri (PDB: 6YHH\_A). Koostatud veebirakendusega SWISS-MODEL ja visualiseeritud programmiga PyMOL. Struktuursed elemendid ja töös uuritud mutatsioonid on märgitud erinevate värvidega:  $\alpha$ -heeliksid – akvamariinsinine,  $\beta$ -ahelad – lilla; lingud – beež; Asp166 – roheline, Pro243 – kollane, Pro248 – punane.

# **2.3.2.** His<sub>6</sub>-märgisega *E. americana N*-atsetüülheksoosaminidaasi variantide ekspresseerimine ja puhastamine afiinsuskromatograafiaga

*Ea*Nah20 variante ekspresseeriti kasutades plasmiide pURI3TEV-EaNah, pURI3TEV-EaNahD166N, pURI3TEV-EaNahP243A ja pURI3TEV-EaNahP248A ning *E. coli* tüve BL21(DE3) peatükis 2.2.2. näidatud kirjelduse alusel. Ekspressiooni toimumise kontrolliks kasvatati transformante LB-Amp söötmes, indutseeriti valgusüntees IPTG-ga ning valmistati indutseeritud rakkudest rakulüsaadid. Lüsaatidest võetud proovidele lisati 1 mM kromogeenset substraati *p*NP-GlcNAc ning inkubeeriti 37°C. Ensümaatilise aktiivsuse olemasolu hinnati kollase värvuse tekke (*p*NP vabanemine) järgi. Uuritud *Ea*Nah variantidel oli aktiivsus rakulüsaadis olemas. Kõige kiiremini värvus *Ea*Nah20 algne variant ja *Ea*NahPro243Ala. *Ea*NahAsp166Asn variandi aktiivsus oli minimaalne, sest segu muutus kollakaks alles peale pikemat inkubeerimist.

Ensüümid puhastati rakulüsaatidest Ni<sup>2+</sup>-afiinsuskromatograafiaga nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.3. Vastavalt afiinsuskromatograafia puhastamise käigus saadud graafikutele (Lisa 2), võeti

potentsiaalselt valku sisaldavatest fraktsioonidest 10 µl suurused proovid ning kanti need 10% SDS-polüakrüülamiidgeelile.

Fraktsioonide valimisel lähtuti sinisest graafikujoonest, mis näitab UV-piirkonnas (OD<sub>280</sub>) tuvastatud valke (Lisa 2). Fraktsioonid, mis His6-jäägiga valku sisaldasid, elueerusid imidasooli kontsentratsiooni tõstmisel ning teine piik sisaldas oodatavalt puhastatud EaNah20 valke (Lisa 2). Kokku kogumiseks ja kontsentreerimiseks valiti fraktsioonid, kus oli näha selge joon SDSgeeli vastavas piirkonnas, mis vastas EaNah20 arvutuslikule molekulmassile – 88.15 kDa (Lisa 2). Sama variandi uuritavat valku sisaldavad fraktsioonid liideti, puhver vahetati ning kontsentreeriti valgupreparaadid. Neist saadud 1 μg proove analüüsiti SDSpolüakrüülamiidgeelil ning järeldati, et saadud valgupreparaadid olid piisava puhtusastmega, et uurida nende biokeemilisi parameetreid. Joonisel 5 on näidatud SDS-geelelektroforeesil lahutatud puhastatud valkude preparaadid ning rakulüsaat. Võis järeldada, et valkude puhastamine oli tulemuslik ning saadud preparaadid on kõrge puhtuseastmega.



**Joonis 5.** SDS-polüakrüülamiidgeel puhastatud valgupreparaatidega. (1) *Ea*Nah20 algset varianti ekspresseeriva *E. coli* rakulüsaat,10  $\mu$ g; (2) puhastatud *Ea*Nah20 algne variant, 1  $\mu$ g; (3) *Ea*Nah20Asp166Asn, puhastatud 1  $\mu$ g; (4) puhastatud *Ea*Nah20Pro243Ala, 1  $\mu$ g; (5) puhastatud *Ea*Nah20Pro248Ala, 1  $\mu$ g.

*Ea*Nah20-ga, mille arvutuslik molekulmass on ligi 88 kDa, on molekulmassilt on sarnased teised bakteriaalsed Nah-id – *Bacillus* sp.  $\beta$ -atsetüülheksoosaminidaas, mille molekulmass on

90 kDa, ja *Chitinolyticbacter meiyuanensis* β-*N*-atsetüülglükoosaminidaas molekulmassiga 92 kDa (Kurakake *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020).

