

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Nina  
URBELIENĖ

Hidrolazių atrankos metodai,  
panaudojant *E. coli* uracilo auksotrofo  
kamieną ir sintetinius nukleozidų  
darinius

**DAKTARO DISERTACIJA**

Gamtos mokslai,  
Biochemija (N 004)

---

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2015–2019 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje.

Moksliniai tyrimai buvo dalinai remiami HORIZON 2020 programos projekto „Pramoninių jūrinių fermentų panaudojimas: inovatyvi paieška ir raiškos platformos atrankai bei funkcinių jūrinių baltymų įvairovės taikymas“ (INMARE), bei MITA finansuoto projekto „Provaistų-fermentų atrankos sistema“ lėšomis.

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

## TURINYS

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| TURINYS.....                                                       | 3  |
| SANTRUMPOS .....                                                   | 7  |
| ĮVADAS.....                                                        | 8  |
| Darbo tikslas.....                                                 | 10 |
| Uždaviniai .....                                                   | 10 |
| Mokslinis naujumas ir praktinė darbo reikšmė .....                 | 10 |
| Ginamieji teiginiai.....                                           | 12 |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA.....                                       | 13 |
| 1.1. Hidrolazės kaip biokatalizatoriai.....                        | 13 |
| 1.1.1. Hidrolazių klasifikacija.....                               | 15 |
| 1.1.2. Karboksirūgščių esterių hidrolazių klasifikacija.....       | 15 |
| 1.1.1.1. $\alpha/\beta$ hidrolazės.....                            | 16 |
| 1.1.1.1.1. Ferulo rūšties esterių hidrolazės ir tanazės .....      | 18 |
| 1.1.1.2. SGNH hidrolazės .....                                     | 19 |
| 1.1.2. Amidohidrolazės.....                                        | 21 |
| 1.1.2.1. Amidazinio žymens amidohidrolazės .....                   | 22 |
| 1.1.2.2. Alifatinės amidohidrolazės arba nitrilazės.....           | 23 |
| 1.1.3. Glikozidų hidrolazės .....                                  | 25 |
| 1.1.3.1. Glikozido hidrolazių reakcijų mechanizmai .....           | 26 |
| 1.1.3.2. $\alpha$ -L Fukozidazės.....                              | 27 |
| 1.1.4. Metagenomų hidrolazės .....                                 | 28 |
| 1.2. Hidrolazių iš metagenominių bibliotekų funkcinė atranka ..... | 29 |
| 1.2.1. Hidrolazių atranka pagal fenotipinį požymį.....             | 30 |
| 1.2.1.1. Esterazių atrankos pagal funkcinį požymį .....            | 31 |
| 1.2.2. Hidrolazių atranka selekcijos pagrindu.....                 | 34 |
| 1.2.2.1. Esterazių atranka selekcijos metodais.....                | 35 |
| 1.2.2.2. Amidohidrolazių selekcijos pagrindu .....                 | 36 |
| 1.3. Atrankos metodų problematika .....                            | 37 |

|         |                                                                                  |    |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.      | MEDŽIAGOS IR METODAI.....                                                        | 38 |
| 2.1.    | Naudoti bakterijų kamienai, vektoriai, terpės bei substratai .....               | 38 |
| 2.1.1.  | Darbe naudoti kamienai .....                                                     | 38 |
| 2.1.2.  | Darbe naudoti DNR vektoriai .....                                                | 38 |
| 2.1.3.  | Darbe naudotos kultivavimo terpės .....                                          | 38 |
| 2.1.4.  | Darbe naudoti substratai .....                                                   | 39 |
| 2.1.5.  | Darbe naudoti pradmenys .....                                                    | 40 |
| 2.1.6.  | Darbe naudotos metagenominės bibliotekos.....                                    | 44 |
| 2.2.    | Darbe taikyti metodai .....                                                      | 44 |
| 2.2.1.  | Kompetentinių ląstelių ruošimas.....                                             | 44 |
| 2.2.3.  | Fermentų atranka selektyvioje agarizuotoje M9 terpėje .....                      | 45 |
| 2.2.4.  | Esterazių/lipazių atranka agarizuotoje terpėje su tributirinu.....               | 45 |
| 2.2.5.  | Genų pagausinimas PGR metodu .....                                               | 45 |
| 2.2.6.  | Kolonijų PGR .....                                                               | 45 |
| 2.2.7.  | Genų klonavimas į pLATE31 vektorių.....                                          | 46 |
| 2.2.8.  | Genų klonavimas į pET21 vektorių .....                                           | 46 |
| 2.2.9.  | DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis .....                                 | 46 |
| 2.2.10. | DNR elektroforezė agarozės gelyje .....                                          | 46 |
| 2.2.11. | DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio .....                                 | 46 |
| 2.2.12. | Plazmidinės DNR gryninimas.....                                                  | 46 |
| 2.2.13. | Fermentų genų raiška.....                                                        | 46 |
| 2.2.14. | <i>E. coli</i> ląstelių ardymas ultragarsu .....                                 | 47 |
| 2.2.15. | Fermentų gryninimas afininės Ni-NTA chromatografijos būdu...                     | 47 |
| 2.2.16. | Fermentų gryninimas iš augimo terpės afininės Ni-NTA chromatografijos būdu ..... | 47 |
| 2.2.17. | Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu .....                         | 48 |
| 2.2.18. | Baltymų grynumo nustatymas poliakrilamidiniame gelyje .....                      | 48 |
| 2.2.19. | Kiekybinis fermentinio aktyvumo nustatymas spektrofotometrinio būdu .....        | 48 |

|          |                                                                                        |    |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.20.  | Esterazinio aktyvumo nustatymas pH indikatoriaus pagrindu.....                         | 49 |
| 2.2.21.  | Nitrocefino ir kitų laktamų hidrolizė .....                                            | 49 |
| 2.2.22.  | nustatymas plonasluoksnės chromatografijos metodu.....                                 | 49 |
| 2.2.23.  | Fermentinių reakcijų produktų nustatymas HPLC-MS metodu....                            | 50 |
| 2.2.24.  | DNR sekoskaita .....                                                                   | 50 |
| 2.2.25.  | 1315H_DUF998_GFP liejinio konstravimas.....                                            | 50 |
| 2.2.26.  | Fermentų mutagenezė .....                                                              | 51 |
| 2.2.27.  | DMSO ir DMF tirpiklių įtakos 62FucI fukozidzės aktyvumui<br>vertinimas.....            | 51 |
| 2.2.28.  | Glikozidazių aktyvumo priklausomybės nuo pH ir temperatūros<br>pokyčių vertinimas..... | 52 |
| 2.2.29.  | n-O-glikozilo darinių fermentinė sintezė .....                                         | 52 |
| 3.       | REZULTATAI.....                                                                        | 54 |
| 3.1.     | Esterazių atrankos metodo kūrimas .....                                                | 54 |
| 3.1.1.   | Esterazių atrankos metodo principas.....                                               | 54 |
| 3.1.2.   | Esterazių selektyvios atrankos proceso eiga .....                                      | 54 |
| 3.1.3.   | Atrinktų esterazių sekų analizė .....                                                  | 56 |
| 3.1.4.   | Atrinktų esterazių gryninimas.....                                                     | 61 |
| 3.1.5.   | Atrinktų esterazių katalizinių savybių nustatymas.....                                 | 65 |
| 3.2.     | Esterazių atranka tributirino metodu.....                                              | 69 |
| 3.3.     | Amidohidrolazių atrankos metodo kūrimas .....                                          | 70 |
| 3.3.1.   | Amidohidrolazių atrankos metodo principas .....                                        | 70 |
| 3.3.2.   | Amidohidrolazių selektyvios atrankos proceso eiga.....                                 | 71 |
| 3.3.3.   | Atrinktų amidazių genų sekų analizė .....                                              | 72 |
| 3.3.4.   | Amidohidrolazių gryninimas .....                                                       | 76 |
| 3.3.5.   | Atrinktų amidohidrolazių katalizinių savybių tyrimas.....                              | 76 |
| 3.4.     | Glikozidazių atrankos metodo kūrimas.....                                              | 80 |
| 3.4.1.   | Modelinio β-D-galaktozidazių atrankos metodo kūrimas.....                              | 80 |
| 3.4.1.1. | β-D-galaktoziluridino fermentinė sintezė .....                                         | 81 |

|          |                                                                      |     |
|----------|----------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.4.1.2. | $\beta$ -galaktozidazių raiškos patikra selektyvioje M9 terpėje..... | 83  |
| 3.4.2.   | $\alpha$ -L-Fukozidazių atrankos modelinio metodo kūrimas .....      | 84  |
| 3.4.3.   | 62Fuc1 sekos analizė .....                                           | 85  |
| 3.4.4.   | Fukozildeoksiuridino fermentinė sintezė .....                        | 87  |
| 3.5.     | Rezultatų apibendrinimas.....                                        | 91  |
|          | IŠVADOS.....                                                         | 94  |
|          | PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS .....                                            | 95  |
|          | PADĖKA.....                                                          | 96  |
|          | LITERATŪROS SĄRAŠAS.....                                             | 97  |
|          | PRIEDAI .....                                                        | 115 |

## SANTRUMPOS

- 2'-FL – 2'-fukosillaktozė  
3-FL – 3-fukozillaktozė  
a.r. – aminorūgštys  
ATM – atominės jėgos mikroskopija  
BMR – branduolių magnetinio rezonanso metodas  
DMF – dimetilformamidas  
DMSO – dimetilsulfoksidas  
FRET – fluorescencinės rezonanso energijos pernašos metodas  
GFP – žaliai fluorescuojantis baltymas  
GH – glikozidų hidrolazės  
IMAC – imobilizuotų metalų giminingumo chromatografija  
IPTG – izopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozidas  
Kf – kalio fosfato buferinis tirpalas  
LB – Luria-Bertani mitybinė terpė  
NCBI – Nacionalinis biotechnologinės informacijos centras  
OD – optinis tankis  
oNP-Gal – *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozidas  
ORF – atviras skaitymo rėmelis  
PEG – polietileno glikolis  
PGR – polimerazės grandininė reakcija  
pNP – *p*-nitrofenolis  
pNPA – *p*-nitrofenolio acetatas  
pNPB – *p*-nitrofenolio butiratas  
pNPD – *p*-nitrofenolio dekanooatas  
pNP-Fuc – *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-fukopiranozidas  
pNPV – *p*-nitrofenolio valeratas  
SDS – natrio dodecilsulfatas  
SDS-PAGE – elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis  
TAE buferinis tirpalas – buferinis tirpalas, sudarytas iš Tris, acto rūgšties ir TB – tributirinas  
UV – ultravioletiniai spinduliai  
v/v – tirpalų tūrių santykis  
X-Fuc – 5-bromo-4-chloro-3-indolil- $\alpha$ -L-fukopiranozidas  
X-gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranozidas  
 $\alpha$ -L-Fuc-(1-3)-D-GlcNAc – fukozil-*N*-acetil-D-gliukozaminas

## ĮVADAS

Mikroorganizmai dalyvaudami biosferos cheminiuose procesuose paverčiant pagrindinius gyvybės elementus – anglį, azotą, deguonį ir sierą turinčius jungius biologiškai aktyviomis formomis, palaiko gyvybę Žemėje. Visi augalai ir gyvūnai yra glaudžiai susiję su mikroorganizmais, kurių dėka jų šeimininkai gauna reikalingas maistines medžiagas, metalus ir vitaminus. Žmogaus žarnyno mikroflora suteikia galimybę iš maisto, kurio mes negalėtume suvirškinti, gauti energijos, taip pat apsaugo mus nuo ligų sukėlėjų. Fermentacijos ir kitų natūralių procesų metu mikroorganizmai sukuria ar pakeičia daugelio maisto produktų vertę. Pagrindinis industrinių fermentų šaltinis taip pat yra įvairūs mikroorganizmai, kurie gali būti kultivuojami dideliais kiekiais, jų auginimo terpės yra santykinai pigios, o fermentacijos laikas trumpas. Tuo tarpu gyvūninės kilmės fermentai sudaro tik nedidelę pramoninių fermentų dalį, dėl sudėtingo gyvūnų ląstelių auginimo ir fermentų išskyrimo sąlygų. *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* ir įvairios *Streptomyces* rūšys, bei mikromicetai *Aspergillus*, *Mucor* ir *Rhizopus* yra plačiausiai naudojami pramoniniai mikroorganizmai [1]. O iš visų industrijoje naudojamų fermentų, didžiausią grupę sudaro hidrolazės, katalizuojančios natūralių polimerinių substratų, tokių kaip baltymai, krakmolos, lipidai, ląstelių skaidulos ir sienelių struktūros skaidymą. Pramonėje daugiausia yra suvartojama peptidazių, amilazių ir celiulazių. Mažesniais kiekiais pagaminama ir suvartojama pektinazių, ksilanazių, fitazių, lipazių, laktamazių, invertazių, izomerazių, oksidazių ir katalazių [2]. Įvairios hidrolazės yra naudojamos maisto, bei pašarų, chemijos pramonėse, biodegalų gamyboje, perdirbant plastiko atliekas ir kitose pramonės šakose.

Istoriškai susiklostė, kad pirmieji mikrobu tyrimai buvo nukreipti į grynosios kultūros pavienių rūšių analizes [3]. Grynos kultūros buvo auginamos laboratorinėmis sąlygomis ir apibūdinamos. Tačiau tokie tyrimai turi du didelius trūkumus. Vienas iš jų – ne visi mikroorganizmai gyvena grynomis pavienėmis kultūromis, ir tai reiškia, kad pavienių kultūrų tyrimai nieko nepasako apie kartu gyvenančių mikroorganizmų bendruomenes, jų tarpusavio ryšius ir gebėjimą prisitaikyti prie besikeičiančių aplinkos sąlygų. Kitas trūkumas – didžioji mikroorganizmų dalis nekultivuojama laboratorinėmis sąlygomis. Mokslinėje literatūroje teigiama, kad iki šiol pavyko užauginti apie  $10^4$  mikroorganizmų rūšių, tuo tarp žemėje gyvenančių mikroorganizmų yra gerokai daugiau –  $10^{11}$ – $10^{12}$  rūšių [4] [5]. Siekis tirti nekultivuojamą mikrobiotą paskatino kitokio pobūdžio tyrimus – metagenomo analizę. Metagenomikos sąvoka apima nuo auginimo



nepriklausomą bendruomenių ar jų narių genomų nustatymą, tai yra genetinės medžiagos, išgautos tiesiai iš aplinkos mėginių, tyrimą. Sukurtas 16S ribosominės RNR sekos nustatymo metodas padėjo įvertinti mikroorganizmų rūšis ir įvairovę aplinkoje, bet šis metodas nieko nepasako apie mikroorganizmų sintetinius fermentus. Žinant įvairios aplinkos mikroorganizmų – mezofilų, termofilų/hipertermofilų, psichofilų ar druskingų buveinių mikroorganizmų gyvenimo sąlygų įvairovę ir milijonus metų vykstančią evoliuciją, galima daryti prielaidą, kad nekultivuojama mikrobiota yra milžiniškas naujų genų, biokatalizatorių, natūralių junginių ir bioproduktų šaltinis [6] [7] [8]. Taigi, siekiant nustatyti laboratorinėmis sąlygomis nekultivuojamų mikroorganizmų fermentus, buvo pradėtos kurti metagenominės bibliotekos – įvairaus ilgio metagenominės DNR fragmentų, klonuotų į vektorius, rinkiniai. Metagenominių bibliotekų kūrimas tuo pačiu paskatino ir fermentų funkcinės atrankos metodų kūrimą. Funkciniu aktyvumu pagrįsta atranka leidžia surasti naujų naudingų genų sekų, koduojančių norimų ar nežinomų funkcijų fermentus. Metagenominių bibliotekų funkcinei analizei yra naudojami tikslingai pakeisti mikroorganizmai, tinkami efektyviai biokatalizatorių selekcijai ir specialūs fermentų substratai, arba reporteriniai genai, leidžiantys atrankiai išskirti norimomis savybėmis pasižyminčius fermentus. Atrankos metodai gali būti paremti ląstelės funkcinio požymio, pvz. spalvos, pasikeitimu, arba selektyvia atranka, kai auga tik ląstelės įgijusios gyvybingumą užtikrinančius genus.

Didelio našumo DNR sekoskaitos nustatymo technologijų sukūrimas žymiai sumažino sekoskaitos sąnaudas ir, tokiu būdu, paskatino *in silico* duomenų kaupimą ir stipriai išplėtė duomenų bazes. O fermentų išskyrimas ir funkcinis apibūdinimas, priešingai, vyksta daug mažesniu greičiu. 2020 metais NCBI duomenų bazėje pateiktoje ataskaitoje matoma, kad iki šiol nuskaitytų genų sekų yra gerokai virš šimto milijonų. Tuo tarpu nuskaitytų genų ir baltymų su patvirtintu funkciniu aktyvumu koduojančių genų santykis drastiškai mažėja: biokatalizinis aktyvumas eksperimentiškai patvirtintas tik apytiksliai 3 iš 100000 sekoskaitos būdu nustatytų atviro skaitymo rėmeliams (2015 metų duomenys) [9]. Baltymų šeimų duomenų bazėje Pfam nurodytos beveik 4000 nežinomos funkcijos baltymų šeimų (vadinami DUF), o NCBI duomenų bazės paieškos lauke įvedus žodį „hipotetinis“ pateikiama virš 4 mln. įrašų (atmetus pasikartojančius įrašus). Taigi nežinomos funkcijos baltymų kiekis rodo, kad šiai dienai yra iširta tik maža natyvių fermentų dalis. Padidinti naujų charakterizuotų fermentų kiekį gali inovatyvūs funkcinės fermentų atrankos metodai, kurie leidžia greitai ir efektyviai surasti naujus gamtinių fermentų variantus, be to yra ir vienas

geresnių stabilumo ir selektyvumo substratams problemos sprendimo būdų [10] [7] [11]. O derinant bioinformatinius metodus su našiais funkcinės atrankos metodais, galima ženkliai padidinti randamų fermentų kiekį.

