

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ÜLDISE- JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

**Bakteri *Streptomyces coelicolor* peroksüdaas ScDyPB esineb kineetiliselt
erinevate ensüümi vormidena**

Magistritöö

30 EAP

Darja Vastšjonok

Juhendajad: PhD Priit Väljamäe

PhD Jürgen Jalak

TARTU 2023

INFOLEHT

Bakteri *Streptomyces coelicolor* peroksüdaas ScDyPB esineb kineetiliselt erinevate ensüümi vormidena

Hiljuti avastatud, värvaineid lagundavad peroksüdaasid (*Dye decolorizing peroxidase*, DyP) on võimelised oksüdeerima erinevaid substraate, selahulgas ligniini ning toksilisi antrakinoon- ja asovärve, mis tingib suure huvi nende ensüümide vastu. Vaatamata sarnasustele DyP-tüüpi ensüümide katalüütilises mehhanismis ja molekulaarses struktuuris, on DyP-tüüpi ensüümide vahel täheldatud märkimisväärseid erinevusi nende kineetilistes omadustes erinevate substraatide oksüdeerimisel. Selles töös uuriti ensüümi ScDyPB katalüütilisi omadusi mudelsubstraadi ABTS oksüdeerimise näitel. Leiti, et ensüüm esineb erinevate kineetiliste omadustega vormidena millede osakaal sõltus nii ensüümi kontsentratsioonist kui ka keskkonna pH-st.

Märksõnad: DyP-tüüpi peroksüdaas, *Streptomyces coelicolor*, ABTS, H₂O₂, oligomeer

CERCS: P310; Proteiinid, ensümolooogia

The peroxidase ScDyPB of the bacterium *Streptomyces coelicolor* exists as kinetically different enzyme forms

Recently discovered Dye decolorizing peroxidases (DyP) have shown activity in the oxidation of a wide spectrum of substrates, including lignin and toxic anthraquinone and azo dyes, which has generated great interest in these enzymes. Despite similarities in the catalytic mechanism and molecular structure of DyP-type enzymes, significant differences have been observed in their catalytic properties of the oxidation of different substrates. This study investigates the catalytic properties of the novel DyP-type heme peroxidase ScDyPB, derived from *Streptomyces coelicolor*, on the model substrate ABTS. We found that the enzyme existed in kinetically different forms, the relative abundance of which was dependent on the concentration of the enzyme as well as on the pH

Keywords: DyP-type peroxidase, *Streptomyces coelicolor*, ABTS, H₂O₂, oligomer

CERCS: P310; Proteins, enzymology

SISUKORD

1. Kirjanduse ülevaade.....	8
1.1. Heem-peroksüdaasid.....	8
1.2. DyP-tüüpi peroksüdaasid	9
1.2.1. DyP-tüüpi ensüümide levik, fülogenees ja füsioloogiline roll	10
1.2.2. DyP-tüüpi ensüümide molekulaarne struktuur	13
1.2.3. DyP-tüüpi ensüümide katalüütiline mehhanism.....	17
1.2.4. DyP-tüüpi ensüümide substraadid ja nende seostumiskohad	19
1.3. Bakteri <i>Streptomyces coelicolor</i> DyP-tüüpi peroksüdaas ScDyPB.....	21
2. Eksperimentaalosa	24
2.1 Töö eesmärgid.....	24
2.2 Materjalid ja meetodikad	24
2.2.1 Materjalid	24
2.2.2 Ensüümi ScDyPB kontsentratsiooni määramine	24
2.2.3 ScDyPB ensüümataolise aktiivsuse mõõtmine.....	25
2.2.4 Vahelahjenduse tingimuste mõju ScDyPB aktiivsusele	26
2.2.5 ScDyPB näilise molekulmassi määramine geelfiltratsioonkromatograafia abil... 26	
2.3 Tulemused	27
2.3.1 Katsetingimuste optimeerimine ScDyPB kineetika uuringuteks.....	27
2.3.2 Ensüümi kontsentratsiooni mõju ABTS oksüdeerimise kiirusele	28
2.3.3 ABTS oksüdeerimise kiiruse sõltuvus ABTS ja H ₂ O ₂ kontsentratsioonidest	31
2.3.4 ScDyPB inaktivatsioon H ₂ O ₂ poolt	36
2.3.5 ScDyPB näilise molekulmassi määramine	39
2.3.6 ScDyPB erinevate vormide vahelise tasakaalu tekkimine.....	41
2.4 Arutelu.....	43
3. Kokkuvõte	47
4. Summary	49
5. Kirjanduse loetelu	52
6. Kasutatud veebiaadressid	59

7. Lihtlitsents.....60

KASUTATUD LÜHENDID

ABTS - 2,2'-azinobis [3-etiülbensotiasoliin-6-sulfoonhape]-diammoonium sool (*2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt*)

BSA - veise seerumi albumiin (*Bovine Serum Albumin*)

CDE - Cld -, värvaineid lagundavate peroksüdaaside - ja EfeB-taoliste valkude superperekond (*Cld-family, dye-decolorizing peroxidase and EfeB-like proteins superfamily*)

Cld - kloritdismutaas (*Chlorite dismutase*)

Cpd I / II - *Compound I / II*

DyP - värvaineid lagundav peroksüdaas (*Dye decolorizing Peroxidase*)

HRP - mädarõika peroksüdaas (*Horseradish peroxidase*)

LiP - ligniin-peroksüdaas (*Lignin peroxidase*)

MnP - mangaan-peroksüdaas (*Manganese peroxidase*)

NaAc - naatriumatsetaat

ScDyPB - värvaineid lagundav peroksüdaas organismist *Streptomyces coelicolor* (*DyP-type peroxidase from Streptomyces coelicolor*)

SISSEJUHATUS

Peroksüdaasid on looduses laialt levinud ensüümid, mis katalüüsivad reaktsioone, milles erinevad substraadid oksüdeeritakse vesinikperoksiidi toimele. RedOxiBase andmebaasi järgi jagatakse peroksüdaasid heem- ja mitte heem-peroksüdaasideks, millest esimesed on katalüüsivõimelised vaid heemiga seostatuna. Selles töös uuritav peroksüdaas kuulub hiljuti avastatud heem-peroksüdaaside superperekonda nimega *Dye decolorizing Peroxidase* (DyP) ehk värvaineid lagundavad peroksüdaasid (Kim & Shoda, 1999).

DyP-tüüpi peroksüdaasid kuuluvad fülogeneetilise analüüsi järgi peroksüdaas-kloritdismutaaside superperekonda (Zámocký et al., 2015). Struktuurse klassifikatsiooni kohaselt kuuluvad need dimeersete $\alpha + \beta$ -tüüpi superperekonda ning omavad DyP-tüüpile spetsiifilist ferredoksiini-taolist volti (SCOP andmebaas). DyP-tüüpi ensüümid jagunevad omakorda klassidesse A, B, C ja D nende primaarse järjestuse ja topoloogia järgi (PerOxiBase andmebaas), kusjuures klassidesse A – C kuuluvad esindajad on peamiselt bakteriaalse päritoluga ning klassi D kuuluvaid ensüüme produtseerivad vaid seened (Ahmad et al., 2011). Teistest heem-peroksüdaasidest eristab DyP-tüüpi ensüüme ühelt poolt ainult nende iseloomulik molekuli üldine struktuur, aga teisalt ka nende katalüütilises tsentris esinev konserveerunud motiiv GXXDG (Ogola et al., 2009; Sugano, 2009). DyP peroksüdaasid on aktiivsed nii monomeeridena kui ka oligomeeridena (Duan et al., 2018; Johjima et al., 2003; Kim & Shoda, 1999; Liers et al., 2013; Sugawara et al., 2017). On täheldatud, et DyP-tüüpi peroksüdaaside kvaternaarsed struktuurid varieeruvad laialdaselt nii erinevate klasside esindajate vahel kui ka ühe klassi sees (Liu et al., 2011, 2017; Ogola et al., 2009; Shrestha et al., 2016; Zubieta, Joseph, et al., 2007; Zubieta, Krishna, et al., 2007; Yoshida et al., 2016).

Praeguseks on teada, et mõned B-klassi kuuluvad peroksüdaasid transporditakse rakust välja nanopartiklitesse enkapsuleerituna, millele viitab nende C-terminaalses osas leitud spetsiifiline järjestus ning peremeesorganismi genoomis paiknemine enkapsuliini kodeeriva geeniga *encap* ühes operonis (Sutter et al., 2008). DyP-tüüpi ensüümide enkapsuleerimine korreleerub peremeesorganismide patogeensusega aga ka võimega lagundada ligniini (Lien et al., 2021; Rahmanpour & Bugg, 2013). Kuigi enamiku DyP-tüüpi ensüümide looduslikud substraadid pole siiani teada, on need peroksüdaasid võimelised katalüüsima paljude erinevate ühendite oksüdatsiooni (Brown et al., 2012; Roberts et al., 2011; Scheibner et al., 2008).

Tekstiilitööstuses laialt kasutatavad sünteetilised värvained on oma struktuuri tõttu halvasti biolagunevad ning neid sisaldava reovee puhastamine hõlmab tavaliselt füüsikalisi ja/või keemilisi meetodeid. Sageli on need meetodid tagasihoidliku efektiivsusega ning ka loodusele kahjulikud, tekitades mürgiseid kõrvalprodukte ning kasutades palju energiat (Kim & Shoda, 1999). Ligniin on puidul põhinevas keemiatööstuses hinnaline toormaterjal, mille lagundamine väärtuslike produktide saamiseks on raskendatud molekuli tõrksa struktuuri tõttu (Pupart et al., 2023). Hetkel on DyP-tüüpi ensüümid teadlaste huvifookuses just nende võime tõttu lagundada sünteetilisi värvaineid ja ligniini (Pupart et al., 2023; Sugano et al., 2009).

Magistritöö raames uurin uut, bakterist *Streptomyces coelicolor* pärineva DyP-tüüpi perekonna B-klassi kuuluva heem-peroksüdaasi *ScDyPB* katalüütilisi omadusi mudelsubstraadi ABTS oksüdeerimisel.

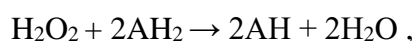
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Heem-peroksüdaasid

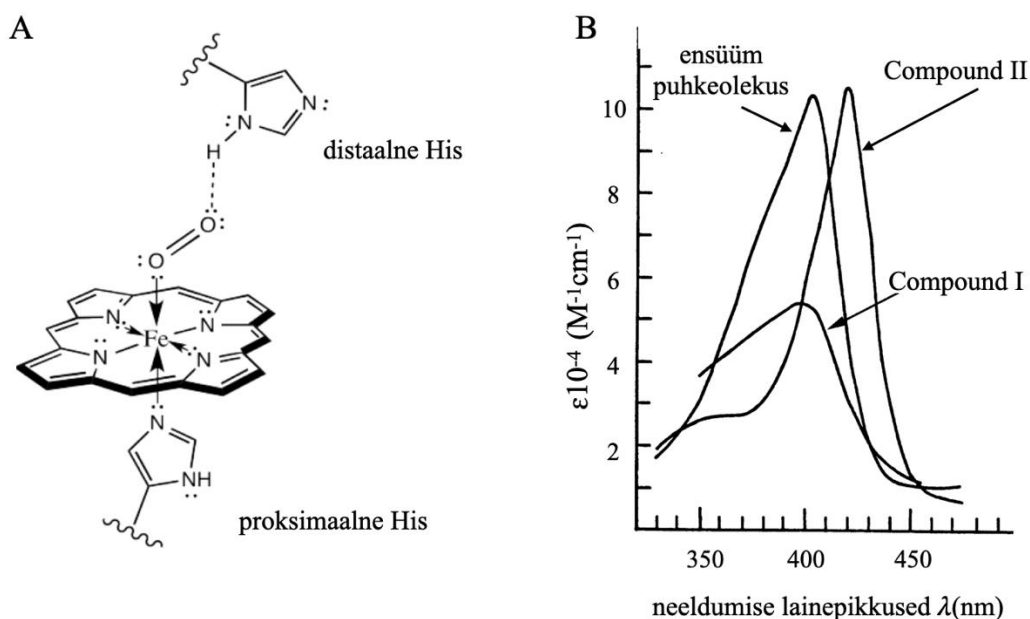
Metalloporfüriine kasutatavad väga erinevad organismid laialdaselt kogus biosfääris, ning nendest kõige levinum on heem (raud protoporfüriin IX, Joonis. 1A). Heemideks nimetatakse komplekse, milles heterotsüklilise orgaanilise molekuli - porfüriini - keskele on koordineeritud rauaioon. Porfüriin on planaarne molekul, mis koosneb neljast aromaatselt pürrooli tsüklist, ning moodustab Fe(II) või Fe(III) iooniga neli koordinatiivset sidet. Olles seotud valgumolekuliga (nt. hemoglobiin), moodustab porfüriini keskel paiknev rauaioon lisaks veel ühe või kaks teljesuunalist (aksiaalset) sidet (Joonis 1A). Valgumolekule, mis on võimelised siduma heemi, nimetatakse üldistavalt heem-proteiinideks. Heemi bioloogilisteks funktsioonideks on näiteks O₂ sidumine ja transport organismis või inter- ja intramolekulaarne elektronide transport mitokondriaalsel hingamisel, mille näiteks on seente tsütokroom c peroksüdaas (Poulos, 2014). Tulenevalt heemi omadusest neelata tugevalt valgust 400 nm lainepikkuse piirkonnas (Joonis 1B) on heemi sisaldavad valgud punase värvusega.

Samuti mängib heem olulist rolli mitmete ensüümide katalüütilises aktiivsuses olles nende kofaktoriks. Need redoksaktiivsed ensüümid, nagu oksüdaasid, peroksüdaasid, oksügenaasid ja peroksügenaasid, on katalüüsivõimelised vaid siis, kui nendele on seostunud (kas kovalentselt või mitte) heemi prosteetiline rühm, mis tähendab holoensüümse vormi moodustamist.

Heem-peroksüdaasid on olnud bioloogide huvi fookuses juba alates 19.sajandist suuresti tänu nende laiale levikule looduses, suhteliselt lihtsale puhastamisele ning kergesti määratavatele produktidele, mis on tihti värvilised ja seega palja silmaga detekteritavad (Poulos, 2014; Wever & Krenn, 1990). Esimesena kirjeldati mädarõika peroksüdaasi (HRP) aastal 1903, millest on saanud klassikaline heem-peroksüdaasi näide (Poulos, 2014). Peroksüdaases reaktsioonis kasutab ensüüm selle koosseisus asuva heem b molekuliga seotud rauaiooni, et kanda üle elektronid substraadimolekulilt (elektronide doonor) vesinikperoksiidile (elektronide aktseptor), mille tulemusena tekib kaks veemolekuli. Oksüdeeritavateks substraatideks võivad sellistes reaktsioonides olla nii orgaanilised- kui ka anorgaanilised elektronide doonorid ning üldine katalüüsitud reaktsioon vastab skeemile:



kus AH_2 on elektronide doonor ja AH on oksüdeeritud reaktsiooniprodukt. Reaktsiooni käigus vesinikperoksiid redutseeritakse veeks (Wever & Krenn, 1990).



Joonis 1. Heemi ehk raua protoporfüriin IX struktuur (A) ja neeldumisspekter (B). Paneelil A on klassikalise taimeperoksüdaasi heemiõõnsuses paiknev porfüriini markotsükel koos sellega seotud pentakoordineeritud rauaiooniga (<https://chem.libretexts.org/>). Proksimaalne histidiin esineb nii taime- kui ka DyP tüüpi heem-peroksüdaasides ning moodustab rauaiooniga viienda, aksiaalse, koordinatiivse sideme. Klassikalistes taimede heem-peroksüdaasides leiduv distaalne histidiinjääk on DyP-tüüpi peroksüdaasides asendatud katalüütiliselt aktiivse asparagiinhappejäägiga. Paneelil B on määrõika peroksüdaasi neeldumisspektrid, kus on näha heemiga seotud ensüümidele iseloomulikke piike lainepikkuse 400 nm juures. Kujutatud on ensüümi katalüütilises tsüklis esinevate olekute neeldumisspektrid: reaktsiooni astub ensüüm puhkeolekus, seejärel toimuvate substraatide oksüdeerimisel tekivad ensüümi vahetvormid *Compound I* ja *Compound II*, mille järel ensüüm naaseb puhkeolekusse ning tsükel saab alata uuesti. $\epsilon(10^{-4}M^{-1}cm^{-1})$ on ekstinktsioonikoefitsient (Poulos, 2014)

Alates esimese värvainet lagundava heem-peroksüdaasi (*Dye decolorizing Peroxidase* e. DyP) kirjeldamisest aastal 1999 sai selgeks, et varem kasutatud klassifikatsioon nende ensüümide päritolu järgi ei ole piisav kirjeldamiseks nende ensüümide molekulaarsete struktuuride, füsioloogiliste funktsioonide ja katalüütiliste mehhanismide mitmekesisust.

1.2. DyP-tüüpi peroksüdaasid

DyP-tüüpi peroksüdaase leidub kõikides eluslooduse domeenides: enamus neist sünteesitakse bakterites, väiksem osa aga pärineb eukarüootidest (seened), arhedest ja viirustest. Taimedest

ja loomadest neid senimaani leitud ei ole (InterPro andmebaas). Valgumolekuli struktuurse klassifikatsiooni järgi kuuluvad DyP-tüüpi peroksüdaasi-laadsed ensüümid $\alpha + \beta$ proteiinide klassi, dimeersete $\alpha + \beta$ -tüüpi superperekonda ning omavad spetsiifilist ferredoksiini-taolist volti (SCOP andmebaas).

Aastal 1999 puhastasid ja kirjeldasid Kim ja Shoda heem-proteiini, millel nad täheldasid peroksüdaasi aktiivsust, ning mis oli võimeine lagundama sünteetilisi värvaineid, nad nimetasid selle ensüümi DyP-ks (ingl. *Dye decolorizing Peroxidase*) (Kim & Shoda, 1999). Hiljuti avastatud peroksüdaas oli algselt klassifitseeritud kui klassikaline taimeperoksüdaas, kuid kaheksa aastat hiljem määratlesid Sugano jt seenest *Bjerkandera adusta* Dec 1 pärit DyP ensüümi uudsesse, DyP-tüüpi peroksüdaaside perekonda kuuluvaks, millega tunnistati see ensüüm teistest teadaolevatest taimeperoksüdaasidest erinevaks (Sugano, 2009; Sugano et al., 1999). See ümberklassifitseerimine põhines substraadi spetsiifilisusel, valgumolekuli tertsiaarsel struktuuril ja selle primaarse struktuuri järjestuse homoloogia puudumisel klassikaliste taimeperoksüdaasidega.

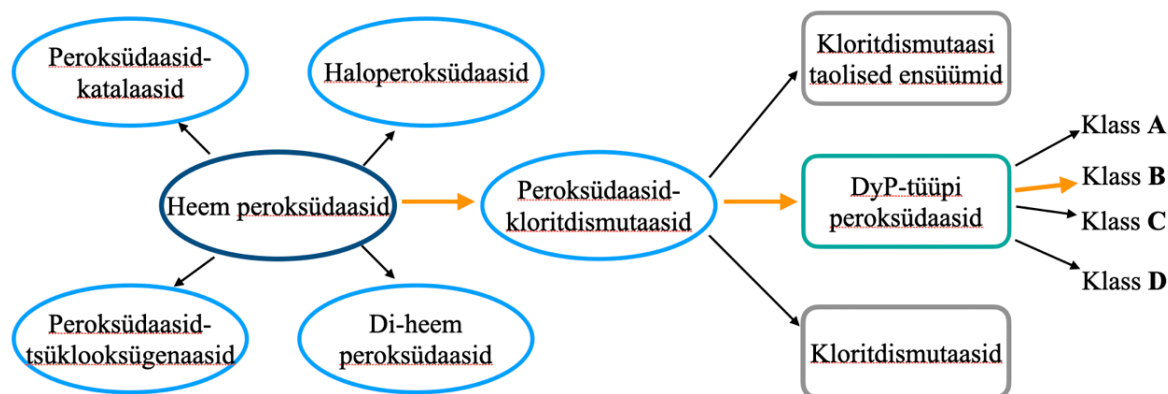
1.2.1. DyP-tüüpi ensüümide levik, fülogenees ja füsioloogiline roll

Uute bioinformaatiliste andmetöötlusriistade tulekuga 2000-ndatel sai võimalikuks lihtsalt ja kiiresti analüüsida erinevate organismide geenijärjestusi ja valkude primaarjärjestusi. Aastal 2011 viisid Ahmad jt läbi struktuuripõhised järjestuste joondused, milleks kasutasid kõiki PeroxiBase andmebaasis selleks ajaks avaldatud järjestusi ja kirjandusest leitud DyP-tüüpi kuuluvate ensüümide perekonna järjestusi, ning mille tulemusena täiendasid nad selleks ajaks PeroxiBase-is eksisteerivat DyP-tüüpi ensüümide jagunemist klassidesse A, B, C ja D. (Ahmad et al., 2011; Ogola et al., 2009; Sugano, 2009)

Selle klassifikatsiooni põhiselt on klassidesse A, B ja C kuuluvad ensüümid valdavalt bakteriaalse päritoluga, aga D klassi esindajaid sünteesivad ainult seened (Ahmad et al., 2011; Ogola et al., 2009). Vaatamata sellele, et hiljem on välja pakutud DyP-tüüpi ensüümide grupeerimine klassidesse I, P ja V, lähtun mina oma töös Yoshida ja Sugamo klassifikatsioonist (klassid A, B, C ja D), kuna selle süsteemi järgi on grupeeritud värvaineid lagundavad peroksüdaasid RedoxiBase elektroonilises andmebaasis (Savelli et al., 2019).

Samal ajal publitseeritud töös uurisid Zámocký jt nelja heem-peroksüdaasi struktuurse superperekonna (peroksüdaas-katalaas, peroksüdaas-tsüklooksügenaas, peroksüdaas-kloritdismutaas ja peroksüdaas-peroksügenaas superperekond) evolutsiooni, kus nad kasutasid

aminohappeliste järjestuste klasterdamist ning lisaks võtsid arvesse ka uuritavate ensüümide tertsiaarseid struktuure (nt aktiivtsentri/heemiõõnsuse ehitus, erinevate sekundaarstruktuuride olemasolu) ja nende ensümaatilist aktiivsust.