#### 2.3.3. N-atsetüülheksoosaminidaasi EaNah variantide biokeemilised omadused

Puhastatud *Ea*Nah20 algsest ning selle muteeritud variantidest määrati katalüüsivõime ning kineetilised parameetrid ja ensüümide temperatuuristabiisus. Kineetiliste parameetrite kindlakstegemiseks määrati pNP-GlcNAc erinevatel kontsentratsioonidel substraadi hüdrolüüsi algkiirused (ensümaatilised aktiivsused), mis väljendati vabanenud *p*NP hulgana µmoolides 1 mg valgu ja 1 minuti kohta (U/mg) (vt peatükk 2.2.4.). Preparaatide valgusisaldused tehti kindlaks nagu on näidatud peatükis 2.2.2. ja vastavateks väärtusteks saadi *Ea*Nah20 algsel variandil 5.7 mg/ml, *Ea*Nah20Asp166Asn 1 mg/ml, *Ea*Nah20Pro243Ala 4.5 mg/ml, *Ea*Nah20Pro248Ala 1.3 mg/ml.

Määratud kineetilised parameetrid on toodud Tabelis 4. Substraadina kasutati universaalset Nah-ide substraati *pNP-GlcNAc-i*, kuigi varasemates töödes on sarnaste omadustega valkude uurimiseks kasutatud ka *pNP-GalNAc-i* (Slamova ja Bojarova, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Visnapuu *et al.*, 2020). Mõlema substraadi kasutamine näitab, et ensüüm on laiema substraadispetsiifikaga. Käesolevasse töösse sai valitud *pNP-GlcNAc*, sest suurem osa iseloomustatud GH20 ensüümidest eelistab *pNP-GlcNAc-i* substraadina ning neil ensüümidel on seega tugev *N*-atsetüülglükoosaminidaasne aktiivsus (vt Tabel 1). Teistest meie grupis tehtud eksperimentidest on teada, et *Ea*Nah20 algne variant kasutab ka *pNP-GalNAc-i*, kuid oluliselt väiksema efektiivsusega. Lisaks sobivad uuritud ensüümile substraatideks ka lakto-*N*-trioos, kuid mitte kiniini oligosahhariidid. Seega ei ole selle ensüümi substraadispetsiifika lai ning tegemist on spetsialiseerunud ensüümiga.

## 2.3.3.1. Mutatsioonide mõju EaNah20 kineetilistele parameetritele

*Ea*Nah20 variantidel arvutati järgmised kineetilised parameetrid:  $V_{max}$  (maksimaalne reaktsioonikiirus),  $K_m$  (kineetiline aktiveerimiskonstant),  $k_{cat}$  (katalüütiline konstant) ja  $k_{cat}/K_m$  (katalüütiline efektiivsus). Reaktsioonisegus kasutati substraati *p*NP-GlcNAc kontsentratsioonidel 0.05–1 mM. Katseandmete põhjal visualiseeriti SigmaPlot 2001 tarkvaraga Michaelis-Menteni ja Eadie-Hofstee graafikud (Joonis 6).



**Joonis 6.** *Ea*Nah20 variantide kineetiliste parameetrite graafikud. (A) *Ea*Nah20 algse valgu Michaelis-Menten graafik; (B) *Ea*Nah20 algse valgu Eadie-Hofstee graafik; (C) *Ea*Nah20Pro243Ala Michaelis-Menten graafik; (D) *Ea*Nah20Pro243Ala Eadie-Hofstee graafik; (E) *Ea*Nah20Pro248Ala Michaelis-Menten graafik; (F) *Ea*Nah20Pro248Ala Eadie-Hofstee graafik. Igast kontsentratsioonipunktist oli tehtud vähemalt 3 tehnilist paralleeli.

Kuigi puhastati *Ea*Nah20 algne valk, *Ea*Nah20Asp166Asn, *Ea*Nah20Pro243Ala ja *Ea*Nah20Pro248Ala variandid, oli võimalik kineetilised parameetrid leida neist kolmel. *Ea*Nah20Asp166Asn aktiivsused oli võimalik määrata *p*NP-GlcNAc kontsentratsioonidel 1

mM ja 2 mM, kuid järgmiste mõõtmispunktide määramise ajaks oli valgu katalüütiline aktiivsus preparaadil juba kadunud. Vähestel substraadi kontsentratsioonidel mõõdetud aktiivsuste alusel ei ole võimalik arvutada kineetilisi parameetreid. Valku säilitati temperatuuril 4°C ning määramisi tehti 3 päeva vältel, mille jooksul *Ea*Nah20Asp166Asn täielikult inaktiveerus. See näitab, et mutatsioon Asp166 positsioonis vähendab valgu stabiilsust väga suurel määral.

Kuna 1 mM substraadi kontsentratsiooni puhul õnnestus kõigil variantidel aktiivsusi määrata, siis oli võimalik võrrelda mutatsioonide mõju katalüüsile (Tabel 3). Kui algse muteerimata variandi ja *Ea*Nah20Pro243Ala aktiivsused olid sarnases suurusjärgus, siis *Ea*Nah20Pro248Ala puhul oli aktiivsus langenud üle 20 korra ja Asp166Asn mutatsioon alandas ensüümi katalüüsivõimet testitud tingimustel üle 1200 korra, mis tõestab selle positsiooni väga suur olulisust ensüümi stabiilsuse ja reaktsioonivõime kontekstis.