### **Darbo tikslas**

Sukurti ir įvertinti selekcijos metodus pritaikytus esterazių, amidohidrolazių ir glikozidazių atrankoms iš metagenominių bibliotekų, bei iširti atrenkamų fermentų biokatalizines savybes.

### **Uždaviniai**

- Sukurti ir optimizuoti metodą skirtą hidrolazių atrankai iš metagenominių bibliotekų, panaudojant uridino esterius ir  $N^4$ -benzoi-(deoksi)цитидино amidus;
- įvertinti atrinktų fermentų įvairovę ir katalizines savybes;
- identifikuoti ir charakterizuoti metagenomines fukozidazes;
- susintetinti glikozidazių atrankoms pritaikytus substratus ir sukurti modelinę šių fermentų atrankos sistemą.

### **Mokslinis naujumas ir praktinė darbo reikšmė**

Šis darbas buvo skirtas esterazių, amidohidrolazių ir glikozidazių selektyvios atrankos iš metagenomų metodų kūrimui. Tokios fermentų klasės buvo pasirinktos dėl galimo plataus šių fermentų pritaikymo chemijos, vaistų, maisto ir maisto papildų pramonėje. Iki šiol visi mokslinėje literatūroje aprašyti esterazių atrankos selekcijos pagrindu metodai buvo pritaikyti tik esterazių atrankai mutantų bibliotekose, bet ne esterazių paieškai metagenomuose, o amidohidrolazių atrankai sukurtas tik vienas selekcijos metodas, panaudojant leucino auktotrofinį *E. coli* TOP10 kamieną ir leucino amidus kaip leucino šaltinį. Tuo tarpu selektyvių atrankos metodų, skirtų fukozidazių atrankai iš metagenomų mokslinėje literatūroje nėra publikuota.

Darbo metu buvo sukurti esterazių ir amidohidrolazių iš metagenominių bibliotekų atrankos selekcijos pagrindu metodai ir parodyta principinė glikozidazių atrankos sistema. Sukurti metodai paremti *E. coli* uracilo auktotrofo DH10B  $\Delta$ pyrFEC kamieno ir sintetinių nukleozidų darinių, pritaikytų esterazių, amidohidrolazių ir glikozidazių vykdomoms hidrolizės reakcijoms.

Atlikus atrinktų esterazių a. r. sekų filogenetinę analizę, paaiškėjo, kad šiuo metodu galima atrinkti ne tik esterazes/lipazes ir  $\beta$ -laktamazes, kurios gali būti randamos ir naudojant klasikinę lipazių atranką su tributirinu, bet ir

esterazes, priklausančias glikozilhidrolazių, *N*-acetyltransferazių ir DUF998 šeimoms. Amidohidrolazių atrankos, panaudojus *N*<sup>4</sup>-benzoi-(deoksi)cidiną, metodu atrinktos amidohidrolazės pagal sekų filogenetinę analizę priklauso tiek skirtingų amidohidrolazių, tiek  $\alpha/\beta$  hidrolazių šeimoms.

Esterazių atrankoms buvo panaudoti du skirtingo ilgio acilų grupių uridino dariniai ir tokiu būdu parodyta, kad substrato esterio grupė bent iš dalies lemia pasirinkto fermentų savitumą hidrolizuojamiems substratams.

Darbo metu buvo charakterizuota metagenominė 62Fuc1 fukozidazė ir jos pagalba atlikta fukozildeoksiuridino sintezė. Pagamintas substratas buvo panaudotas fukozidazės raiškos patikrai selektyvioje terpėje ir taip pirmą kartą parodytas principinis glikozidazių selekcijos metodas, kuris gali būti taikomas glikozidazių atrankoms iš metagenomų.

Sukurtų esterazių ir amidohidrolazių atrankų metodų pagalba rasti unikalūs metagenominiai fermentai, iš kurių 11 fermentų artimiausi homologai duomenų bazėse įvardinti kaip hipotetiniai, rastos dvi unikalios amidohidrolazės – D8\_RL ir *E. coli* YqfB, PET monomerų DMT ir BHET hidrolazė ir DUF998 šeimai priklausanti esterazė 1315H. *E. coli* YqfB baltymo genas yra seniai žinomas, bet tik dabar buvo nustatytas jo funkcinis aktyvumas. YqfB ir D8\_RL hidrolazės turi ASCH domeną, kuris, manoma, dalyvauja sąveikoje su RNR, o šį domeną turintys baltymai galimai dalyvauja prokariotų transliacijos reguliacijoje. Šio tyrimo metu taip pat pirmą kartą buvo nustatytas esterazinis aktyvumas DUF998 šeimos baltymui.

Taigi, sukurti metodai, panaudojant uracilo auksatrofo *E. coli* kamieną ir sintetinius nukleozidų darinius, leido atrinkti ir charakterizuoti 27 metagenomines esterazes ir 8 amidohidrolazes. Atrinkti fermentai gali būti panaudojami įvairių esterių ir amidų hidrolizės bei transesterifikacijos reakcijose. Enatioatrankios esterazės 30T1, 30T2, SVG3, plataus substratų spektro esterazės SVG1, EN3H, amidohidrolazės BRM\_Am, D8\_RL ir YqfB jau buvo panaudotos mokslinių projektų tyrimuose ir jų panaudojimo galimybės bus toliau plečiamos.

Funkcinės biokatalizatorių atrankos yra svarbios ne tik fermentų paieškai metagenomuose, bet ir vystant bioinformatinius metodus. Taikant molekulinį modeliavimą jau galima numatyti fermentų funkcinės savybės lyginant su žinomomis fermentų struktūromis, o *de novo* fermentų kūrimo metodai, pasitelkiant matematinius algoritmus, tik pradeda vystytis. Sėkmingam bioinformatinių metodų vystymui reikalingos eksperimentiškai laboratorijoje patvirtintos žinios apie fermentų katalizines savybes. Taigi tiek modernių bioinformatinių metodų kūrimui, tiek natyvių biokatalizatorių

atrankoms iš metagenomų reikalingos atrankos sistemos, kurios leidžia greitai ir efektyviai nustatyti biokatalizines fermentų savybes.

### **Ginamieji teiginiai**

1. Selektivos atrankos metodus, panaudojus uracilo auksotrofo *E. coli* kamieną bei sintetinius uridino esterius ar amidus, galima taikyti esterazių ir amidohidrolazių atrankoms iš metagenominių bibliotekų.
2. Sukurtas esterazių atrankos metodas lyginat su klasikiniu tributirino metodu yra jautresnis.
3. Esterazių ir amidohidrolazių metodai leidžia atrinkti fermentus su nežinomu ar nenustatytu aktyvumu.
4. Atrankoms naudojamas tiek substratas, tiek substrato pakaito grupė lemia atrenkamų fermentų substratinį savitumą.
5. Metagenominė 62Fuc1 fukozidazė – tai  $\alpha$ -L-fukozidazė, katalizuojanti transglikozilinimo reakcijas.
6. Modelinis glikozidazių atrankos metodas, panaudojus uracilo auksotrofo *E. coli* kamieną bei glikozil(deoksi)uridiną, gali būti taikomas glikozidazių selekcijai.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Hidrolazės kaip biokatalizatoriai

Hidrolazės (EC 3) [12] – tai fermentų klasė, veikianti kaip biokatalizatoriai, kurie cheminiam ryšiui suskaidyti naudoja vandenį. Be hidrolizės reakcijų, šie fermentai gali vykdyti ir pernašos reakcijas (transesterinimo, transamidinimo, transglikozilinimo ir t.t.).

Trijų klasių hidrolazių – esterazių/lipazių, amidohidrolazių ir glikozidazių svarbą atspindi platus jų panaudojimas pramonėje (1.1 pav.).



**1.1 pav.** Esterazių, amidohidrolazių ir glikozidazių panaudojimas pramonėje.

Devintajame dešimtmetyje lipazės buvo bene intensyviausiai tiriami fermentai. Jiems nereikalingi kofaktoriai, baltymai yra gana stabilūs ir aktyvūs organiniuose tirpikliuose. Vienos lipazės pasižymi stereo- ir enantio-atrankumu, kitos yra mažiau specifinės. Dėl šių savybių esterazės/lipazės yra svarbūs biokatalizatoriai chemijos pramonėje, ką parodo didelis mokslinių publikacijų ir patentų skaičius [10] [13] [14] [15] [16]. Farmacijos ir chemijos pramonėje esterazės panaudojamos įvairių vaistų ir cheminių junginių gamybai: pavyzdžiui, ibuprofeno ar deksketoprofeno raceminių mišinių atskyrimui, plastiko komponentų sintezei, riebalų rūgščių hidrolizei, trigliceridų esterifikacijai ir t. t. [17] [18] [19]. Naudojant lipazes gaminami natūralaus skonio esteriai [16], o ploviklių gamybai pasaulyje sunaudojama ~1000 tonų lipazių per metus [13] [15]. Paminėtini ir plastikų (bio)degradacijos fermentai: tai PET-azė ir MHET-azė iš *Ideonella sakaiensis* [20], bei baltymų inžinerijos pagalba sukurta PET depolimerazė [21]. Pramoninės esterazės/lipazės buvo išskirtos iš įvairių šaltinių, įskaitant bakterijas, archėjas, mikromicetinius grybus, dumblius, gyvūnus bei augalus. Šių fermentų paieškai tirti įvairios aplinkos mikroorganizmai – mezofilai,

termofilai ir hipertermofilai, šaltų ar druskingų būveinių bakterijos. Struktūrinės bei funkcinės įvairovės prielaidas sudaro ir karboksirūgščių esterių hidrolazių funkcijų įvairovė gyvuose organizmuose: jos dalyvauja metabolitų reguliavime, signalo perdavime, baltymų sintezėje, šiluminio streso atsake, ląstelių sienelių ir membranų struktūrų formavime.

Amidohidrolazės taip pat yra be galo įvairi fermentų superšeima, pasižyminti be galo dideliu ir įvairiu substratų spektru. Kaip ir esterazių/lipazių, amidohidrolazių pritaikymą industrijoje lemia jų stereo- ir enantioatrankumas bei išskirtinis atsparumas ekstremaliai aplinkos pH ir temperatūriniam diapazonui. Amidazės yra naudojamos  $\beta$ -laktaminių antibiotikų biosintezei [22], (*S*)-4-fluorfenilglicino (chiralinis tarpinis produktas antiemetikų vaistų sintezei), nikotino [23] ir 2-chlornikotino rūgščių [24] bei herbicido L-fosfinotricino [25] gamybai. L-asparaginazė ir L-glutaminazė yra naudojamos kaip onkolitiniai fermentai, o maisto pramonėje – gaminant maistą be akrilamido, t. y. siekiant sumažinti akrilamido koncentraciją aukštoje temperatūroje ruoštame krakmolingame maiste [26]. Amidazės taip pat naudojamos įvairioms karboksirūgštims, hidroksamo rūgštims (junginiai turintys RC(O)N(OH)R' grupę) ir hidrazinams sintetinti [27], gaminant akrilamidus [28] ir nikotinamidus [29]. O naujausios publikacijos aprašančios atrandamų amidohidrolazių šeimai priklausančių fermentų biokatalizines savybes [30] [31], leidžia manyti, kad šios superšeimoms atstovai vis dar yra nepakankamai ištirti.

Kita gerai žinoma hidrolazių šeima – glikozidazės – naudojamos maisto, biokuro, tekstilės, polimerų ar prebiotikų pramonėje [32]. Dabartinėje pramonėje didesniais kiekiais naudojamos celiulazės, ksilanazės, o glikozidazėms priklausančios fukozidazės, kurios bus nagrinėjamos šiame darbe, kol kas nėra plačiai taikomos. Tačiau sprendžiant iš fukozidazių svarbos gyviesiems organizmams, jos turi didelę panaudojimo perspektyvą prebiotikų ir vaistų pramonėje. Žinduolių organizmuose esant fukozidazių trūkumui sutrinka glikozilintų baltymų ir lipidų hidrolizė, ko pasekoje sutrinka virškinimas, vaisingumas (spermatozoidų ir kiaušinėlio paviršiuje yra fukozilintų oligosacharidų, būtinų atpažinimui ir adhezijai), galiausiai įvyksta greita neurodegeneracija (liga – fukozidozė). Žmogaus piene 60–80% motinos pieno oligosacharidų yra fukozilinti. Yra žinoma, kad trys iš gausesnių fukozilintų žmogaus pieno oligosacharidų – 2'-fukosillaktozė (2'-FL), 3-fukosillaktozė (3-FL) ir laktodifukotetraozė atlieka prebiotikų funkciją [33]. Augalų ląstelės sienelės oligosacharidai taip pat gali būti fukozilinti, kai kurie jų skirti apsisaugoti nuo parazitų. Taigi, organizmams, kurie minta augaliniu maistu, arba juos parazituoja, fukozidazės svarbios virškinimui arba maisto

medžiagų patekimui į ląsteles. Kai kurioms bakterijoms fukozidazės yra svarbios metabolizuojant fukozilintus substratus [34] [35].

Taigi, visų trijų klasių hidrolazės dalyvauja gyvybiškai svarbiuose organizmų metaboliniuose procesuose bei naudojamos pramonėje, gaminant žmonėms būtinus produktus.

### 1.1.1. Hidrolazių klasifikacija

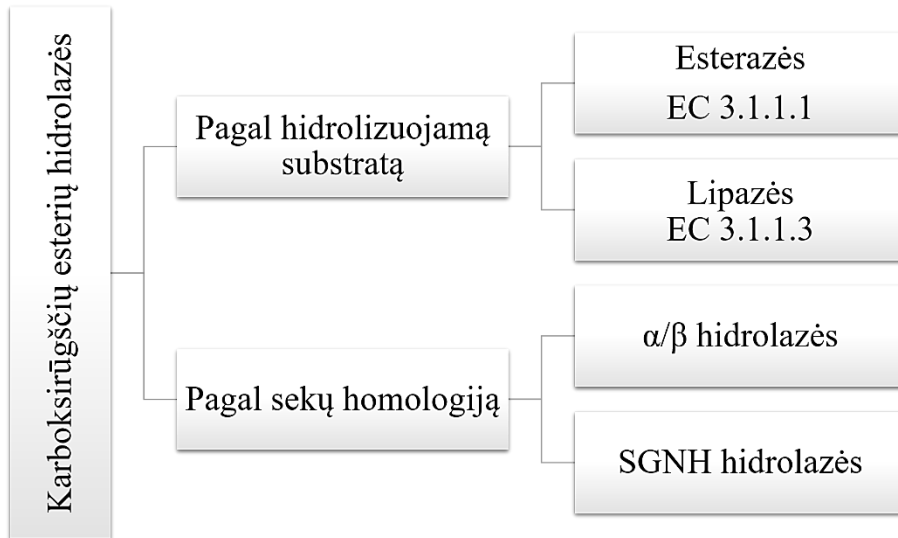
Sisteminiai hidrolazių pavadinimai ir priskyrimas EC klasėms formuojami pagal jų skaidomus ryšius, o pagal sekų homologiją fermentai skirstomi į superšeimas ir šeimas [36]. Karboksirūgščių esterių hidrolazės (esterazės/lipazės) hidrolizuojačios esterius (C-O ryšys), priklauso EC 3.1 klasei, amidohidrolazės, skaidančios amidus (C-N ryšys) – EC 3.5, o glikozidų hidrolazės – glikozidus (O-, N-, S- glikozidinius ryšius) hidrolizuojačią fermentų EC 3.2 klasei. Klasifikacija pagal sekų homologiją ir atpažįstamus substratus dažnai persikloja, ir skirtingi pagal veikiamą substratą fermentai gali atsidurti vienoje superšeimoje. Pavyzdžiui esterazių klasė EC3.2 pagal sekų homologiją gali priklausyti ir  $\alpha/\beta$  hidrolazių ir SGNH hidrolazių superšeimoms. Ir atvirkščiai, amidohidrolazės pagal sekų homologiją priklausančios tai pačiai Amidazinio žymens (angl. Amidase signature, AS) superšeimai, pagal skaidomą substratą gali priklausyti EC3.4 (peptidinio ryšio hidrolizės) ir EC3.5 amidohidrolazių (C-N, bet ne peptidinio ryšio) klasėms.

Kai kurios fermentų grupės dar yra klasifikuojamos ir pagal kitokius parametrus. Pavyzdžiui, polimerines grandines skaidandys fermentai gali būti klasifikuojami pagal hidrolizės vietą – egzo/endo hidrolazės, taip pat pagal reakcijos mechanizmą, stereoatrankumą ir kitus savitus požymius.

### 1.1.2. Karboksirūgščių esterių hidrolazių klasifikacija

Karboksirūgščių esterių hidrolazių (EC 3.1.1) substratai yra esteriai, gauti kondensavus karboksirūgštį ir alkoholį. Istorškai karboksiesterių hidrolazės (EC3.1.1) buvo suskirstytos į du pagrindinius poklasius remiantis specifiškumu substratams: esterazės (EC 3.1.1.1) ir lipazės (EC 3.1.1.3). Esterazės (EC 3.1.1.1) katalizuoja bent iš dalies vandenyje tirpių trumpų anglies grandinių esterių skilimą ir susidarymą, tuo tarpu lipazės (EC 3.1.1.3) katalizuoja vandenyje netirpių, ilgų grandinės esterių hidrolizę. Pagal sekų homologiją ir tretinę struktūrą, dauguma žinomų esterazių/lipazių priklauso  $\alpha/\beta$  hidrolazių [36] superšeimai (SSF53474), bet nemažai jų – SGNH

hidrolazėms (SSF52266) [37] [38]. Karboksilesterazių klasifikacijos schema yra pavaizduota 1.2 paveiksle.