Joonis 2. Heem-peroksüdaaside superperekondade evolutsioon. Põhjaliku ensüümide struktuuride analüüsi tulemusena pakutud heem-peroksüdaaside superperekonda kuuluvate ensüümide jagamine perekondadesse. Joonisel on välja toodud jagunemine alamperekondadesse ainult peroksüdaas-kloritdismutaaside korral, ning jagunemine klassidesse on täpsustatud ainult DyP-tüüpi ensüümide korral. (Kohandatud: Chen & Li, 2016)

Zámocký ja kolleegid pakkusid välja DyP-tüüpi ensüümide perekondade fülogeneetilise klassifikatsiooni, mille järgi need kuuluvad peroksüdaas-kloritdismutaaside superperekonda koos klassikaliste kloritdismutaasidega ning nende kahe perekonna vahelülks peetava kloritdismutaaside-sarnaste valkude perekonnaga (Joonis 2). Klassifitseerimise aluseks võeti valgumolekuli heemperoksüdaasse aktiivsusega domeeni struktuur, mis on iga superperekonna puhul ainulaadne. (Zámocký et al., 2015)

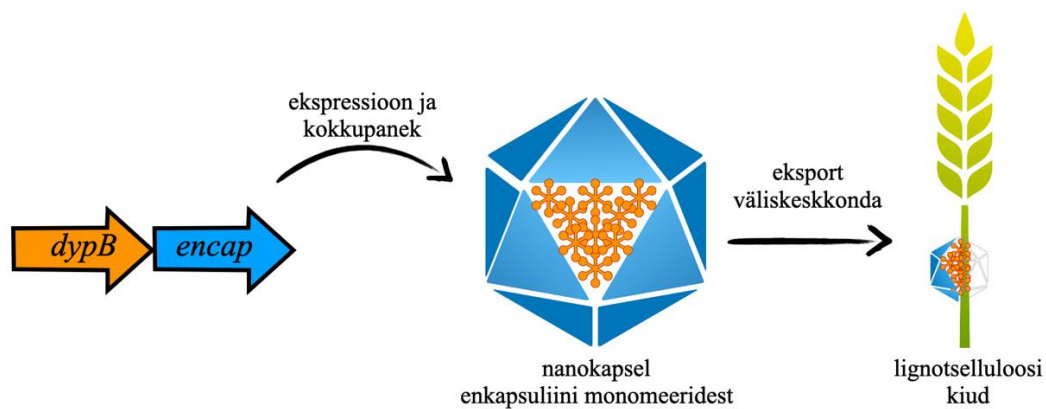
DyP-tüüpi ensüümide esindajaid leidub enamasti lihtsamates organismides nagu bakterid ja seened, mis esinevad erinevates muldades ning ligniini- ja tselluloosirikastes ökosüsteemides. Nende ensüümide täpsed füsioloogilised rollid on seni ajani teadmata, ehkki vastust sellele küsimusele on otsitud alates esimese DyP tüüpi ensüümi kirjeldamisest aastal 1999. Teadaolevate *dyp*-geenide järjestuste määramine, operoniliste kontekstide analüüsimine ning DyP-tüüpi ensüüme produtseeritavate organismide uurimine on näidanud, et DyP peroksüdaasid toimivad erinevates tingimustes, sealhulgas intratsellulaarses-, periplasmaatilises- ning rakuvälises keskkonnas. (Ahmad et al., 2011; Pupart et al., 2023; Sugano & Yoshida, 2021)

Klassi A kuuluvatel DyP-tüüpi ensüümidel on molekuli N-terminaalses osas Tat-signaaljärjestus, mis viitab nende funktsioneerimisele periplasmas gram-negatiivsete bakterite

puhul, või rakuvälises keskkonnas gram-positiivsete bakterite puhul (Petrus et al., 2016; Sturm et al., 2006; van Bloois et al., 2010; van der Ploeg et al., 2011). Nende oletatavad füsioloogilised rollid on raua- ja vaseioonide transport bakterirakku, reaktiivsete hapnikuühendite detoksifitseerimine, ligniini lagundamine koostöös teiste ensüümidega, mangaani oksüdeerimine ning deferrokelaatsioon (heemist raua hõivamine ilma tetrapürrooli skeleti hävitamiseta). (Létoffé et al., 2009; Maurer et al., 2005; Miethke et al., 2013; Petrus et al., 2016; Rahmanpour & Bugg, 2015; Sturm et al., 2006)

Vaatamata sellele, et DyP-tüüpi ensüümide klasside B, C ja D esindajatel puudub Tat-signaaljärjestus, ei pruugi nende füsioloogilised rollid olla seotud vaid rakusisese keskkonnaga. Klassi B esindajatel on tuvastatud C-terminaalses osas paiknev konserveerunud aminohappeline järjestus, mis interakteerub bakterite sünteesitud ja väliskeskkonda sekreteeritavate kapslite (*encapsulin nanocompartment*) sisepinnaga (Sutter et al., 2008). Lisaks on enkapsuliini kodeerivad järjestused tuvastatud mitmete B-klassi kuuluvate ensüümidega samades operonides, mis viitab nende valgumolekulite enkapsuleerimisele ja eraldamisele väliskeskkonda (Contreras et al., 2014; Rahmanpour & Bugg, 2013). Sellisel DyP-tüüpi ensüümide pakkimisel eksporditavate kapslites sisse on täheldatud seos ligniini degradatsiooni efektiivsuse parandamisega (Joonis 3) ja bakteri patogeensuse suurenemisega (Lien et al., 2021; Rahmanpour & Bugg, 2013). B-klassi kuuluvatel ensüümidel on samuti täheldatud selliseid biokeemilisi funktsioone nagu mangaani oksüdeerimine, ligniini transformeerimine ja defferokelataasne aktiivsus (Ahmad et al., 2011; Brown et al., 2012; Shrestha et al., 2017).

Kõige vähem on kirjeldatud C-klassi DyP-tüüpi peroksüdaase. Oletatakse, et nende võimalik bioloogiline roll on ligniini lagundamisel osalevate mangaan-peroksüdaaside (MnP) ja mitmekülgsede peroksüdaaside (*versatile peroxidase*) poolt tekitatud liigse mangaani eemaldamine (Brown et al., 2012; Duan et al., 2018; Fernández-Fueyo et al., 2015). D-klassi kuuluvaid DyP peroksüdaase on aga vastupidiselt eelmise klassi esindajatele uuritud kõige rohkem. Ekstratsellulaarse proteoomi analüüsid viitavad selle klassi ensüümide eritamisele väliskeskkonda pärmide kasvamisel lignotselluloosi sisaldavatel materjalidel (Fernández-Fueyo et al., 2015). Lisaks peroksüdatiivsele aktiivsusele on täheldatud ka oksüdatiivset aktiivsust ning võimet lagundada taimede poolt produtseeritud seenevastaseid ühendeid (Lauber et al., 2017; Sugawara et al., 2019).

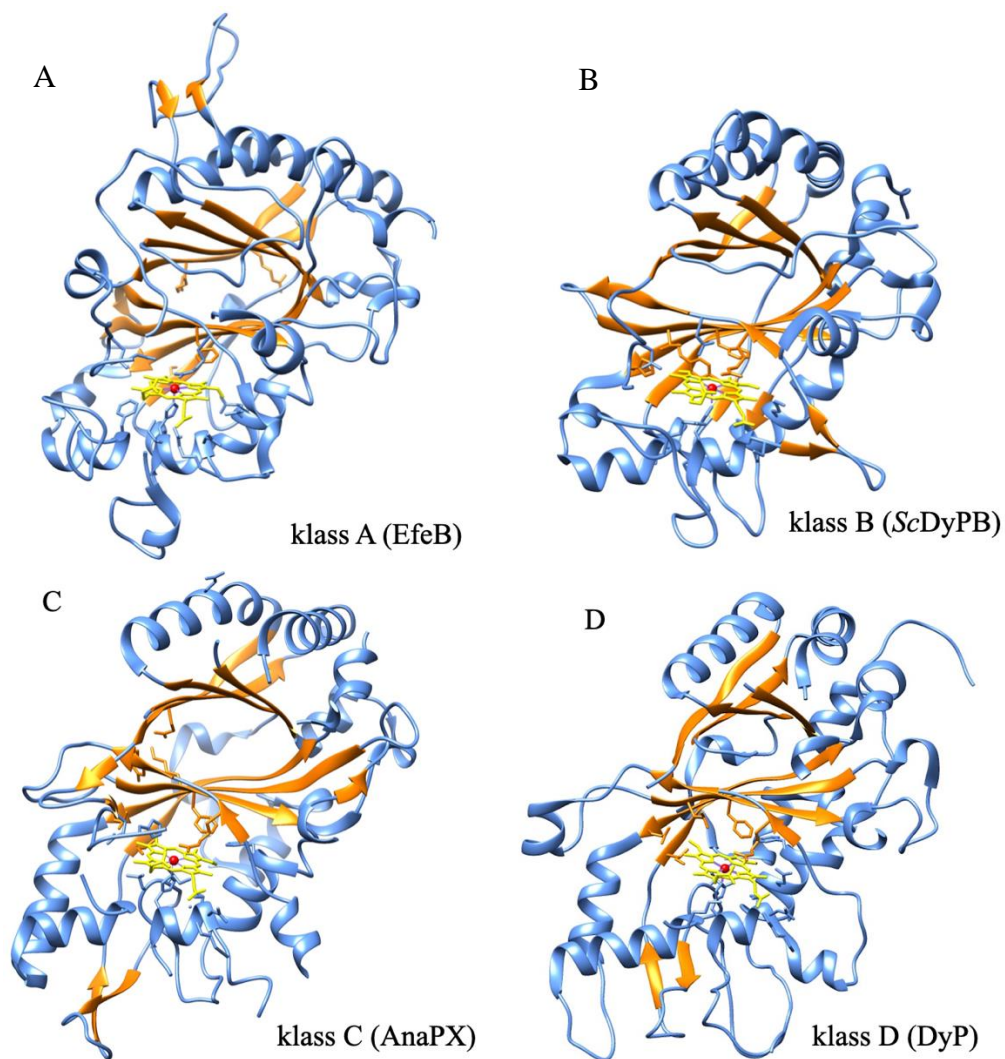


Joonis 3. DyP-tüüpi ensüümi enkapsuleerimine tõhustab selle võimet lagundada ligniini. Joonisel on bakteri *Rhodococcus jostii* B-klassi kuuluv DyP-tüüpi peroksüdaas. Bakteri genoomis paikneb teda kodeeriv geen samas operonis koos enkapsuliini kodeeriva geeniga. Enkapsuliini monomeeridest moodustuvad bakterirakus nanokapslid, mille abil transporditakse samaaegselt koos enkapsuliiniga ekspresseeruv DyP peroksüdaas rakust välja. Katsed on näidanud märkimisväärset aktiivsuse langust ligniini lagundamisel juhul, kui *encap* geeni ekspressioon on häiritud. *dypB* - DypB ensüümi kodeeriv geen, *encap* - valgu enkapsuliini kodeeriv geen. (Kohandatud: Rahmanpour & Bugg, 2013)

Tänase päevani ei ole lõplikult selge, mis on DyP-tüüpi ensüümide looduslikeks substraatideks, ja seega on ebaselge ka nende ensüümide täpne funktsioon. Täheldatud on nende ensüümide võimet lagundada väga laia spektrit substraate, k.a. ligniini ja sünteetilisi värvaineid, ning sellest tulenevalt pakub DyP-tüüpi ensüümide detailsem uurimine suurt huvi eeskätt nende potentsiaalse rakendamise tõttu tööstuses.

1.2.2. DyP-tüüpi ensüümide molekulaarne struktuur

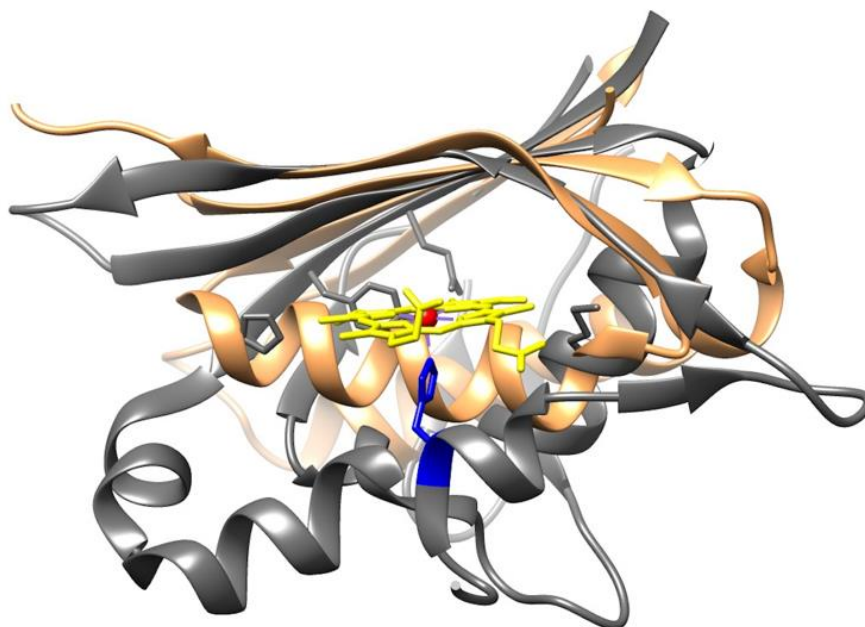
Ensüümidel, mis kuuluvad DyP-perekonna erinevatesse klassidesse (A, B, C ja D), on märkimisväärselt erinev primaarne järjestus, kuid nende üldine struktuurne topoloogia on kõrgelt konserveerunud ning on säilinud kõikidel selle perekonna esindajatel (Joonis 4) (Yoshida & Sugano, 2015).



Joonis 4. DyP-tüüpi perekonna erinevate klasside esindajate tertsiaarsed struktuurid. Paneelide tähistused A, B, C ja D vastavad ka DyP klassidele. Sinisega on tähistatud α -heeliksid ja silmused (*loops*), oranžiga on tähistatud β -lehed, kollasega on tähistatud porfüriini makrotsükkel, punasega on tähistatud rauaioon. Iga monomeer koosneb kahest mitteparalleelsest β -lehest, mis on paigutatud üksteise vastu samal tasapinnal. Arvukate α -heeliksitega ümbritsetud β -lehed moodustavad DyP-tüüpi ensüümidele iseloomulikku β -tüüni struktuuri. Heem paikneb iga monomeeri C-terminaalses domeenis. Joonis on tehtud programmis Chimera, PDB andmebaasi koodid paneelidel A, B, C ja D kuvatud valkudele on vastavalt: 2Y4F, 4GU7, 5C2I, 7D8M.

Iga apoensüümi monomeer koosneb arvukatest α -heeliksitest, mis ümbritsevad kahte antiparalleelset neljaahelalist β -lehte, mis omakorda moodustavad vaid DyP-tüüpi ensüümidele omase ferredoksiin-taolise voldi (Roberts et al., 2011; Singh & Eltis, 2015; Sugano et al., 2007). Valgumolekuli N- ja C-terminaalsed domeenid on oma ehituselt üksteisele üpris sarnased: mõlemad on struktuuri poolest $\alpha+\beta$ voldid ning mõlemas domeenis paiknevad kaks

antiparalleelset β -lehte selliselt, et moodustub α -heeliksiite vahele jääv β -tünni struktuur (ferredoksiin-taoline volt, mis mängib olulist rolli heemi paigutuses globulaarse ensüümi molekuli sisemuses) (Goblirsch et al., 2011; Liu et al., 2017). Oluline erinevus N- ja C-terminaalsete domeenide vahel seisneb võimes siduda redoks-kofaktorit – heem seostub ainult C-terminaalse domeeniga (Joonis 5) kuna N-terminaalse domeeni „heemi taskus“ selleks ruumi ei ole (Goblirsch et al., 2011). Arvatakse, et muutused N-terminaalse domeeni heemi taskus (suurem kompaktsus, proksimaalseks ligeerimiseks sobivalt paigutatud His jäägi puudumine ja täiendava α -heeliksi olemasolu) tekkisid geeni duplikatsiooni teel. (Goblirsch et al., 2011; Sugano et al., 2007; Zámocký et al., 2015). Sellisel molekuli tertsiaarsel struktuuril ei ole analooge klassikaliste taimeperoksüdaaside nagu HRP, MnP ja LiP (ligniini-peroksüdaas) hulgas (Gajhede et al., 1997; Poulos, 2014; Sundaramoorthy et al., 1994).



Joonis 5. Dyp-tüüpi ensüümi *ScDyPB* monomeeri N- ja C-terminaalsete domeenide võrdlus. Joonisel on paigutatud N- ja C terminaalised domeenid teineteise peale. C-terminaalne domeen on tähistatud halli värviga, sinisega on märgistatud heemiõõnsuse proksimaalne histidiinjääk ning sellega seondunud heem on märgistatud kollasega, raud on märgistatud punasega. N-terminaalne domeen on märgistatud oranži värviga. Mõlemas domeenis on α -heeliksiite ja β -lehtede omavaheline paigutus üldiselt sarnane, kuid N-terminaalses domeenis on sekundaarsed struktuurid paigutatud üksteise suhtes kompaktsemalt, mistõttu ei ole heemi seostumine võimalik (Goblirsch et al., 2011). Selline struktuur on konserveerunud DyP-tüüpi ensüümide korral. Joonis on tehtud programmis Chimera, PDB andmebaasi kood 4GU7.

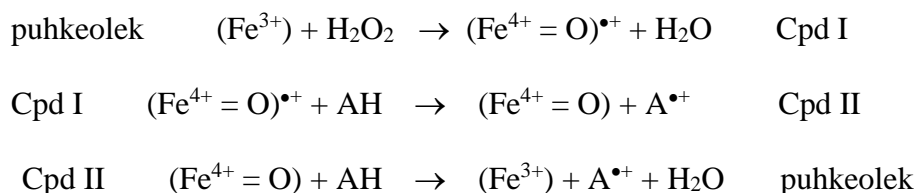
DyP-tüüpi ensüüme eristab klassikalistest taimeperoksüdaasidest aminohappelises järjestuses leiduv kõrgelt konserveerunud motiiv GXXDG, kus asparagiinhape (D) jääk asendab taimeperoksüdaasides sarnases heemi tasku järjestuses leiduvat distaalset histidiinjääki (Sugano, 2009). Arvatakse, et see võib olla DyP-tüüpi ensüümide madalama optimaalse pH-väärtuse põhjuseks (Shrestha et al., 2017; Sugano, 2009; Sugano et al., 2007; Yoshida & Sugano, 2015). Muu osas on DyP-tüüpi ensüümide heemiõõnsuse ehitus sarnane taimeperoksüdaaside omaga sisaldades konserveerunud proksimaalset histidiinjääki, mis moodustab heemi rauaiooniga aksiaalse koordinatiivse sideme (Joonis 1A). (Colpa et al., 2014; Sugano et al., 2007).

DyP-tüüpi peroksüdaasid on aktiivsed nii monomeerses vormis kui ka oligomeersete vormidena (Duan et al., 2018; Johjima et al., 2003; Kim & Shoda, 1999; Liers et al., 2013; Sugawara et al., 2017). On näidatud, et DyP-tüüpi peroksüdaaside kvaternaarsed struktuurid varieeruvad laialdaselt nii erinevate klasside vahel kui ka ühe klassi sees (Liu et al., 2011, 2017; Ogola et al., 2009; Shrestha et al., 2016; Zubieta, Joseph, et al., 2007; Zubieta, Krishna, et al., 2007; Yoshida et al., 2016). Uurimaks DyP-tüüpi ensüümide oligomeriseerumist ning oligomeriseerumise seost nende bioloogiliste funktsioonidega on kasutatud väga erinevaid meetodeid. Ehkki saadud tulemused ei anna täpset vastust DyP-tüüpi ensüümide oligomeriseerumise kohta *in vivo*, on tekkinud arusaam nende peroksüdaaside kalduvusest moodustada kompleksemaid struktuure. Näiteks on mõnede DyP-tüüpi ensüümide primaarses struktuuris leitud konserveerunud motiivid, mis tersiaarses struktuuris hõlmavad 10% välispinnast ning osalevad molekulide dimeriseerumises (Zubieta, Krishna, et al., 2007). Samuti on DyP-tüüpi peroksüdaaside puhul täheldatud tetrameeride moodustumist kahest dimeerist, mis on omakorda moodustunud kahest kovalentselt ühendatud monomeerist (Yoshida et al., 2016). DyP-tüüpi peroksüdaaside ja nanokapsli-laadseid struktuure moodustava enkapsuliini vaheliste interaktsioonide põhjalikud uuringud näitavad otsest seost peroksüdaasi oligomeeride moodustamise ning nende nanokapslitesse pakkimise ja rakust välja transpordimise vahel (Lien et al., 2021; Sutter et al., 2008). Oligomeriseerunud vormis peroksüdaaside kristallstruktuuride analüüs näitab ensüümi aktiivtsentri võrdset kättesaadavust väiksematele substraadimolekulidele nii mono-, di- kui ka heksameersedel molekulidel (Zubieta, Krishna, et al., 2007; Yoshida et al., 2016).

Selline oligomeersete struktuuride mitmekesisus on huvitav fenomen, mis võib anda ka olulist infot nende molekulide bioloogiliste funktsioonide kohta.

1.2.3. DyP-tüüpi ensüümide katalüütiline mehhanism

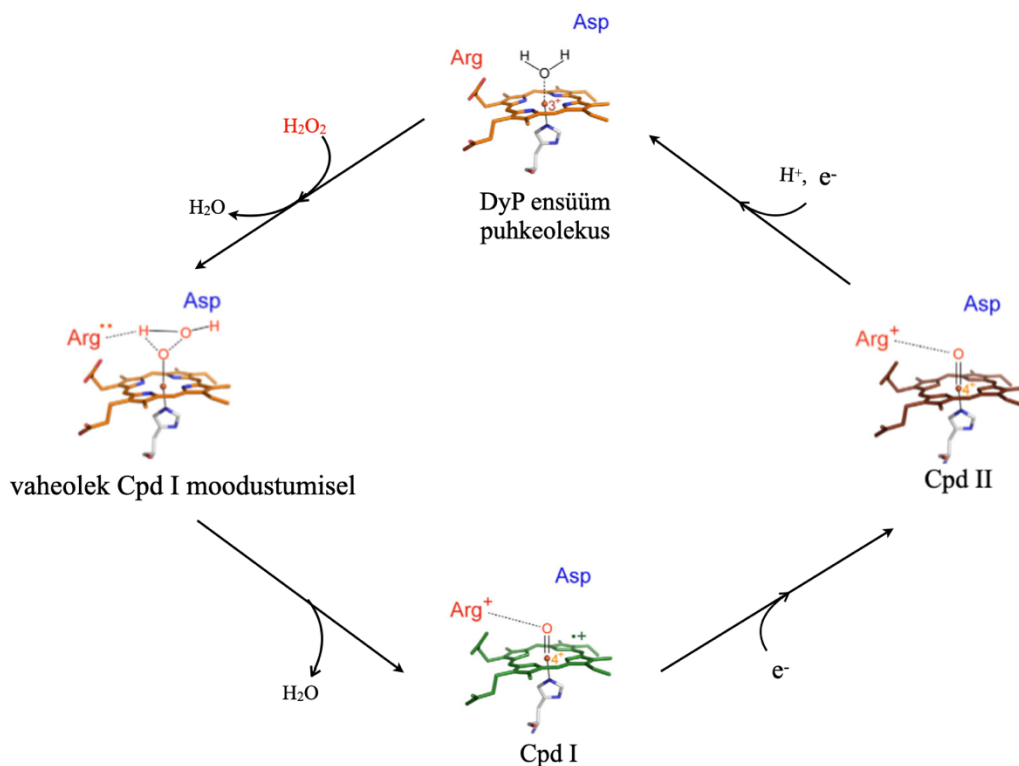
DyP-tüüpi peroksüdaaside katalüütiline mehhanism hõlmab kahe substraadi (H_2O_2 ja redutseeriv substraat) vahelist reaktsiooni:



kus AH tähistab redutseerivat substraati (nt ABTS), $\text{A}^{\bullet+}$ produktina tekkivat radikaali ning Cpd I ja Cpd II tähistavad ensüümi vaheolekuid katalüütilises tsükli, vastavalt *Compound I* ja *Compound II* (Sugano et al., 2009).