Tabelis 4 on näidatud saadud kineetiliste parameetrite väärtused. *Ea*Nah20 on teiste biokeemiliselt uuritud Nah-idega võrreldes pigem suure katalüütilise aktiivsusega ja substraadi suhtes afiinne (Tabel 1). Praeguseks publitseeritud Nah-idest on kõige suurema katalüütilise efektiivsusega ja afiinsusega on bakterist *Cellulomonas fimi* pärinev Hex20, mille K<sub>m</sub> on 0.053 mM ja  $k_{cat}/K_m$  9090 (Mayer *et al.*, 2006). *Ea*Nah20-ga sarnases suurusjärgus oli merebakteri *P. hydrolytica Ph*Nah20A afiinsus (Visnapuu *et al.*, 2020), kuid *Ea*Nah20 oli sellest ensüümist oluliselt suurem katalüütiline konstant. Paljudel uuritud Nah-idel on oluliselt väiksem afiinsus substraadi suhtes ning katalüütilised efektiivsused oluliselt väiksemad (Tabel 1 ja 4), mis näitab *Ea*Nah20 rakendatavust Nah reaktsiooni läbiviimisel.

Variandil *Ea*Nah20Pro243Ala K<sub>m</sub> on veidi väiksem võrreldes *Ea*Nah20-ga, mis näitab mõningal määral efektiivsemat substraadi sidumisvõimet. *Ea*Nah20Pro248Ala variandil on K<sub>m</sub> suurem ning see valk ei seo substraati nii tugevasti. Tulemustest on näha, et *Ea*Nah20 algne variant ning *Ea*NahPro243Ala on kineetilistelt parameetritelt üsna sarnased, aga metsiktüüpi valgu maksimaalne reaktsioonikiirus ja ka katalüütiline konstant ning efektiivsus on veidi suurem. See näitab, et mutatsioon positsioonis Pro243 ei mõjuta märkimisväärselt katalüüsivõimet. Pro248Ala mutatsioon mõjutas oluliselt kineetilisi parameetreid (Tabel 4), eriti reaktsiooni maksimaalkiirust ja seega katalüütilist efektiivsust, mis oli langenud ligi 25 korda. Siit võib ka järeldada, et mida konserveerunum oli vastav aminohape vastavas positsioonis (Joonis 3, Joonis 4), seda suurem oli mutatsiooni mõju. Pro243 positsioonis esineb mõnel organismil ka alaniini ning antud mutatsioonil oli kõige väiksem mõju.

<i>Ea</i> Nah20	EaNah20 algne	<i>Ea</i> Nah20	<i>Ea</i> Nah20	<i>Ea</i> Nah20
variant		Asp166Asn	Pro243Ala	Pro248Ala
Aktiivsus (U/mg)	89.6 ± 0.531	$0.07\pm0.002$	74.4 ± 1.458	3.9 ± 0.012

**Tabel 3.** Puhastatud valkude ensümaatilised aktiivsused substraadi pNP-GlcNAckontsentratsioonil 1 mM. Näidatud on ka parameetrite standardhälbed.

**Tabel 4.** Puhastatud *Ea*Nah20 variantide arvutuslikud molekulmassid ja kineetilised parameetrid. Näidatud on ka parameetrite standardhälbed.

EaNah20 variandid	$\mathbf{M}_{\mathbf{w}}$	Vmax	Km	<b>k</b> cat	kcat/Km
	(kDa)	(U/mg)	( <b>mM</b> )	(1/s)	[1/(mg/ml) × s]
<i>Ea</i> Nah20 algne variant	88.15	122.3 ± 3.0	$0.35 \pm 0.02$	179.7 ± 2.5	507.9
EaNah20Pro243Ala	88.13	98.4 ± 2.0	$0.33 \pm 0.02$	144.5 ± 2.1	433.9
EaNah20Pro248Ala	88.13	5.6±0.5	$0.41 \pm 0.071$	8.2 ± 8.6	19.9

# 2.3.3.2. Mutatsioonide mõju temperatuuristabiilsusele

Ensüümi variantide temperatuuristabiilsuse kindlakstegemiseks kasutati metoodikat, mida on kirjeldatud peatükis 2.2.5. Peale uuritavatel temperatuuridel 30 minutit inkubeerimist mõõdeti jääkaktiivsus ning peale inkubeerimist säilinud aktiivsus temperatuuril 37°C seati 100%-le vastavaks aktiivsuseks.