**1.2 pav.** Karboksirūgščių esterių hidrolazių klasifikacija.

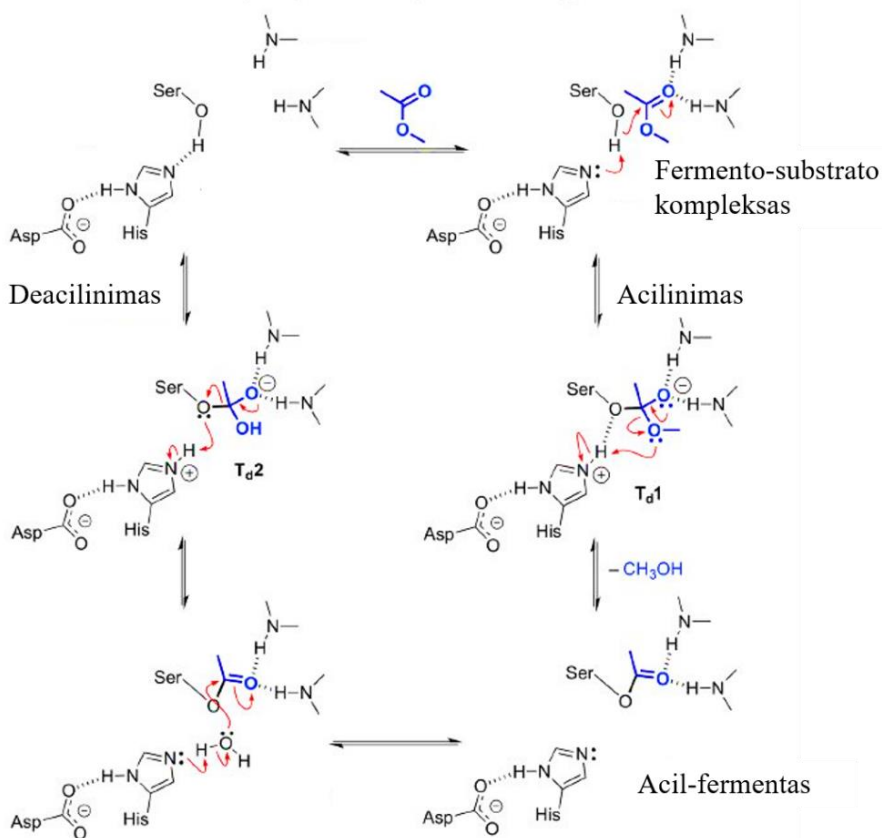
Arpigny ir Jaeger [39] remdamiesi lipazių ir esterazių sekų homologija bei katalizinėmis savybėmis suskirstė mikroorganizmų išskiriamas lipazes ir karboksilesterazes į aštuonias šeimas. Suradus naujo tipo esterazių, atsirado ir naujų šeimų, šeimos suskirstytos į pošeimius [40] [41]. Istoriskai esterazėms/lipazėms buvo priskiriami pavadinimai pagal panaudoto substrato pavadinimą (kutinazė, cholesterolesterazė ir pan.), tai įnešė daug painiavos ir prieštarauja dabartinės nomenklatūros reikalavimams [42].

#### 1.1.1.1. $\alpha/\beta$ hidrolazės

$\alpha/\beta$  hidrolazių (ABhidrolazės) superšeimai (SSF53474) priskiriamų fermentų šerdį sudaro  $\alpha/\beta$  lakštas, kuriame yra aštuonios  $\beta$ -klostės, sujungtos šešiomis  $\alpha$ -spiralėmis [43], kai kuriais atvejais  $\beta$ -klosčių skaičius gali varijuoti [44] [45] [46]. Paprastai esterazių aktyvų centrą sudaro katalizinė triada Ser-Asp(Glu)-His ir aplink katalizinę seriną būdinga konservatyvi Gly-x-Ser-x-Gly seka [44]. Daugelis  $\alpha/\beta$  hidrolazių šeimai priskiriamų esterazių veikia pagal kanoninę esterazių mechanizmą priskiriamą „ping-pog“ „Bi-Bi“ reakcijos tipui susidarant acil-serino fermento tarpiniam produktui (1.3 pav.). Reakcijos mechanizmas susideda iš keturių etapų: substrato surišimas su



aktyviu serinu, gaunant tarpinį kompleksą, kurį stabilizuoja His ir Asp aminorūgščių liekanos. Acilinimo etape sudaroma pirmoji tetraedrinė struktūra ( $T_{d1}$ ), išlaisvinamas alkoholis ir suformuojamas acilo-fermento kompleksas. Po nukleofilo atakos (vanduo – hidrolizėje, alkoholis arba esteris (trans)esterifikacijos reakcijoje) vėl sudaroma tarpinė tetraedrinė struktūra ( $T_{d2}$ ), ir, galiausiai, gaunamas produktas – rūgštis (hidrolizės reakcijoje) arba esteris (transesterinimo reakcija) ir laisvas fermentas [47] (1.3 pav.)



1.3 pav. Esterazių kanoninio reakcijos mechanizmo schema.

Pagal tą patį reakcijos mechanizmą veikiančių estrazių skirtingų substratų hidrolizės greičiai gali labai skirtis. Rauwerdink ir Kazlauskas pasiūlė Esterazės 2 iš *Alicyclobacillus acidocaldarius* katalizuojamos *p*-nitrofenolio *n*-heksanoato ir *n*-dodekanoato esterių hidrolizės reakcijų greičių skirtumų paaiškinimą [47]. *n*-heksanoato hidrolizės reakcijoje acil-fermento formavimas yra greitas procesas, o reakcijos greitį lemianti stadija yra acil-fermento skaidymas, bet *n*-dodekanoato atveju acil-fermento susidarymas yra

labai lėtas procesas, ribojantis reakcijos greitį. Prieš pusiausvyrinio būvio kinetikos rezultatai parodė staigų *p*-nitrofenolio išsiskyrimą ir atitinkamai greitą acilinimą *n*-heksanoatohidrolizės reakcijoje, o *n*-dodekanoato atveju šis procesas buvo lėtas. Kristalinė šio fermento struktūra su *n*-heksadekanoilsulfonatu, kovalentiškai surištu su aktyviuoju serinu, parodė, kad abu substratai, greičiausiai, yra skirtingai prijungiami. *p*NP-heksanoilo esterio atveju, substrato *n*-heksanoilo grupė jungiasi acilo surišimo vietoje, o *p*-nitrofenolis – alkoholio rišimo vietoje, pagal kanoninį esterazės mechanizmą. *n*-heksadekanoilo atveju inhibitorius, kaip ir *n*-dodekanoilo substratas, greičiausiai, yra per ilgi acilo surišimo vietai, dėl to jungiasi atvirkštine kryptimi: acilo grupė rišasi alkoholį rišančioje vietoje, o *p*-nitrofenolio grupė – acilo surišimo vietoje. Taigi, dėl atvirkštinės pozicijos *p*-nitrofenolio nueinančios grupės deguonis atsiduria per toli nuo katalizinio histidino vandenilio ir negali sudaryti jungties. Nesusidarant vandenilinei jungčiai, lėtėja pirmojo tarpinio tetraedro skilimo procesas, kas nulemia ir lėtesnį substrato acilinimą. Detalus acil-fermento išlaisvinimo mechanizmas nėra žinomas. Spėjama, kad dodekanoatas tiesiog ilgiau keliauja link acilo surišimo vietos, o pati hidrolizė vyksta pagal kanoninį esterazės mechanizmą.

Kaip jau minėta, esterazėms ir lipazėms nereikalingi kofaktoriai, fermentai yra gana stabilūs ir aktyvūs organiniuose tirpikliuose [42]. Be to, daugelis esterazių/lipazių, priklausančių  $\alpha/\beta$  hidrolazių superšeimai, katalizuoja daugiau nei vieną cheminę reakciją, pavyzdžiui esterių, ir amidų hidrolizę [48].

ABhidrolazės yra viena iš didžiausių žinomų baltymų šeimų, be esterazių/lipazių šiai superšeimai priklauso amidazės, epoksidhidrolazės, dehalogenazės ir hidroksinitrilo liazės ir C-C ryšio hidrolazės. Tikriausiai dėl labilios struktūros, ABhidrolazėms yra sėkmingai taikoma baltymų inžinerija keičiant fermentų savybes. Be pagerinto termostabilumo [49] ir pakeisto enantioselektyvumo [50], buvo sukurti fermentai su visiškai nauju kataliziniu aktyvumu [51] [52]. Pavyzdžiui *Pseudomonas fluorescens* esterazė paversta epoksidhidrolaze [53] arba perhidrolaze [54], to paties mikroorganizmo karboksilesterazė – lipaze [55], o hemo neturinti *Streptomyces aureofaciens* bromperoksidazė – lipaze [56].

#### 1.1.1.1.1. Ferulo rūšties esterių hidrolazės ir tanazės

Ferulo rūšties esterių hidrolazės ir tanazės yra dvi šeimos iš daugelio šeimų, priklausančių  $\alpha/\beta$  hidrolasių superšeimai [57] [58] [59]. Ferulo rūšties esterazės skaido ląstelių sienelės polisacharidų esterius, hidrolizuojant

esterinę jungtį tarp ferulo ar di-ferulo rūgšties ir angliavandenio. Tanazės – fermentai skaidantys esterines jungtis galotaninuose, sudėtinuose taninuose ir galo rūgšties esteriuose [60]. Šių šeimų atstovų randama bakterijose, grybuose ir augaluose. Feruloilesterazės ir tanazės industrijoje naudojamos biomasės perdirbimui, bioetanolio ir popieriaus pramonėse [61], o dar didesnio susidomėjimo šių šeimų fermentai sulaukė, kai atsirado duomenų, kad tokio tipo fermentai gali skaidyti plastikų komponentų esterinius ryšius [62].

Polietileno tereftalato (PET) fermentinę hidrolizę galima suskirstyti į dvi kategorijas – poliesterio pluošto paviršiaus modifikavimas ir PET atliekų skaidymas. Šiuos du procesus katalizuoja skirtingi fermentai. Fermentiniam paviršiaus modifikavimui naudojamos hidrolazės, tokios kaip lipazės, karboksilesterazės, kutinazės ir peptidazės. Šiame procese pašalinamos išsikišusios, polimero paviršiuje esančios, esterio grupės. Tokie fermentai turėtų būti klasifikuojami kaip PET modifikuojantys fermentai ir neturėtų skaidyti PET šerdies. Priešingai, norint skaidyti PET atliekas, reikia fermentų, skaidančių PET šerdinę polimerinę grandinę [63]. Vieni garsiausių šios šeimos atstovų, skaidančių PET, yra IsPETazė ir IsMHETazė iš *Ideonella sakaiensis* [20] [64]. Abu fermentai PET hidrolizės procese dirba sinergetiškai – PETazė hidrolizuoja šerdį, o MHETazė antrajame etape skaido PET komponentus iki pradinių PET sintezės junginių – tereftalio rūgšties ir etilenglikolio. IsMHETazė yra priskiriama ferulo rūgšties esterazių/tanazių šeimai.

#### 1.1.1.2. SGNH hidrolazės

SGNH baltymų superšeima iš pradžių buvo pavadinta GDSL superšeima dėl konservatyvaus amino rūgščių GDSL motyvo [65] [37]. SGNH hidrolazėms būdinga taip vadinama „sumuštinio“  $\alpha/\beta/\alpha$  struktūra, kurią sudaro  $\beta$ -klostės, sujungtos  $\alpha$ -spiralėmis [66]. Skirtingai negu  $\alpha/\beta$  hidrolasių, turinčių GxSxG amino rūgščių motyvą, SGNH hidrolazės turi kitokį – GDSL (anksčiau žinomą kaip GDSLS) konservatyvųjį motyvą aplink katalizinį seriną. Aktyvųjį centrą sudaro Ser-His-Asp(Glu) triada, kurios nukleofilinis serinas yra arčiau konservatyvios sekos N-galo, skirtingai negu  $\alpha/\beta$  hidrolazių (pastarųjų yra konservatyvios sekos centre). SGNH-hidrolazėms būdingas griežtas keturių katalizinių amino rūgščių išsidėstymas keturiuose I, II, III ir V blokuose (1.4 pav). I bloke esantis katalizinis serinas veikia kaip nukleofilas ir protono donoras oksianiono kišenėje. Glicinas II bloke ir asparaginas III bloke taip pat yra oksaniono kišenėje. Jie, sudarydami

vandenilinius ryšius, stabilizuoja neigiamai įkrautą tarpinį produktą. Histidino liekana V bloke veikia kaip bazė – deprotonizuodama hidroksilo grupę didina serino nukleofiliškumą. V bloke trečiojoje pozicijoje nuo His (DxxH seka) esantis Asp yra trečiasis katalizinės triados narys [65] [38].

| PDB Nr. | 610                 | 660                 | 700                   | 790                   |
|---------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| 2WAA    | I L V L G D S V T C | V C W G R G L I R   | L I I S A I G T N D F | D N S D A H P T K D Q |
| 1ESC    | T V F F G D S Y T A | V S C G G A L I H H | L T V G S L G G N T L | I P W Y A H P N D K G |
| 4HYQ    | Y V A L G D S Y S S | V A C S G A V T S D | L V S L T I G G N D A | I N D S Y H P T A A G |
| 5MAL    | Y V A L G D S Y S S | T A C S G A R T G D | L V S I T I G G N D A | V E N S Y H P T A N G |
| 2VPT    | I M P V G D S C T E | E G H S G W T I P Q | V V F L W I G G N D L | S W D G L H L S E I G |
| 4TX1    | V L C Y G D S L T W | E G L N G R T T A Y | L V I F M L G S N D M | P I D G V H L D A E N |
| 2Q0Q    | I L C F G D S L T W | E G L S A R T T N I | L V I I M L G S N D T | G V D G I H F T E A N |
| 3KVN    | L V V F G D S L S D | W A V G G Y R T D Q | L Y Y I T G G G N D F | F N D S V H P T I T G |
| 3W7V    | L L F I G D S I T D | K G I S G N T V R D | W V S I M I G I N D V | A W D R V H P S V A G |
| 4JGG    | L L V V G D S I S A | A S I S G D T S A G | L V V I E L G G N D G | Q A D G I H P A L A A |
| 1IVN    | L L I L G D S L S A | A S I S G D T S Q Q | W V L V E L G G N D G | Q D D G I H P N R D A |
|         | *                   | *                   | *                     | *                     |
|         | I Blokas            | II Blokas           | III Blokas            | V Blokas              |

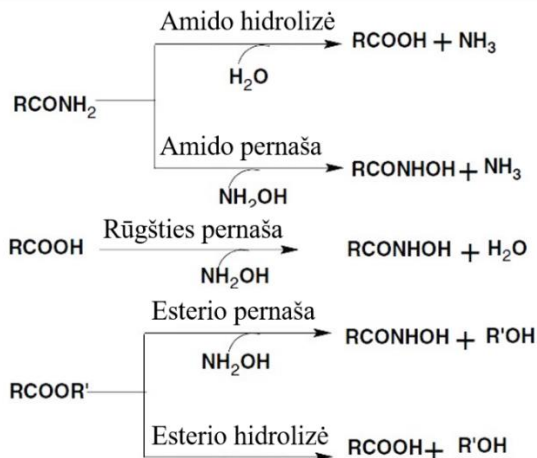
1.4 pav. SGNH hidrolazių katalizinių amino rūgščių išdėstymas blokuose [45].

Literatūroje yra aprašyti SGNH superšeimos atstovai išskirti iš bakterijų, mikromicetų, virusų, augalų ir gyvūnų. Dirvožemyje gyvenančiose bakterijose [67] [68], [69], ir mikromicetuose [66] dažnai randamos SGNH hidrolazių šeimai priklausančios hidrolazės, atsakingos už sienelių struktūrų esterifikaciją ir hidrolizę. Augalo *Tanacetum cinerariifolium* aciltransferazė [70] dalyvauja piretrinų (natūralių insekticidų) esterinio ryšio formavime. Žinduolių acetilhidrolazė, randama smegenyse, svarbi neuronų vystymosi procese [71]. Virusų esterazės atsakingos už receptorių atpažinimą ląstelės paviršiuje [72]. O *E. coli* tioesterazės I pasižyminčios tioesterazės, peptidazės, lizofosfolipazės aktyvumais [73], funkcija ląstelėse iki šiol nenustatyta, tačiau keli tyrimai parodė, kad fermentas lokalizuotas periplasmoje. Remiantis struktūros analize, daroma prielaida, kad šio fermentų platus hidrolizuojamų substratų spektras yra susijęs su fermento aktyviosios vietos lankstumu [74].

NCBI duomenų bazėje taip pat pateikta daug hipotetinių baltymų, priskiriamų SGNH hidrolazėms.

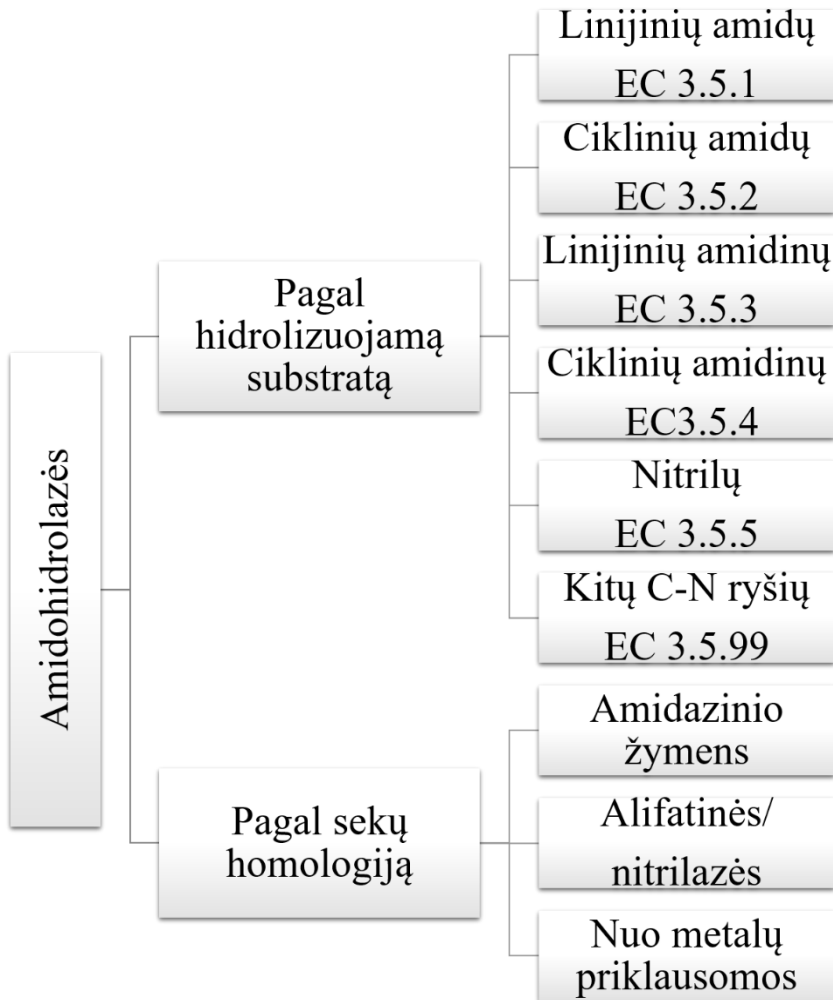
### 1.1.2. Amidohidrolazės

Amidohidrolazės gali katalizuoti keturių skirtingų tipų reakcijas: amidotransferazės, aciltransferazės, rūgšties transferazės ir esterio transferazės (1.5 pav.) [27] [75].