Nagu ka taimeperoksüdaaside puhul, hõlmab DyP-tüüpi ensüümide katalüütiline tsükkel puhkeolekut ning vaheolekuid Cpd I ja Cpd II (*Compound I / II*). H_2O_2 seostub ensüümiga selle puhkeolekus ja oksüdeerib rauaiooni $[\text{Fe}^{3+}]$, mille tulemusena moodustub Cpd I $[\text{Fe}^{4+} = \text{O}]^{\bullet+}$. Edasi reageerib Cpd I redutseeriva substraadi ühe elektroni ekvivalendiga ja moodustub Cpd II $[\text{Fe}^{4+} = \text{O}]^{\bullet+}$. Viimases etapis reageerib Cpd II järgmise elektroni ekvivalendiga ning ensüümi puhkeolek taastub (Joonis 6). (Chen et al., 2015)

Katalüütilise tsükli alguses seostub H_2O_2 molekul heemiga ning selle deprotoneerimisel moodustub HOO^- anioon. DyP-tüüpi ensüümidel vahendab seda etappi heemiõõnsuses paiknev katalüütiliselt aktiivne asparagiinhappejääk (Uchida et al., 2015). Enamikes taimeperoksüdaasides on selles etapis tähtis roll aga distaalsel histidiinil, mis DyP-tüüpi ensüümide aktiivtsentris puudub (Zubieta, Krishna, et al., 2007; Uchida et al., 2015). Pärast ensüümi hüdro-peroksüvormi $[\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}]$ moodustumist toimub O-O sideme heterolüütiline lagunemine, mis viib ensüümi Cpd I moodustumiseni.



Joonis 6. DyP-tüüpi B-klassi ensüümide katalüütiline tsükkel. Peroksüdatiivne tsükkel algab puhkeolekus ensüümi aktiveerimisega H_2O_2 poolt, mille tulemusena moodustub Cpd I. Cpd I redutseeritakse kahe järjestikulise elektroni ülekandega redutseerivalt substraadilt. Esimese elektroni ülekande tulemusel moodustub Cpd II vorm ja teise elektroni ülekande taastab puhkeoleku (Avram et al., 2018). Juhul kui redutseerivaks substraadiks on ühe elektroni doonor, nagu ABTS, siis tekivad produktidena kaks katioon radikaali A^{*+} (neid ei ole joonisel näidatud) (Kohandatud: Singh & Eltis, 2015)

Ensüümi Cpd I moodustumine nõuab happe-aluse katalüsaatori olemasolu heemiõõnsuse distaalses osas. Klassikalistes taimeperoksüdaasides tagab selle funktsiooni distaalne histidiin koos arginiiniga (Uchida et al., 2015). DyP-tüüpi ensüümides aga täidavad happe-aluse moduleerivat ning ka H_2O_2 suhtes polariseerivat rolli heemiõõnsuses leiduvad asparagiinhape- ja arginiinijäägid (Goblirsch et al., 2011).

Arvatakse, et katalüütilise tsükli jooksul toimuvad ensüümi konformatsioonilised muutused võivad piirata mudelsubstraadi ABTS oksüdatsiooni kiirust, kuid ei ole selge, milline ensüümi vaheolekutest osaleb katalüütilise tsükli kiirust piiravas etapis (Chen et al., 2015). On samuti põhjust arvata, et reaktsiooni kiirust piirav etapp võib olla substraadist sõltuv (Chen et al., 2015).

Nagu paljude teiste peroksüdaaside puhul esineb ka DyP-tüüpi ensüümidel inaktivatsioon H_2O_2 poolt. Taimeperoksüdaaside puhul on näidatud, et redutseeriva substraadi puudumisel

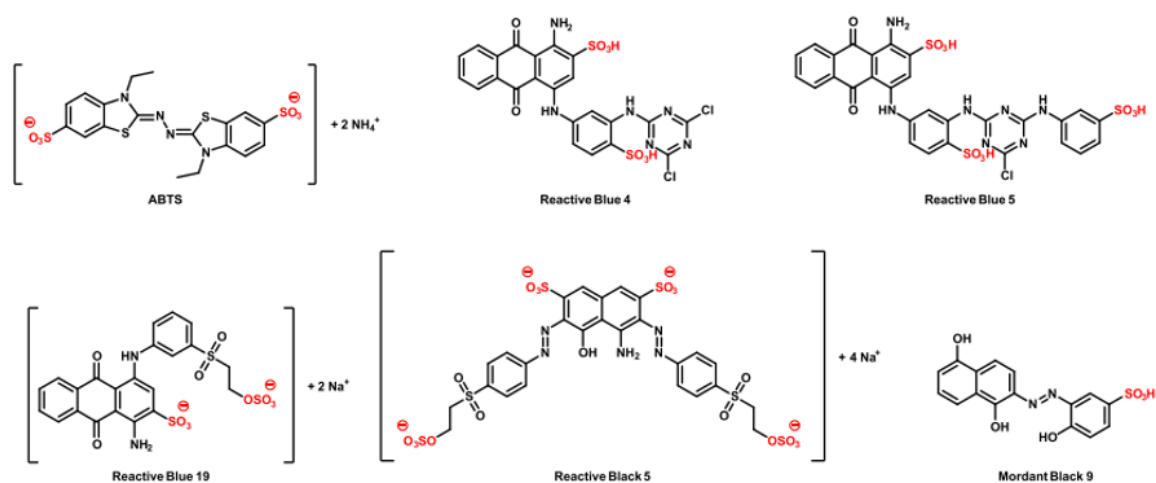
reaktsiooni keskkonnas võib H₂O₂ rünnata Cpd I, moodustades mitteproduktiivse okso-peroksüdaasi vormis ensüümi, ehk stabiilse Cpd III (Hiner et al., 2002). Kuna DyP-tüüpi ensüümide jaoks hetkel puudub selline detailne inaktivatsiooni mehhanismi skeem, võib spekuloida, et kirjeldatud ensüümi deaktiveerimise mehhanism esineb ka DyP-tüüpi ensüümide korral.

1.2.4. DyP-tüüpi ensüümide substraadid ja nende seostumiskohad

On teada, et DyP-perekonda kuuluvate ensüümide bioloogiline roll võib varieeruda erinevates organismides ning sellega kooskõlas on need ensüümid võimelised oksüdeerima laia spektrit erinevaid substraate. Seevastu kaassubstraadiks on nendel ensüümidel alati vesinikperoksiid.

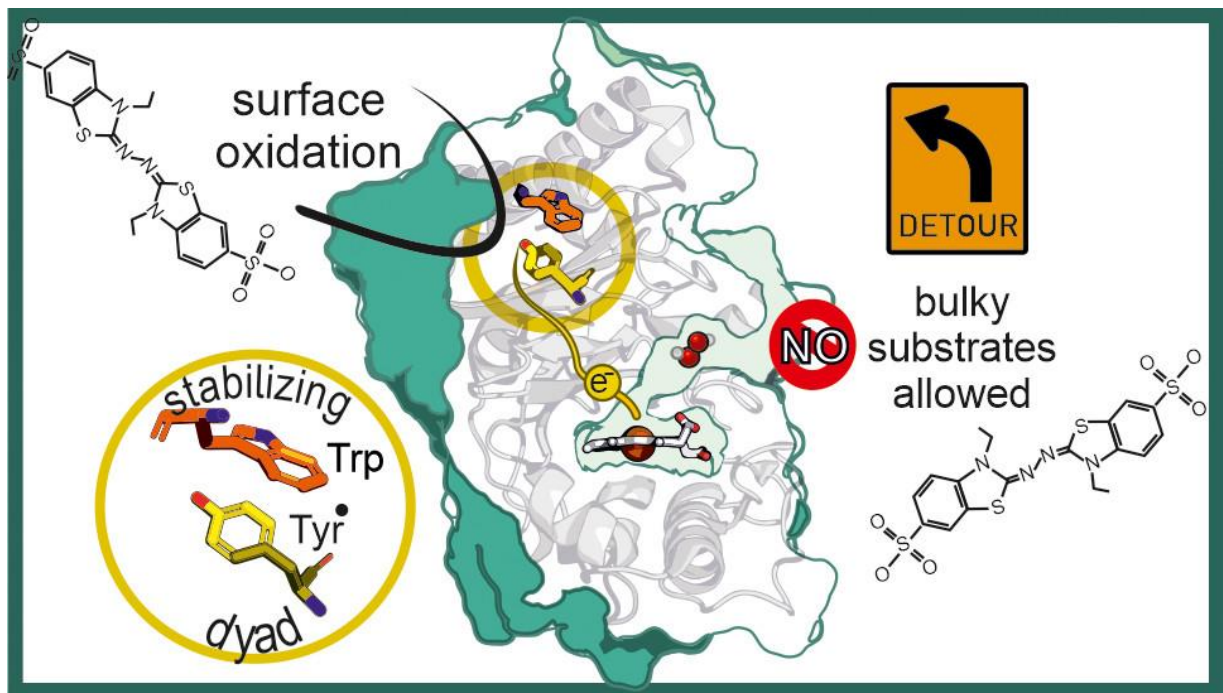
Arvatakse, et DyP-tüüpi ensüümide primaarses järjestuses leitud konserveerunud motiiv moodustab tertsiarses valgusstruktuuris tunneli, mille kaudu H₂O₂ pääseb globulaarse molekuli sisse (Rodrigues et al., 2021; Yoshida et al., 2016). Tunnel paikneb heemi distaalse külje läheduses ning on moodustunud asparagiinhape-, arginiini- ja kahe hüdrofoobse aminohappe jääkidest (fenüülalaniin ja leutsiin/treoniin) (Sugano, 2009; Sugano et al., 2007; Yoshida et al., 2011). Kumb ülalmainitud konserveerunud aminohapetest, kas Asp või Arg, on katalüütiliselt aktiivne ja seega mängib kriitilist rolli Cpd I moodustamisel, ei ole senini üheselt kindlaks määratud (Chen et al., 2015; Shrestha et al., 2017; Singh et al., 2012; Sugano et al., 2007).

Värvaineid lagundavad ensüümid on võimelised oksüdeerima klassikalisi peroksüdaaside substraate nagu 2,2'-azinobis [3-etüülbensotiasoliin-6-sulfoonhape]-diammoonium sool (ABTS) ja 2,6-dimetoksüfenool (Pupart et al., 2023; van Bloois et al., 2010). Kuid on näidatud, et nende poolt katalüüsitud redoks-reaktsioonides võivad substraatideks olla ka muud fenoolsed ühendid (nt. guaiakool, pürogallool, katehhool) ning samuti ka mittefenoolsed metoksüleeritud aromaatsed ühendid (nt. veratriülalkohol), aso- ja antrakinoongruppe sisaldavad värvained (Joonis 7), mangaan, β -karoteen, mittefenoolsed ligniini mudelühendid (Brown et al., 2012; Chen et al., 2015; Kim & Shoda, 1999; Liers et al., 2010; Scheibner et al., 2008).



Joonis 7. DyP-tüüpi ensüümide suuremõõtmelised substraadid. ABTS on peroksüdaaside uurimisel kasutatav mudelsubstraat, mida kasutasime ka meie antud uurimistöös. Reactive Blue 4/5/19 on sünteetilised värvained, mis kuuluvad antrakinoonvärvide hulka. Kõikide antrakinoonvärvainete molekulide põhiliseks struktuuriühikuks on antrakinoon. Reactive Black 5 ja Mordant Black 9 on sünteetilised aso-värvained, mis kuuluvad asoühendite perekonda ning mis sisaldavad tüüpilist C-N=N-C sidet. (Strittmatter et al., 2015)

DyP-tüüpi peroksüdaasid on võimelised katalüüsima väga erineva molekulaarse ehitusega substraadide oksüdeerimist, alustades kompaksematest fenoolsetest ühenditest kuni suuremõõtmeliste antrakinoonvärvaineteni välja (Joonis 7). Suuremate mõõtmetega substraadid nagu RB19 või ABTS ei mahu ensüümi heemiõõnsusesse ning seetõttu ei oma otsest kontakti heemiga (Nys et al., 2021). Kuid kuna ka nende puhul ensüümid näitavad katalüütilist aktiivsust, siis on välja pakutud mitmed alternatiivsed potentsiaalsed substraadide seostumiskohad – suuremate molekulide puhul paiknevad need globulaarse ensüümimolekuli välispinnal, väiksemate molekulite oksüdeerimiseks aga kasutatakse heemi taskus leiduvaid seostumiskohti (Linde et al., 2015; Shrestha et al., 2016; Strittmatter et al., 2015; Yoshida et al., 2012). Arvatakse, et suuremate substraadimolekulide puhul kasutab ensüüm reaktsiooni katalüüsiks pikamaa elektronide ülekande rada e. LRET (*long range electron transfer*). DyP-tüüpi peroksüdaaside erinevate klasside esindajatel on primaarjärjestuses leitud kõrgelt konserveerunud redoks-aktiivsed türosiini ja trüptofani jäägid (Joonis 8), mis tertsiaarses struktuuris on paljastatud ensüümi pinnal, ning mis võimaldavad elektronide ülekannet oksüdeeritavast substraadist heemile. (Baratto et al., 2015; Liers et al., 2014; Rai et al., 2021; Rodrigues et al., 2021; Strittmatter et al., 2013)



Joonis 8. Suuremõõtmeliste substraatide eeldatav seostumisviis DyP-tüüpi ensüümiga. Senini avaldatud DyP-üüpi ensüümide kristallstruktuurid näitavad aktiivtsentri paiknemist ensüümi heemiõõnsuses, kuhu suuremad substraadimolekulid ei pruugi mahtuda. Väiksemad molekulid on võimelised sisenema ensüümi aktiivtsentrisse ning sellisel juhul toimub otsene elektronide ülekande substraadilt heemile. Suuremate substraatide (nt ABTS) puhul toimub oksüdeerimine mööda LRET-rada (*long range electron transfer*). Sellisel juhul astuvad reaktsiooni ensüümi pinnal olevad Trp ja Tyr jäägid ning substraadilt saadud elektron kantakse aktiivtsentris asuva rauaioonini heemi keskel. (Kohandatud: Nys et al., 2021)

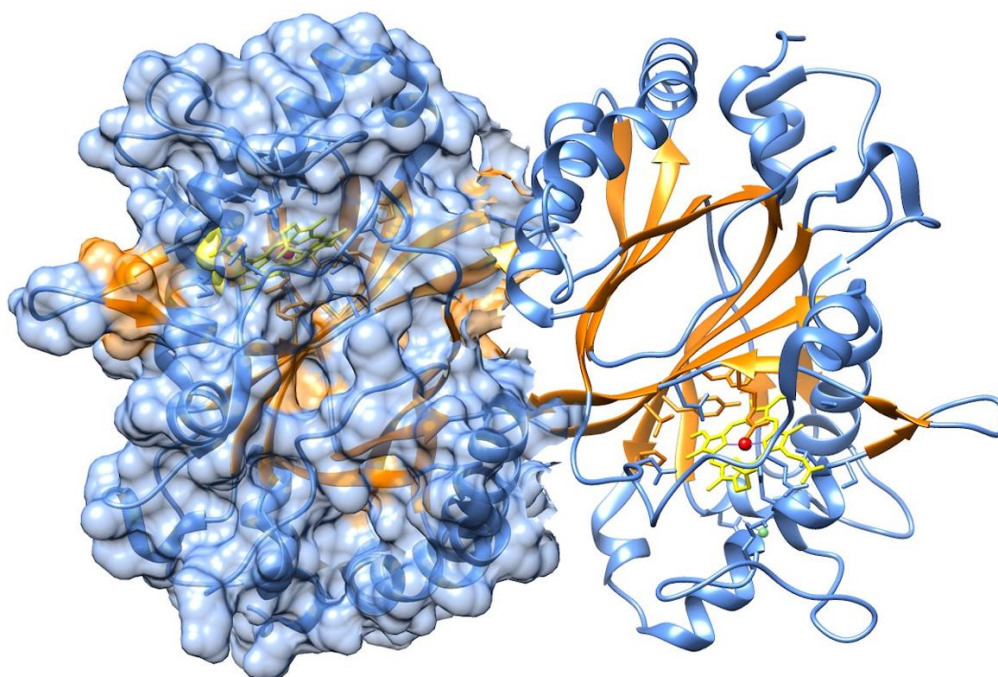
Kuna DyP-tüüpi peroksüdaasid on võimelised lagundama erinevaid ligniini oligomeere vaatamata suurtele erinevustele substraadi molekulide suuruses, on tõenäoline alternatiivsete seostumiskohtade esinemine. Roberts et al tuvastasid valgu pinnal hüdrofoobsetest aminohappejääkidest koosneva õnaruse, mis suure tõenäosusega osaleb hüdrofoobse molekuli sidumisel ja pikamaa elektronide ülekande rada mööda oksüdatsiooni katalüüsil. (Roberts et al., 2011)

1.3. Bakteri *Streptomyces coelicolor* DyP-tüüpi peroksüdaas ScDyPB

Käesoleva töö uurimisobjektiks on bakteri *Streptomyces coelicolor* A3(2) DyP-tüüpi B-klassi peroksüdaas, mida meie nimetame ScDyPB-ks (Joonis 9). *S. coelicolor* on filamentne grampositiivne sporuleeriv eubakter, mis kuulub *Actinobacteria* hõimkonda ja millel on võime looduses lagundada ligniini (Hoskisson & van Wezel, 2019; Tian et al., 2014). Juba aastal 1908 kirjeldas Müller selle organismi võimet tekitada kartuli pinnale sinist pigmenti, millel olid

happelisuse indikaatori omadused — happelises keskkonnas muutus see punaseks, aluselises keskkonnas aga sai sellest hoopis roheline pigment (Conn, 1943). Ka tänapäeval pakub *S. coelicolor* teadlastele huvi ning see on kasutusel mudelorganismina paljudes uurimistöodes just tänu oma fenooli kataboliseerivatele ensüümidele (Majumdar et al., 2014).

Selle eubakteri üksiku lineaarse kromosoomi kolmes erinevas lookuses on kodeeritud kokku kolm erinevat DyP-tüüpi ensüümi, millest kaks on A- ning üks on B-klassi kuuluv peroksüdaas (Pupart et al., 2023). Uuritava ensüümi *ScDyPB* kodeeriva geeni nimetuseks on SCO7193; see paikneb bakteriaalses kromosoomis sigma-faktori - ja polüsahhariidi biosünteesi valke kodeerivate järjestuste vahel (NCBI Sequence Viewer (Graphics)). Peroksüdaasil *ScDyPB* puudub N-terminaalne Tat-signaaljärjestus ning selle operonilises kontekstis puudub enkapsuliini kodeeriv järjestus, mis viitab selle ensüümi tsütosoolsele paiknemisele rakus (Pupart et al., 2023). Selle oletatavaks bioloogiliseks funktsiooniks bakteriaalses rakus on eksogeense heemi rauaiooni taastamine — see ensüüm ekstraheerib rauaiooni heemist säilitades samal ajal protoporfüriini makrotsükli intaktsena (deferrokelataasne aktiivsus) (InterPro andmebaas).



Joonis 9. Ensüümi *ScDyPB* dimeer. Sinisega on tähistatud α -heeliksid ja silmused (*loops*), oranžiga on tähistatud β -lehed, kollasega on tähistatud porfüriini makrotsükkel ning punasega on tähistatud rauaioon. Monomeerid on üksteisega mittekovaalentselt seotud „*head to tail*”, orientatsioonis, moodustades dimeeri. *ScDyPB* kujutis on tehtud programmis Chimera, PDB andmebaasi kood 4GU7.

Teaduskirjanduses on *ScDyPB* kohta avaldatud informatsiooni väga vähe. Alles aastal 2023 iseloomustasid Pupart jt kolme *S. coelicolor* DyP-tüüpi ensüümi biokeemilisi omadusi, analüüsid nende kineetikat erinevatel substraatidel. *ScDyPB* on katalüütiliselt aktiivne ABTS oksüdeerimisel temperatuuride vahemikus 20 – 40 °C ning pärast 24 tundi inkubeerimist 30 °C ja pH 3,5 juures säilitab 80% oma aktiivsusest. Optimaalseks pH väärtuseks ABTS oksüdeerimisel määrati *ScDyPB* jaoks pH 3,5, aga ligniini korral sobis paremini aluseline keskkond pH 8,0. Kolmest uuritud ensüümist ilmnes kõige kõrgem näiline spetsiifilisuskonstant (k_{cat}/K_M) ABTS-i oksüdeerimisel *ScDyPB* korral, kusjuures selle ensüümi puhul oli ABTS-i inhibeeriv efekt ka kõige suurem. Taimsest biomassist eraldatud ligniini töötlemisel *ScDyPB*-ga täheldati selle ensüümi võimet ligniini polümeriseerida. (Pupart et al., 2023)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Magistritöö eesmärgiks on uurida ning iseloomustada bakterist *Streptomyces coelicolor* pärineva DyP-tüüpi ensüümi ScDyPB kineetikat peroksüdaaside mudelsubstraadi 2,2'-azinobis [3-etüülbensotiasoliin-6-sulfoonhape]-diammoonium sool (ABTS) oksüdeerimise näitel.

2.2 Materjalid ja meetodikad

2.2.1 Materjalid

Ensüümi ScDyPB ekspresseeris ja puhastas Hegne Pupart TalTech-ist (Pupart et al., 2023). 20 mM Tris-HCl pH 7,5 puhvis koos 0,1 M NaCl lahustatud ja ~50 µL kogustena külmutatud ensüüm säilitati sügavkülmas -70 °C juures (edaspidi kasutan vedellämmastikus külmutatud ScDyPB koguste kohta terminit „pärl“). Puhastatud ensüüm oli lahuses pruunikaspunane, mis viitab heemi rühma olemasolule.

Peroksüdaasi substraatidena kasutasin: ABTS (Sigma-Aldrich, Lot# SLBZ8095, MW: 548,68 g/mol), H₂O₂ (Honeywell, Lot# SZBG2070, 30 wt. % in H₂O, MW: 34,01 g/mol), Reactive Blue 4 RB4 (Alfa Aesar, dye content ca 40%, Lot# L26Z029, MW: 637,44 g/mol), Reactive Blue 19 RB19 (Acros organics, Lot# A0371241, MW: 626,53 g/mol). Ensüümi vahelahjenduste valmistamisel kasutasin BSA (GE Healthcare, Lot# K00113-2235, Fraction V, pH 7,0).