**Joonis 7.** *Ea*Nah20 variantide temperatuuritaluvus. 100% märgiti vastava variandi ensümaatiline aktiivsuseks temperatuuril 37°C. Aktiivsused temperatuuril 37°C: *Ea*Nah20 algne – 45.8 U/mg; *Ea*Nah20Pro243Ala – 40.7 U/mg; *Ea*Nah20Pro248Ala – 1.45 U/mg.

*Ea*Nah20 võib pidada vastavalt saadud andmetele temperatuuri suhtes vastupidavaks ensüümiks. Joonis 7 näitab, et *Ea*Nah20 algse variandi ning variant *Ea*Nah20Pro243Ala stabiilsus erinevatel temperatuuridel on pigem sarnane. Peamine erinevus nende kahe vahel esineb temperatuuril  $50^{\circ}$ C – *Ea*Nah20Pro243Ala aktiivsus on jätkuvalt sarnane temperatuuril  $37^{\circ}$ C mõõdetud aktiivsusega, samas algse variandi aktiivsus selles punktis hakkab langema. Võib järeldada, et mutatsioon positsioonis Pro243Ala on vähesel määral isegi parandanud temperatuuristabiilsust – temperatuuril  $50^{\circ}$ C on variandil *Ea*Nah20Pro243Ala säilinud 89% aktiivsusest, aga algse järjestusega ensüümil 70.5%. Variant *Ea*Nah20Pro248Ala temperatuuritundlikkus on juba langenud temperatuuril  $45^{\circ}$ C ning inkubeerimine temperatuuril  $50^{\circ}$ C on valk juba denatureerinud ning aktiivsust enam ei tuvastatud. 50% ensümaatilist aktiivsusest säilinud temperatuuril  $46^{\circ}$ C ja temperatuuristabiilsus on seega langenud ligi 5 kraadi võrra.

# KOKKUVÕTE

*N*-atsetüülheksoosaminidaasid on ekso-aktiivsusega glükosidaasid, mis lagundavad *N*-atsetüleeritud heksoose sisaldavaid ühendeid. Bakteriaalset päritolu Nah-e ei ole väga põhjalikult uuritud ning nende ensüümide struktuuri-funktsiooni seoseid on ainult vähesel määral iseloomustatud. Neil ensüümidel võiks olla biotehnoloogilist potentsiaali ning nad võiksid leida kasutust *N*-atsetüleeritud suhkruid lagundavate ja modifitseerivate katalüüsijatena.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks oli teha kindlaks bakterist *Ewingella americana* isoleeritud *N*-atsetüülheksoosaminidaasi *Ea*Nah20 ning selle ensüümi mutantsete variantide biokeemilisi omadusi keskendudes kineetilistele parameetrite ja ensüümide temperatuuristabiilsuse kindlakstegemisele. Uuriti positsioonides Asp166, Pro243 ning Pro248 punktmutatsioonidega *Ea*Nah20 variante. Lisaks koostati arvutipõhiste meetoditega *Ea*Nah20 3D struktuuri mudel ning näidati mudelil uuritavate punktmutatsioonide asukohad.

Töö raames ekspresseeriti *E. coli*'s edukalt ja puhastati *Ea*Nah20 algne variant ning *Ea*NahAsp166Asn, *Ea*Nah20Pro243Ala ja *Ea*Nah20Pro248Ala. Saadud tulemused näitasid, et *Ea*Nah20 on katalüütiliselt aktiivne ensüüm, mille katalüütiline efektiivsus on 507.9 1/(mg/ml)  $\times$  s ning afiinsus *p*NP-GlcNAc suhtes on 0.35 mM. Kõige väiksema mõjuga ning kineetilistelt kõige sarnasem *Ea*Nah20 algsele ensüümile oli variant punktmutatsiooniga positsioonis Pro243. Kõige suuremat mõju ensüümi katalüütilisele aktiivsusele ja stabiilsusele avaldas mutatsioon Asp166Asn, mille tulemusel puhastatud valgupreparaadil vähenes aktiivsus üle 1200 korra ning ensüüm inaktiveerus mõne päeva jooksul 4°C. *Ea*Nah20 algse variandi aktiivsus säilis samadel tingimustel hoiustades mitme nädala vältel.

Punktmutatsioon Pro243Ala parandas vähesel määral *Ea*Nah20 temperatuuristabiilsust temperatuuril 50°C, kus algsel variandil oli säilinud aktiivsusest ligi 71% ja *Ea*Nah20Pro243Ala 89%. Variandil *Ea*Nah20Pro248Ala oli lisaks 25 korda vähenenud katalüütilisele efektiivsusele märkimisväärselt vähenenud temperatuuristabiilsus – temperatuuril 46°C oli ensüümil alles ligikaudu pool algsest aktiivsusest ning temperatuuril 50°C oli ensüüm täiesti inaktiveerunud.