**1.5 pav.** Amidohidrolazių katalizuojamos reakcijos [24].

Sisteminis šios fermentų klasės pavadinimas turėtų būti acilamido amidohidrolazės, bet literatūroje dažnai naudojami kiti pavadinimai – amidazė, amidohidrolazė, acilamidazė, acilazė, deaminazė, riebalų acilamidazė ir N-acetilaminohidrolazė. Amidohidrolazės (EC 3.5) pagal savitumą substratams skirstomos į klases, hidrolizuojančias linijinius amidus (EC 3.5.1), ciklinius amidus (EC 3.5.2), linijinius amidinus (EC 3.5.3), ciklinius amidinus (EC 3.5.4), nitrilus (EC 3.5.5), kitų komponentų C-N ryšius (EC 3.5.99) (1.6 pav.). Šioms šeimoms nepriskiriami peptidinių ryšių hidrolizės fermentai (EC3.4) [27] [75]. O pagal sekų homologiją, amidohidrolazės klasifikuojamos į amidazinio žymens amidazės (ang. *Amidase signature (AS)*) [27] (šiai šeimai priklauso ir EC 3.4, ir EC 3.5 amidazės), nitrilazės (alifatinės amidohidrolazės) EC 3.5.5.1 [76] [77], nuo metalų priklausomos amidohidrolazės, kurias autoriai vadina tiesiog amidohidrolazėmis [78] [79] (1.4 pav). Mokslinėje literatūroje nėra sistemingos amidohidrolazių klasifikacijos. Tai greičiausiai nulėmė didelė šių fermentų įvairovė tiek pagal hidrolizuojamą substratą, tiek pagal sekų homologiją.



**1.6 pav.** Amidohidrolazių klasifikacija.

#### 1.1.2.1. Amidazinio žymens amidohidrolazės

Amidazinio žymens (trumpinys anglų kalboje AS) fermentai turi konservatyvią maždaug 130 aminorūgščių seką, vadinamą AS seka. AS fermentai pasižymi labai konservatyviu C-galo regionu, kuriame gausu serino ir glicino liekanų, tačiau neturi asparto rūgšties ir histidino liekanų. Šių fermentų šerdį sudaro  $\alpha/\beta/\alpha$  struktūra, kurių N- ir C-galų topologijos yra panašios. Šie fermentai turi unikalią, labai konservatyvią Ser-Ser-Lys katalizinę triadą, bet acilfermento tarpinių junginių susidarymo katalizinis mechanizmas gali būti skirtingas [80]. Aktyviojo centro lizinas veikia kaip

bendroji bazė ir aktyvuoja katalizinę seriną netiesiogiai, bet per tarpinį antrąjį seriną.

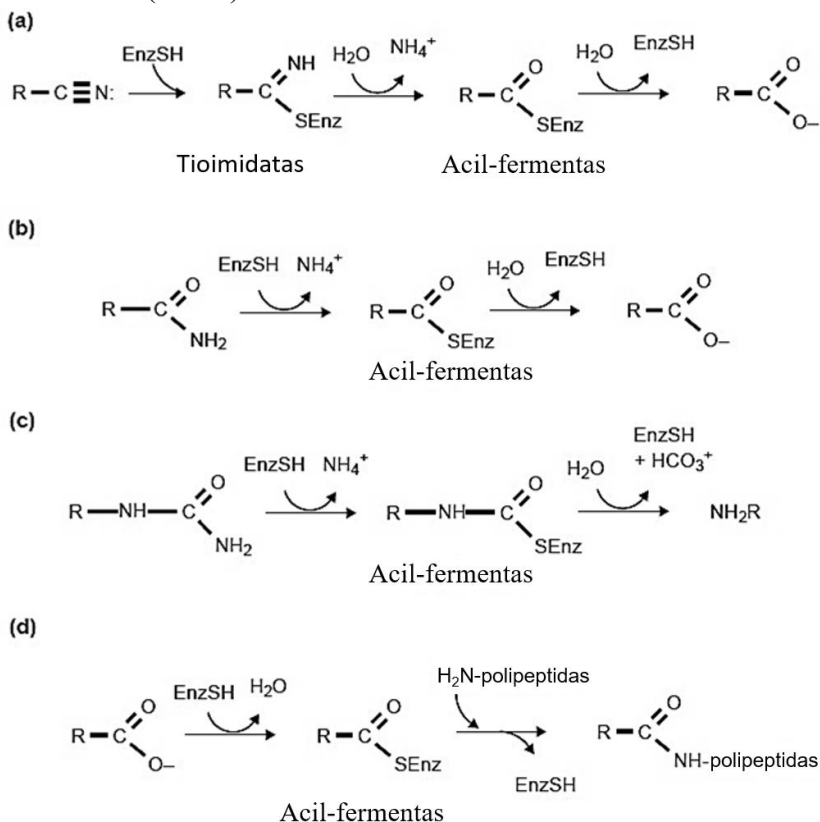
AS fermentai pasižymi labai įvairiu specifiskumu substratams – alifatiniai, aromatiniai amidai ir  $\alpha$ -pakeistų karboksirūgščių amidai [27] [81]. Žinomi AS fermentai yra bakterijų peptidų amidazė, katalizuojanti peptidų amidinių ryšių hidrolizę [80], žinduolių riebiųjų rūgščių amidų hidrolazė, katalizuojanti riebiųjų rūgščių amidų hidrolizę [82]. Malonamidazė E2 iš azotą fiksuojančių bakterijų, katalizuojanti malonamato hidrolizę iki malonato ir amoniako (dalyvauja azoto apykaitos reakcijose) [83] ir prokariotų Glu-tRNA(Gln) amidotransferazės A subvienetas katalizuojantis transmidinimo reakciją susidarant Gln-tRNA(Gln) [84].

#### 1.1.2.2. Alifatinės amidohidrolazės arba nitrilazės

Nitrilazės superšeimai priskiriami tiolių fermentai, dalyvaujantys azoto apykaitos reakcijose augalų, gyvūnų, grybų ir tam tikrų prokariotų ląstelėse. Taip istoriškai susiklostė, kad alifatinės amidohidrolazės, dalyvaujančios azoto apykaitoje, buvo priskirtos nitrilazių superšeimai. Pagal sekų antrinės ir tretinės struktūros panašumus nitrilazių superšeimos atstovus galima suskirstyti į 13 šakų, o pagal atpažįstamus substratus išskiriamos tik devynios šakos, iš kurių tik viena šaka yra tikros nitrilazės, o aštuonių šakų fermentai dalyvauja amidų hidrolizės ar kondensacijos reakcijose [76]. 10-tai šakai priskiriami Nit polipeptidinę seką turintys baltymai, o 11–13 šakoms priskirti polipeptidai neturintys aprašytų struktūrinių panašumų. Alifatinės amidohidrolazės katalizuoja trumpų grandinių alifatinių amidų (pvz., acetamido, propionamido ar akrilamido) hidrolizę iki atitinkamos organinės rūgšties ir amoniako. Šie fermentai taip pat pasižymi acilo transferazės aktyvumu *in vitro*, perkeldami acilo fragmentą nuo trumpų grandinių amidų ant hidroksilamino, sudarant hidroksamatus (1.7 pav.). Su nitrilaze susiję baltymai yra multimeriniai  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  „sumuštinio struktūros“ baltymai, turintys konservatyvią Glu-Lys-Cys katalizinę triadą, o nukleofilinėje atakoje dalyvauja cisteinas [76] [27].

Alifatinėms amidohidrolazėms priklauso nitrilazės iš *C. elegans*, *S. cerevisiae*, *Arabidopsis* ir daugelio bakterijų (1 šaka), alifatinė amidazė iš *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacteria* ir *Helicobacteria* (2 šaka), *S. cerevisiae* aminoterminalinė amidazė Nta1 (3 šaka), dalyvaujanti baltymų apykaitoje (ubikvitilimo reguliaciniame procese), biotinidazė (4 šaka), ureidopropionazė (5 šaka), bakterijų karbamidazė (6 šaka), nuo glutamino

priklausomos NAD sintetazės (7 ir 8 šakos), *E. coli* apolipoproteino N-aciltransferazės (9 šaka).



**1.7 pav.** Nitrilazių šeimai priskiriamų fermentų vykdomų reakcijų schemas: (a) nitrilazių (1 šaka); (b) amidazių (2–4 šakos); (c) karbamilazių (5 ir 6 šaka); (d) N-acilamidazių (9 šaka) [76].

### 1.1.2.3. Nuo metalų jonų priklausomos amidohidrolazės

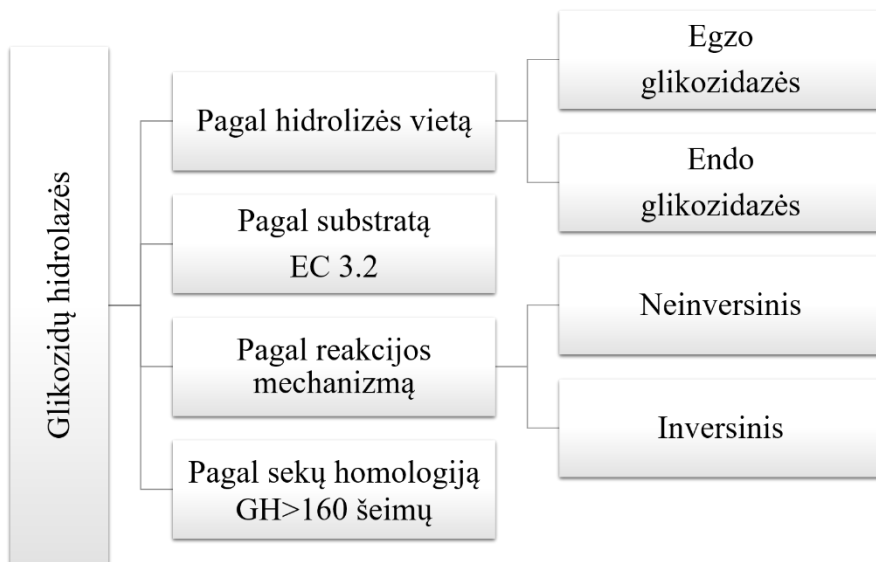
Daugelis nuo metalų priklausomų hidrolazių turi konservatyvę metalų surišimo vietą, sudarytą iš keturių histidinių ir vienos asparto rūgšties liekanų. Tretinė struktūra yra statinė sudaryta iš 8  $\alpha$ -spiralių ir 8 paraleliai išsidėsčiusių  $\beta$ -klosčių. Šie fermentai gali turėti vieną arba du metalo surišimo centrus. Substrato hidrolizė vyksta, kai nukleofilas – vandens molekulė – aktyvuojama, sudarant kompleksą su metalo surišimo centru. Šiai šeimai priklauso tiek prokariotų, tiek eukariotų  $\alpha$ -ureazės, adozino ir citozino deaminazės, fosfotriesterazės, dihidroorotazės, alantoinazės, hidantoinazės, AMP-, adenino ir citozino deaminazės, imidazolnpropionazė, arildialkilfosfatazė, formilmetanfurano dehidrogenazės ir kitos [78] [85].



### 1.1.3. Glikozidų hidrolazės

Glikozidų hidrolazės (GH) – fermentai, katalizuojantys glikozidų glikozidinių jungčių hidrolizę, kai reakcijos produktai yra cukraus hemiacetalis arba hemiketalis ir atitinkamas laisvasis aglikonas. Glikozido hidrolazės taip pat vadinamos glikozidazėmis, o kartais dar ir glikozilų hidrolazėmis. Glikozidų hidrolazės gali katalizuoti O-, N- ir S-ryšių glikozidų hidrolizę. Kadangi angliavandeniai turi ne po vieną stereocentrą, tai jų įvairovė yra milžiniška, ir tai lemia gan sudėtingą glikozidų hidrolazių klasifikaciją. CaZy (ang. Carbohydrate Active Enzymes) duomenų bazėje (<http://www.cazy.org/>) yra nurodyta keletas klasifikacijos būdų (1.8 pav):

- pagal polisacharido hidrolizės vietą – egzo/endo glikozidazės;
- pagal katalizuojamą reakciją (priskiriamas EC numeris);
- pagal reakcijos mechanizmą – neinversinis (substrato anomerinio pakaito padėtis išlaikoma) ir inversinis ( $\alpha$ -anomeris virsta  $\beta$ -anomeru, ar atvirkščiai) [86];
- pagal sekų homologiją (>160 šeimų).



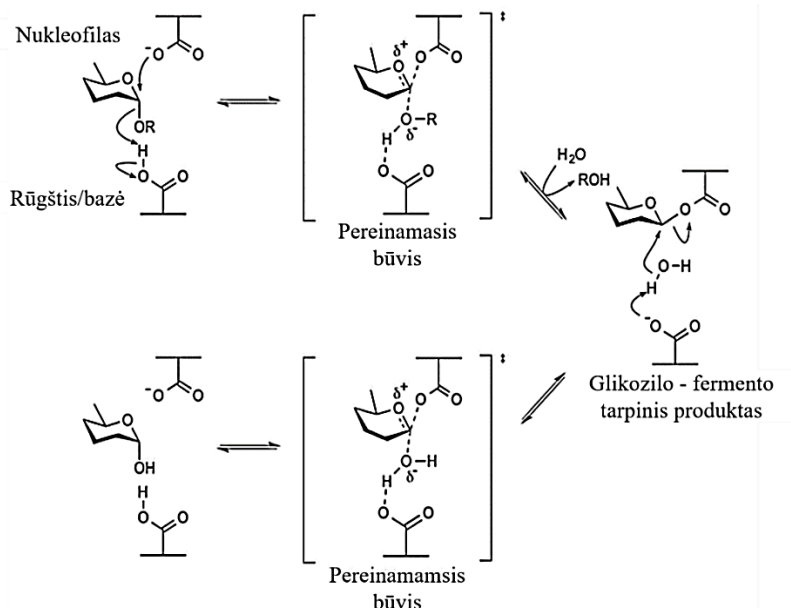
**1.8 pav.** Glikozidų hidrolazių klasifikacija.

Taip pat yra pasiūlyta glikozidazių šeimas suskirstyti į didesnes grupes, vadinamas „klanais“ [87]. Klanas – grupė šeimų, turinčių reikšmingą tretinių struktūrų panašumą, tas pačias katalizines amino rūgščių liekanas ir reakcijos mechanizmą.

### 1.1.3.1. Glikozido hidrolazių reakcijų mechanizmai

Daugeliu atvejų glikozidinio ryšio hidrolizę katalizuoja dvi fermento aminorūgščių liekanos: bendroji rūgštis (protono donoras) ir nukleofilas/bazė [88] [89]. Priklausomai nuo šių katalizinių amino rūgščių erdvinės padėties, hidrolizės metu anomerinė konfigūracija išlaikoma arba invertuojama. Kiekvienai šeimai, išvardytai „CAZY“ duomenų bazėje, nurodyta (kai žinoma) katalizuojamos reakcijos tipas bei amino rūgščių liekanų, veikiančių kaip nukleofilas/bazė ir kaip protonų donoras, tipą.

Neinversines ir inversines reakcijas vykdančioms fermentams pasiūlyti du reakcijos mechanizmai, kuriuos pirmiausia apibūdino Koshland [89]. Neinversinė hidrolizė vyksta dviem etapais, susidarant tarpiniam fermento-glikozilo kompleksui (1.9 pav.). Katalizėje dalyvauja rūgštis/bazė ir nukleofilas, paprastai glutamatas ar aspartatas, esantys vienas nuo kito 5,5 Å atstumu. Pirmajame etape (dažnai vadinamas glikozilinimo etapu) viena amino rūgšties liekana atlieka nukleofilo vaidmenį, atakuoja anomerinį centrą ir išstumia aglikoną, taip susidarant glikozil-fermento tarpiniam junginiui. Tuo pačiu metu kita amino rūgšties liekana veikia kaip rūgštinis katalizatorius - protono donoras. Antrame etape (žinomas kaip deglikozilinimo etapas) glikozil-fermento kompleksas hidrolizuojamas vandeniu.



**1.9 pav.**  $\alpha$ -glikozidazių neinversinės hidrolizės mechanizmas. Pavaizduota remiantis <https://www.cazypedia.org>.

$\beta$ -glikozidazių neinversinio mechanizmo reakcijos procesas yra toks pat, kaip ir  $\alpha$ -glikozidazių, tik katalizinės amino rūgščių liekanos išdėstytos erdvėje priešingai nei  $\alpha$ -glikozidazių. Tuo tarpu inversinio mechanizmo reakcija vyksta vienu etapu ir tarpinis glikozil-fermento kompleksas nesudaromas.