2.2.2 Ensüümi ScDyPB kontsentratsiooni määramine

Esimesena määrasin ScDyPB üldkontsentratsiooni ning heemiga seostunud (ehk aktiivse) ensüümi vormi kontsentratsiooni pärlites.

Valgu kontsentratsioonid määrasin spektrofotomeetriliselt (UV-1900i UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu, Jaapan), kasutades arvutiprogrammi "LabSolutions-UV" funktsiooni "spectrum". Selleks sulatasin ühe ensüümi pärlil jää peal ning valmistasin 500 µL-se kvartsküveti pärlilist 10X lahjenduse (50 µL ensüümi lahust segasin kokku 450 µL puhvriga 20 mM Tris-HCl, 0,1 M NaCl pH 7,5).

Ensüümi kontsentratsioonid määrasin spektrite põhjal lainepikkuste vahemikus 250 - 700 nm, kasutades Beer-Lambert-i seadust: $A = \epsilon * l * c$, kus "A" on teatud lainepikkuse juures saadud

neeldumisväärtus, "l" on optilise tee pikkus, "c" on lahuse kontsentratsioon ning "ε" on ScDyPB ekstinktsioonikoefitsient. Heemiga seotud e. aktiivse ensüümi vormi kontsentratsiooni arvutamiseks kasutasin neeldumist 406 nm juures ning heemi ekstinktsioonikoefitsienti $\epsilon_{406} = 100\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Pupart et al., 2023). Valgu üldkontsentratsiooni arvutamiseks kasutasin neeldumist 280 nm juures ning ScDyPB teoreetilist ekstinktsioonikoefitsienti $\epsilon_{280} = 18450\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Ensüümi neeldumised on mõõdetud kolmes korduses ning kõikidest tulemustest on maha arvestatud puhvri (20mM Tris-HCl, 0,1M NaCl pH7,5) neeldumine. ScDyPB üldkontsentratsioon ning aktiivse vormi kontsentratsioon olid vastavalt: $39,0 \pm 1,6\ \mu\text{M}$ ning $18,1 \pm 0,6\ \mu\text{M}$. Järgnevas töös lähtusin heemiga seotud ensüümi vormi mõõtmisel saadud tulemusest.

2.2.3 ScDyPB ensümaatilise aktiivsuse mõõtmine

Produktide teket määrasin spektrofotomeetriliselt (UV-1900i UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu, Jaapan) H₂O₂ juuresolekul, redutseeriva substraadina kasutasin ABTS, mis on peroksüdaaside mudelsubstraat.

Kui ei ole kirjas teisiti, siis standardtingimustel ScDyPB aktiivsuste määramisel oli reaktsioonisegu lõppmaht 1 mL ning reaktsioonisegu sisaldas 50 mM pH 4,0 naatriumatsetaat (NaAc) puhvrit, 1,0 mM ABTS ja 100 μM H₂O₂, ScDyPB kontsentratsioon reaktsioonisegus oli 15 nM ning reaktsioonid viisin läbi kvartsküvetis. Kõik ScDyPB vahelahjendused sisaldasid BSA-d lõppkontsentratsioonis 0,1 g/L.

ScDyPB pH optimumi määramise katses kasutasin reaktsioonisegu valmistamisel erinevaid puhvreid pH väärtusega vahemikus 3,0 - 6,0: 50 mM tsitraatpuhver pH 3,0, 50 mM tsitraatpuhver pH 3,5, 50 mM naatrium atsetaat (NaAc) pH 4,0, 50 mM (NaAc) pH 4,5, 50 mM (NaAc) pH 5,0, 50 mM Bis-Tris pH 5,5, 50 mM Bis-Tris pH 6,0.

Katsetes, kus analüüsisin ABTS oksüdeerimise kiiruse sõltuvust ABTS või H₂O₂ kontsentratsioonist, varieerisin emma-kumma substraadi kontsentratsioone vastavalt vahemikus 10 - 3000 μM või 10 - 1000 μM ning teise substraadi kontsentratsioon oli konstantne. Katsetes, kus uurisin ensüümi kontsentratsiooni mõju ABTS oksüdeerimise kiirusele, olid ScDyPB kontsentratsioonid vahemikus 2 - 30 nM. Kui ei ole kirjas teisiti, siis inkubeerisin kõiki ensüümi vahelahjendusi ning reaktsiooni jaoks ette valmistatud ABTS-puhvri lahuseid enne reaktsioonide käivitamist 25 °C juures: ABTS-puhvri segusid inkubeerisin 10 min, ensüümi vahelahjenduste inkubeerimise aeg varieerus sõltuvalt katse tüübist. H₂O₂-i

lahused inkubeerisid toatemperatuuril enne ABTS-puhvri segule lisamist vahetult enne reaktsiooni käivitamist ensüümiga. Küvetis toimusid kõik reaktsioonid toatemperatuuril. ABTS oksüdatsioonil tekkiva radikaali $ABTS^{\bullet+}$ moodustamist mõõtsin lainepikkusel 420 nm ($\epsilon_{420} = 36\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), kasutades arvutiprogrammi "LabSolutions-UV" funktsiooni "time course". Neeldumise mõõtmist alustasin 30 s pärast ensüümi lisamist substraatide segule ja neeldumisi mõõtsin 2 min vältel.

2.2.4 Vahelahjenduse tingimuste mõju ScDyPB aktiivsusele

Katsetes, milles määrasin 0,15 μM või 1,5 μM vahelahjendusest pärineva ensüümi aktiivsust, käivitasin reaktsiooni vastavalt 100 μL või 10 μL ScDyPB vahelahjenduse lisamisega H_2O_2 ja ABTS puhvrisegule, mille eelnevalt pipeteerisin 1 mL-se kvartsküveti. Reaktsioonid, milles määrasin 30 nM vahelahjendusest pärineva ensüümi aktiivsust, käivitasin 500 μL H_2O_2 ja ABTS puhvrisegu lisamisega kvartsküveti, mis sisaldas 500 μL 30 nM ensüümi vahelahjendust toatemperatuuril. ABTS-puhvrisegu inkubeerisin enne reaktsiooni käivitamist 25 °C juures 10 - 20 min, H_2O_2 inkubeerisin enne ABTS-puhvrisegule lisamist toatemperatuuril. H_2O_2 lisasin ABTS-puhvrisegule vahetult enne reaktsiooni käivitamist substraatide seguga. Katsetes kasutasin erineva kestusega inkubeerimisi ning kõik mõõtmised viisin läbi kolmes korduses.

ScDyPB 1,5 μM ja 0,15 μM vahelahjendused valmistasin kas 20 mM Tris-HCl (sisaldas 100 mM NaCl) puhvrise pH 7,5 või 50 mM NaAc puhvrise pH 4,0. Kõik vahelahjendused sisaldasid BSA lahust lõppkontsentratsiooniga 0,1 g/L. BSA lahuse lõppkontsentratsiooniga 1 g/L valmistasin 20 mM Tris-HCl puhvrise pH 7,5 (sisaldas 100 mM NaCl), külmutasin 1 mL-Ste osadena ning säilitasin -20 °C juures; 1 mL-se koguse sulatasin jään enne töölahuste valmistamist. H_2O_2 töölahused valmistasin värskelt iga päev. ABTS töölahuseid valmistasin lahustatuna mQ-puhtusega vees. Kontrollmõõtmiseks kasutasin reaktsioonisegusid ilma ScDyPB-ta, ehk määrasin ABTS mitteensümaatilise oksüdatsiooni kiirused H_2O_2 -ga, ning lahutasin saadud taustkiiruseid kõikidest katsetulemustest. Andmeanalüüsiks kasutasin arvutiprogrammi "Statistica 8".

2.2.5 ScDyPB näilise molekulmassi määramine geelfiltratsioonkromatograafia abil

ScDyPB näilise molekulmassi määramiseks kasutasin geelfiltratsioonkromatograafiat (*size exclusion chromatography*), kasutades Superdex 75 Increase 10/300 GL (GE Healthcare; code

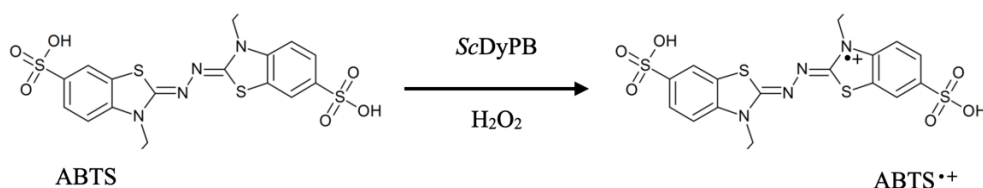
no: n17-5174-01, id. no: 0651021) kolonni ÄKTA FPLC süsteemis (GE Healthcare; Äkta purifier P-900, UV-900, pH/C-900, BOX-900). Valkude elueerumist kolonnist detekteerisin neeldumise alusel lainepikkusel 280 nm. Kolonni tasakaalustamiseks ja valkude elueerimiseks kasutasin 20 mM Tris-HCl 0,1 M NaCl pH7,5 puhvrit. Voolutuskiiruseks oli 0,5 mL/min. Kolonnile koguruumalaga 24 mL kandsin 150 µL ScDyPB lahust kontsentratsiooniga 18,07 µM. Kõiki valguproove (sh standardite lahuseid) inkubeerisin toatemperatuuril 1 tunni jooksul enne süsteemi süstimist.

ScDyPB erinevate oligomeersete vormide elueerimisruumala määramiseks lahutasin standatrvalkude (Cytiva; GF Calibration Kit HMW, Lot: 17556413) segud samadel tingimustel. Standardvalkudena kasutasin ovalbumiini (44 kDa, lõppkontsentratsioon 4 mg/mL), konalbumiini (75 kDa, lõppkontsentratsioon 3 mg/mL), aldolaasi (158 kDa, lõppkontsentratsioon 4 mg/mL) ja ferritiini (440 kDa, lõppkontsentratsioon 0,3 mg/mL). Standardvalkude proovid valmistasin "Cytiva Gel filtration Calibration Kit Instructions for use", *part 4 p.5* järgi. Katsetes kasutasin standardvalkude segusid üldmahuga 150 µL: ovalbumiin + aldolaas ja konalbumiin + ferritiin.

2.3 Tulemused

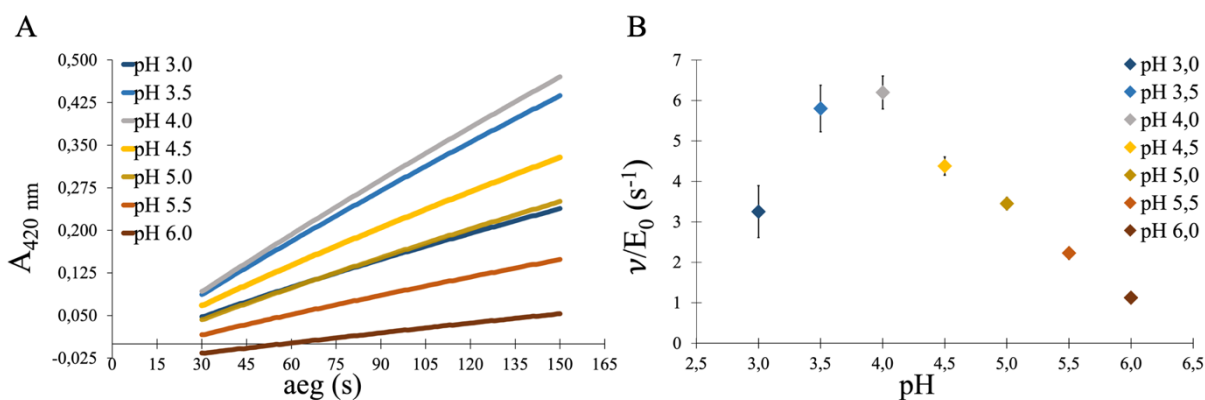
2.3.1 Katsetingimuste optimeerimine ScDyPB kineetika uuringuteks

DyP kineetika uuringuteks otsustasime kasutada peroksüdaaside mudelsubstraati ABTS. Selle oksüdeerimist on lihtne jälgida spektrofotomeetriliselt, mõõtes tekkiva produkti ABTS^{•+} neeldumist 420 nm lainepikkuse juures. ABTS^{•+} radikaal tekib reaktsiooniskeemi alusel:



Ensüümreaktsioonid käivitasin ensüümi lisamisega küvetti, mis sisaldas ABTS ja H₂O₂ segu. Kõik töös esitatud kiirused vastavad reaktsiooni algkiirustele, mida mõõtsin vahemikus 30 - 60 s peale reaktsiooni käivitamist (Joonis 10A). Eelkatsete tulemustest selgus, et DyP seostub laboriplastikule, mille vältimiseks oli vaja ensüümi vahelahjendustele lisada BSA-d (lõppkontsentratsiooniga 0,1 g/L) 20 mM Tris-HCl 0,1 M NaCl puhvris pH 7,5.

Optimaalse pH määramiseks mõõtsin ABTS-i oksüdeerimist reaktsiooni pH väärtusega vahemikus 3,0 - 6,0 (Joonis 10). Tulemustest selgus, et ABTSi oksüdeerimiseks on sobivaimaks pH väärtuseks 4,0 (Joonis 10B), seega kõikides edasistes ABTS oksüdeerimise katsetes kasutasin 50 mM NaAc puhvrit pH 4,0.



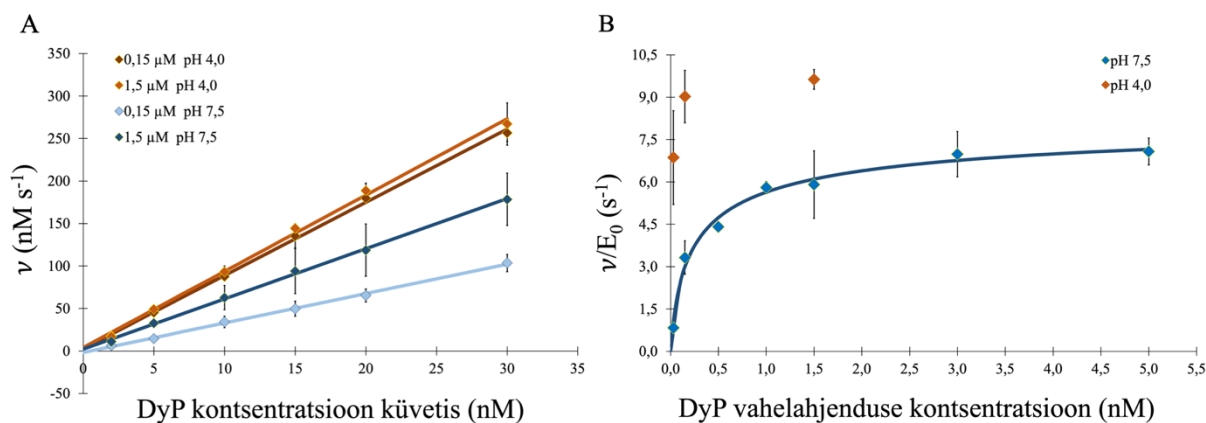
Joonis 10. pH mõju ABTS oksüdeerimise kiirusele. Kõik reaktsioonid küvetis toimusid toatemperatuuril vastavas 50 mM puhvris. Kasutatud puhvrid: pH 3,0 ja pH 3,5 tsitraatpuhver; pH 4,0, pH 4,5 ja pH 5,0 naatrium atsetaat (NaAc) puhver; pH 5,5 ja pH 6,0 Bis-Tris puhver. ABTS-i ja H₂O₂-i kontsentratsioonid olid vastavalt 1,0 mM ja 100 µM. ScDyPB kontsentratsioon reaktsioonis oli 15 nM. Ensüümi 1,5 µM vahelahjendust valmistasin 20 mM Tris-HCl puhvris pH 7,5, millele lisasin BSA-d lõppkontsentratsiooniga 0,1 g/L. Reaktsioonid käivitasin 10 µL ensüümi vahelahjenduse lisamisega substraatide lahusele. Enne katseseria algust inkubeerisin ScDyPB vahelahjendust 25 °C juures 5 min. A) ABTS oksüdeerimise ajakõverad. Pime aeg reaktsiooni käivitamisest kuni mõõtmiste alguseni 30 s on graafiku koostamisel arvestatud. Produkti teket mõõtsin lainepikkusel 420 nm 2 min jooksul. B) ABTS-i oksüdatsiooni algkiiruse sõltuvus reaktsiooni pH-st. Tulemused on esitatud kolme sõltumatu katse keskmisena ja veajooned näitavad standardhälvet.

Kogu järgnevas töös on kasutatud järgmist katseskeemi. ScDyPB (18,07 µM) hoiustasin 20 mM Tris-HCl puhvris pH 7,5 (sisaldas 100 mM NaCl) külmutatuna pärlitena -70 °C juures. Eelkirjeldatud säilituslahusest valmistasin ensüümi vahelahjendused (kontsentratsiooniga kas 0,15 µM või 1,5 µM), mida kasutasin ensüümreaktsiooni käivitamiseks. Töö käigus selgus, et nii ensüümi vahelahjenduste tegemiseks kasutatud puhvri pH kui ka ensüümi kontsentratsioon vahelahjendustes mängisid ensüümi aktiivsuse seisukohast olulist rolli. Seda teemat käsitlen läbi kogu töö põhjalikumalt.

2.3.2 Ensüümi kontsentratsiooni mõju ABTS oksüdeerimise kiirusele

Järgmisena uurisin ScDyPB katalüütilise aktiivsuse sõltuvust selle kontsentratsioonist reaktsioonis ja vahelahjenduses, määraes ABTS-i oksüdeerimise kiiruseid.

Kõik reaktsioonid toimusid standardtingimustel, ning reaktsioonid käivitasin vastavas koguses 0,15 μM või 1,5 μM ensüümi vahelahjenduse lisamisega substraatide segule (Joonis 11A). *ScDyPB* kontsentratsioon reaktsioonides oli 15 nM. Tulemused näitasid, et ABTS-i oksüdeerimise kiirus ootuspäraselt kasvab proportsionaalselt koos ensüümi kontsentratsiooni kasvuga küvetis (Joonis 11A), kuid lisaks veel, et reaktsiooni kiirus sõltub ka ensüümi kontsentratsioonist vahelahjenduses ja vahelahjenduse pH-st (Joonis 11A).



Joonis 11. ABTS oksüdeerimise kiiruse sõltuvus *ScDyPB* kontsentratsioonidest. Kõik reaktsioonid toimusid 50 mM NaAc pH 4,0 puhvris 25 °C juures. ABTS ja H₂O₂ kontsentratsioonid olid vastavalt 1,0 mM ja 100 μM . A) Reaktsioonikiiruse sõltuvus *ScDyPB* kontsentratsioonist reaktsionis. Ensüümi kontsentratsioon küvetis varieerus vahemikus 2 – 30 nM. *ScDyPB* kontsentratsioon vahelahjenduses ja vahelahjenduse pH on toodud joonisel. Enne reaktsiooni käivitamist inkubeerisin ensüümi vahelahjendust 25 °C juures vähemalt 30 min. Pidevad jooned näitavad katseandmete lähendamist sirge võrrandile. B) Reaktsioonikiiruse sõltuvus *ScDyPB* kontsentratsioonist vahelahjenduses ja vahelahjenduse pH väärtusest. DyP vahelahjendused olid kas 20 mM Tris-HCl puhvrisesse pH 7,5 või 50 mM NaAc puhvrisesse pH 4,0. Kõik DyP vahelahjendused sisaldasid 0,1 g/L BSA. Reaktsioon käivitati DyP vahelahjenduse lisamisega küveti, mis sisaldas ABTS ja H₂O₂ segu. DyP kontsentratsioon küvetis oli 15 nM. Pidev joon näitab katseandmete mittelineaarset lähendamist vastavalt võrrandile 4. Tulemused on esitatud kolme sõltumatu katse keskmisena ja veajooned näitavad standardhälvet.

Jooniselt 11B nähtub, et kui DyP kontsentratsioon vahelahjenduses läheneb nullile, siis läheneb nullile ka aktiivsus. Kui reaktsioonikiiruse lineaarne sõltuvus ensüümi kontsentratsioonist (Joonis 11A) on ensüümikatalüüsitud reaktsioonide puhul ootuspärane, siis aktiivsuse sõltuvus ensüümi kontsentratsioonist tema vahelahjenduses (Joonis 11B) seda ei ole. Kõige lihtsamaks seletuseks oleks siin ensüümi mitte-spetsiifiline seostumine laboriplastikule. Madalama ensüümi kontsentratsiooniga vahelahjendustes on mitte-spetsiifilise seostumise osakaal suurem ja see kajastub madalamas aktiivsuses. *ScDyPB* mitte-spetsiifilise seostumise

efekti me oma eelkatsetes tõepoolest täheldasime (andmed ei ole näidatud), kuid välistasime selle BSA lisamisega *ScDyPB* vahelahjendustesse.