Saadud tulemustest võib järeldada, et Pro243 muteerimine alaniiniks *Ea*Nah20 valgus ei mõjuta oluliselt katalüütilisi parameetreid ega ka ensüümi stabiilsust. Variandi *Ea*Nah20Pro248Ala kineetilised parameetrid olid võrdluses algse *Ea*Nah20-ga oluliselt muutunud: K<sub>m</sub> väärtus oli suurem, substraadi seondumine häiritud ja reaktsiooni läbiviimise võimekus vähenenud. Konserveerunud positsioonis asuval aminohappel Pro248 on seega oluline suurem mõju

31

ensüümi kineetilisele võimekusele ja stabiilsusele. Positsioon Asp166 on katalüütiliselt väga oluline ning mutatsioon selles positsioonis muudab valgu väga ebastabiilseks ning inaktiivseks, kõrgelt konserveerumist kinnitas töös koostatud Nah valgujärjestuste joondus.

# RESÜMEE

# Determination of catalytic activity and temperature stability of *N*-acetylhexosaminidase *Ea*Nah20 from *Ewingella americana* and the effect of selected mutations on its biochemical properties

**Enely Ernits** 

#### Summary

*N*-acetylhexosaminidases (Nah-s) have been discovered in nearly all organisms and have been found to exhibit a vital role in several fundamental processes. Although most of the Nah-s belong to the glycoside hydrolase family 20 (GH20), there are enzymes with comparable activity in families 3, 5, 84, 109, and 116. *N*-acetylhexosaminidases have been used to create inhibitors, in the process of controlling plant pathogens, to create functional food components, and also in the chemo-enzymatic creation of chromogenic substrates. *N*-acetylhexosaminidases hydrolyze and modify *N*-acetylated saccharides, which are vital components for example in brain gangliosides, mucins, histones, and blood type antigens as well as in chitin oligosaccharides.

While Nah enzymes are well-known for their oligosaccharide-hydrolyzing capability, some of the enzymes also have a transglycosylation activity and can produce new oligosaccharides. The most detailed research has been conducted on fungal Nah-s in comparison to bacterial enzymes. The properties of almost 200 Nah enzymes have been described, while a few dozens of 3D enzymatic structures have been researched. The aim of this study was to focus on the catalytic activity and temperature stability of bacterial *N*-acetylhexosaminidase *Ea*Nah20 originated from *Ewingella americana*, a proteobacterium from the *Enterobacteriales* order.

In addition to determining the kinetic parameters and temperature stability of *Ea*Nah20, the aim of the study was to verify the effect of selected mutations on its biochemical parameters and create a 3D structure model of the enzyme. The studied single amino acid mutations were chosen based on the alignment of *Ea*Nah20 and 32 other similar enzymes. All mutations were located near the conserved positions and were predicted to affect the catalytic ability. Chosen mutations for the study were Asp166Asn, Pro243Ala and Pro248Ala.

The results of the study confirmed the high catalytic activity of *Ea*Nah20 with catalytic efficiency 507.9  $1/(mg/ml) \times s$  and affinity 0.35 mM towards *p*NP-GlcNAc. The enzyme was stable 30 minutes up to the temperature of 50°C. Replacing aspartate in the position 166 inactivated the enzyme entirely within couple of days at 4°C. Replacing the proline by alanine in the position 248 decreased the catalytic efficiency considerably and temperature stability was

also significantly affected. The effect of the replaced proline to alanine in position 243 was slight. Based on the alignment of the proteins, the mutations in the more conserved areas had the greatest effect on the catalytic efficiency.

Compared to other described Nah-s, the *Ea*Nah20 is catalytically active and it binds to the substrate *p*NP-GlcNAc efficiently. Since the enzyme remains stable at the temperature of 50°C, it's considered to have a considerable temperature stability potentially relevant to biotechnological applications.

# TÄNUSÕNAD

Kõige suuremad tänusõnad bakalaureusetöö valmimise eest kuuluvad minu juhendajale kaasprofessor Triinu Visnapuule. Tema professionaalse ja teadmistepõhise, kuid samas ka lahke ja sõbraliku juhendamise abil omandasin rohkelt uusi teadmisi ja sain laboritöö kogemuse võrra rikkamaks. Aitäh, et sain võimaluse osaleda uurimisrühma töös ning suurim tänu panustatud aja, paindlikkuse, kannatlikkuse ja toetuse eest!

Suur aitäh kogu Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi meeskonnale.

## **KASUTATUD KIRJANDUS**

Alteen, M. G., Oehler, V., Nemcovicova, I., Wilson, I. B., Vacadlo, D. J., Gloster, T. M. (2016). Mechanism of Human Nucleocytoplasmic Hexoseaminidase D. Biochemistry, 2735-2747.

Beier, S., Bertilsson, S. (2013). Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. Front. Microbiol. 4:149.