Be šių pagrindinių pasiūlytų mechanizmų, dar yra žinoma keletas įdomių šių mechanizmų variantų: (1) be katalizinio nukleofilo, kai 2-acetamido grupė veikia kaip vidinis molekulinis nukleofilas (būdingas GH18, GH20, GH25, GH56, GH84, ir GH85 šeimoms); (2) be bendrosios rūgšties, bet turinčios egzogeninę bazę – įprastai glutamo rūgštis yra pakeista glutaminu (GH1 šeima); (3) alternatyvaus nukleofilo – vietoj asparto rūgšties liekanos yra tirozinas (GH33 ir GH34 šeimos); (4) nuo NADH kofaktoriaus priklausomas mechanizmas (GH4 ir GH109).

Neinversinis reakcijos mechanizmas būdingas GH29 šeimos  $\alpha$ -L-fukozidazėms, GH2 šeimai priklausančioms  $\beta$ -galaktozidazėms (pvz. *E. coli lacZ* geno produktas),  $\beta$ -glukuronidazėms,  $\beta$ -manozidazėms ar egzo- $\beta$ -gliukosaminidazėms ir kitų šeimų atstovams.

#### 1.1.3.2. $\alpha$ -L Fukozidazės

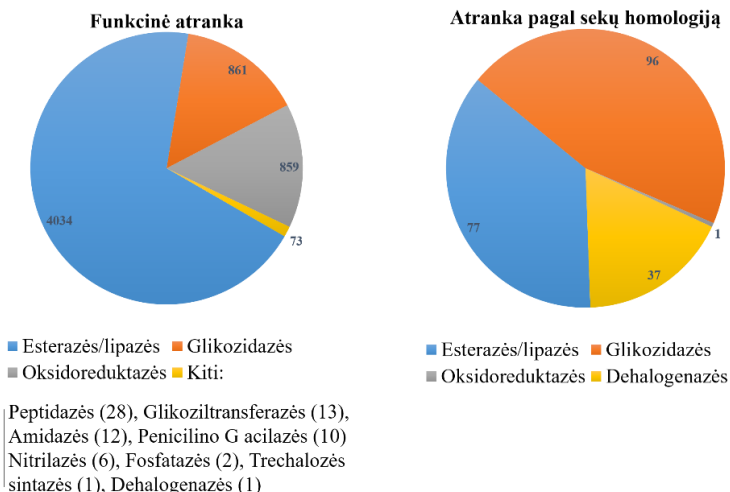
$\alpha$ -L-Fukozidazės yra egzoglikozidazės [90]. CAZy duomenų bazėje yra nurodytos keturios  $\alpha$ -L-fukozidazių šeimos: GH29 (EC 3.2.1.51) ir GH95 (EC 3.2.1.63), GH141 ir GH151. GH29 šeimos  $\alpha$ -L-fukozidazės katalizuoja galinių  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4 ar  $\alpha$ -1,6 L-fukozilų hidrolizę. Bet taip pat yra žinoma, kad šie fermentai gali veikti ir kaip transglikozilazės [90]. GH29 šeimos fukozidazės dažniausiai yra heksamerai, sudaryti iš katalizinio ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> tipo domeno ir C-galinio  $\beta$  “sumuštinio” domeno [91], jiems būdingas neinversinis reakcijos mechanizmas. GH95 šeimos 1,2- $\alpha$ -L-fukozidazės taip pat yra egzoglikozidazės, bet katalizuoja  $\alpha$ -Fuc-1,2-Gal ryšio hidrolizę (tokie ryšiai randami žmogaus pieno oligosachariduose ar kraujo grupių glikokonjugatuose). GH95 šeimai priklauso ir 1,2- $\alpha$ -L-galaktozidazės, skaldančios L-galaktozidų ryšius arabinoksilanuose [92] [93]. GH95 šeimos fermentams būdingas inversinis reakcijos mechanizmas [94]. Katalizinio domeno struktūra yra ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub>-statinė. Manoma, kad GH95 fermentai pasižymi unikaliu reakcijos mechanizmu, kuriame asparto rūgšties aktyvuotas asparaginas veikia kaip bendroji bazė, o glutamato karboksilo liekana yra bendroji rūgštis [95]. Trečioji fukozidazių šeima yra GH141 (EC 3.2.1.51), kuriai priklauso BT1002 *B. thetaiotaomicron*  $\alpha$ -L-fukozidazė. Šio fermento reakcijos mechanizmas, pagal kristalinę struktūrą, turėtų būti panašus į GH29

šeimos fukozidazių reakcijos mechanizmą, tačiau kol kas nėra duomenų apie šio fermento transfukozilavimo aktyvumą. Apie GH151 šeimos (EC 3.2.1.51) atstovus literatūroje kol kas pateikta labai mažai duomenų. Šios šeimos atstovai pasižymi neinversiniu mechanizmu ir atlieka transfukozilavimo reakciją kaip ir GH29 šeimos  $\alpha$ -L-fukozidazės [35].

#### 1.1.4. Metagenomų hidrolazės

Iš daugybės, pramoniniu būdu naudojamų fermentų, daugiau nei pusę sudaro mikromicetinių grybų, daugiau nei trečdalis – bakterijų, o likusi dalis yra gyvūninės (8%) ir augalų (4%) kilmės fermentai [96]. Mikroorganizmų fermentų populiarumą lemia lengvesnis, greitesnis ir tuo pačiu pigesnis mikroorganizmų kultivavimas, didelė mikroorganizmų įvairovė, bei pačių fermentų paprastesnis gavimo ir išskyrimo procesas.

Atsiradus atrankos metodams iš metagenomų, atrodė, kad neliko jokių kliūčių greitai susirasti norimas reakcijas katalizuojančius fermentus. Deja, bet Martinezz-Martinezz ir kt. [9] pateikta duomenų bazių ir bibliografinių įrašų apžvalga parodė, kad apytiksliai per 20 metų (iki 2015) išgauta tik apie 6100 aktyviųjų arba išgrynintų fermentų klonų, o bioinformatiniais metodais, atrinkta dar beveik 30 kartų mažiau (1.10 pav.). To priežastys gali būti įvairios: tiek atrankos metodų jautrumo, tiek genų dažnio ir raiškos, tiek bioinformatinių metodų, galinčių nustatyti menamas funkcijas, nepakankamumas.



**1.10 pav.** Atrinktų ir panaudotų fermentų skaičiaus palyginimas vykdant funkcinę atranką ir atliekant paiešką duomenų bazėse pagal sekų homologiją (dviejų dešimtmečių publikacijų duomenys iki 2015 metų) [9].

Iš pateiktos ataskaitos (1.10 pav.) matoma, kad daugiausia yra surasta metagenominių esterazių. Tai greičiausiai lėmė esterazių metodų gausa (1.2.1.1 skyrius), substratų prieinamumas, pačių esterazių genų dažnis mikroorganizmuose ir, be abejo, susidomėjimas šių fermentų klase.

## 1.2. Hidrolazių iš metagenominių bibliotekų funkcinė atranka

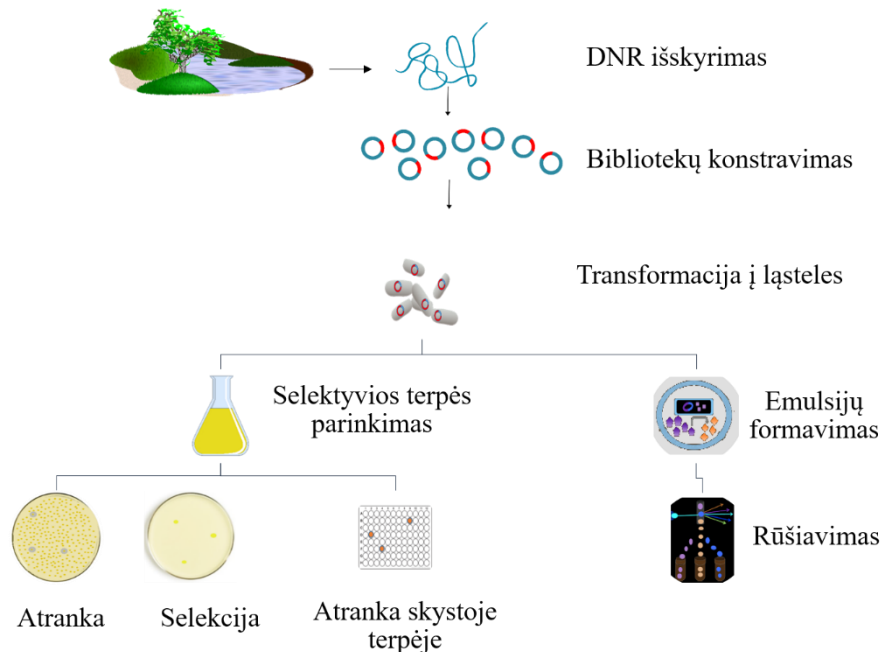
Naujų fermentų paieška paprastai remiasi viena iš šių strategijų: (1) metagenominių bibliotekų konstravimas ir funkcinė teigiamų klonų atranka [40] [97] [98] [99] [100]; (2) paieška (meta)genomuose remiantis homologue sekų analize, chemine tikslinių genų sinteze ir rekombinantinių baltymų katalitizinių savybių gerinimu [101] [96]; (3) tikslinga evoliucija, įskaitant didelio našumo (angl. HTS) mikroskysčių technologiją, kurios pagalba vykdoma fermentų atranka iš atsitiktinai sugeneruotų kombinatorinių bibliotekų [10] [102]; (4) racionali dizainu *in silico* ir eksperimentiniu atrinktų variantų tikrinimu [103] [104] [105] [106]. Funkcinė atranka iš metagenomų suteikia galimybę surasti unikalių savybių turinčius fermentus, kurių katalizinės savybės gali būti vėliau pagerintos *in vitro* evoliucijos pagalba [96] [107]. Vykdamas fermentų selekciją iš metagenomų, išvengiama daugelio problemų – nereikia ieškoti kultivavimo terpių, galima surasti fermentus iš laboratorinėmis sąlygomis nekultivuojamų mikroorganizmų, nebūtina žinoti genomo sekos, ir svarbiausia, atranka vykdoma pagal funkciją, kas leidžia surasti necharakterizuotus fermentus.

Pagrindiniai metagenominių bibliotekų funkciniai analizės metodai *in vivo* yra du:

- atranka pagal tam tikrą fenotipą, kai auga visi klonai, bet keičiasi funkciškai aktyvių klonų fenotipas, pvz. kolonijos pakeičia spalvą (baltų-mėlynų kolonijų testas), ima fluorescuoti, ar atsiranda hidrolizės zonos, pvz.: tributirino hidrolizė (lipazių/esterazių atranka), nugriebto pieno hidrolizė (peptidazių atranka).
- selekcija, kai pašalinami nefunkcionalūs variantai ir auga tik ląstelės, turinčios augimą sąlygojančius genus, pvz. auksotrofinio požymio kompensavimas, ar įgytas atsparumas antibiotikui.

Funkcinę hidrolazių atranką galima vykdyti agarizuotoje ar skystoje terpėje, arba taikant mikroskysčių technologiją (1.11 pav.). Atrankos metodo efektyvumas priklauso nuo pasirinktų sąlygų: bibliotekos kokybės, tai yra jos dydžio, klonuotų fragmentų ilgio, DNR šaltinio, taip pat nuo naudojamo substrato ir pasirinkto šeimininko. Pasirinkto metodo efektyvumas gali skirtis

nuo kelių tūkstančių iki milijardų patikrintų ląstelių kolonijų, o atrenkamų genų, pvz. esterazių skaičius gali svyruoti santykiu nuo 1:11 iki 1:193200 [100] [98].



**1.11 pav.** Funkcinės atrankos iš metagenominių bibliotekų metodų principai. Išskyrus iš aplinkos DNR ir sukonstravus biblioteką, galimos skirtingos atrankos strategijos: atranka agarizuotoje terpėje pagal pasikeitusį fenotipą, arba vykdant selekciją, skystoje terpėje – mikroplokštelėse, arba pavienių ląstelių įkapsuliavimas į aliejaus lašelius kartu su substratu ir lizės agentais.

### 1.2.1. Hidrolazių atranka pagal fenotipinį požymį

Funkcinės atrankos *in vivo* paprastai vykdomos agarizuotoje terpėje ( $10^2$ – $10^3$  klonų analizė Petri lėkštelėje), kai ląstelių kolonijos atrenkamos pagal fluorescencinį arba kolorimetrinį produkto formavimą. Kaip alternatyva, gali būti tiriama atskirų ląstelių klonų aktyvumas mikrotitravimo plokštelių formatu [108] [109]. Atliekant atranką skystoje terpėje, norint išgryninti reakciją katalizuojantį kloną, reikia atlikti papildomas persėjimo procedūras [110]. Nors plokštelių našumas lyginant su atranka Petri lėkštelėje yra mažesnis, yra privalumų, susijusių su kokybiškesniu ir tikslesniu aktyvumo nustatymu bei galimybėmis automatizuoti atrankos procedūrą.

Fermentų atrankos našumą galima padidinti panaudojant sužadintos fluorescencijos ląstelių rūšiavimo (FACS) technologiją [111].

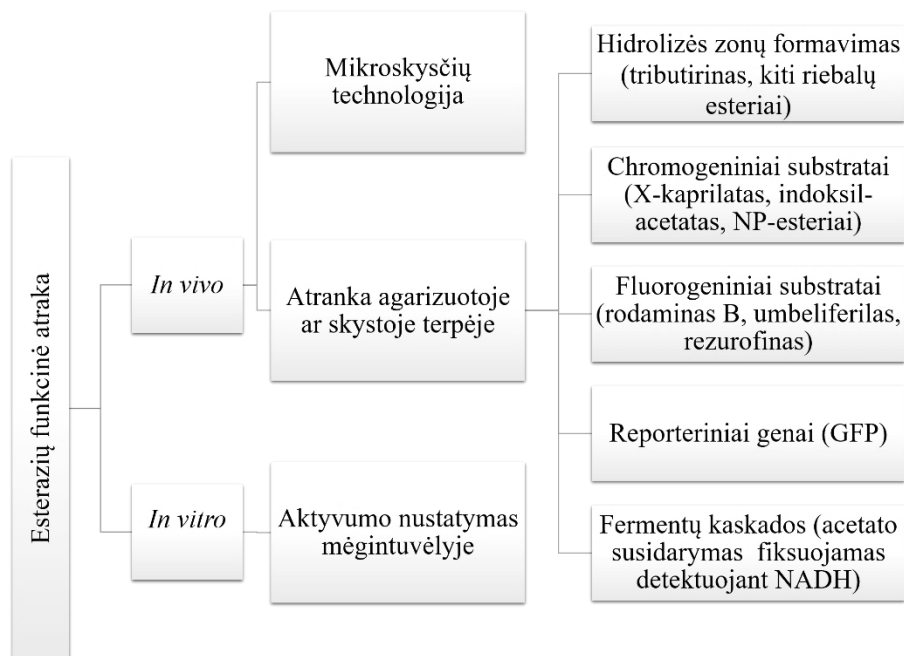
Kitas gana naujas metodas, reikalaujantis atitinkamos įrangos, yra atrankoms pritaikyta mikroskopsčių technologija. Atlikus metagenominės bibliotekos transformaciją, pvz. į *E. coli* ląsteles, pavienės bakterijų ląstelės įkapsuliuojamos į emulsinius lašelius kartu su substratu ir lizės agentais. Po to emulsijos lašeliai inkubuojami mikrogardelėse. Pasireiškus fermento, galinčio hidrolizuoti atitinkamą substratą, ekspresijai, ląstelės ima fluorescuoti. Dielektroforezės pagalba fluorescuojančios ląstelės atskiriamos nuo nefluorescuojančių. Tai jautrus, greitas metodas, tinkamas naudoti įvairių hidrolazių atrankai, kurių nepavyksta identifikuoti klasikiniiais metodais dėl per mažo jautrumo, substratų pasirinkimo ar naudojamų substratų toksiskumo ląstelėms-šeimininkėms [11].

Vietoj chromogeninių ar fluorogeninių substratų hidrolazių atrankai galima naudoti metodą pagrįstą reporterinių genų raiška, tokių kaip GFP genai. Šiose sistemose metagenominės bibliotekos genų produktai suaktyvina reporterinio geno raišką per transkripcijos reguliavimą arba per potransliacinės modifikacijas [111] [112] [100].

#### 1.2.1.1. Esterazių atrankos pagal funkcinį požymį

Esterazių funkcinė atranka gali būti vykdoma *in vivo* ir *in vitro*. Atranka *in vivo* yra laikoma didelio našumo ir taikoma fermentų iš metagenomo paieškai, ar mutantų bibliotekų analizei tiek agarizuotoje, tiek skystoje terpėje, naudojant įvairius substratus ar reporterinius genus (1.12 pav.). *In vitro* atranka vykdoma, nustatant žinomų esterazių savitumą substratams. Klasikinis esterazių ar lipazių atrankos metodas yra paremtas hidrolizės zonų formavimu agarizuotoje terpėje, naudojant substratus aliejų emulsijų pagrindu – tributiriną, rečiau – trikapriliną [113], alyvuogių aliejų ar trioleiną, taip pat Tween-20 ar Tween-80 su CaCl<sub>2</sub> (įvykus hidrolizei, riebalų rūgštys su kalcio druskomis sudaro netirpias nuosėdas), plastiko komponentus – polilakto rūgšties, polikaprolaktono esterius, polietileno tereftalatus, kiaušinio trynį, kutino pluoštus [100] [10]. Esterazių atrankoms taip pat naudojamos chromogeninės medžiagos – *p*-nitrofenolio esteriai, nitrocefinas (esterazėms, turinčioms laktamazinį aktyvumą), 5-bromo-4-chloro-3-indolilkaprilatas (X-kaprilatas) arba indoksilacetatas (mėlynų kolonijų formavimas),  $\alpha$ -naftilacetatas ar lauratas kartu su o-dianizidino zinko druska (Fast Blue B) ar 4-benzoilamino-2,5-dimetoksianilinas (Fast Blue RR), įvykus hidrolizei susidaro violetinės-rudos spalvos nuosėdos (diazonio dažai) [100]. Siekiant

atrinkti enantioatrankias karboksilesterazes, atrankai gali būti panaudojami enantiomerai. Pavyzdžiui, Reetz ir jo kolegos [114] enantio-selektyvių *Pseudomonas aeruginosa* lipazės mutantų atrankai panaudojo optiškai grynus (R)- ir (S)-2-metil-dekanoato pNP esterius. Mikroorganizmų esterių hidrolazėms identifikuoti naudojami ir įvairūs fluorogeniniai substratai: rodaminas B (kolonijos fluorescuoja geltonai 350 nm bangos ilgio šviesoje), umbeliferilo [115], rezorufino esterius [116], ar FRET technologiją [100]. Taip pat yra aprašytų metodų su reporterinio geno panaudojimu [117] ar fermentų kaskados, kai procese dalyvauja keli fermentai [100].