Siinkohal püstitasime hüpoteesi ensüümi *ScDyPB* kahe erineva vormi eksisteerimisest, mis esinevad igas ensüümi lahuses samaaegselt, kuid mille osakaalu mõjutavad ensüümi lahuse kontsentratsioon ja selle pH väärtus. Lihtsuse mõttes eeldame, et *ScDyPB* esineb monomeerse ja dimeerse vormi tasakaalulise seguna. Teise lihtsustusena eeldame, et aktiivsust omab ainult dimeerses olekus olev ensüüm ja monomeeril katalüütiline aktiivsus puudub. Kõrgem ensüümi kontsentratsioon vahelahjenduses nihutab monomeer/dimeer tasakaalu dimeeri tekke suunas. Lisaks on vajalik eeldus, et monomeer/dimeer tasakaalu saavutumine on aeglane ja aktiivsuse mõõtmise ajaskaalas (2 min) oluliselt ei muutu. Ainult sellisel juhul peegeldub vahelahjenduses esinev ensüümi vormide tasakaaluline olek hilisemas aktiivsuse mõõtmises, kus koguensüümi kontsentratsioon oli alati 15 nM (Joonis 11B). Monomeer/dimeer tasakaalu kirjeldab dimeeri dissotsiatsiooni tasakaalukonstant K_d .

$$K_d = \frac{[E][E]}{[EE]} \quad (1)$$

Võrrandis 1 tähistavad $[E]$ ja $[EE]$ vastavalt monomeerse ja dimeerse ensüümi vormi kontsentratsioone. Eeldusel, et aktiivsust omab ainult dimeerne ensüümi vorm võime reaktsioonikiiruse esitada järgnevalt:

$$\frac{v_i}{E_0} = k_{cat}^{app} \frac{[EE]}{E_0} \quad (2)$$

Võrrandis 2 tähistab k_{cat}^{app} näilist katalüütilist konstanti ja E_0 koguensüümi kontsentratsiooni. Asendades võrrandis 1 esineva monomeerse ensüümi vormi kontsentratsiooni dimeerse vormi ja koguensüümi kontsentratsiooni kaudu vastavalt võrrandile 3:

$$[E] = E_0 - 2[EE] \quad (3)$$

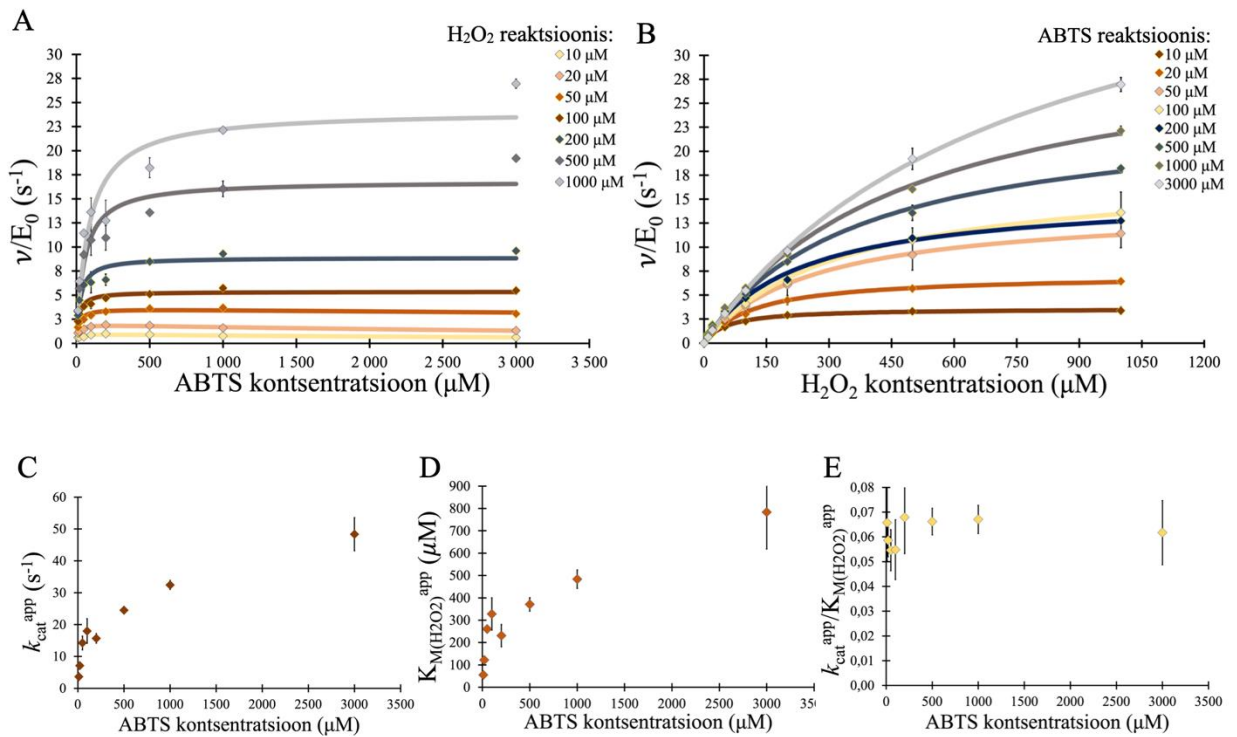
ja kombineerides võrrandiga 2 saame kiiruse võrrandiks:

$$\frac{v_i}{E_0} = \frac{k_{cat}^{app}}{E_0} \left\{ \left(\frac{K_d}{8} + \frac{E_0}{2} \right) - \sqrt{\left(\frac{K_d}{8} + \frac{E_0}{2} \right)^2 - \frac{E_0^2}{4}} \right\} \quad (4)$$

Võrrand 4 näitab ruutvõrrandi „miinus“ lahendit, kuna „pluss“ lahend oli kahanev (dimeerse vormi osakaal vähenes koos koguensüümi kontsentratsiooni kasvuga) ja seega mittereaalne. Võrrandi 4 lähendamine katseandmetele mittelineaarse regressiooni teel andis parameetrite väärtusteks $k_{cat}^{app} = 17,4 \pm 0,7 \text{ s}^{-1}$ ja $K_d = 0,38 \pm 0,07 \text{ }\mu\text{M}$. Parameetri k_{cat}^{app} näiliselt kõrgem väärtus võrreldes katseliselt mõõdetutega (Joonis 11B) tuleneb sellest, et võrrandis 2 defineeritud vastab k_{cat}^{app} dimeerse vormi katalüütilisele konstandile ja dimeerse vormi osakaal ($[EE]/E_0$) saab olla maksimaalselt (olukord, kus kõik ensüüm on dimeerses vormis) 0,5.

2.3.3 ABTS oksüdeerimise kiiruse sõltuvus ABTS ja H₂O₂ kontsentratsioonidest

Katsed tein 50 mM NaAc pH 4,0 puhvis 25 °C juures, ScDyPB kontsentratsioon oli 15 nM ja reaktsioonisegu koguruumala oli 1 mL. Reaktsioonid käivitasin 10 µL ScDyPB vahelahjenduse lisamisega küveti, mis sisaldas värskelt valmistatud ABTS ja H₂O₂ segu. Vahelahjendus sisaldas 1,5 µM ScDyPB ning 0,1 g/L BSA-d ja oli 20 mM Tris-HCl pH 7,5 puhvi keskkonnas. Reaktsioonikiiruse (läbi jagatuna DyP kontsentratsiooniga küvetis) sõltuvus ABTS ja H₂O₂ kontsentratsioonidest on toodud Joonisel 12A ja 12B.



Joonis 12. ABTS oksüdatsiooni kiiruse sõltuvus ABTS (A) ja H_2O_2 (B) kontsentratsioonidest ja näiliste parameetrite k_{cat}^{app} (s^{-1}), $K_M^{app}(H_2O_2)$ (μM), ja k_{cat}^{app}/K_M^{app} sõltuvus ABTS kontsentratsioonidest. Kõik reaktsioonid teostati 50 mM NaAc pH 4,0 puhvril 25 °C juures. DyP kontsentratsioon küvetis oli 15 nM. Reaktsioonid käivitati DyP vahelahjenduse lisamisega küveti, mis sisaldas ABTS ja H_2O_2 segu. Iga seeria raames hoidsin H_2O_2 kontsentratsiooni konstantsena ning ABTS kontsentratsiooni varieerisin. DyP 1,5 μM vahelahjendused tein 20 mM Tris-HCl puhvril pH 7,5. Kõik DyP vahelahjendused sisaldasid 0,1 g/L BSA. Enne reaktsiooni käivitamist inkubeerisin ensüümi vahelahjendust 25 °C juures 5 min. Produkti teket mõõtsin lainepikkusel 420 nm 2 min jooksul. Pidev joon näitab katseandmete mittelineaarset lähendamist vastavalt võrrandile 5 (A) ja võrrandile 6 (B). Sekundaarse analüüsi tulemused (C-E) on saadud katseandmete lähendamisel vastavalt võrrandile 5. Tulemused on esitatud kolme sõltumatu katse keskmisena ja veajooned näitavad standardhälvet.

Reaktsioonikiiruse sõltuvus ABTS kontsentratsioonist näitas ABTS-ist tingitud substraatinhibitsiooni, mille efekt oli suurem madalate H_2O_2 kontsentratsioonide puhul (Joonis 12A). Tulemuste analüüsiks kasutati võrrandit 5:

$$\frac{v_i}{E_0} = \frac{k_{cat}^{app} [ABTS]}{[ABTS] + K_M^{app} + \frac{[ABTS]^2}{K_i^{app}}} \quad (5)$$

Võrrandis 5 on k_{cat}^{app} näiline (näilisele parameetrile osundab ülaindeks app) katalüütiline konstant, $K_{M(ABTS)}^{app}$ näiline Michaelise konstant ABTS jaoks ja K_i^{app} on näiline ABTS substraatinhibitsiooni konstant.

Reaktsioonikiiruse sõltuvus H_2O_2 kontsentratsioonist substraatinhibitsiooni ei näidanud (Joonis 12B) ja tulemusi analüüsiti vastavalt tavalisele Michaelis-Menteni võrrandile 6.

$$\frac{v_i}{E_0} = \frac{k_{cat}^{app}[H_2O_2]}{[H_2O_2] + K_{M(H_2O_2)}^{app}} \quad (6)$$

Võrrandis 6 on k_{cat}^{app} näiline katalüütiline konstant ja $K_{M(H_2O_2)}^{app}$ näiline Michaelise konstant H_2O_2 jaoks.

Võrrand 6 kirjeldab andmeid küllaltki hästi katseseeriates, kus H_2O_2 kontsentratsioon varieerus ja ABTSi kontsentratsioon oli konstantne. Paraku näitasid analüüsi tulemusena saadud näiliste parameetrite (k_{cat}^{app} , $K_{M(H_2O_2)}^{app}$ ja $k_{cat}^{app}/K_{M(H_2O_2)}^{app}$) alusel koostatud n.ö. sekundaarsed graafikud (Joonis 12C-E) kõrvalekaldeid oodatud tulemustest. Seeriates, kus ABTS kontsentratsioon varieerus ja H_2O_2 kontsentratsioon oli konstantne, esines tulemuste ja võrrandi 5 lähenduse vahel süstemaatilisi kõrvalekaldeid. Need erisused katseandmete ja mudeli vahel on eriti selgelt nähtavad kõrgemate H_2O_2 kontsentratsioonidega seeriates ja ABTS-i kontsentratsioonide vahemikus 100 – 200 μM . Graafikul näeb selline süsteemne reaktsiooni kiiruse langus ja edaspidine kiire taastumine välja iseloomuliku maksimumina küllastuskõvera keskel (Joonis 12A). Tulenevalt süstemaatilistest kõrvalekaldest katseandmete ja võrrandi 5 vahel me edaspidises tulemuste interpreteerimises võrrandi 5 abil saadud näiliste ABTS parameetrite (k_{cat}^{app} , $K_{M(ABTS)}^{app}$ ja $k_{cat}^{app}/K_{M(ABTS)}^{app}$) sõltuvust H_2O_2 kontsentratsioonist ei kasuta.

Eeldusel, et ABTS oksüdeerimine DyP poolt järgib n.ö. ping-pong mehhanismi, mis on heem-peroksüdaaside puhul tavapärane (Joonis 6), ja arvestades ABTS-ist tingitud substraatinhibitsiooni, peaks reaktsioonikiirus olema kirjeldatav võrrandiga 7 (Zhao et al., 2015).

$$\frac{v_i}{E_0} = \frac{k_{cat}[ABTS][H_2O_2]}{K_{M(ABTS)}[H_2O_2] + K_{M(H_2O_2)}[ABTS] \left(1 + \frac{[ABTS]}{K_i(ABTS)} \right) + [ABTS][H_2O_2]} \quad (7)$$

Erinevalt võrranditest 5 ja 6 on võrrandis 7 esinevad parameetrid juba tõelised ensüümikineetika parameetrid. Juhul, kui DyP kineetika vastaks võrrandile 7 peaks kehtima järgmised tõeliste ja näiliste ensüümikineetika parameetrite vahelised seosed:

$$k_{cat}^{app} = \frac{k_{cat}[ABTS]}{[ABTS] + K_{M(ABTS)}} \quad (8)$$

ja

$$\frac{k_{cat}^{app}}{K_{M(H_2O_2)}^{app}} = \frac{k_{cat}}{K_{M(H_2O_2)}} \left(\frac{K_i(ABTS)}{K_i(ABTS) + [ABTS]} \right) \quad (9)$$

Paraku näeme, et ABTS kontsentratsiooni kasvades ei lähene k_{cat}^{app} väärtus selgele platoole, milleks on vastavalt võrrandile 8 tõeline k_{cat} väärtus, vaid jätkab sujuvat kasvamist (Joonis 12C). Samuti ei kahane näilise $k_{cat}^{app}/K_{M(H_2O_2)}^{app}$ väärtus ABTS kontsentratsiooni kasvades väärtuseni null (Joonis 12E), nagu võiks eeldada võrrandi 9 põhjal.

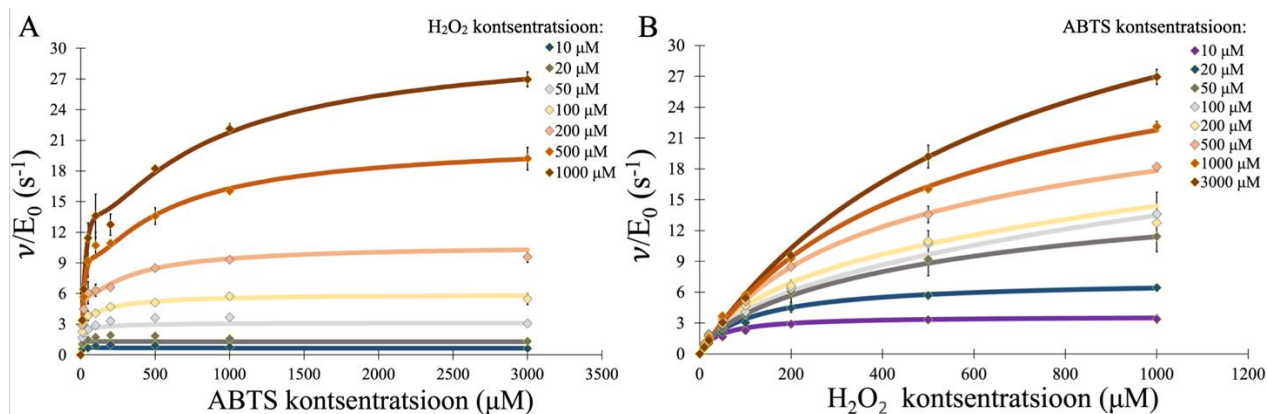
Joonisel 12 toodud reaktsioonikineetika on kõige paremini kirjeldatav kahe sõltumatu reaktsiooni kiiruse summana. Üks reaktsioonidest järgib tavapärasest ping-pong mehhanismile vastavat Michaelis-Menteni kineetikat. Teine reaktsioon toimub samuti vastavalt ping-pong mehhanismile, kuid sisaldab ka substraatinhibitsiooni ABTS-i poolt ehk siis käitub vastavalt võrrandile 7. Seega me eeldame, et ScDyPB esineb kahe erineva ensüümi vormina E^I ja E^{II} .

$$\frac{v_i}{E_0} = \frac{\frac{[E^I]}{E_0} k_{cat}^I [ABTS] [H_2O_2]}{K_{M(ABTS)}^I [H_2O_2] + K_{M(H_2O_2)}^I [ABTS] + [ABTS] [H_2O_2]} + \frac{\frac{[E^{II}]}{E_0} k_{cat}^{II} [ABTS] [H_2O_2]}{K_{M(ABTS)}^{II} [H_2O_2] + K_{M(H_2O_2)}^{II} [ABTS] \left(1 + \frac{[ABTS]}{K_i(ABTS)} \right) + [ABTS] [H_2O_2]} \quad (10)$$

Võrrandis 10 on v_i ABTS oksüdeerimise algkiirus. E_0 tähistab koguensüümi kontsentratsiooni ning $[E^I]$ ja $[E^{II}]$ on vastavalt ensüümi vormide I ja II kontsentratsioonid. Ka erinevatele ensüümi vormidele vastavad kineetika parameetrid, k_{cat} ning K_M nii ABTS kui ka H_2O_2 jaoks,

on tähistatud ülaindeksitega I ja II. Ensüümi vorm II on ABTSi poolt ka substraatihibeeritud ja seda arvestab inhibitsioonikonstant $K_{i(\text{ABTS})}$.

Lähendades katsetes saadud tulemusi võrrandile 10 globaalse mittelineaarse regressiooni abil saame graafiku, mis visualiseerib ensüümi erinevate vormide E^I ja E^{II} kineetikat paremini seeriade puhul, kus varieerub ABTS kontsentratsioon (Joonis 13A). Seeriad, kus varieerub H_2O_2 kontsentratsioon olid sama hästi kirjeldatavad klassikalise Michaelis-Menteni võrrandiga.



Joonis 13. ABTS oksüdatsiooni kiiruse kirjeldamine kahe sõltumatu reaktsiooni kiiruste summana (võrrand 10). Joonisel toodud katseandmed on täpselt samad, mis joonise 12 paneelidel A ja B. Pidevad jooned näitavad katseandmete lähendamist võrrandile 10 globaalse mittelineaarse regressiooni teel (teostas Hegne Pupart TalTech-ist).

Kõikide katseseeriade samaaegne lähendamine võrrandile 10 globaalse mittelineaarse regressiooni teel andis küll rahuldava tulemuse (Joonis 13), kuid parameetrite n.ö omavahelise „seotuse“ tõttu ei ole võimalik nende väärtuseid kõrge täpsusega määrata (**Tabel 1**).

Tabel 1. *ScDyPB* eeldatavate vormide (I ja II) kineetiliste parameetrite väärtused. Parameetrite väärtused on leitud Joonisel 13 toodud katseandmete lähendamisel võrrandile 10 globaalse mittelineaarse regressiooni teel. Ensüümi eeldatav vorm I ei ole redusteeriva substraadi poolt inhibeeritav. Tulemused tabelis on koos standardvigadega.

Parameeter	Ensüümi vorm I	Ensüümi vorm II
$[E]k_{\text{cat}}/E_0$ (s^{-1})	59 ± 3	184 ± 366
$K_{M(\text{ABTS})}$ (μM)	1012 ± 125	590 ± 1200
$K_{M(\text{H}_2\text{O}_2)}$ (μM)	894 ± 65	2060 ± 3840
$K_{i(\text{ABTS})}$ (μM)	-	$16 \pm 8,5$
$([E]k_{\text{cat}}/E_0)/K_{M(\text{ABTS})}$ ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	0,058	0,314
$([E]k_{\text{cat}}/E_0)/K_{M(\text{H}_2\text{O}_2)}$ ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	0,066	0,089

2.3.4 ScDyPB inaktivatsioon H₂O₂ poolt

Eelmises peatükis toodud tulemused näitasid ScDyPB substraatinhibitsiooni ABTS poolt (Joonis 12A), kuid substraatinhibitsiooni H₂O₂ poolt ei täheldatud (Joonis 12B). Siiski on teada, et redutseeriva substraadi puudumisel on paljud heem-peroksüdaasid, mis kuuluvad erinevatesse klassidesse, pöördumatult inaktiveeritavad kaassubstraadi H₂O₂ toimel (Zamorano et al., 2012). Seega soovisime välja selgitada, kas ScDyPB on H₂O₂ poolt inaktiveeritav ABTS puudumisel.

Peroksüdaasi inaktiveerimise kineetika määramiseks, inkubeerisin uuritavat ensüümi peroksiidiga. ScDyPB 1,5 µM vahelahjendused, mis olid kas 20 mM Tris-HCl puhvris pH 7,5 (sisaldas 100 mM NaCl) või 50 mM NaAc puhvris pH 4,0, olid eelinkubeeritud 0,1 mM, 1,0 mM või 5 mM H₂O₂-ga. Teatud ajapunktidel pärast H₂O₂ lisamist ensüümi vahelahjendustele võtsin 10 µL vahelahjendust ja lisisin 990 µL-le segule, mis sisaldas ABTS (1 mM) ja H₂O₂ (100 µM), ning mõõtsin ABTS oksüdeerimise algkiirust. Ensüümi jääkaktiivsuse määrasin spektrofotomeetriliselt, mõõtes ABTS^{•+} radikaali teket lainepikkusel 420 nm. Kontrollina kasutasin reaktsiooni kiiruse mõõtmist 0 mM H₂O₂-ga eelinkubeeritud vahelahjendustest võetud ensüümiga, mille korral lisisin ensüümi vahelahjendusse peroksiidi lahuse asemel vastavat puhvrit.

Jooniselt 14 nähtub, et ScDyPB on peroksiidi poolt inaktiveeritav nii pH 4,0 kui ka pH 7,5 puhvrites eelinkubeerimisel. ScDyPB jääkaktiivsuse $((v_i/E_0)_t)$ sõltuvus H₂O₂-ga eelinkubeerimise ajast (t) oli kooskõlas lihtsa esimest järku reaktsiooni kineetikaga (võrrand 11).

$$\frac{v_i}{E_0} = \left(\frac{v_i}{E_0}\right)_{max} e^{-k_{obs}t} \quad (11)$$

Võrrandis 11 on $(v_i/E_0)_{max}$ ScDyPB aktiivsus H₂O₂-ga inaktivatsiooni puudumisel ja k_{obs} on inaktivatsiooni kiiruskonstant.

H₂O₂ inaktivatsiooni kiiruskonstandi (k_{obs}) sõltuvus H₂O₂ kontsentratsioonist (Joonis 14C) on ligikaudu lineaarne viidates sellele, et ScDyPB inaktivatsiooni kiirus ei ole meie poolt kasutatud

H₂O₂ kontsentratsioonide vahemikus H₂O₂-ga küllastunud. Järgnevalt analüüsisime k_{obs} sõltuvust H₂O₂ kontsentratsioonist kasutades sirge võrrandit (12).

$$k_{obs} = k_0 + k_i[H_2O_2] \quad (12)$$

Võrrandis 12 on k_0 ScDyPB inaktivatsiooni esimest järku kiiruskonstant H₂O₂ puudumisel ja k_i on teist järku inaktivatsioonikonstant H₂O₂ jaoks.

Inaktivatsiooni kiiruskonstandi $k_{obs(H_2O_2)}$ ja H₂O₂ kontsentratsiooni sõltuvuse analüüsi jaoks lähendasime katseandmed lineaarsele regressioonisirgele (võrrand 12). Tulemused on esitatud Tabelis 2. Katseandmete lähendamisel sirgele regressioonivõrrandile saadud R² väärtused pH 4,0 ja pH 7,5 jaoks on vastavalt R² = 0,9968 ja R² = 0,9803.