Chen, F., Chen, X.-Z., Qin, L.-N., Tao, Y., Dong, Z.-Y. (2015). Characterization and homologous overexpression of an *N*-acetylglucosaminidase Nag1 from *Trichoderma reesei*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 459:184–188.

Chen, X., Xu, L., Jin, L., Sun, B., Gu, G., Lu, L., Xiao, M. (2016). Effcient and regioselective synthesis of  $\beta$ -GalNAc/GlcNAc-lactose by a bifunctional Transglycosylating  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase from *Bifidobacterium bifidum*. Appl. Environ. Microbiol. 82:5642–5652.

Chen, Y., Zhou, N., Chen, X., Wei, G., Zhang, A., Chen, K., Ouyang, P. (2022). Characterization of a New Multifunctional GH20 β-*N*-Acetylglucoseaminidase From *Chitinibacter* sp. GC72 and Its Application in Converting Chitin Into *N*-Acetyl Glucosamine. Front. Microbiol.

Dimond, R. L., Loomis, W. F. (1974). Vegetative isozyme of *N*-acetylglucosaminidase in *Dictyostelium discoideum*. J. Biol. Chem. 249:5628–5632.

Drouillard, S., Armand, S., Davies, J. G., Vorgias, E. C., Henrissat, B. (1997). *Serratia marcescens* chitobiase is a retaining glycosidase utilizing substrate acetamido group participation. Biochem. J. 328:945–949.

Flockenhaus, B., Kieß, M., Müller, M. C. M., Leippe, M., Scholze, H., Riekenberg, S., Vahrmann, A. (2004). The  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase of *Entamoeba histolytica* is composed of two homologous chains and has been localized to cytoplasmic granules. Mol. Biochem. Parasitol. 138:217–225.

Gutternigg, M., Rendić, D., Voglauer, R., Iskratsch, T., Wilson, I. B. (2009). Mammalian cells contain a second nucleocytoplasmic hexosaminidase. Biochem J. 419:83-90.

Heggelund, J. E., Varrot, A., Imberty, A., Krengel, U. (2017). Histo-blood group antigens as mediators of infections, Current Opinion in Structural Biology, 44:190-200.

Hronska, H., Stefuca, V., Ondrejkova, E., Blahova, M., Višnovsky, J., Rosenberg, M. (2022). Chemo-Enzymatic Production of 4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-α-D-galactopyranoside Using Immobilized β-*N*-Acetylhexosaminidase. Catalysts 12:474.

Kurakake, M., Goto, T., Ashiki, K., Suenaga, Y., Komaki, T. (2003). Synthesis of new glycosides by transglycosylation of N-acetylhexosaminidase from *Serratia marcescens* YS-1. J. Agric. Food Chem. 51:1701–1705.

Kurakake, M., Amai, Y. (2022). Characterization of a  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase with transglycosylation activity from *Metarhizium* sp. A34. J. Food Sci. 87:1466-1474.

Kurakake, M., Amai, Y., Konishi, M., Ikehira, K. (2018). Characteristics of an  $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidase from *Bacillus sp.* CH11, Including its Transglycosylation Activity. J. Food Sci. 83:1208-1214.

Lan, X., Ozawa, N., Nishiwaki, N., Kodaira, R., Okazaki, M., Shimosaka, M. (2004). Purification, cloning, and sequence analysis of  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68:1082–1090.

Lan, X., Zhang, X., Kodaira, R., Zhou, Z., Shimosaka, M. (2008). Gene cloning, expression, and characterization of a second  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72:492–498.

Lemieux, M. J., Mark, B. M., Cherney, M. M., Withers, S. G., Mahuran, D. J., James, M. N. G. (2006). Crystallographic structure of human beta-hexosaminidase A: interpretation of Tay-Sachs mutations and loss of GM2 ganglioside hydrolysis. J. Mol. Biol. 359:913-929.

Liu, T., Zhou, Y., Chen, L., Chen, W., Liu, L., Shen, X., Zhang, W., Zhang, J., Yang, Q. (2012). Structural Insights into Cellulolytic and Chitinolytic Enzymes Revealing Crucial Residues of Insect β-*N*-acetyl-D-hexosaminidase. PLoS ONE 7(12): e52225.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., Henrissat, B. (2014). The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. Nucleic Acids Res 42:D490–D495.

Mark, B. L., Mahuran, D. J., Cherney, M. M., Zhao, D., Knapp, S., Jame, M. N. G. (2003). Crystal Structure of Human  $\beta$ -Hexosaminidase B: Understanding the Molecular Basis of Sandhoff and Tay-Sachs Disease. J. Mol. Biol. 327:1093-1109.

Mark, B. L., Wasney, G. A, Salo, T. J. S., Khan, A. R., Cao, Z., Robbins, P. Z., James, M. N. G., Triggs-Raine, B. L. (1998). Structural and Functional Characterization of *Streptomyces* 

*plicatus*  $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidase by Comparative Molecular Modeling and Site-directed Mutagenesis. J. Biol. Chem. 273:19618-19624.