**1.12 pav.** Esterazių funkcinės atrankos metodai.

Hidrolizės zonų formavimas paprastai leidžia per kelias dienas ištirti iki  $10^4$  variantų, tačiau metodo jautrumas dažnai būna ribotas, nes optimaliai vizualizacijai reikalinga didelė substrato koncentracija (2,5–10000 mg/l terpės), o hidrolizės zonos dažnu atveju pamatomos tik esant labai aktyviems fermentams. Naudojant spalvines reakcijas, jautrumas yra didesnis (naudojama nuo kelių ng iki kelių mg/l substrato). Iš aprašytų esterazių ir lipazių aktyvumo detekcijai naudojamų substratų, jautriausias metodas yra fiksuojant pH pokytį – teigiamų klonų randama 1:29 santykiu, po to seka polilakto rūgštis (1:13334), tributirinas (1:15478),  $\alpha$ -naftilacetatas (1: 19925), polietileno tereftalatas (1:21400), trioleinas/alyvuogių aliejus ir rodaminas B (1:22061), Tween-20 (1:26496), metil- ir etilferulatai (1:26496), 5-bromo-4-



chloro-3-indolilfosfatkaprilato (X-kaprilato) (1:50000) ir trikaprilino (1:68279) [9].

Lyginant atrankas skystoje ir agarizuotoje terpėje, atranka plokštelėse yra jautresnė, bet reikalauja papildomų persėjimų, norint išgryninti kloną su esteraziniu aktyvumu (taip per kelias dienas galima patikrinti  $> 10^4$  variantų). Taikant mikroskysčių technologiją ir ląstelių išskirstymą pagal fluorescencijos intensyvumą per dieną galima patikrinti iki  $10^9$  klonų. Tai labai didelio našumo metodas, bet reikalaujantis atitinkamos brangios įrangos. Reporterinių genų panaudojimas rečiau taikomas, nes reikia atlikti papildomų klonavimo darbų, o fermentų kaskados gali pareikalauti papildomų tyrimų, įrodant, kad fiksuojamas būtent esterazės katalizuojamos reakcijos produktas [100].

#### 1.2.1.2. Amidohidrolazių atrankos pagal funkcinį požymį

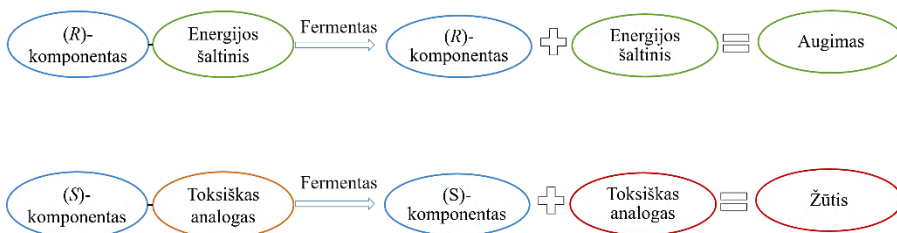
Iki šiol aprašyti amidohidrolazių funkcinės atrankos metodai remiasi chromogeninių junginių susidarymu, naudojant pagalbinius priedus. Pavyzdžiui, aprašytas metodas, kai amidazės aktyvumas stebimas įvykus hidrosilamino hidrolizei iki hidroksamo rūgšties, kuri sudaro tamsiai rudos spalvos kompleksus su trivalente geležimi [118], arba nikotinamidazių ir pirazinamidazių hidrolizės produktai – spalvoti nikotino ir pirazino rūgščių kompleksai su geležies druskomis [119]. Taip pat galimas prochromogeninių substratų kartu su pagalbiniu fermentu atrankos metodas. Pavyzdžiui amidohidrolazės prochromogeniniu substratu gali būti indolo-3-karboksirūgšties amidas, įvykus amidazės katalizuojamai hidrolizei, antrame etape indol-3-karboksilato monooksigenazė konvertuoja indolo-3-karboksirūgštį į indoksilą, kuris spontaniškai oksiduojasi iki indigo – mėlynos spalvos dažo [120]. Kitas atrankos pavyzdys su pagalbiniu baltymu būtų taip vadinama genų ekspresijos sistema indukuojama produktu (PIGEX). Metodas esmė yra tokia: amidohidrolazė katalizuoja benzamido virsmą benzoatu, kuris suaktyvina transkripcijos reguliatorių ir promotorių, o pastarasis indukuoja reporterio GFP geno ekspresiją. Amidohidrolazės aktyvumas vertinamas matuojant GFP fluorescenciją [121]. Kiti aprašyti atrankos metodai remiasi N-acilhomoserino laktono (NAHL) ir biojutiklių panaudojimu [122], taip pat galimas variantas, kai stebima ne substrato hidrolizės, o produkto biosintezės reakcija, pavyzdžiui L-fosfinotricino biosintezė [25].

### 1.2.1.3. Fukozidazių atrankos metodai

Iš mokslinių publikacijų apie glikozidazių atrankos analizės paaiškėjo, kad iki šiol daugiau dėmesio buvo skirta pramoniniu būdu naudojamų glikozidazių – celiulazių, pektinazių ir ksilanazių atrankai iš metagenomų [32], o fukozidazių atrankai skirtų publikacijų skaičius yra itin mažas [112] [123]. Tai gali sąlygoti maža atrankai tinkamų substratų pasiūla. Paskelbtose publikacijose aprašytos atrankos buvo vykdomos pagal fenotipinį požymį, naudojant prochromogeninį arba profluorogeninį glikozido substratą. Pavyzdžiui, yra aprašytas 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -L-fukopiranozido (X-Fuc) panaudojimas metagenominių fukozidazių atrankai (po substrato hidrolizės kolonijos nusidažo mėlyna spalva) [124] [125], *p*-nitrofenolio fukopiranozidų [126], profluorogeninių substratų – metilumbeliferilo glikozidų panaudojimas įvairių glikozidazių aktyvumo detekcijai, taip pat  $\alpha$ -galaktozidazės atrankai *in vivo* [127]. Tačiau nėra aprašytas šio fluorogeninio substrato panaudojimas fukozidazių atrankai iš metagenominių bibliotekų.

### 1.2.2. Hidrolazių atranka selekcijos pagrindu

Selekcijos metodai priklauso nuo tiesioginio ryšio tarp ląstelių augimo ir patobulintos ar įgytos fermento funkcijos, kurie sintetina būtinas maistines medžiagas ląstelių augimui ir išgyvenimui. Lyginant su atrankomis pagal fenotipinio požymio pasikeitimą, selekcijos *in vivo* metodų našumas yra gerokai didesnis ir siekia  $10^8$ – $10^{10}$  variantų patikrą Petri lėkštelėje [108]. Hidrolazių selekcijai dažniausiai naudojami ląstelės-šeimininkės metabolinių kelių auksotrofiniai kamienai, kaip pavyzdžiui leucino [128], aspartato [129], prolino [130], NAD biosintezės [131] bei savitus substratus [132], kuriuos hidrolizuotų saviti fermentai, taip užtikrindami šeimininko gyvybingumą. Enantioatrankių hidrolazių selektyviai atrankai mutantų bibliotekose gali būti panaudojami ir pseudoisomerai: vieno enantiomero hidrolizės reakcijos produktas yra, pavyzdžiui, anglies šaltinis, o kito – toksiškas junginys, stabdantis augimą [133]. Principinė tokio metodo schema pavaizduota 1.13 pav.

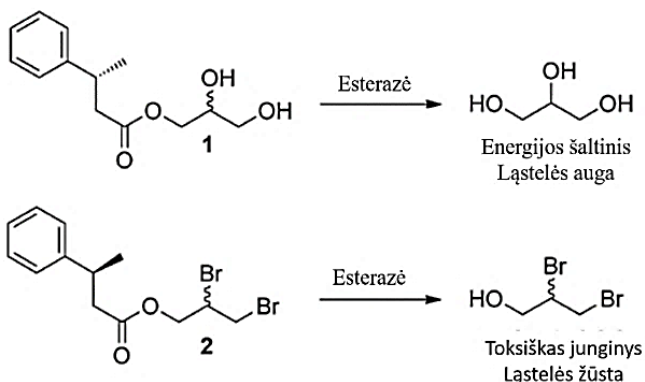


**1.13 pav.** Selekcijos metodas, paremtas pseudoizomerų panaudojimu: vienas reakcijos produktas užtikrina gyvybingumą, o kitas lemia žūtį. [133].

Pasiūlyta atranka yra labai efektyvi, tačiau platesnis tokios sistemos pritaikymas yra šiek tiek apribotas, nes pradiniai substratai turi būti netoksiški organizmui-šeimininkui, o galimų tokių izomerų porų variantai nėra gausūs.

#### 1.2.2.1. Esterazių atranka selekcijos metodais

Palyginus su esterazių/lipazių atrankos metodų pagal fenotipinio požymio pasikeitimą gausa, selekcijos metodų yra pasiūlyta labai nedaug. *Bacillus subtilis* lipazės A enantioselektyvių mutantų bibliotekos selektyviai atrankai buvo sėkmingai panaudotas aspartato auksotrofinis *Escherichia coli* kamienas, bei S-izopropiliden-glicerolio asparto esteris ir pagalbinis slopiklis – R-enantiomeras – alkoholis [129]. Remdamiesi tokiu metodu, Reetz ir kolegos [133] aprašė pseudoenantimerų panaudojimo metodą, kai reakcijos produktas yra acetatas (anglies šaltinis) arba fluoracetatas (toksiškas junginys). Alvaro ir kolegų [106] aprašytas metodas taip pat pagrįstas pseudoenantimerinių esterių mišinio panaudojimu, vienas iš kurių veikia kaip potencialus anglies šaltinis augimui, o kitas priešingai – kaip potencialus augimo slopiklis. Šiame tyrime, autoriai panaudojo du esterius, kurių hidrolizės metu susidaro arba glicerolis – anglies šaltinis, arba 2,3-dibromopropanolis – toksiškas junginys (1.14 pav.).



**1.14 pav.** Enantioselektyvių esterazių selekcija paremta pseudoenantiomerų panaudojimu. Susidarant gliceroliui, ląstelės auga, kitu atveju reakcijos produktas yra toksiškas junginys, ko pasekoje ląstelės žūsta [106].

Iki šiol visi šie aprašyti selekcijos metodai buvo pritaikyti atrankai tik mutantų bibliotekose, bet ne esterazių/lipazių paieškai metagenomuose.

#### 1.2.2.2. Amidohidrolazių selekcijos pagrindu

Selekcijos metodų, skirtų amidohidrolazių atrankai, mokslinėje literatūroje yra vos keletas. Vienas iš amidohidrolazių selekcijos iš metagenomo pavyzdžių aprašytas Gabor ir autorių [128], kurie siekė atrinkti D-fenilglicino amido darinius hidrolizuojančias amidazes. Tam buvo panaudotas leucino auktotrofinis *E. coli* TOP10 kamienas ir fenilacetil-L-leucinas arba D-fenilglicino-L-leucinas kaip leucino šaltinis. D-fenilglicino amido dariniai yra tarpiniai junginiai pusiau sintetinių  $\beta$ -laktaminių antibiotikų (ampicilino, amoksicilino, cefaleksino ir cefadroksilio) biokatalizinėje sintezėje. Kitas pavyzdys yra skirtas enantioselektyviai amidazių atrankai, panaudojant raceminį tert-leucino amidą kaip azoto šaltinį minimalioje mitybinėje terpėje. Iš dirvožemio ir vandens pavyzdžių atrinktų 162 bakterijų kamienų, turinčių amidazinį aktyvumą, pasireiškusių po praturtinimo naudojant amidus kaip azoto šaltinį, autoriams pavyko rasti vieną amido hidrolazę, pasižyminčią enantioselektyvumu tert-leucino hidrolizės reakcijoje [134].

### 1.3. Atrankos metodų problematika

Apibendrinus literatūroje pateiktus metagenominių hidrolazių atrankos metodus, galima išskirti tokius iššūkius, su kuriais susiduriama, vykdant atrankas:

- mažas atrankos metodų našumas;
- metagenominėje DNR yra mažas genų, koduojančių dominančius fermentus, skaičius. Pagal literatūroje pateiktus duomenis, fermentų atrankos iš metagenomo dažnis yra skirtingas: acilazės (1 teigiamas klonas kiekvienam 333 klonui), fosfatazės (1:2843), oksidoreduktazės (1:3370), peptidazės (1:9388), esterazės ir lipazės (1:17320) ir glikozidazės (1: 31190) [9];
- mažas funkinei atrankai tinkamų substratų pasirinkimas. Substratas lemia atrankos sėkmę, pavyzdžiui vienoje publikacijoje aprašyta, kad tikrinant tą pačią genų biblioteką esterazių/lipazių aktyvumas pasireiškė nuo 1:188 iki 1:3937 ir 1:15625 santykiu, su atitinkamai 1% tributirino, trikaprilino ir trioleino substratais [113].
- pagal genų sekų homologiją identifikuoti fermentai yra neaktyvūs raiškos kamieniuose;
- programų, leidžiančių numatyti fermentinį aktyvumą sekose, koduojančiose hipotetinius baltymus, trūkumas.

Galimi šių problemų sprendimo būdai yra:

- selektyvi atranka – galima patikrinti didelį klonų kiekį, taip padidinant metodo našumą ir retų genų suradimo tikimybę;
- savitų naujų substratų sintezė, ko pasekoje atrenkami fermentai atliekantys pageidaujamas funkcijas;
- ląstelių-šeimininkų ir raiškos vektorių parinkimas;
- kompiuterinis modeliavimas ir *in silico* racionalus dizainas, siekiant gauti pranašesnius variantus, derinimas su funkine atranka selekcijos pagrindu.

Atsižvelgiant į aukščiau išvardintas hidrolazių atrankos problemas, šio tyrimo tikslas buvo sukurti didelio našumo, patogius naudoti esterazių, amidohidrolazių ir glikozidazių metodus, panaudojant savitus substratus ir *E. coli* uracilo auksotrofo kamieną.

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Naudoti bakterijų kamienai, vektoriai, terpės bei substratai

#### 2.1.1. Darbe naudoti kamienai

- *Escherichia coli* DH10B: F<sup>-</sup> *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*dlacZ*Δ*M15* Δ*lacX74 endA1 recA1 deoR* Δ(*ara, leu*)7697 *araD139 galU galK nupG rpsL* λ<sup>-</sup> (Thermo Fisher Scientific),
- *Escherichia coli* DH10B Δ*pyrFEC* [31],
- *Escherichia coli* HMS174 Δ*pyrFEC* (konstruotas MMB skyriuje),
- *Escherichia coli* BL21 (DE3): *hsdD gal (λcIts857 indl Sam7 nin5 lacUV-T7* *genas 1* (Novagen),
- *Escherichia coli* HMS174: F<sup>-</sup> *recA1 hsdR* (rK12<sup>-</sup> mK12<sup>+</sup>) (DE3) (Rif R) (Novagen),
- *Escherichia coli* Arctic express (DE3): B F<sup>-</sup> *ompT hsdS*(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) *dcm*<sup>+</sup> Tetrgalλ(DE3) *endA Hte* [cpn10 cpn60 Gent<sup>r</sup>] (Agilent).

#### 2.1.2. Darbe naudoti DNR vektoriai

- Klonavimo vektorius pUC19 (Thermo Fisher Scientific),
- Raiškos vektoriai pLATE31 (Thermo Fisher Scientific), pET-21b(+) (Novagen).

#### 2.1.3. Darbe naudotos kultivavimo terpės

Plazmidžių padauginimui naudota: Luria-Bertami (LB) terpė: 10 g/L peptono, 5 g/L mielių ekstrakto, 5 g/L natrio chlorido, pH 7,2–7,3, 100 μg/ml ampicilino (Roth).

Ląstelių gaivinimui po transformacijos naudota SOB terpė: SOB + 0,2% gliukozė. SOB terpė: 0.5% mielių ekstraktas, 2% triptonas, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM MgSO<sub>4</sub>.

Fermentų atrankai naudota:

- Selektivi M9 mineralinė terpė: 33.9 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 2.5 g/L NaCl, 0.2% (w/v) gliukozės, 0.2% kazamino rūgščių, 1 mM IPTG, 15 g/L agaro, 0,02 mg/ml uridino ar jo analogo 2'3'5'-tri-*O*-acetil-uridino, 2'3'5'-tri-*O*-heksanoil-uridino – esterazių atrankai, arba N<sup>4</sup>-benzoil-2'-deoksicitidino amidohidrolazių atrankai, n-*O*-fukozil-2'-deoksiuridinas – fukozidazių atrankai, n-*O*-galaktozil-2'-deoksiuridinas – galaktozidazių atrankai. Fukozidazių ir glikozidazių atrankai vietoj gliukozės buvo naudotas glicerolis (1%

v/v) kaip anglies šaltinis (siekiant išvengti galimos katabolinės represijos).

- Lipazių esterzių atrankos terpė su tributirinu: LB terpė su 1% tributirino, 100 µg/ml ampicilino (Roth), 15 g/L agaras.