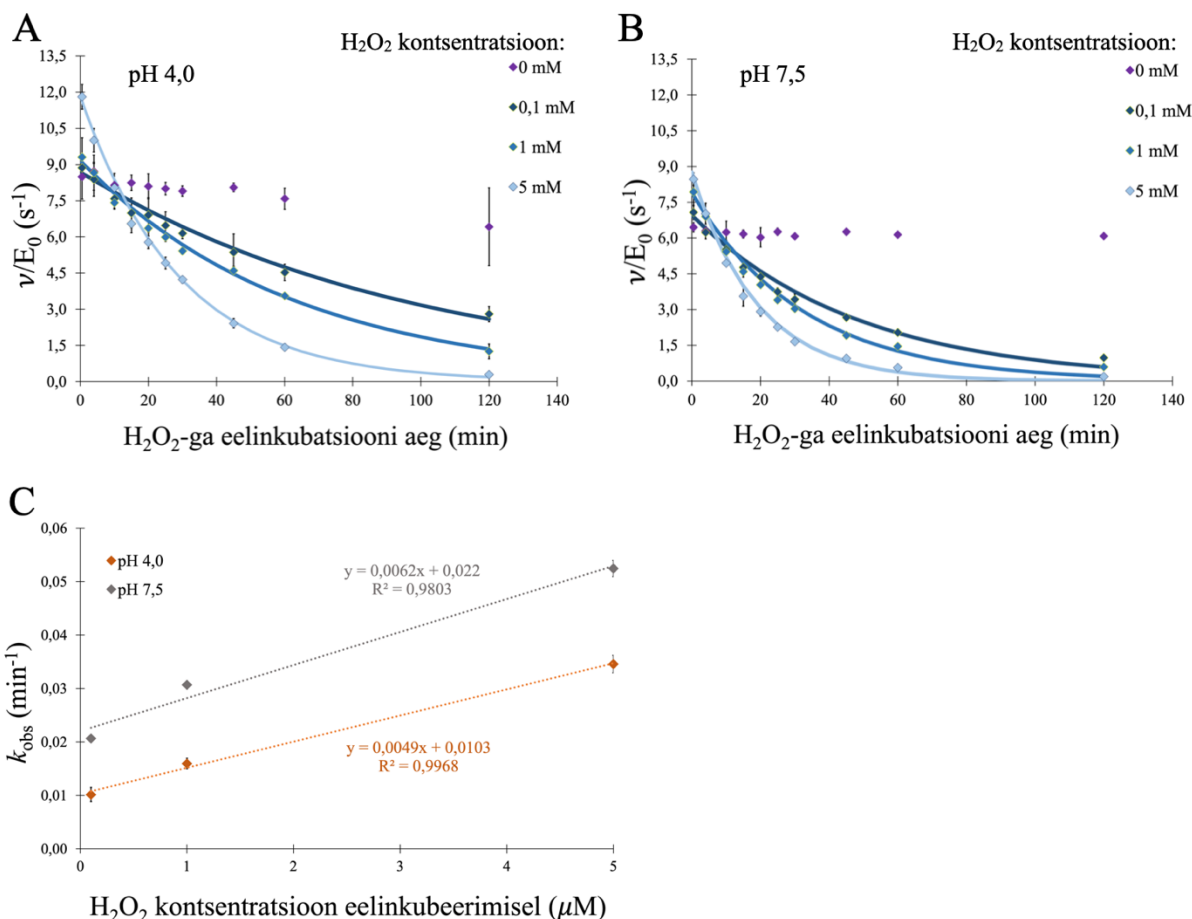
Tabel 2. ScDyPB inaktivatsioonil H₂O₂-ga saadud näilised kineetilised parameetrid. k_0 on ScDyPB inaktivatsiooni esimest järku kiiruskonstant H₂O₂ puudumisel ja k_i on teist järku inaktivatsioonikonstant H₂O₂ jaoks. Parameetrid on esitatud koos standardvigadega.

Parameeter	pH 4,0	pH 7,5
k_0 (s ⁻¹)	0,0103 ± 0,0009	0,022 ± 0,003
k_i (M ⁻¹ s ⁻¹)	0,0049 ± 0,0003	0,0062 ± 0,0009

Analüüsil saadud väärtused peegeldavad Joonisel 14A-B esitatud inaktivatsiooni tulemusi. Eelinkubatsioon pH 7,5 keskkonnas soodustab ScDyPB inaktivatsiooni H₂O₂ poolt rohkem võrreldes inkubatsiooniga pH 4,0 juures ja muutused ensüümi aktiivsuses on pH 7,5 korral suuremad. Pärast 120 min eelinkubeerimist 0,1 mM H₂O₂-ga on pH 7,5 vahelahjendusest pärineva ensüümi aktiivsus ABTS oksüdeerimisel kahanenud nullilähedaseks, kuid sama pikalt väldanud inkubeerimisel pH 4,0 juures säilitab ensüüm oma aktiivsuse ca 30% ulatuses. Siiski, H₂O₂ kontsentratsiooni tõstmisel eelinkubeerimise ajal 5 mM-ni on inaktivatsioon suurem ka happelises keskkonnas, millele viitavad ka H₂O₂ kontsentratsiooniga lineaarselt kasvavad $k_{obs(H_2O_2)}$ väärtused (Joonis 14C).

Graafikutel nähtuvad suuremad aktiivsused kõrgemate H₂O₂ kontsentratsiooniga lühiajalisel eelinkubeerimisel (antud katse puhul kuni 5 min) on tingitud reaktsiooni astuva H₂O₂ kui kaassubstraadi kõrgematest kontsentratsioonidest (Joonis 14A-B). Ka antud ajavahemike korral

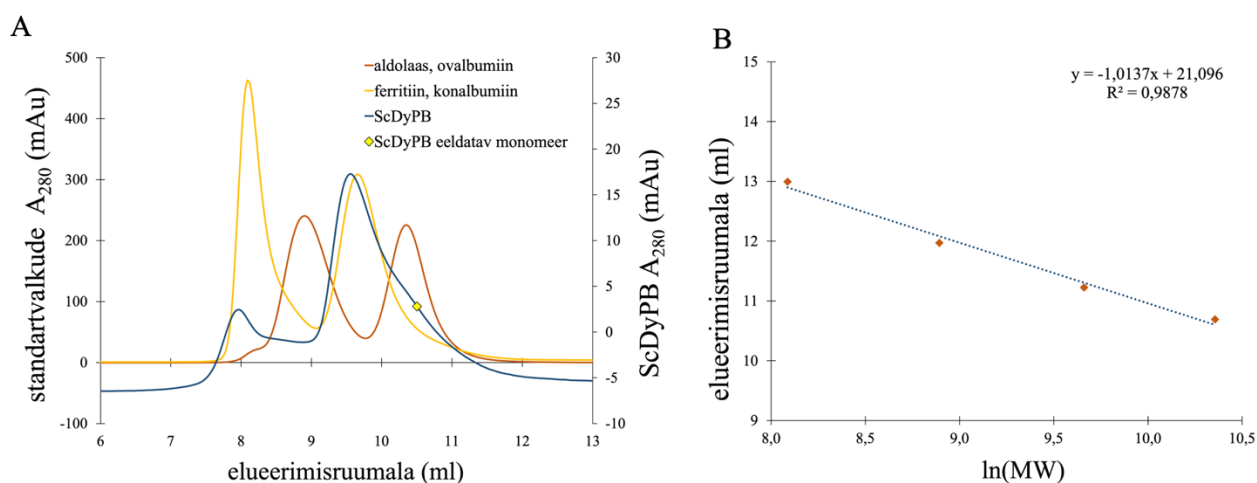
on vahelahjenduse pH väärtusel oluline efekt. Happelises keskkonnas, mille pH langeb kokku ensüümi aktiivsuse jaoks optimaalse väärtusega (Joonis 10B), on ABTS oksüdeerimise algiirused suuremad. Selline tulemus on kooskõlas Joonisel 11B toodud andmetega.



Joonis 14. ScDyPB inaktivatsioon H₂O₂ poolt. Eelinkubeerisin 1,5 μM ScDyPB vahelahjendusi 25 °C juures erinevas kontsentratsioonis H₂O₂-ga (näidatud joonisel) erinevat aega. Eelinkubatsioon toimus kas 50 mM NaAc pH 4,0 puhvris (A) või 20 mM Tris-HCl pH 7,5 puhvris (B). Kõik DyP vahelahjendused sisaldasid 0,1 g/L BSA. Kõik jääkaktiivsuse määramise reaktsioonid toimusid 50 mM NaAc pH 4,0 puhvris 25 °C juures. ABTS ja H₂O₂ kontsentratsioonid olid vastavalt 1,0 mM ja 100 μM, ScDyPB kontsentratsioon küvetis oli 15 nM. Reaktsioonid käivitasin H₂O₂-ga eelinkubeerunud DyP vahelahjenduse lisamisega substraatide segule. Produkti teket mõõtsin lainepikkusel 420 nm 2 min jooksul. Pidevad jooned (A-B) näitavad katseandmete mittelineaarset lähendamist vastavalt võrrandile 11. (C) k_{obs} sõltuvus H₂O₂ kontsentratsioonist eelinkubeerimisel. Esitatud on nii puhvris pH 7,5 kui ka puhvris pH 4,0 tehtud eelinkubeerimise tulemused. Punktiirjoon näitab katseandmete lähendamist vastavalt võrrandile 11. Parameetrite k_0 (s⁻¹) ja k_i (M⁻¹s⁻¹) väärtused leiti tulemuste lähendamisel regressioonisirgele (toodud joonisel). Kõik joonisel esitatud tulemused on kolme sõltumatu katse keskmised, veajooned näitavad standardhälvet.

2.3.5 ScDyPB näilise molekulmassi määramine

Aktiivsuskatsete tulemused viitavad sellele, et uuritav peroksüdaas eksisteerib lahustes kahes erinevas vormis E^I ja E^{II} , mis meie algse hüpoteesi järgi on valgu monomeerne- ja dimeerne vorm vastavalt. Nende kahe vormi kineetilised parameetrid erinevad teineteisest märgatavalt ning nende vormide osakaal lahustes nihkub ühe või teise vormi suunas sõltuvalt nii lahuse pH väärtusest kui ka peroksüdaasi kontsentratsioonist lahuses (Joonis 11). Järgmisena uurisin peroksüdaasi oligomerisatsiooni astet.



Joonis 15. ScDyPB näilise molekulmassi analüüs geelfiltratsiooni kolonnil. Valkude lahutamiseks kasutasin ÄKTA FPLC süsteemi, kolonni Superdex 75 Increase 10/300 GL üldmahuga 24 mL. Liikuv faas oli 20 mM Tris-HCl puhver pH 7,5 (sisaldas 100 mM NaCl). Voolutuskiirus oli 0,5 mL/min. Valkude neeldumise mõõtsin lainepikkusel 280 nm. Graafikul on esitatud viie valgu geellahutamise tulemused, millest neli on standardvalgud kaliibergraafiku (B) koostamiseks ning ScDyPB. Valkude pealekantavad hulgad olid: ovalbumiini 600 μ g, konalbumiini 900 μ g, aldolaasi 600 μ g, ferritiini 90 μ g, ScDyPB 92 μ g. Standardvalgud kanti peale paarikaupa lahustes, mis valmistati 20 mM Tris-HCl, 0,1 M NaCl pH 7,5 puhvis. Kõik lahutamiseks kasutatud valkude lahuseid inkubeerisin enne süstimist toatemperatuuril 1 tund. Iga süstitava proovi maht oli 150 μ L. Standardvalgud on graafikul kirjas nende kolonnist väljumise järjekorras, nende molekulmassid on toodud graafikul (A). Graafiku A vasak y-telg kirjeldab standardvalkude neeldumisi, parem y-telg kirjeldab ScDyPB neeldumist. Pidevad jooned näitavad erineva molekulmassiga ja erineva kontsentratsiooniga valkude elueerimist kolonnist. Punkt tähistab ScDyPB monomeerse vormi arvutusliku elueerimispiiki, mis on dimeerse vormi vastava piigiga kokku sulanud. Monomeerse ScDyPB elueerimispiigi ruumala arvutasin välja kaliibergraafiku põhjal saadud lineaarse regressiooni võrrandi abil (toodud joonisel).

Uuritava ensüümi oligomerisatsiooni astme uurimiseks analüüsisin ScDyPB näilist molekulmassi määrates selle elueerimisruumala geelfiltratsioonil ÄKTA FPLC (Joonis 15). Varasematest uuringutest on teada, et ensüümi ScDyPB monomeeri molekulmass $MW = 34$ kDa

(Pupart et al., 2023). Vastavalt sellele valisin standardvalkude komplekti kaliibergraafiku koostamiseks. Kasutasin nelja standardvalku kahe kaupa kombinatsioonides ning iga lahutamine andis kaks selget piiki. Valkude lahutamine toimub molekulide suuruse järgi, kus suuremad molekulid (k.a suurema oligomerisatsiooni astmega valgud) väljuvad kolonnist varem (elueerimisruumala on väiksem) ning väiksemad molekulid (nt monomeersed valgud) väljuvad hiljem (elueerimisruumala on suurem).

Siin on oluline arvesse võtta, et 14,5 μM ScDyPB inkubeerimisel toatemperatuuril tund aega 200 mM NaAc puhvril pH 4,0 sadenes välja, mistõttu sellistel tingimustel geelfiltratsiooni meil teha ei õnnestunud.

Uuritava ensüümi lahuse lahutamise tulemusena saime profiili mille pealt nähtub kaks selgelt eristuvat piiki. Kasutades standardvalkude teadaolevaid molekulmasse ning standardvalkudele vastavate piikide elueerimisruumalaid koostasime kaliibergraafiku, mille regressioonanalüüsil saime võrrandi $Y = -1,0137 \cdot x + 21,096$ ($R^2 = 0,9878$), mida kasutasime ScDyPB erinevate vormide molekulmasside välja arvutamisel. Tulemused on esitatud Tabelis 3.

Tabel 3. ScDyPB näilise molekulmassi määramine geelfiltratsioonkromatograafiaga. Elueerimisel saadud piikidele vastavate valgumolekulide MW (kDa) on arvatud kaliibergraafiku alusel. ScDyPB erinevate vormide oligomeriseerumisastme arvutamiseks jagasin saadud tulemused läbi ensüümi monomeeri molekulmassiga 34 kDa.

Analüüsitud valk	elueerimisruumala (mL)	MW (kDa)	valgu oligomeersus
ScDyPB (1. piik)	7,98	~ 446	13,1
ScDyPB (2. piik)	9,55	~ 91	2,6

Vastavalt meie arvutustele, ScDyPB lahutamisel saadud esimesele piigile (elueerimisruumala 7,978 mL) vastab molekul mille MW ~ 446 kDa (ensüümi 13-14 monomeeri ühendatud vorm) ning teisele piigile (elueerimisruumala 9,551 mL) vastab molekul mille MW ~ 91 kDa (ensüümi 2-3 monomeeri ühendatud vorm). Täpsemal vaatlusel näeme mõlema piigi puhul nõ „õlgu“, mis viitab lahendamata piikidele, ning tähendab mittetäiuslikku proovi lahutamist. Ka oligomerisatsiooni astme arvutamisel saadud tulemused viitavad sarnase molekulmassiga oligomeeride elueerimisele kolonnist ligikaudu samal ajal, mis viitab, et kahele oligomeerile vastavad piigid on kokku sulandunud. Kasutades kaliibersirge võrrandit ning teadaolevat ScDyPB monomeeri molekulmassi (34 kDa), saame välja arvutada monomeeri eeldatava elueerimisruumala (10,518 mL), mis on kooskõlas ScDyPB lahutamisel saadud kõvera teise

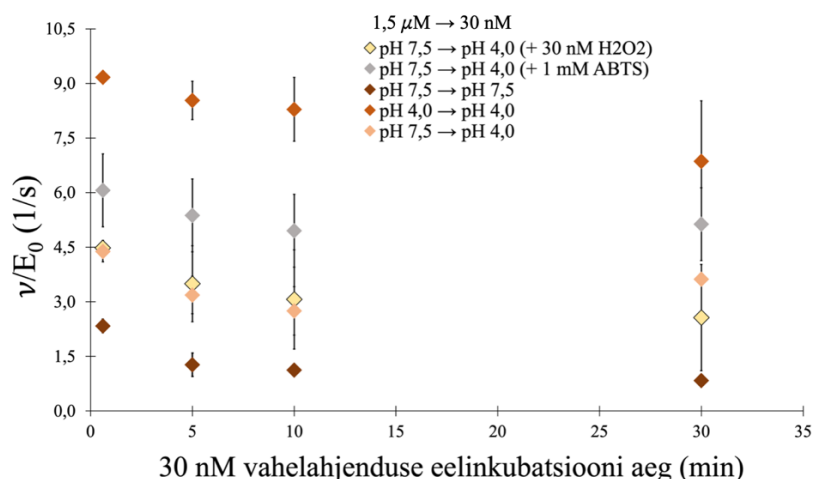
piigi juures nähtava õlaga (Joonis 15). Kuna meie kineetika tulemused viitasid asjaolule, et kõrgema aktiivsusega *ScDyPB* vormi osakaal on suurem pH 4,0 juures (Joonis 11B) siis proovisime teha geelfiltratsioon ka pH 4,0 juures. Kahjuks selgus, et *ScDyPB* ei olnud piisavalt stabiilne NaAc pH 4,0 pihvris ning sellistel tingimustel geelfiltratsiooni analüüsi meil teha ei õnnestunud.

Suurema täpsuse saamiseks ja kromatograafiliste piikide osalise kattumise ennetamiseks võiks järgmisel *ScDyPB* geellahutamisel muuta liikuva faasi komponentide proportsiooni/kombinatsiooni ning vähendada voolutuskiirust.

2.3.6 *ScDyPB* erinevate vormide vahelise tasakaalu tekkimine

Geelfiltratsiooni tulemustest nähtus, et *ScDyPB* võib esineda lahuses erinevate oligomeersete vormidena, ning, vastavalt aktiivsuskatsete tulemustele, võivad nendel olla erinevad katalüütilised omadused. Joonisel 11A esitatud tulemused on kõik saadud kasutades 15 nM *ScDyPB* kontsentratsiooni küvetis. Kuna kiirused sõltusid *ScDyPB* kontsentratsioonist vahelahjenduses, mida kasutati reaktsiooni käivitamiseks, ja samas ka vahelahjenduse pH väärtusest, siis võib eeldada, et ABTS oksüdeerumise mõõtmise vältel (2 min) ei jõua küvetis tekkida uus tasakaal erinevate *ScDyPB* vormide vahel. Vastasel juhul peaksid kõik tulemused langema kokku 15 nM koguensüümi kontsentratsioonile vastavale *ScDyPB* vormide vahelisele tasakaalule ja kiirused ei sõltuks *ScDyPB* kontsentratsioonist vahelahjenduses.

Uurimaks võimalike *ScDyPB* vormide vahelise tasakaalu tekkimise kiirust, eelinkubeerisin 30 nM *ScDyPB* vahelahjendusi ajavahemikus 0,5 kuni 30 min enne ABTS-i oksüdeerimise kiiruse mõõtmist standardtingimustel (Joonis 16). Reaktsioonid käivitasin 500 µL substraatide segu lisamisega küveti, milles inkubeerisin uuritava peroksüdaasi 30 nM vahelahjendust üldmahuga 500 µL. Nii ensüümi 1,5 µM vahelahjenduse, kui ka sellest valmistatud 30 nM vahelahjenduse puhul kasutasin kahte erinevat puhvrit (20 mM Tris-HCl pH 7,5, mis sisaldas 100 mM NaCl, ning 50 mM NaAc pH 4,0), et saada põhjalikumat ülevaadet keskkonna pH mõjust *ScDyPB* vormide vahelise tasakaalu tekkimise kiirusele.



Joonis 16. *ScDyPB* erinevate vormide vahelise tasakaalu tekkimise kiiruse määramine. Kõik reaktsioonid toimusid 50 mM NaAc pH 4,0 puhvis toatemperatuuril. ABTS ja H₂O₂ kontsentratsioonid olid vastavalt 1,0 mM ja 100 µM ning DyP kontsentratsioon küvetis oli 15 nM. Reaktsioonid käivitasin ABTS ja H₂O₂ segu lisamisega küveti, mis sisaldas 30 nM DyP vahelahjendust. Graafikul on reaktsioonikiiruste sõltuvus 30 nM DyP vahelahjenduse eelinkubatsiooni ajast ning DyP 1,5 µM ja sellest valmistatud 30 nM vahelahjenduste pH väärtustest. Katsetes on kasutatud kas 20 mM Tris-HCl pH 7,5 puhvrit või 50 mM NaAc pH 4,0 puhvrit, kõik *ScDyPB* 1,5 µM vahelahjendused sisaldasid 0,1 g/L BSA. Graafikul on esitatud ka ensüümi 30 nM vahelahjenduse eelinkubeerimisel H₂O₂-ga ja ABTS-ga saadud tulemused (eelinkubeerimisel kasutatud substraatide kontsentratsioonid on toodud joonisel). Tulemused on esitatud kolme sõltumatu katse keskmisena ja veajooned näitavad standardhälvet.

Jooniselt 16 nähtub, et vahelahjenduste valmistamisel kasutatud puhvri pH väärtus tõepoolest mängib olulist rolli ensüümi aktiivsuse seisukohast. Kooskõlas tulemustega, mis on esitatud Joonisel 11B, on ka siin katses saadud reaktsioonikiirused märkimisväärselt kõrgemad juhul kui mõlemad vahelahjendused olid pH 4,0 puhvis ning tulemused on kõige madalamad kui mõlemad vahelahjendused olid valmistatud pH 7,5 puhvisse. Need tulemused on kooskõlas meie oletusega, et tasakaalu tekkimine erinevate *ScDyPB* vormide vahel on piisavalt aeglane, et ABTS oksüdeerumise mõõtmise vältel (2 min) uut tasakaalu ei saabu. Seda kinnitab asjaolu, et 1,5 µM vahelahjendusest pH 7,5 valmistatud 30 nM vahelahjendus pH 4,0 annab kiiruse väärtused, mis jäävad kahe eelnevalt kirjeldatud tulemuste vahele.

Lisaks näitavad tulemused, et koos ABTS-iga eelinkubeeritud ensüümil on kõrgem aktiivsus. Vastavas katses oli 1,5 µM *ScDyPB* vahelahjendus puhvis pH 7,5 ning sellest valmistatud 30 nM vahelahjendusele pH 4,0 puhvis lisasin kas ABTS-i (lõppkontsentratsiooniga 1 mM) või H₂O₂ (lõppkontsentratsiooniga 30 nM). ABTS-i lisamisel on reaktsioonikiirused suuremad kui ilma lisandita katses, samas H₂O₂ puhul sarnast efekti ei ilmnenud.

Kuna meie hüpoteesi kohaselt eksisteerib uuritav peroksüdaas lahustes kahes erinevas vormis (E^I ja E^{II}), millest üks on oluliselt suurema aktiivsusega, siis sellist tulemust saame seletada kui ABTS-i molekuli võimet pärssida aktiivse vormi muutumist vähemaktiivseks vormiks eelinkubatsioonil.