Mark, B. L., Vocadlo, D. J., Knapp, S., Triggs-Raine, B. L., Withers, S. G., James, M. N. G. (2001). Crystallographic Evidence for Substrate-assisted Catalysis in a Bacterial  $\beta$ -Hexosaminidase. J. Biol. Chem. 276:P10330-10337.

Mazurkewich, S., Helland, R., Mackenzie, A., Eijsink, V. G. H., Pope, P. B., Bränden, G., Larsbrink, J. (2020). Structural insights of the enzymes from the chitin utilization locus of *Flavobacterium johnsoniae*. Sci. Rep. 10:13775.

Mayer, C., Vocadlo, D. J., Mah, M., Rupitz, K., Stoll, D., Warren, R. A. J., Withers, S. G. (2006). Characterization of a  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase and a  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase/ $\beta$ -glucosidase from *Cellulomonas fimi*. FEBS J. 273:2929-2941.

Miwa, M., Horimoto, T., Kiyohara, M., Katayama, T., Kitaoka, M., Ashida, H., Yamamoto, K. (2010). Cooperation of  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. Glycobiology 20:1402–1409.

Muschiol, J., Vuillemin, M., Meyer, A. S., Zeuner, B. (2020). β-*N*-Acetylhexosaminidases for Carbohydrate Synthesis via Trans-Glycosylation. Catalysts 10:365.

Niimi, K., Shepherd, M. G., Cannon, R. D. (2001). Distinguishing *Candida* Species by  $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidase Activity. J. Clin. Microbiol. 39:2089-2097.

Nyffenegger, C., Nordvang, R. T., Zeuner, B., Łężyk, M., Difilippo, E., Logtenberg, M. J., Schols, H. A., Meyer, A. S., Mikkelsen, J. D. (2015). Backbone structures in human milk oligosaccharides: trans-glycosylation by metagenomic β-*N*-acetylhexosaminidases. Appl Microbiol Biotechnol. 99:7997-8009.

Prag, G., Papanikolau, Y., Tavlas, G., Vorgias, C. E., Petratos, K., Oppenheim, A. B. (2000). Structures of chitobiase mutants complexed with the substraate di-*N*-acetyl-D-glucosamine: the catalytic role of the conserved acidic pair, aspartate 539 and glutamate 540. J. Mol. Biol. 300:611-617.

Rauvolfová, J., Kuzma, M., Weignerová, L., Fialová, P., P<sup>\*</sup>rikrylová, V., Pišvejcová, A., Macková, M., K<sup>\*</sup>ren, V. (2004). β-*N*-Acetylhexosaminidase-catalysed synthesis of non-reducing oligosaccharides. J. Mol. Catal. B Enzym 29:233–239.

Sakabe, K., Wang Z., Hart G. W. (2010). β-*N*-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. Proceedings of the National Academy of Sciences 107:19915-19920.

Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press (NY, USA).

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., ... Higging, D. G. (2011). Fast, scalable generation of highquality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol. Syst. Biol. 7:539.

Sipione, S., Monyror, J., Galleguillos, D., Steinberg, N., Kadam, V. (2020). Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications. Front. Neurosci. 14:572965.

Slamova, K., Bojarova, P. (2017). Engineered *N*-acetylhexoseamine-active enzymes in glycoscience. Biochim. Biophys. Acta. Ge. Subj. 1861:2070-2087.

Slamova, K., Bojarova, P., Petraskova, L., Kren, V. (2010). β-*N*-Acetylhexoseaminidase: What's in a name...? Biotechnol. Adv. 28:682-693.

Slamova, K., Krejzova, J., Marhol, P., Kalachova, L., Kulik, N., Pelantova, H., Cvacka, J., Kren, V. (2015). Synthesis of Derivatized Chitooligomers using Transglycosidases Engineered from the Fungal GH20 β-*N*-Acetylhexosaminidase. Adv. Synth. Catal. 357:1941-1950.

Stanley *et al.*, 2017. Essentials of Glycobiology. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press (NY, USA).

Zhang, A., Mo, X., Zhou, N., Wang, Y., Wi, G., Chen, J., Chen, K., Ouyang, P. (2020). A novel bacterial  $\beta$ -*N*-acetyl glucosaminidase from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* possessing transglycosylation and reverse hydrolysis activites. Biotechnol Biofuels. 13:115.

Zhang, R., Zhou, J., Song, Z., Huang, Z. (2018). Enzymatic properties of  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102:93-103.

Zitta, K., Wertheimer, E. V., Miranda, P. V. (2006). Sperm *N*-acetylglucosaminidase is involved in primary binding to the zona pellucida. Mol. Hum. Reprod. 12:557-563.