Genų raiškai *E. coli* BL21 (DE3) ar HMS174 kamienuose naudota:

- Luria-Bertami (LB terpė): 0,5% peptono, 0,5% NaCl, 0,3% mielių ekstrakto, pH 7,2–7,3.
- BHI terpė (Brain-Heart-Infusion Broth): (7,5 g/l kiaulės smegenų ekstrakto, 10 g/l kiaulės širdžių ekstrakto, 10 g/l peptono, 2 g/l gliukozės, 5 g/l NaCl, 2,5 g/l Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 ± 0,2) (Roth).
- Pusiau sintetinė terpė: 1 % triptono, 0,5% mielių ekstrakto, 0,268% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,15% NH<sub>4</sub>Cl, 0,6% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1% glicerolio, pH 7,0. Priedai, dedami prieš indukciją (pasirenkamas vienas iš jų vienam eksperimentui): 0,7 M sorbitolis/ 0,5 M sacharozė/ 0,7 M manitolis/ 0,5 M argininas.

Visų terpių komponentai ištirpinami distiliuotame vandenyje, pH vertė privedama iki 7,2–7,3. Terpės autoklavuojamos 30 min, 121 °C, 1 atm slėgyje. Į terpes prieš naudojimą pridedama atitinkamo antibiotiko ir kitų priedų.

#### 2.1.4. Darbe naudoti substratai

Esterazinio aktyvumo analizei naudota: *p*-NP acetatas, *p*-NP butiratas, *p*-NP heksanoatas, *p*-NP deksanoatas, *p*-NP palmitatas, *p*-NP stearatas, *p*-NP trimetilacetatas, benzil-*p*-nitrofenil-karbonatas, β-D-gliukozės pentaacetatas, β-D-galaktozės pentaacetatas (Sigma-Aldrich). 2',3',5'-tri-*O*-acetiluridinas, 2',3',5'-tri-*O*-heksanoiluridinas, *R/S*-1-feniletilo esteriai – acetatas, heksanoatas ir benzoatas susintetinti MMB skyriuje [128], 3'-*O*-benzoil-2'-deoksiuridinas (Carbosynth), 3'-*O*-acetil-2'-deoksiuridinas, 3'-*O*-acetil-*N*<sup>4</sup>-benzoil-2'-deoksicitidinas, 3'-*O*-levulinil-*N*<sup>4</sup>-benzoil-2'-deoksicitidinas ir 5'-*O*-levulinil-*N*<sup>4</sup>-benzoil-2'-deoksicitidinas (Jena Bioscience). Esterazių/lipazių atrankai klasikiniu atrankos metodu naudotas tributirinas (1,3-di (butanoiloksi) propan-2-il butanoatas) (Applichem).

Amidohidrolazinio aktyvumo analizei naudota: *N*<sup>4</sup>-acetilcitidinas, *N*<sup>4</sup>-acetil-2'-deoksicitidinas, *N*<sup>4</sup>-benzoil-2'-deoksicitidinas, *N*<sup>4</sup>-benzoilcitidinas, (Combi-Blocks), *N*<sup>4</sup>-isobutiril-2'-deoksicitidinas, kapecitabinas (Sigma-Aldrich), *N*<sup>4</sup>-heksanoil-2'-deoksicitidinas, *N*<sup>4</sup>-nikotinoil-2'-deoksicitidinas, *N*<sup>4</sup>-(2-acetil-benzoil)-2'-deoksicitidinas, *N*<sup>4</sup>-(3-acetil-benzoil)-2'-deoksicitidinas, *N*<sup>4</sup>-(4-acetil-benzoil)-2'-deoksicitidinas, *N*<sup>4</sup>-(2-benzoil-

benzoil)-2'-deoksicitidinas,  $N^4$ -(3-benzoil-benzoil)-2'-deoksicitidinas,  $N^4$ -(4-benzoil-benzoil)-2'-deoksicitidinas susintetinti MMB skyriuje [135]. Heterociklinės bazės: isocitozinas (Combi-Blocks),  $N^4$ -acetilcitozinas ir  $N^2$ -acetilzocitozinas,  $N^4$ -acetil-5-fluorocitozinas sintetinti MMBS [136]. *p*-nitroamidai: *p*-nitroacetanilidas (Sigma-Aldrich), *p*-nitrobenzanilidas (CombiBlocks). Kontrolinėms reakcijoms naudoti nukleozidai: uridinas, 2'-deoksiuridinas, citidinas, 2'-deoksicitidinas (Sigma-Aldrich).

Laktamazinio aktyvumo nustatymui naudoti substratai: nitrocefinas (Oxoid), Vince laktonas (2-azobiciklo [2,2,1]hept-5-en-3-onas) (Sigma-Aldrich), 7-nitro-2*H*-1,4-benzookiazin-3(4*H*)-onas, 5-nitro-2-oksindolas, 6-nitro-3,4-dihidrochinolin-2(1*H*)-onas, 6-nitrochinoksalin-2-onas, *tert*-butil-4-nitrofenilkarbamatas (Combi-Blocks).

Glikozidazių aktyvumo nustatymui naudoti substratai: *p*-nitrofenil-β-D-fukopiranozidas (Sigma-Aldrich), *p*-nitrofenil-α-L-fukopiranozidas, metil-α-L-fukopiranozidas. Kontrolinėms reakcijoms naudota L-fukozę (Carbosynth).

Fermentinei sintezei naudota Lactazyme-B™ iš *Bacillus circulans* (GenoFocus) galaktozidazė.

#### 2.1.5. Darbe naudoti pradmenys

**2.1 lentelė.** Genų klonavimo pradmenys. Pabraukta ir parašyta kursyvu pradmens dalis skirta sąveikai su pLATE31 vektoriumi.

| Klonas | F pradmuo                                                  | R pradmuo                                          |
|--------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 24T5   | TACATATGCTGAGAAAATG<br>GCTG                                | CTAAGCTTGTGCGCTTCGATGA<br>AG                       |
| 24T1   | <u>AGAAGGAGATATAACTATGG</u><br>ATCAAACACTTCTCGCTT          | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCC</u><br>TCTGCGAGGTAAGGCTT |
| 24T3   | <u>AGAAGGAGATATAACTATGG</u><br>AAAGCCAGACGTTTGGGA          | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCC</u><br>TTCAGGCTCTCCGCAA  |
| 33T1   | TACATATGAAAGCCAGACG<br>TTTG                                | TACTCGAGTCTTCAGGCTCTCA<br>GCAAAG                   |
| 30T1   | <u>AGAAGGAGATATAACTATGC</u><br>GTCGTCCATCCTTG              | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCC</u><br>TGGGCCAGATGCTCG   |
| 30T2   | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>AAGTTAAAATTTAATAGT<br>TTTCC | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCTT</u><br>GAGTAATTTTATTTTC |



|               |                                                      |                                                        |
|---------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>36T2</b>   | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>CCCTGAGACTTGCG        | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCC</u><br>AGGTTGTCGCGGAAC       |
| <b>3T</b>     | ATGCATATGGCGTTTTTCG<br>ATTTGCC                       | ATGCTCGAGATCCAGCAGATCA<br>TGCAG                        |
| <b>GRU1</b>   | <u>AGAAGGAGATATAACTATGC</u><br>CGGTTATCGACATG        | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCC</u><br>AAACCAAGCATAAACTGAAC  |
| <b>BD1</b>    | <u>AGAAGGAGATATAACTATGAT</u><br>CAGAAACATCTTTGGC     | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCC</u><br>TGCAGACCACGGCG        |
| <b>12T</b>    | TACATATGCTTCATCGTCAT<br>TGC                          | TAGTCGACGAGTTTGGTCGCGG<br>GATC                         |
| <b>33T3</b>   | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>ATAAATCAAACGTACGT     | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCTT</u><br>TGAAAATGGACAGATCTATC |
| <b>BD9</b>    | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>AGCCCACTCGCTG         | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCC</u><br>AACAGCGCAGCGTC        |
| <b>36T1</b>   | <u>AGAAGGAGATATAACTATGAT</u><br>AAAACCTCAATCCTGTCTTC | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCC</u><br>AAGAACAGCCGCGG        |
| <b>45T3</b>   | GGCGAGTTGCATATGACCC                                  | GGAAGCTTGCCCGTGGGAAGG                                  |
| <b>C233</b>   | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>CGAACCCCAAGTCG        | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCC</u><br>ACCTCCGTGCTGTGC       |
| <b>PLA1</b>   | <u>AGAAGGAGATATAACTATGC</u><br>GCCGCCGC              | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCC</u><br>GGCTTTGCCATCACC       |
| <b>MO101T</b> | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>ACATCGTATTGATTCA      | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCT</u><br>AAAGGCACTGAAATATTTTCG |
| <b>SVG1</b>   | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>GTCTCCACCTCAAGTG      | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCC</u><br>GGTTTGCGTAGACC        |
| <b>SVG3</b>   | <u>AGAAGGAGATATAACTATGC</u><br>GCAAGGGG              | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCC</u><br>TTAAAGACAGAATCAAGAAAC |
| <b>B11</b>    | <u>AGAAGGAGATATAACTATGC</u><br>GCGATGCCTC            | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCC</u><br>TGCGCTTCGATGAAG       |
| <b>4H1T</b>   | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>GAATCATTTTTATCCCT     | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCT</u><br>ACTTTAGAAAAGAAGTCCTGA |

|                         |                                                 |                                                      |
|-------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>RIEB</b>             | <u>AGAAGGAGATATAACTATGC</u><br>GCACATCTTTGC     | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCG</u><br>AGGTGCGCCGTC A      |
| <b>MO4B</b>             | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>AAAGTCCATCCAAG   | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCA</u><br>CGTAAGGCCGTA CTG    |
| <b>EN1H</b>             | <u>AGAAGGAGATATAACTATGC</u><br>AATCAACCAA       | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCG</u><br>GAATAGATTTTTTCAGATA |
| <b>EN3H</b>             | <u>AGAAGGAGATATAACTATGC</u><br>CCAACAACATCG     | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCG</u><br>GACACATCTTCCCC      |
| <b>BD2H</b>             | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>GTTCGCTCCGCC     | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCA</u><br>AGCGTCCTCTCAAACCA   |
| <b>CAP3H</b>            | <u>AGAAGGAGATATAACTATGC</u><br>ATCGAGCTGTTTC    | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCG</u><br>GGCGTACACGGC        |
| <b>1315H</b>            | <u>AGAAGGAGATATAACTATGT</u><br>GGGCCACCAGC      | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCG</u><br>GAGACGGACTTGCCTAA   |
| <b>SVGPA-<br/>2T</b>    | <u>AGAAGGAGATATAACTATGC</u><br>CGGCGCTTGACGGC   | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCG</u><br>GGCCGTCATCCG        |
| <b>K3H2</b>             | <u>AGAAGGAGATATAACTATGT</u><br>CCGACCCGCAA      | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCG</u><br>CCGGCGAGCGCTTCCTT   |
| <b>Tb_10-7T</b>         | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>ATCATAACGTATCCGC | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCA</u><br>CGGTGAGAAATTTCAAG   |
| <b>Tb_7_1T</b>          | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>CACATGGATTGACA   | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCG</u><br>TCATCAATCGCGGC      |
| <b>MO13_<br/>Est631</b> | TCCATATGAGCTCACTTTTT<br>ATTG                    | GCTCGAGTTTAATCAGTTTGAT<br>AT                         |
| <b>MO13_<br/>Est537</b> | TCCATATGAGCTCACTTTTT<br>ATTG                    | ACTCGAGTGCTTTTAAGCATG                                |
| <b>BRM_A<br/>m</b>      | <u>AGAAGGAGATATAACTATGG</u><br>ACATCCAGAACCTG   | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCT</u><br>AACCGACAGGCATTGAC   |
| <b>K3_Am</b>            | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>CGAACCAACTCTGGC  | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCG</u><br>ACCGGGCACCGGTC      |
| <b>Mo10_A<br/>m</b>     | <u>AGAAGGAGATATAACTATGC</u><br>GCCAGACACCCG     | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCG</u><br>GAGAAGGCCTGGCAGTC   |

|                           |                                                           |                                                         |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>CIAN4</b>              | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>AGAGACATATTCAGAT           | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCAT</u><br>GCACGGCGCA            |
| <b>P4FUMM<br/>07_AcAm</b> | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>GCTTAGAACACAGGCAC          | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCG</u><br>ACTGCAACTTGAAATGTTTGC  |
| <b>P4FUMM<br/>07_AmH</b>  | <u>AGAAGGAGATATAACTATGA</u><br>CCCAGGTTTCAGGAACTAT<br>TTT | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCG</u><br>TGGACGCGGCGTC          |
| <b>D8_RL</b>              | <u>AGAAGGAGATATAACTATGG</u><br>AACAAATAAAATTTCAA          | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCAT</u><br>CGTGTGCTGGTGTG        |
| <b>62Fuc1</b>             | <u>AGAAGGAGATATAACTATGG</u><br>ACAAGATGTGGGGGGACT<br>CGAA | <u>GTGGTGGTGATGGTGATGGCCG</u><br>CGAATGAGTGTGCATGCCTATG |
| <b>62Fuc1_4<br/>22</b>    | CGCGCTTGTGAGTTGGAGT<br>TC                                 | GGCCATCACCATCACCACCAC                                   |

2.2 lentelė. 1315H\_DUF\_GFP liejinio pradmenys

| <b>Pavadinimas</b>                             | <b>F pradmuo</b>                                  | <b>R pradmuo</b>                                              |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <b>1315H_DUF_His<br/>/1315H_DUF_<br/>gfp_R</b> | <u>AGAAGGAGATATAACTAT</u><br><u>GTGGGCCACCAGC</u> | AGTTCTTCTCCTTTACTCG<br>AGACGGACTTGCCTAA                       |
| <b>1315H_DUF_F_<br/>His/gfp_R_His</b>          | TTAGGCAAGTCCGTCT<br>CGAGTAAAGGAGAAG<br>AACT       | <u>GTGGTGGTGATGGTGATG</u><br><u>GCCCGAGACGGACTTGCC</u><br>TAA |

2.3 lentelė. Kolonijų PGR ir sekoskaitos pradmenys

| <b>Pavadinimas</b>                 | <b>F pradmuo</b>            | <b>R pradmuo</b>              |
|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <b>T7 Promoter/<br/>Terminater</b> | TAATACGACTCACTA<br>TAGGG    | GCTAGTTATTGCTCAGCGG           |
| <b>LIC<br/>Forward/Reverse</b>     | TAATACGACTCACTA<br>TAGGG    | GAGCGGATAACAATTTACAC<br>ACAGG |
| <b>M13/pUC<br/>Forward/Reverse</b> | CCCAGTCACGACGT<br>TGTA AACG | AGCGGATAACAATTTACACA<br>CAGG  |

2.4 lentelė. BRM\_Am hidrolazės taškinės mutagenėzės pradmenys

| <b>Pavadinimas</b>   | <b>Pradmuo</b>                         |
|----------------------|----------------------------------------|
| <b>BRM_Lys77_Ala</b> | CGGCGAAAACAGGTCCGCGATCAGGGTCGGTAC<br>C |

|                       |                            |
|-----------------------|----------------------------|
| <b>BRM_Ser153_Ala</b> | CCGCCGCTGGCACCGCCGGCACT    |
| <b>BRM_Ser177_Ala</b> | CACACGCAAGGCACCGCCGCCATCGT |

## 2.5 lentelė. MO13\_Est537 hidrolazės taškinės mutagenezės pradmenys

| <b>Pavadinimas</b> | <b>F pradmuo</b>              | <b>R pradmuo</b>                     |
|--------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| <b>MO13_S195A</b>  | TTGCGGGTGGTGCG<br>GAAGGAGG    | AATACACTTGATCCGGAA<br>CGGCGTT        |
| <b>MO13_D429A</b>  | ATGGTACGGAAGCC<br>GAAATGGTCGC | GGACTAAAATCAACTTAC<br>CCCCGTTCTC     |
| <b>MO13_H467A</b>  | GGTTTCAGCGCTGGC<br>GGGGGTAA   | AGGAACCAAGTAGTACTG<br>AGCAAATTCGTCAA |

### 2.1.6. Darbe naudotos metagenominės bibliotekos

Fermentų atrankoms naudotos metagenominės bibliotekos buvo paruoštos GMC Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus darbuotojų iš aplinkos dirvožemio ir vandens mėginių. Bibliotekų paruošimas aprašytas publikacijoje [137].

## 2.2. Darbe taikyti metodai

### 2.2.1. Kompetentinių ląstelių ruošimas

Kompetentinės ląstelės auginamos BHI terpėje iki optinis tankis pasiekia  $OD_{600} = 0,6-0,7$ . Ląstelės nucentrifuguojamos  $4000 \times g$   $4^\circ C$  10 min. Ląstelių biomasė resuspenduojama to paties tūrio šaltame 10% glicerolio tirpale ir vėl centrifuguojama  $4000 \times g$   $4^\circ C$  10 min. Šis procesas kartojamas tris kartus. Po paskutinio centrifugavimo ląstelių biomasė resuspenduojama penktadalyje nuo pradinio terpės tūrio 10% glicerolio tirpale. Taip paruoštos kompetentinės ląstelės gali būti elektroporuojamos iš karto arba saugomos –  $80^\circ C$ .

### 2.2.2. Elektroporacija

Kompetentinių ląstelių suspensija ir 1–2 ng plazmidinės DNR tirpalo supilama į atšaldytą elektroporacijos kiuvetę (Eppendorf). Elektroporacija vykdoma leidžiant  $1800 \text{ mV/cm}$  įtampos srovę, impulso trukmė 3,9–5,4 ms (Electroporator 2510, Eppendorf). Iškart po elektroporacijos ląstelės užpilamos SOC gaivinimo terpės ( $10 \times$  ląstelių suspensijos tūrio) ir inkubuojamos  $37^\circ C$  termostate 30 min. Po gaivinimo dešimtoji ląstelių

suspensijos tūrio dalis išsėjama ant agarizuotos LB terpės su reikiamu antibiotiku.