2.4 Arutelu

Ensüümide esinemine di- või multimeeridena on looduses laialt levinud nähtus. Hästi on teada multimeersuse roll allosteeriliste ensüümide puhul. Allosteerilistel ensüümidel esineb substraadi seostumiskohast eraldiseisev n.ö regulaatormolekulide seostumiskoht, mis tihtipeale paikneb subühikute (ensüümkompleksi koostises olev monomeer) kokkupuute piirpinnal. Regulaatormolekulide seondumine põhjustab subühikute omavahelise orientatsiooni muutust, mille tagajärjel ensüümi aktiivsus kas suureneb (allosteeriline aktivatsioon) või väheneb (allosteeriline inhibitsioon). Allosteerilistele ensüümidele on omane positiivne kooperatiivsus, mis väljendub reaktsioonikiiruse sigmoidse sõltuvusena substraadi kontsentratsioonist. Näilist positiivset kooperatiivsust on täheldatud ka mitmete DyP peroksüdaaside puhul (Chaplin et al., 2017; Chen et al., 2015; Shrestha et al., 2016; Zitare et al., 2021). Osad neist ensüümidest on multimeersed (Chen et al., 2015; Shrestha et al., 2016), kuid osad mitte (Zitare et al., 2021). Lisaks ei ole leitud DyP peroksüdaaside allosteerilisi regulaatoreid. Ka käesolevas töös uuritud DyP peroksüdaas, *ScDyPB*, esines multimeerina (Joonis 15, Tabel 3), kuid positiivset kooperatiivsust ABTS oksüdeerimisel ei esinenud. Eeltoodu põhjal võib järeldada, et DyP peroksüdaaside puhul puuduvad selged tõendid selle kohta, et ensüümi multimeersus tuleneb tema käitumisest n.ö. klassikalise allosteerilise ensüümina. Sellegi poolest leidsime vihjeid selle kohta, et *ScDyPB* ABTS oksüdeeriv aktiivsus sõltub ensüümi oligomerisatsiooni astmest. Tähelepanu väärivad järgmised tulemused:

- (i) *ScDyPB* aktiivsus sõltub ensüümi kontsentratsioonist vahelahjenduses mida kasutati ensüümreaktsiooni käivitamiseks (Joonis 11).
- (ii) ABTS oksüdatsiooni kineetika viitas sellele, et ensüüm esineb kahe, kineetiliselt erineva, vormina (Joonis 13, võrrand 10).

Kõige lihtsam seletus tähelepanekule (i) oleks *ScDyPB* mitte-spetsiifiline seondumine laboriplastikule. Esimeste katsete tulemused (pole esitatud) näitasid, et *ScDyPB*-l tõepoolest esineb mitte-spetsiifiline seondumine. Leidsin, et 0,1 g/L BSA juuresolekul *ScDyPB* vahelahjendustes mittespetsiifilist seondumist ei olnud ning seetõttu otsustasime lisada BSA-d

lõppkongtsentratsioon 0,1 g/L ensüümide 0,15 μM ja 1,5 μM vahelahjendustele kõikides järgnevat katsetes.

Ensüümi aktiivsuse sõltuvus vahelahjenduste kontsentratsioonidest võib olla seletatav olukorraga, kus ensüüm eksisteerib lahustes kahe erineva oligomerisatsiooni astmega vormi seguna ja kõrgema oligomerisatsiooni astmega ensüüm omab kõrgemat aktiivsust. Siiski saame me ensüümi aktiivsuse erinevusi (Joonis 11) seletada vaid lisaeldusel, et ensüümi vormide tasakaalu saavutamine on piisavalt aeglane ning produkti mõõtmise aja jooksul (2 min) oluliselt ei muutu. Aeglasele tasakaalule viitavad ScDyPB vahelahjenduste 30 minutilise eelinkubatsiooni jooksul esinevad muutused aktiivsuses (Joonis 16). Huvitav on, et ABTS juuresolek vahelahjenduse eelinkubatsioonis näis soodustavat kõrge aktiivsusega vormi (Joonis 16).

Tähelepanek (ii) on samuti kooskõlas ScDyPB esinemisega erinevate vormidena. Jooniselt 12 nähtub, et heem-peroksüdaaside jaoks tavapärase ping-pong kineetika ei kirjelda ScDyPB katalüütilist aktiivsust piisavalt hästi, kuna sellele lisandub ensüümi substraatinhibitsioon ABTS-i poolt, mida nägime H_2O_2 madalatel kontsentratsioonidel (Joonis 12A). Seetõttu ei ole ABTS kontsentratsiooni varieerumisel saadud tulemused kirjeldatavad tavalise Michaelis-menteni võrrandiga kirjeldatavad (võrrand 6) ning ka substraatinhibitsiooni arvestatavatele võrranditele (5 ja 7) tulemuste lähendamisel näeme tulemuste süsteemset kõrvalekallet. Vaatamata substraatinhibitsioonile ABTS poolt, ei läinud ensüümi aktiivsus siiski ABTS kontsentratsiooni kasvades nulli nagu võiks eeldada võrrandite 5 ja 7 järgi. Jooniselt 12 C-E nähtub, et ka näilised parameetrid $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$, $K_{\text{M}}^{\text{app}}(\text{H}_2\text{O}_2)$ ja $k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_{\text{M}}^{\text{app}}(\text{H}_2\text{O}_2)$ ei käitunud vastavalt võrranditele 8 ja 9 ning näha on süsteemseid kõrvalekaldeid.

Arvestades kõike varem kirjeldatut saame eeldada, et ScDyPB kineetika on kvalitatiivselt kirjeldatav olukorraga, kus ensüüm esineb lahuses kahe, kineetiliselt erineva vormi seguna (võrrand 10), millest üks on substraatinhibeeritav ABTS-ga, teine aga mitte (Tabel 1). Katseandmete lähendamisel võrrandile 10 globaalse mittelineaarse regressiooni teel oli küll võimalik ennustada parameetrite väärtusi ensüümi vormile I (Tabel 1), kuid parameetrite väärtuste omavahelise seotuse tõttu tuleks nendesse tulemustesse suhtuda ettevaatlikkusega.

Substraatinhibitsioon redutseeriva substraadi poolt on DyP-tüüpi peroksüdaaside jaoks tavapärase nähtus (Zitare et al., 2021). Arvatavasti, on põhjuseks ABTS mitteproduktiivne seostumine puhkeolekus ensüümile (Joonis 17). Ka H_2O_2 -ga peroksüdaaside inaktiveerimine on ootuspärane ning nende katalüütilisest mehhanismist tulenev nähtus (Hiner et al., 2002).

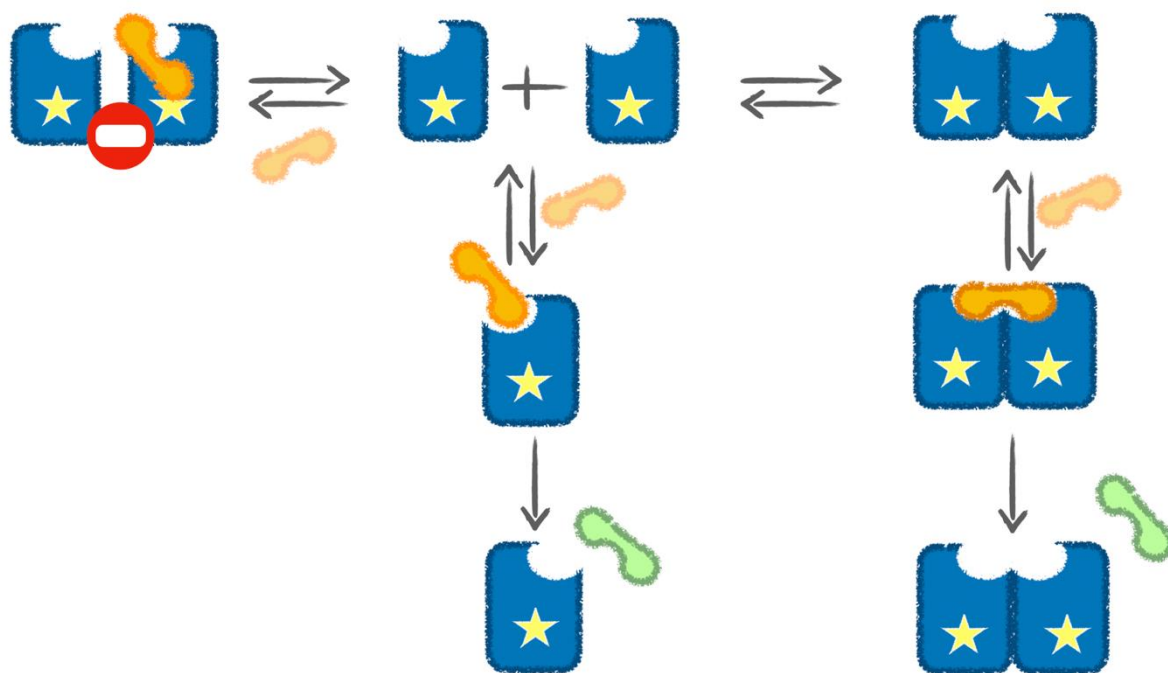
Vaatamata sellele, et varasemad andmed viitavad DyP-tüüpi ensüümide substraatinhibitsioonile peroksiidi poolt, *ScDyPB* puhul me seda ei näinud (Joonis 12B) (Avram et al., 2018). Siiski, redutseeriva substraadi puudumisel keskkonnas, toimub ensüümi pöördumatu inaktivatsioon H_2O_2 poolt (Joonis 14). See nähtus võib olla seletatav olukorraga, kus peroksiid seostub ensüümi Cpd I-le ning moodustub katalüütiliselt inaktiivne ensüümi vorm Cpd III, nagu on näidatud taimedest pärit peroksüdaaside puhul (Hiner et al., 2002). ABTS juuresolekul aga konkureerivad Cpd I-ga reageerimise pärast mõlemad substraadid ning edukus sellises konkurentsisis on määratud vastavate spetsiifilisuskonstandite k_{cat}/K_M väärtuste poolt. Võrreldes omavahel $k_{cat}/K_{M(ABTS)}$ väärtust ($58\,000\ M^{-1}s^{-1}$, Tabel 1) ja k_i väärtust H_2O_2 jaoks ($0,0049\ M^{-1}s^{-1}$, Tabel 2) näeme, et Cpd I reageerimine ABTS-iga on rohkem kui 10^7 korda eelistatud võrreldes tema reageerimisele H_2O_2 -ga. Tõenäoliselt on see põhjuseks, miks me ei näe substraatinhibitsiooni H_2O_2 poolt (Joonis 12B).

Kõige lihtsam mudel, mis selgitaks antud töös saadud tulemusi on toodud joonisel 17. Meie mudeli kohaselt:

- (i) eksisteerib *ScDyPB* kahe vormi seguna, aga mõlemad hüpoteetilised ensüümi vormid omavad ABTS oksüdeerivat aktiivsust ning lihtsuse mõttes eeldame, et tegemist on mono- ja dimeerse ensüümi vormiga
- (ii) seostudes dimeerse vormiga nihutab ABTS dimeer monomeer tasakaalu dimeerse vormi suunas
- (iii) ABTS võib mitteproduktiivselt seostuda monomeersele vormile põhjustades substraatinhibitsiooni; dimeersele vormile ABTS mitteproduktiivselt ei seostu

Joonisel 17 toodud mudeli puhul on tegemist lihtsustatud lähenemisega, kuna *ScDyPB* analüüs geelfiltratsiooni kolonnil viitas kõrgemat järku oligomeeride olemasolule (Joonis 15, Tabel 3). Sellegi poolest arvame, et Joonisel 11B toodud andmed ja lihtsast dimeer/monomeer tasakaalust tuletatud mudel on põhimõtteliselt kooskõlas ka kõrgemate oligomeeride puhul (näiteks, trimeer ja heksameer jne). Kuigi võrrandi 4 tuletamisel eeldasime, et monomeerne vorm on inaktiivne, siis on see ka kooskõlas olukorraga, kus ensüüm on meie katse tingimustes (1,0 mM ABTS, Joonis 11B) nii tugevalt ABTS poolt substraat inhibeeritud, et tema aktiivsus läheneb nullile. Põhimõtteliselt on meie tulemused on seletatavad ka olukorraga, kus ABTS oksüdeerimise aktiivsus on monomeersel ja dimeersel vormil sama, kuid dimeerse vormi puhul ei ole ABTS-il mitteproduktiivset seostumist ja sellest tulenevat substraatinhibitsiooni (Joonis 17).

Ensüümi *ScDyPB* eeldatav oligomeriseerumine on kooskõlas varasemate andmetega DyP-tüüpi ensüümide kohta, mis viitavad nende bioloogiliste funktsioonide seosele multimeersusega ning enkapsuleerimisega edaspidiseks transpordiks rakust väliskeskkonda (Sutter et al., 2008; Tang et al., 2021). Võrreldes pH 4,0 ja pH 7,5 juures saadud tulemusi näeme, et happelisem keskkond eeldatavasti soodustab *ScDyPB* dimeeride või suuremate kompleksite moodustumist (Joonis 11B). pH 7,5 juures on valkudes esinevad karboksüülrühmad negatiivse laenguga ja aminorühmad positiivse laenguga. Seega on vähetõenäoline, et pH 4,0 juures on rohkem võimalike negatiivse ja positiivse laenguga rühmade paare. Pigem on olukord vastupidine sest pH 4,0 juures võivad osad karboksüülrühmad oma negatiivse laengu kaotada. Eeltoodut arvestades võib arvata, et laeng-laeng interaktsioonid ei osale *ScDyPB* oligomeersete vormide stabiliseerimisel. Edasised uuringud peavad näitama täpsemaid seoseid oligomeeride suuruse ja aktiivsuse vahel aga ka oligomeeride stabiliseerimisel osalevaid interaktsioone.



Joonis 17. Eeldatav *ScDyPB* erinevate kineetiliste omadustega vormide tasakaal ensüümi lahuses. Siniste kastidega on tähistatud *ScDyPB* monomeerid, kollaste tähtedega on tähistatud heem, oranži värvi on substraat (ABTS molekul) ning roheline on produkt (ABTS⁺). Punase keelumärgiga kompleks tähistab ABTS-iga mitte-produktiivses kompleksis olevat, katalüütiliselt inaktiivset ensüümi vormi. Dimeersele ensüümi vormile on võimalik ainult ABTS produktiivne seostumine. Monomeersele ensüümi vormile on võimalik nii produktiivne kui ka mitteproduktiivne ABTS seostumine.

3. KOKKUVÕTE

Peroksüdaasid on looduses laialt levinud ensüümid, mis katalüüsivad reaktsioone, milles erinevad substraadid oksüdeeritakse vesinikperoksiidi toimetel. Hiljuti avastatud, värvaineid lagundavad peroksüdaasid (Dye decolorizing peroxidase, DyP) on võimelised oksüdeerima erinevaid substraate, selahulgas ligniini ning toksilisi antrakinoon- ja asovärve. Sellest tulenevalt on suur huvi nende ensüümide vastu.

Magistritöös on uuritud ja analüüsitud DyP-tüüpi peroksüdaasi *ScDyPB* kineetilisi omadusi mudelsubstraadi ABTS oksüdeerimisel. Uuritav ensüüm pärineb mullabakterist *Streptomyces coelicolor*, mille genoomist tuvastati hiljuti kolm erinevat DyP-tüüpi ensüüme kodeerivat järjestust, kaks A-tüüpi ning üks B-tüüpi DyP-i geenid (Pupart et al., 2023). Vaatamata sellele, et *S. coelicolor* on aktinomütsetide uurimisel mudelorganism, on seniajani selle produtseeritavad DyP-tüüpi peroksüdaasid detailselt kirjeldamata (Bentley et al., 2002). Alles hiljuti analüüsisid Pupart jt kolme *S. coelicolor* DyP peroksüdaaside katalüütilisi omadusi ABTS ja ligniini oksüdeerimisel, keskendudes eelkõige aktiivsusele ligniinil (Pupart et al., 2023). Meie eesmärgiks oli peroksüdaasi *ScDyPB* kineetiliste omaduste põhjalikum analüüs.

Töö tulemusena täheldasime, et *ScDyPB* kineetika on keeruline ning ei vasta ei klassikalisele Michaelis-Menteni kineetikale ega ka peroksüdaasidele iseloomulikule substraatinihbitsiooni sisaldavale kineetikale. Ehkki *ScDyPB* näitas klassikalist Michaelis-Menteni kineetikat kaassubstraadi H_2O_2 suhtes (Joonis 12B, Võrrand 6), oli kiiruse sõltuvus ABTS-i kontsentratsioonist keerulisem. Viimane oli kõige paremini kirjeldatav Michaelis-Menteni ja substraat inhibitsiooni kineetika summana (võrrand 10). Sarnaselt teistele peroksüdaasidele esines *ScDyPB* puhul pöördumatu inaktiveerimine H_2O_2 -ga eelinkubeerides (Joonis 14A-B). *ScDyPB* puhul esines ensüümreaktsioonidele tavapäratu aktiivsuse sõltuvus ensüümi kontsentratsioonist selle vahelahjenduses, mida kasutati reaktsioonide käivitamiseks. Lisaks mõjutas aktiivsust ensüümi vahelahjenduse pH. *ScDyPB* analüüs geelfiltratsioonkromatograafia abil näitas erinevate oligomeeride esinemist *ScDyPB* lahuses (Joonis 15). Valdav osa ensüümist oli oligomerisatsiooni astmega ligikaudu 3, kuid esines ka rohkem kui 10-st monomeerist koosnev agreagaat (Tabel 3).

Pakume välja mudeli mille kohaselt esineb *ScDyPB* lahustes kahe erineva vormi tasakaalulise seguna, millel on erinevad kineetilised omadused, ning nende kahe vormi tasakaalu mõjutavad ensüümi kontsentratsioon lahuses ning lahuse pH väärtus. Eeldame, et need erinevad ensüümi

vormid on erineva astmega *ScDyPB* oligomeerid. Lihtsuse mõttes eeldame, et vaadeldav tasakaal on monomeeri ja dimeeri vahel. Dimeersele vormile on võimalik ainult produktiivne ABTS seostumine, samas monomeersele vormile seostub ABTS, nii produktiivselt kui ka mitte-produktiivselt. ABTS-iga mitte-produktiivselt seostunud ensüüm on katalüütiliselt inaktiivne (Joonis 17). Olukorras, kus prevaleerib monomeerne vorm, allub kinineetika ABTS substraat inhibitsiooni kineetikale. Olukorras, kus prevaleerib dimeerne vorm, allub kineetika Michaelis-Menteni kineetikale. Olukorras, kus mõlemad vormid on piisavalt esindatud, on tegemist summaga Michaelis-Menteni ja substraat inhibitsiooni kineetikast.

The peroxidase *ScDyPB* of the bacterium *Streptomyces coelicolor* exists as kinetically different enzyme forms

Darja Vastšjonok

Summary

Peroxidases are ubiquitous enzymes that catalyze reactions in which various substrates are oxidized by hydrogen peroxide (InterPro database). According to the RedOxiBase database, peroxidases are divided into heme- and non-heme peroxidases, by their ability to bind Fe-associated heme and use it as an electron acceptor in the catalytic cycle. The peroxidase investigated in this work belongs to Dye decolorizing Peroxidase superfamily (DyP), the recently discovered superfamily of heme peroxidases, which has shown a unique ability to degrade synthetic dyes (Kim & Shoda, 1999).

According to the structural classification present in SCOP database, DyP-s belong to the superfamily of dimeric $\alpha + \beta$ barrel proteins and have a very specific ferredoxin-like fold in their tertiary structure (SCOP database). According to the structure based sequence alignment DyP-type enzymes were divided into classes A, B, C and D (PerOxiBase database). Enzymes that belong to classes A - C are mainly of bacterial origin, whereas enzymes belonging to class D are of fungal origin (Ahmad et al., 2011). All DyP-s share the overall tertiary structure of monomers and a unique conserved motif GXXDG forming their catalytic center, which distinguishes them from classical plant peroxidases (Ogola et al., 2009; Sugano, 2009).

DyP-s have shown activity both as monomers and oligomers (Duan et al., 2018; Johjima et al., 2003; Kim & Shoda, 1999; Liers et al., 2013; Sugawara et al., 2017), whereas quaternary structures of DyP-s vary widely both between members of different classes and within a single class (Liu et al., 2011, 2017; Ogola et al., 2009; Shrestha et al., 2016; Zubieta, Joseph, et al. al., 2007; Zubieta, Krishna, et al., 2007; Yoshida et al., 2016). Although the natural substrates of most DyP-s are not known to date, these peroxidases are able to catalyze the oxidation of a wide spectrum of compounds, including synthetic dyes and lignin (Brown et al., 2012; Roberts et al., 2011; Scheibner et al., 2008; Pupart et al., 2023).

In this study, we investigated and analyzed the kinetic properties of the DyP from *Streptomyces coelicolor* in the oxidation of the model substrate ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt).

The object of our study, enzyme ScDyPB, comes from the soil bacterium *Streptomyces coelicolor*, which genome encodes three different Dyp-s, two A-type and one B-type DyP (Pupart et al., 2023). Despite the fact that *S. coelicolor* is the model actinomycete used in different studies, the DyP-s encoded by this organism have not been described in details yet (Bentley et al., 2002). Only recently, Pupart et al. have analyzed the catalytic properties of all the DyP-s from *S. coelicolor* in the oxidation of a model substrate ABTS and lignin, however the main focus of their study was to analyze enzymes' activity on lignin (Pupart et al., 2023). In our work, we have focused on a more comprehensive analysis of kinetic properties of one particular peroxidase from *S. coelicolor*, namely ScDyPB.

As a result, we observed that the kinetics of ScDyPB is complex and it does not correspond either to the classic Michaelis-Menten kinetics nor to the classic substrate inhibition kinetics characteristic of peroxidases. Although ScDyPB showed classical Michaelis-Menten kinetics with respect to its co-substrate H₂O₂ (Figure 12B, equation 6), the rate dependence on ABTS concentration was more complex. The latter was best described as the sum of Michaelis-Menten and substrate inhibition kinetics (equation 10). In accordance with the kinetics of classical peroxidases, ScDyPB was irreversibly inactivated upon preincubation with H₂O₂ (Figure 14A-B). In the case of ScDyPB, there was a dependence of the activity on the concentration of the enzyme in its intermediate dilution used to initiate the reactions, which is unusual for enzyme reactions. In addition, we saw the enzyme's activity dependence on the pH value of the enzyme solution. The oligomerization state of ScDyPB was assessed by size exclusion chromatography, which revealed the presence of different oligomers in the ScDyPB solution (Figure 15). For the most part, ScDyPB existed in the oligomerization degree of approximately 3, but there was also aggregates consisting of more than 10 monomers (Table 3).

Hereby we propose a model according to which ScDyPB exists in solutions as an equilibrium mixture of two different forms with different kinetic properties, and the ratio of these two forms is affected by both — the concentration of the enzyme in the solution and the pH value of the solution. We hypothesize that these forms differ by the oligomerization states. For simplicity, we assume that the observed equilibrium is between monomeric and dimeric enzyme forms. We also assume that binding of ABTS to enzyme dimeric form is strictly productive, whereas

binding of ABTS to the monomeric form can be both — productive and non-productive. The latter results in catalytically inactive enzyme (Figure 17). If the monomeric form prevails in the reaction, then the *ScDyPB* kinetics is subject to the kinetics of substrate inhibition by ABTS and in the opposite situation with the dimer form prevailing, the *ScDyPB* kinetics obey Michaelis-Menten kinetics. Finally, in a situation where both enzyme forms are represented sufficiently in a solution, the *ScDyPB* kinetics is a sum of two — the substrate inhibition and Michaelis-Menten kinetics.