Tsujibo, H., Kondo, N., Tanaka, K., Miyamoto, K., Baba, N., Inamori, Y. (1999). Molecular analysis of the gene encoding a novel transglycosylative enzyme from *Alteromonas* sp. strain O-7 and its physiological role in the chitinolytic system. J. Bacteriol. 181:5461–5466.

Visnapuu, T., Teze, D., Kjeldsen, C., Lie, A., Duus, J.O., Andre-Miral, C., Pedersen, L. H., Stougaard, P., Svensson, B. (2020). Identification and Characterization of a *N*-Acetylhexosaminidase with a Biosynthetic Activity from the Marine Bacterium *Paraglaciecola hydrolytica* S66. Int. J. Mol. Sci. 21:417.

Vitiazeva, V., Kattla, J. J., Flowers S. A., Lindén, S. K., Premaratne, P., Wijdegard, B., Sundfeldt, K., Karlsson, N. G. (2015). The O-Linked Glycome and Blood Group Antigens ABO on Mucin-Type Glycoproteins in Mucinous and Serous Epithelial Ovarian Tumors. PLOS ONE 10(6): e0130197.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., ... Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. Nucleid Acids Res. 46:W296-W303.

# KASUTATUD VEEBILEHED

BLAST kasutatud 18.05.2022, 21.05.2022 https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

CAZy külastatud 24.04.2022 http://www.cazy.org

Clustal Omega kasutatud 20.05.2022 https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/

ExPASy ProtParam kasutatud 11.05.2022 https://web.expasy.org/protparam/

Megazyme kasutatud 08.08.2021 https://www.megazyme.com/beta-n-acetylhexosaminidase

New England Biolabs kasutatud 08.08.2021 <u>https://international.neb.com/products/p0721-n-acetylhexosaminidase-f#Product%20Information</u>

SWISS-MODEL kasutatud 18.05.2022 https://swissmodel.expasy.org/

# LISAD

LISA 1

Ekspressiooniplasmiid pURI3TEV-EaNah. Plasmiidis on ampitsilliini resistentsuse geen.



# LISA 2

A: *Ea*Nah20 algse variandi puhastusgraafik. B: *Ea*Nah20 algse variandi fraktsioonidele SDSgeel, 1 – fraktsioon esimesest piigist, 2 – fraktsioon esimese piigi lõpust, 3-9 – valku sisaldavad fraktsioonid tähistatud rohelisega.



C: EaNah20Pro243Ala puhastusgraafik. D: EaNah20Pro243Ala fraktsioonidele SDS-geel, 1 – fraktsioon esimesest piigist, 2 – fraktsioon esimese piigi lõpust, 3-9 – valku sisaldavad fraktsioonid.



44

**E**: *Ea*Nah20Asp166Asn puhastusgraafik. **F**: *Ea*Nah20Asp166Asn fraktsioonidele SDS-geel, 1 – fraktsioon esimesest piigist, 2 – fraktsioon esimese piigi lõpust, 3-9 – valku sisaldavad fraktsioonid.



F





**G**: *Ea*Nah20Pro248Ala puhastusgraafik. **H**: *Ea*Nah20Pro248Ala fraktsioonidele SDS-geel, 1 – rakulüsaat, 2 – fraktsioon esimesest piigist, 3 – fraktsioon esimese piigi lõpust, 4-9 – valku sisaldavad fraktsioonid. Kõigil SDS-geelidel on rajal M suurusmarker (Protein Ladder Blue Prestained, Naxo, Eesti).



# LISA 3

Veebirakendusega SWISS-MODEL koostatud 3D struktuuri mudel *E. americana N*-atsetüülheksoosaminidaasile kasutades alusena *Flavobacterium johnsoniae* kitobiaasi (*Fj*GH20) struktuuri (PDB: 6YHH\_A).



# LISA 4

*Ea*Nah20 ensüümi 3D struktuuri mudel kasutades alusena *Flavobacterium johnsoniae* kitobiaasi (*Fj*GH20) struktuuri (PDB: 6YHH\_A). Koostatud veebirakendusega SWISS-MODEL ja visualiseeritud programmiga PyMOL. Struktuursed elemendid ja töös uuritud mutatsioonid on märgitud erinevate värvidega:  $\alpha$ -heeliksid – akvamariinsinine,  $\beta$ -ahelad – lilla; lingud – beež; Asp166 – roheline, Pro243 – kollane, Pro248 – punane.



# LIHTLITSENTS

# Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

# Mina, Enely Ernits,

- annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose *Ewingella americana N*-atsetüülheksoosaminidaasi *Ea*Nah20 katalüüsivõime ja temperatuuristabiilsuse kindlakstegemine ning valitud mutatsioonide mõju hindamine ensüümi biokeemilistele omadustele, mille juhendaja on kaasprofessor Triinu Visnapuu, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
- 2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 01.06.2023 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
- 3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
- 4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Enely Ernits **26.05.2022**