5. KIRJANDUSE LOETELU

- Ahmad, M., Roberts, J. N., Hardiman, E. M., Singh, R., Eltis, L. D., & Bugg, T. D. H. (2011). Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a Lignin Peroxidase. *Biochemistry*, *50*(23), 5096–5107. <https://doi.org/10.1021/bi101892z>
- Avram, A., Sengupta, A., Pfromm, P., Zorn, H., Lorenz, P., Schwarz, T., Nguyen, K., & Czermak, P. (2018). Novel DyP from the basidiomycete *Pleurotus sapidus*: Substrate screening and kinetics. *Biocatalysis*, *4*, 1–13. <https://doi.org/10.1515/boca-2018-0001>
- Baratto, M. C., Sinicropi, A., Linde, D., Sáez-Jiménez, V., Sorace, L., Ruiz-Duenas, F. J., Martinez, A. T., Basosi, R., & Pogni, R. (2015). Redox-Active Sites in *Auricularia auricula-judae* Dye-Decolorizing Peroxidase and Several Directed Variants: A Multifrequency EPR Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, *119*(43), 13583–13592. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.5b02961>
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., ... Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, *417*(6885), Article 6885. <https://doi.org/10.1038/417141a>
- Brown, M. E., Barros, T., & Chang, M. C. Y. (2012). Identification and Characterization of a Multifunctional Dye Peroxidase from a Lignin-Reactive Bacterium. *ACS Chemical Biology*, *7*(12), 2074–2081. <https://doi.org/10.1021/cb300383y>
- Chaplin, A. K., Wilson, M. T., & Worrall, J. A. R. (2017). Kinetic characterisation of a dye decolourising peroxidase from *Streptomyces lividans*: New insight into the mechanism of anthraquinone dye decolourisation. *Dalton Transactions*, *46*(29), 9420–9429. <https://doi.org/10.1039/C7DT01144J>
- Chen, C., & Li, T. (2016). Bacterial dye-decolorizing peroxidases: Biochemical properties and biotechnological opportunities. *Physical Sciences Reviews*, *1*(9). <https://doi.org/10.1515/psr-2016-0051>
- Chen, C., Shrestha, R., Jia, K., Gao, P. F., Geisbrecht, B. V., Bossmann, S. H., Shi, J., & Li, P. (2015). Characterization of Dye-decolorizing Peroxidase (DyP) from *Thermomonospora curvata* Reveals Unique Catalytic Properties of A-type DyPs. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(38), 23447–23463. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.658807>
- Colpa, D. I., Fraaije, M. W., & van Bloois, E. (2014). DyP-type peroxidases: A promising and versatile class of enzymes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *41*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1371-6>
- Conn, J. E. (1943). The Pigment Production of *Actinomyces coelicolor* and *A. violaceus-ruber*. *Journal of Bacteriology*, *46*(2), 133–149. <https://doi.org/10.1128/jb.46.2.133-149.1943>
- Contreras, H., Joens, M. S., McMath, L. M., Le, V. P., Tullius, M. V., Kimmey, J. M., Bionghi, N., Horwitz, M. A., Fitzpatrick, J. A. J., & Goulding, C. W. (2014). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* Nanocompartment and Its Potential Cargo Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(26), 18279–18289. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.570119>

- Duan, Z., Shen, R., Liu, B., Yao, M., & Jia, R. (2018). Comprehensive investigation of a dye-decolorizing peroxidase and a manganese peroxidase from *Irpex lacteus* F17, a lignin-degrading basidiomycete. *AMB Express*, 8(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0648-6>
- Fernández-Fueyo, E., Linde, D., Almendral, D., López-Lucendo, M. F., Ruiz-Dueñas, F. J., & Martínez, A. T. (2015). Description of the first fungal dye-decolorizing peroxidase oxidizing manganese(II). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(21), 8927–8942. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6665-3>
- Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T., & Poulos, T. L. (1997). Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Structural Biology*, 4(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nsb1297-1032>
- Goblirsch, B., Kurker, R. C., Streit, B. R., Wilmot, C. M., & DuBois, J. L. (2011). Chlorite Dismutases, DyPs, and EfeB: 3 Microbial Heme Enzyme Families Comprise the CDE Structural Superfamily. *Journal of Molecular Biology*, 408(3), 379–398. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.047>
- Hiner, A. N. P., Ruiz, J. H., López, J. N. R., Cánovas, F. G., Brisset, N. C., Smith, A. T., Arnao, M. B., & Acosta, M. (2002). Reactions of the Class II Peroxidases, Lignin Peroxidase and *Arthromyces ramosus* Peroxidase, with Hydrogen Peroxide: CATALASE-LIKE ACTIVITY, COMPOUND III FORMATION, AND ENZYME INACTIVATION *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 26879–26885. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200002200>
- Hoskisson, P. A., & van Wezel, G. P. (2019). *Streptomyces coelicolor*. *Trends in Microbiology*, 27(5), 468–469. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.008>
- Johjima, T., Ohkuma, M., & Kudo, T. (2003). Isolation and cDNA cloning of novel hydrogen peroxide-dependent phenol oxidase from the basidiomycete *Termitomyces albuminosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(3), 220–225. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1236-4>
- Kim, S. J., & Shoda, M. (1999). Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 Involved in Decolorization of Dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1029–1035.
- Lauber, C., Schwarz, T., Nguyen, Q. K., Lorenz, P., Lochnit, G., & Zorn, H. (2017). Identification, heterologous expression and characterization of a dye-decolorizing peroxidase of *Pleurotus sapidus*. *AMB Express*, 7, 164. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0463-5>
- Létoffé, S., Heuck, G., Delepelaire, P., Lange, N., & Wandersman, C. (2009). Bacteria capture iron from heme by keeping tetrapyrrol skeleton intact. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28), 11719–11724. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903842106>
- Lien, K. A., Dinshaw, K., Nichols, R. J., Cassidy-Amstutz, C., Knight, M., Singh, R., Eltis, L. D., Savage, D. F., & Stanley, S. A. (2021). A nanocompartment system contributes to defense against oxidative stress in *Mycobacterium tuberculosis*. *eLife*, 10, e74358. <https://doi.org/10.7554/eLife.74358>
- Liers, C., Aranda, E., Strittmatter, E., Piontek, K., Plattner, D. A., Zorn, H., Ullrich, R., & Hofrichter, M. (2014). Phenol oxidation by DyP-type peroxidases in comparison to fungal and plant peroxidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 103, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.09.025>

- Liers, C., Pecyna, M. J., Kellner, H., Worrlich, A., Zorn, H., Steffen, K. T., Hofrichter, M., & Ullrich, R. (2013). Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(13), 5839–5849. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4521-2>
- Linde, D., Pogni, R., Cañellas, M., Lucas, F., Guallar, V., Baratto, M. C., Sinicropi, A., Sáez-Jiménez, V., Coscolín, C., Romero, A., Medrano, F. J., Ruiz-Dueñas, F. J., & Martínez, A. T. (2015). Catalytic surface radical in dye-decolorizing peroxidase: A computational, spectroscopic and site-directed mutagenesis study. *Biochemical Journal*, *466*(Pt 2), 253–262. <https://doi.org/10.1042/BJ20141211>
- Liu, X., Du, Q., Wang, Z., Zhu, D., Huang, Y., Li, N., Wei, T., Xu, S., & Gu, L. (2011). Crystal Structure and Biochemical Features of EfeB/YcdB from *Escherichia coli* O157. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(17), 14922–14931. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.197780>
- Liu, X., Yuan, Z., Wang, J., Cui, Y., Liu, S., Ma, Y., Gu, L., & Xu, S. (2017). Crystal structure and biochemical features of dye-decolorizing peroxidase YfeX from *Escherichia coli* O157 Asp143 and Arg232 play divergent roles toward different substrates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *484*(1), 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.081>
- Majumdar, S., Lukk, T., Solbiati, J. O., Bauer, S., Nair, S. K., Cronan, J. E., & Gerlt, J. A. (2014). Roles of Small Laccases from *Streptomyces* in Lignin Degradation. *Biochemistry*, *53*(24), 4047–4058. <https://doi.org/10.1021/bi500285t>
- Maurer, L. M., Yohannes, E., Bondurant, S. S., Radmacher, M., & Slonczewski, J. L. (2005). PH Regulates Genes for Flagellar Motility, Catabolism, and Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, *187*(1), 304–319. <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.304-319.2005>
- Miethke, M., Monteferrante, C. G., Marahiel, M. A., & van Dijl, J. M. (2013). The *Bacillus subtilis* EfeUOB transporter is essential for high-affinity acquisition of ferrous and ferric iron. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1833*(10), 2267–2278. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.027>
- Nys, K., Furtmüller, P. G., Obinger, C., Van Doorslaer, S., & Pfanzagl, V. (2021). On the Track of Long-Range Electron Transfer in B-Type Dye-Decolorizing Peroxidases: Identification of a Tyrosyl Radical by Computational Prediction and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Biochemistry*, *60*(15), 1226–1241. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00129>
- Ogola, H. J. O., Kamiike, T., Hashimoto, N., Ashida, H., Ishikawa, T., Shibata, H., & Sawa, Y. (2009). Molecular Characterization of a Novel Peroxidase from the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(23), 7509–7518. <https://doi.org/10.1128/AEM.01121-09>
- Petrus, M. L. C., Vijgenboom, E., Chaplin, A. K., Worrall, J. A. R., van Wezel, G. P., & Claessen, D. (2016). The DyP-type peroxidase DtpA is a Tat-substrate required for GlxA maturation and morphogenesis in *Streptomyces*. *Open Biology*, *6*(1), 150149. <https://doi.org/10.1098/rsob.150149>
- Poulos, T. L. (2014). Heme Enzyme Structure and Function. *Chemical Reviews*, *114*(7), 3919–3962. <https://doi.org/10.1021/cr400415k>

- Pupart, H., Jöul, P., Bramanis, M. I., & Lukk, T. (2023). Characterization of the Ensemble of Lignin-Remodeling DyP-Type Peroxidases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Energies*, *16*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/en16031557>
- Rahmanpour, R., & Bugg, T. D. H. (2013). Assembly in vitro of *Rhodococcus jostii* RHA1 encapsulin and peroxidase DypB to form a nanocompartment. *The FEBS Journal*, *280*(9), 2097–2104. <https://doi.org/10.1111/febs.12234>
- Rahmanpour, R., & Bugg, T. D. H. (2015). Characterisation of Dyp-type peroxidases from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Oxidation of Mn(II) and polymeric lignin by Dyp1B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *574*, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.022>
- Rai, A., Klare, J. P., Reinke, P. Y. A., Englmaier, F., Fohrer, J., Fedorov, R., Taft, M. H., Chizhov, I., Curth, U., Plettenburg, O., & Manstein, D. J. (2021). Structural and Biochemical Characterization of a Dye-Decolorizing Peroxidase from *Dictyostelium discoideum*. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(12), 6265. <https://doi.org/10.3390/ijms22126265>
- Roberts, J. N., Singh, R., Grigg, J. C., Murphy, M. E. P., Bugg, T. D. H., & Eltis, L. D. (2011). Characterization of Dye-Decolorizing Peroxidases from *Rhodococcus jostii* RHA1. *Biochemistry*, *50*(23), 5108–5119. <https://doi.org/10.1021/bi200427h>
- Rodrigues, C. F., Borges, P. T., Scocozza, M. F., Silva, D., Taborda, A., Brissos, V., Frazão, C., & Martins, L. O. (2021). Loops around the Heme Pocket Have a Critical Role in the Function and Stability of BsDyP from *Bacillus subtilis*. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms221910862>
- Savelli, B., Li, Q., Webber, M., Jemmat, A. M., Robitaille, A., Zamocky, M., Mathé, C., & Dunand, C. (2019). RedoxiBase: A database for ROS homeostasis regulated proteins. *Redox Biology*, *26*, 101247. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101247>
- Scheibner, M., Hülsdau, B., Zelena, K., Nimtz, M., de Boer, L., Berger, R. G., & Zorn, H. (2008). Novel peroxidases of *Marasmius scorodoni* degrade β -carotene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *77*(6), 1241–1250. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1261-9>
- Shrestha, R., Chen, X., Ramyar, K. X., Hayati, Z., Carlson, E. A., Bossmann, S. H., Song, L., Geisbrecht, B. V., & Li, P. (2016). Identification of Surface-Exposed Protein Radicals and A Substrate Oxidation Site in A-Class Dye-Decolorizing Peroxidase from *Thermomonospora curvata*. *ACS catalysis*, *6*(12), 8036–8047. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b01952>
- Shrestha, R., Huang, G., Meekins, D. A., Geisbrecht, B. V., & Li, P. (2017). Mechanistic Insights into Dye-Decolorizing Peroxidase Revealed by Solvent Isotope and Viscosity Effects. *ACS Catalysis*, *7*(9), 6352–6364. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b01861>
- Singh, R., & Eltis, L. D. (2015). The multihued palette of dye-decolorizing peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *574*, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.01.014>
- Singh, R., Grigg, J. C., Armstrong, Z., Murphy, M. E. P., & Eltis, L. D. (2012). Distal Heme Pocket Residues of B-type Dye-decolorizing Peroxidase: ARGinine BUT NOT ASPARTATE IS ESSENTIAL FOR PEROXIDASE ACTIVITY*. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(13), 10623–10630. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.332171>

- Strittmatter, E., Liers, C., Ullrich, R., Wachter, S., Hofrichter, M., Plattner, D. A., & Piontek, K. (2013). First Crystal Structure of a Fungal High-redox Potential Dye-decolorizing Peroxidase: SUBSTRATE INTERACTION SITES AND LONG-RANGE ELECTRON TRANSFER *Journal of Biological Chemistry*, 288(6), 4095–4102. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400176>
- Strittmatter, E., Serrer, K., Liers, C., Ullrich, R., Hofrichter, M., Piontek, K., Schleicher, E., & Plattner, D. A. (2015). The toolbox of *Auricularia auricula-judae* dye-decolorizing peroxidase – Identification of three new potential substrate-interaction sites. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 574, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.016>
- Sturm, A., Schierhorn, A., Lindenstrauss, U., Lilie, H., & Brüser, T. (2006). YcdB from *Escherichia coli* Reveals a Novel Class of Tat-dependently Translocated Hemoproteins *. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 13972–13978. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511891200>
- Sugano, Y. (2009). DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(8), 1387–1403. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8651-8>
- Sugano, Y., Matsushima, Y., Tsuchiya, K., Aoki, H., Hirai, M., & Shoda, M. (2009). Degradation pathway of an anthraquinone dye catalyzed by a unique peroxidase DyP from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Biodegradation*, 20(3), 433–440. <https://doi.org/10.1007/s10532-008-9234-y>
- Sugano, Y., Muramatsu, R., Ichiyanagi, A., Sato, T., & Shoda, M. (2007). DyP, a Unique Dye-decolorizing Peroxidase, Represents a Novel Heme Peroxidase Family: ASP171 REPLACES THE DISTAL HISTIDINE OF CLASSICAL PEROXIDASES*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36652–36658. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706996200>
- Sugano, Y., Sasaki, K., & Shoda, M. (1999). CDNA cloning and genetic analysis of a novel decolorizing enzyme, peroxidase gene *dyp* from *Geotrichum candidum* Dec 1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(4), 411–417. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80087-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80087-5)
- Sugano, Y., & Yoshida, T. (2021). DyP-Type Peroxidases: Recent Advances and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms22115556>
- Sugawara, K., Igeta, E., Amano, Y., Hyuga, M., & Sugano, Y. (2019). Degradation of antifungal anthraquinone compounds is a probable physiological role of DyP secreted by *Bjerkandera adusta*. *AMB Express*, 9(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0779-4>
- Sugawara, K., Nishihashi, Y., Narioka, T., Yoshida, T., Morita, M., & Sugano, Y. (2017). Characterization of a novel DyP-type peroxidase from *Streptomyces avermitilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(4), 425–430. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.12.001>
- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M. H., & Poulos, T. L. (1994). The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 32759–32767. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)30056-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)30056-9)

- Sutter, M., Boehringer, D., Gutmann, S., Günther, S., Prangishvili, D., Loessner, M. J., Stetter, K. O., Weber-Ban, E., & Ban, N. (2008). Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment. *Nature Structural & Molecular Biology*, *15*(9), 939–947. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1473>
- Zámocký, M., Hofbauer, S., Schaffner, I., Gasselhuber, B., Nicolussi, A., Souidi, M., Pirker, K. F., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2015). Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *574*, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.025>
- Zamorano, L. S., Cuadrado, N. H., Galende, P. P., Roig, M. G., & Shnyrov, V. L. (2012). Steady-state kinetics of <i>Roystonea regia</i> palm tree peroxidase. *Journal of Biophysical Chemistry*, *03*(01), 16–28. <https://doi.org/10.4236/jbpc.2012.31002>
- Zhao, J., Lu, C., & Franzen, S. (2015). Distinct Enzyme–Substrate Interactions Revealed by Two Dimensional Kinetic Comparison between Dehaloperoxidase-Hemoglobin and Horseradish Peroxidase. *The Journal of Physical Chemistry B*, *119*(40), 12828–12837. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b07126>
- Zitare, U. A., Habib, M. H., Rozeboom, H., Mascotti, M. L., Todorovic, S., & Fraaije, M. W. (2021). Mutational and structural analysis of an ancestral fungal dye-decolorizing peroxidase. *The FEBS Journal*, *288*(11), 3602–3618. <https://doi.org/10.1111/febs.15687>
- Zubieta, C., Joseph, R., Sri Krishna, S., McMullan, D., Kapoor, M., Axelrod, H. L., Miller, M. D., Abdubek, P., Acosta, C., Astakhova, T., Carlton, D., Chiu, H.-J., Clayton, T., Deller, M. C., Duan, L., Elias, Y., Elsliger, M.-A., Feuerhelm, J., Grzechnik, S. K., ... Wilson, I. A. (2007). Identification and structural characterization of heme binding in a novel dye-decolorizing peroxidase, TyrA. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *69*(2), 234–243. <https://doi.org/10.1002/prot.21673>
- Zubieta, C., Krishna, S. S., Kapoor, M., Kozbial, P., McMullan, D., Axelrod, H. L., Miller, M. D., Abdubek, P., Ambing, E., Astakhova, T., Carlton, D., Chiu, H.-J., Clayton, T., Deller, M. C., Duan, L., Elsliger, M.-A., Feuerhelm, J., Grzechnik, S. K., Hale, J., ... Wilson, I. A. (2007). Crystal structures of two novel dye-decolorizing peroxidases reveal a β -barrel fold with a conserved heme-binding motif. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *69*(2), 223–233. <https://doi.org/10.1002/prot.21550>
- Tang, Y., Mu, A., Zhang, Y., Zhou, S., Wang, W., Lai, Y., Zhou, X., Liu, F., Yang, X., Gong, H., Wang, Q., & Rao, Z. (2021). Cryo-EM structure of Mycobacterium smegmatis DyP-loaded encapsulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(16), e2025658118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025658118>
- Tian, J.-H., Pourcher, A.-M., Bouchez, T., Gelhaye, E., & Peu, P. (2014). Occurrence of lignin degradation genotypes and phenotypes among prokaryotes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(23), 9527–9544. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6142-4>
- Uchida, T., Sasaki, M., Tanaka, Y., & Ishimori, K. (2015). A Dye-Decolorizing Peroxidase from *Vibrio cholerae*. *Biochemistry*, *54*(43), 6610–6621. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00952>
- van Bloois, E., Torres Pazmiño, D. E., Winter, R. T., & Fraaije, M. W. (2010). A robust and extracellular heme-containing peroxidase from *Thermobifida fusca* as prototype of a bacterial peroxidase superfamily. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(5), 1419–1430. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2369-x>

- van der Ploeg, R., Mäder, U., Homuth, G., Schaffer, M., Denham, E. L., Monteferrante, C. G., Miethke, M., Marahiel, M. A., Harwood, C. R., Winter, T., Hecker, M., Antelmann, H., & van Dijl, J. M. (2011). Environmental Salinity Determines the Specificity and Need for Tat-Dependent Secretion of the YwbN Protein in *Bacillus subtilis*. *PLoS ONE*, *6*(3), e18140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018140>
- Wever, R., & Krenn, B. E. (1990). Vanadium Haloperoxidases. N. D. Chasteen (Toim), *Vanadium in Biological Systems: Physiology and Biochemistry* (1k 81–97). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2023-1_5
- Yoshida, T., Ogola, H. J. O., Amano, Y., Hisabori, T., Ashida, H., Sawa, Y., Tsuge, H., & Sugano, Y. (2016). Anabaena sp. DyP-type peroxidase is a tetramer consisting of two asymmetric dimers. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *84*(1), 31–42. <https://doi.org/10.1002/prot.24952>
- Yoshida, T., & Sugano, Y. (2015). A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *574*, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.01.022>
- Yoshida, T., Tsuge, H., Hisabori, T., & Sugano, Y. (2012). Crystal structures of dye-decolorizing peroxidase with ascorbic acid and 2,6-dimethoxyphenol. *FEBS Letters*, *586*(24), 4351–4356. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.10.049>
- Yoshida, T., Tsuge, H., Konno, H., Hisabori, T., & Sugano, Y. (2011). The catalytic mechanism of dye-decolorizing peroxidase DyP may require the swinging movement of an aspartic acid residue. *The FEBS Journal*, *278*(13), 2387–2394. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08161.x>

6. KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<https://supfam.mrc-lmb.cam.ac.uk/SUPERFAMILY/cgi-bin/scop.cgi?sunid=143265>
(vaadatud 27.01.2023)

<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR006314/taxonomy/uniprot/#sunburst>
(vaadatud 29.01.2023)

https://peroxibase.toulouse.inra.fr/documentation/display_doc/4 (vaadatud 19.03.2023)

<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/PF04261/protein/UniProt/?search=streptomyces%20coelicolor#table> (vaadatud 20.03.2023)

<https://goldbook.iupac.org/terms/view/H02773> (vaadatud 22.03.2023)

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/profile/PS51404/> (vaadatud 23.03.2023)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=100226&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> (vaadatud 30.03.2023)

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_003888.3?from=7996367&to=7997603&report=graph&content=5 (vaadatud 30.03.2023)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1102630> (vaadatud 30.03.2023)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1102631> (vaadatud 30.03.2023)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1102632> (vaadatud 30.03.2023)

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Book%3A_Structure_and_Reactivity_in_Organic_Biological_and_Inorganic_Chemistry_\(Schaller\)/V%3A__Reactivity_in_Organic_Biological_and_Inorganic_Chemistry_3/04%3A_Oxygen_Binding_and_Reduction/4.02%3A_Oxygen_Binding](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Book%3A_Structure_and_Reactivity_in_Organic_Biological_and_Inorganic_Chemistry_(Schaller)/V%3A__Reactivity_in_Organic_Biological_and_Inorganic_Chemistry_3/04%3A_Oxygen_Binding_and_Reduction/4.02%3A_Oxygen_Binding) (vaadatud 21.05.2023)

<https://doi.org/10.2210/pdb4gu7/pdb> (vaadatud 28.05.2023)

<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0004601> (vaadatud 30.05.2023)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Darja Vastšjonok,

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

"Bakteri *Streptomyces coelicolor* peroksüdaas ScDyPB esineb kineetilisel erinevate ensüümi vormidena",

mille juhendajad on Priit Väljamäe ja Jürgen Jalak,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

1. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i 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, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Darja Vastšjonok

31.05.2023