### 2.2.3. Fermentų atranka selektyvioje agarizuotoje M9 terpėje

Atlikus transformaciją, po gaivinimo *E. coli* DH10B  $\Delta$ *pyrFEC* ląstelės nucentrifuguojamos  $10000\times g$  ~1 min., terpė nupilama, ląstelės resuspenduojamos fiziologiniame tirpale (0,9% NaCl tirpalas) ir glaistymo metodu išsėjamos ant selektyvios agarizuotos M9 terpės. Petri lėkštelės inkubuojamos 37 °C temperatūroje 1–4 paras. Užauga tik transformantai, turintys aktyvų, atitinkamą substratą hidrolizuojantį geną.

### 2.2.4. Esterazių/lipazių atranka agarizuotoje terpėje su tributirinu

Po elektroporacijos *E. coli* DH10B  $\Delta$ *pyrFEC* ląstelės (1/20 suspensijos tūrio) glaistymo metodu išsėjamos ant agarizuotos LB terpės, turinčios 100  $\mu$ g/ml ampicilino, emulsinio tributirino (1%) ir IPTG 0,1 mM (Thermo Fisher Scientific). Lėkštelės inkubuojamos 37 °C temperatūroje 1–2 paras. Norimi transformantai identifikuojami, remiantis skaidrių zonų susidarymu aplink kolonijas. Hidrolizės zonos rodo, kad tokia kolonija turi esterazės/lipazės geną ir vyksta šio geno raiška [138] [100] [139].

### 2.2.5. Genų pagausinimas PGR metodu

Genų pagausinimas atliekamas naudojant Phusion Green Hot Start II High – Fidelity PCR Master Mix, esant 0.25  $\mu$ M kiekvieno tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų koncentracijai (2.1 lentelė), bei 30–100 ng DNR. PGR sąlygos: 1) pirminė denatūracija vykdoma 98 °C 30 s; 2) denatūracija 98 °C 10 s; 3) pradmenų prilydimas 15s (temperatūra apskaičiuojama naudojant Tm Calculator (ThermoScientific web tools)); 4) DNR sintezė vykdoma 72°C 20 s/1 kb fragmentui; 5) galutinė polimerizacija – 72°C 3 min. 2–4 stadijos kartojamos 30 kartų.

### 2.2.6. Kolonijų PGR

Kolonijų PGR atliekama naudojant DreamTaq™ Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo nurodymą. Tikrinant užaugusius transformantus kolonijų PGR metodu įnešama atskirų užaugusių transformantų kolonijų biomasės. PGR atliekama naudojant vieną iš 2.3 lentelėje nurodytų pradmenų porų. PGR sąlygos parenkamos, remiantis pradmenų lydimosi temperatūra ir gausinamo geno ilgiu.

### 2.2.7. Genų klonavimas į pLATE31 vektorių

PGR metodu pagausintas genas klonuojamas į pLATE31 vektorių naudojantis „aLICator LIC Cloning and Expression Kit 3“ (Thermo Fisher Scientific) rinkiniu pagal gamintojo nurodymus.

### 2.2.8. Genų klonavimas į pET21 vektorių

DNR fragmentų ligavimas atliekamas T4 DNR ligazės buferiniame tirpale su 0,25 U/μl T4 DNR ligazės (Thermo Fisher Scientific), 20 ng/μl vektoriaus, 50–100 ng DNR fragmento. Mišinys inkubuojamas 1 val kambario temperatūroje arba 4 °C 18–24 val.

### 2.2.9. DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis

DNR hidrolizė buvo atliekama, naudojant restrikcijos endonukleazes (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo nurodymus. DNR hidrolizės rezultatai vertinami DNR elektroforeze agarozės gelyje.

### 2.2.10. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė vykdyta 1% agarozės gelyje TAE buferyje (120 V). Elektroforezės eiga stebėta pagal „DNA Gel Loading Dye (6X)“ (Thermo Fisher Scientific). Po elektroforezės gelis 5 min dažytas etidžio bromido tirpale. DNR fragmentų dydžiui nustatyti naudotas „GeneRuler DNA Ladder Mix“ (Thermo Fisher Scientific) ilgio standartas.

### 2.2.11. DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio

DNR fragmentai iš agarozės gelio gryninti naudojant „GeneJET Gel Extraction Kit“ (Thermo Fisher Scientific) rinkinį pagal gamintojo nurodymus.

### 2.2.12. Plazmidinės DNR gryninimas

Iš *E. coli* ląstelių plazmidinė DNR buvo išskiriama naudojantis „ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kit“ (Zymo Research) rinkiniu pagal gamintojo nurodymus.

### 2.2.13. Fermentų genų raiška

*E. coli* ląstelės buvo augintos aeruojant BHI, LB arba pusiau sintetinėje terpėje iki  $OD_{600} = 0,7-1,0$ . Genų raiška indukuojama 0,1–0,5 mM IPTG. Auginant pusiau sintetinėje terpėje, prieš indukciją, į terpę pridedama vieno iš

priedų: 0,5 M sacharozės (Merck), 0,7 M sorbitolio (Merck), 0,5 M arginino (Merck) arba 0,7 M D-manitolio (Merck). Po indukcijos ląstelės auginamos 16 °C 18–20 val. aeruojant.

#### 2.2.14. *E. coli* ląstelių ardyimas ultragarsu

Atlikus tikslinio geno raišką, *E. coli* ląstelės surenkamos centrifuguojant 4000×g 4 min. Mitybinė terpė nupilama ir ląstelės suspenduojamos 50 mM K-fosfatiniame buferyje, pH 7,5 santykiu 1 g biomasės su 20 ml buferinio tirpalo. Ląstelės ardomos ultragarsiniu dezintegratoriumi (UZDN-2T) 22 000 Hz dažniu. Ardymas vykdomas ledovandens vonioje, po 20 s, su 20 s pertraukomis ~2 min. Po ardymo mėginys centrifuguojamas 10000×g 4 °C 6 min. Supernatantas naudojamas baltymo gryninimui.

#### 2.2.15. Fermentų gryninimas afininės Ni-NTA chromatografijos būdu

Fermentai buvo gryninami afininės chromatografijos būdu naudojant „AKTApurifier“ (GE Healthcare Life Sciences) chromatografijos sistemą. Baltymo gryninimui naudojama „HiTrap™ Chelating HP“ su nikelio (GE Healthcare Life Sciences) kolonėlė. Nesisorbavusių baltymų frakcija pašalinama sorbentą plaunant 50 mM kalio fosfato buferiu, pH 7,5 (5 kolonos tūriai), tikslinis baltymas desorbuojamas kalio fosfato buferiu pH 7,5 su 300 mM imidazolo (10 kolonos tūrių, gradientas 0–100%). Frakcijos su tiksliniu baltymu apjungiamos.

#### 2.2.16. Fermentų gryninimas iš augimo terpės afininės Ni-NTA chromatografijos būdu

Lastelių suspensija centrifuguojama 4000×g 10 min. Terpė nupilama į atskirą indą, į kurią pridedama „IMAC Sepharose 6 Fast Flow resin“ (GE Healthcare Life Sciences) sorbento, įsotinto nikelio (sorbento ir terpės tūrių santykis 1:100). Taip paruošta terpė inkubuojama maišant 2–16 h 16 °C. Po inkubacijos terpė centrifuguojama 100×g 1 min, supernatantas nupilamas, o sorbentas su surištu tiksliniu fermentu perkeliamas į chromatografijos kolonėlę (GE Healthcare Life Sciences). Afininė baltymo chromatografija vykdoma „AKTApurifier“ (GE Healthcare Life Sciences) chromatografijos sistema. Nesorbuoti baltymai iš kolonėlės pašalinami sorbentą praplaunant 50 mM K-fosfatiniumi, pH 7,5 buferiu, sorbuotas baltymas išplaunamas palaipsniui didinant imidazolo koncentraciją, naudojant 50 mM K-fosfatinį buferį su 300 mM imidazolo, pH 7,5.

Išgrynintas baltymo tirpalas perkeliamas į dializės maišelį (Spectra/Por® Biotech RC) ir dializuojamas 50 mM K-fosfatiniame, pH 7,5 buferyje 18–24 val 4 °C temperatūroje, maišant magnetine maišykle. Baltymo tirpalo ir buferinio tirpalo santykis turi būti ne mažesnis nei 1:50. Po dializės į fermento tirpalą pridedama glicerolio iki 50% (v/v).

#### 2.2.17. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu

Baltymo koncentracijai naudotas Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). 200 µl Bradfordo reagento sumaišoma su 4 µl 0,1–0,5 mg/ml baltymo tirpalo ir matuojama optinė sugertis, esant 595 nm bangos ilgiui. Kalibracinė kreivė sudaroma analogiškai matuojant optines sugertis su žinomų koncentracijų BSA tirpalais (Thermo Fisher Scientific). Pagal kalibracinę kreivę apskaičiuojama tiriamo baltymo koncentracija.

#### 2.2.18. Baltymų grynumo nustatymas poliakrilamidiniame gelyje

Baltymų grynumui įvertinti atliekama baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis 14% poliakrilamidiniame gelyje. Analizei paruošiami 3 µg tiriamo baltymo mėginys ir po 0.125 µg, 0.25 µg ir 0.5 µg BSA (Thermo Fisher Scientific) baltymo mėginiai kalibracinei kreivei sudaryti. Atlikus elektroforezę, gelis dažomas *Coomassie* G-250 dažu, blukinamas, skenuojamas ir analizuojamas GelAnalyser programa. Grynumas įvertinamas iš bendro tiriamo mėginio kiekio atėmus visų tiriamo mėginio suminių priemaišų kieki.

#### 2.2.19. Kiekybinis fermentinio aktyvumo nustatymas spektrofotometriniu būdu

Esterazinis tiriamų fermentų aktyvumas vertintas spektrofotometriškai, substratu naudojant *p*-NP esterius. Reakcijos mišinio sudėtis: 50 mM kalio fosfato buferio (pH 7,5), 1 mM *p*NP esterio (naudotas 10 mM koncentratas DMSO) ir 5–300 ng tiriamo fermento. Bendras reakcijos tūris – 100 µl. Matavimai atliekami kas 1 min dešimties minučių intervale. Reakcijos mišinių sugertis buvo matuojama esant 405 nm bangos ilgiui ir 37°C temperatūrai, naudojant *PowerWave XS* mikroplokštelių skaitytuvą. Gauti mikroplokštelės skaitytuvo rezultatai analizuojami, apskaičiuojamas fermento savitasis aktyvumas. Vienas esterazės aktyvumo vienetas apibrėžiamas kaip baltymo kiekis, reikalingas susidaryti 1 µmol *p*-nitrofenolio per 1 min. 50 mM kalio fosfatiniame buferiniame tirpale pH 7,5, 37°C temperatūroje [137] [140] [141].



Savitasis aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$U/\mu g = \frac{(A - A_0) \times sk \times V_{bendras}}{\varepsilon \times t \times V_{fermento}}$$

A – mėginio sugerties intensyvumas; A<sub>0</sub> – sugerties intensyvumas kontrolėje (mišinys be fermento); sk – skiedimų skaičius (kiek kartų praskiestas fermento tirpalas); V<sub>bendras</sub> – bendras reakcijos tūris; ε – molinis ekstinkcijos koeficientas, lygus 12 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>; t – matavimo laikas nuo reakcijos pradžios; V<sub>fermento</sub> – fermento tirpalo tūris reakcijos mišinyje.

#### 2.2.20. Esterazinio aktyvumo nustatymas pH indikatoriaus pagrindu

Hidrolizinis esterazinis aktyvumas buvo tirtas reakcijos mišinyje: 5 mM kalio fosfato buferis, pH 7,5, 0,5 mM fenolio raudonojo (naudotas 10 mM tirpalas vandenyje), 0,1–4,6 μg fermento/reakcijai ir 10 mM substrato: R/S-1-feniletilo acetato/heksanoato/benzoato (naudotas 100 mM tirpalas acetone), β-D-gliukozės pentaacetatas, β-D-galaktozės pentaacetatas (100 mM koncentratas acetone), 3'-O-acetil-2'-deoksiuridinas, 3'-O-acetil-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-deoksicitidinas, 3'-O-levulinil-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-deoksicitidinas ir 5'-O-levulinil-N<sup>4</sup>-benzoil-2'-deoksicitidinas (100 mM tirpalai DMSO). Bendras reakcijos mišinio tūris lygus 100 μl. Reakcijos mišinys buvo inkubuotas kambario temperatūroje iki 5 val. Aktyvumas vertintas vizualiai. Reakcijos mišinio spalvos pokytis iš raudonos į geltoną rodo esterių hidrolizę [101] [142] [143].

#### 2.2.21. Nitrocefino ir kitų laktamų hidrolizė

Nitrocefinas yra chromogeninis cefalosporino substratas, įprastai naudojamas β-laktamazių aptikimui [144] [145] [146]. Hidrolizuotas nitrocefinas keičia spalvą iš geltonos į raudoną. β-laktamazinis aktyvumas buvo vertintas reakcijos mišinyje: 50 mM kalio fosfato buferio (pH 7,0), 1 mM nitrocefino (naudotas 10 mM koncentratas DMSO) ir 2–100 μg/ml fermento, inkubuojant 37 °C iki 2 val. Spalvos pasikeitimas buvo vertinamas vizualiai.

Kitų laktamų (2.1.4 syrius) hidrolizė buvo stebima spektrofotometriškai 240–600 nm ilgio bangose, analogiškomis sąlygomis.

#### 2.2.22. Fermentinio aktyvumo nustatymas plonasluoksnės chromatografijos metodu

2–3 μl baltymo tirpalo ar ląstelių biomasės suspensijos įpilama į reakcijos buferį (50 mM kalio fosfato, pH 7,5, 4 mM tiriamo substrato) ir

reakcijos mišinys (bendras tūris 20 µl) inkubuojamas 1 h 37 °C. Kontrolinėms reakcijoms naudojamas toks pat reakcijos mišinys, tik be fermento. Po inkubacijos 0,7 µl reakcijos mišinio perkeliama ant „TLC Silica gel 60“ (Merck Millipore) plonasluoksnės chromatografijos plokštelės. Naudotos judriosios fazės:

esterių ir amidų analizė: chloroformas:metanolis santykiu 5:1;

glikozidų analizė: etilacetatas:metanolis:vanduo santykiu 7:3:1.

Nukleozidų ar aromatinių organinių junginių reakcijos produktai analizuojami plokštelę apšvietus UV šviesa (254 nm). Kiti junginiai dažyti anyžių aldehido dažų: 0.266% (v/v) anyžių aldehido (4-metoksibenzenkarbaldehio), 3,6% (v/v) sieros rūgšties, 1.03% (v/v) acto rūgšties etanolyje. Dažas ruoštas taip: 0,54 ml anyžių aldehido ištirpinta 50 ml etanolio (98%), pridėta 1,9 ml koncentruotos sieros rūgšties ir 0,54 ml acto rūgšties. TLC plokštelė, atlikus junginių išskirstymą, pamerkiama į dažų tirpalą, nusausinama ir pakaitinama virš plytelės 1–2 min. iki norimo ryškumo.

#### 2.2.23. Fermentinių reakcijų produktų nustatymas HPLC-MS metodu

HPLC-MC analizei naudota aukšto slėgio skysčių chromatografas (CBM-20A, Shimadzu) ir masių spektrofotometras (LCMS-2020, Shimadzu). HPLC-MS analizei mėginiai paruošiami juos praskiedžiant tuo pačiu tūriu acetonitrilo ir centrifuguojant 6 min, 13200×g. Chromatografinis atskyrimas atliekamas naudojant 150×3 mm kolonėlę YMC-Pack Pro. Atskyrimas vykdomas esant 40 °C temperatūrai, judriąja faze naudojant 0,1% skruzdžių rūgšties tirpalo vandenyje ir acetonitrilo mišinį. Masių spektrai užrašomi intervale tarp 10 m/z ir 500 m/z, esant 350 °C temperatūrai ir apytiksliai 4500 V įtampai, azoto dujas naudojant įpurškimui ir džiovinimui. Masių spektrometrijos analizė atliekama, taikant tiek teigiamos, tiek neigiamos jonizacijos režimą, pasitelkiant LabSolutions LC/MS programinę įrangą.

#### 2.2.24. DNR sekoskaita

DNR sekoskaita atlikta MacroGen Europe (Nyderlandai) naudojant 2.3 lentelėje nurodytus pradmenis.

#### 2.2.25. 1315H\_DUF998\_GFP liejinio konstravimas

Pirmiausia 1315H\_DUF998 koduojantis genas pagausintas PGR būdu naudojant 1315H\_DUF\_F\_His ir 1315DUF\_gfp\_R pradmenis, o GFP genas

– su 1315\_DUF\_gfp\_F ir gfp\_R\_His pradmenimis (2.2 lentelė). Pagausinimui naudota 2× Phusion HS II green master mix (Thermo Fisher Scientific), 0,25 mM pradmenų koncentracijos ir ~1 ng/μl plazmidinės DNR.

I PGR sąlygos: 1 ciklas 98 °C 30 s; 30 ciklų – 98°C 10 s, 62 °C (DUF genui) 50 °C (GFP genui) 15 s, 72 °C 20 s, 1 ciklas – 72 °C 3 min.

II PGR sąlygos: 1315H\_DUF998\_GFP liejinys pagausintas naudojant 1315H\_DUF\_F\_His ir gfp\_R\_His pradmenų porą: 1–5 ciklai atlikti be pradmenų, 6–30 ciklai su 0,2 mM koncentracijos pradmenimis.

Pagausinti produktai (po I ir II PGR) gryninti iš gelio, panaudojant GeneJET Gel Extraction kit (Thermo Fisher Scientific). Išgrynintas DUF998\_GFP liejinio fragmentas klonuotas į pLATE31 vektorių naudojantis „aLICator LIC Cloning and Expression Kit 3“ (Thermo Fisher Scientific) rinkiniu pagal gamintojo nurodymus.

#### 2.2.26. Fermentų mutagenezė

BRM\_Am tikslinės mutacijos atliktos naudojant rinkinį *QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent) remiantis gamintojo protokolu, naudojant pradmenis nurodytus 2.4 lentelėje (pagal šį metodą PGR atliekamas su vienu pradmeniu).

MO13\_Est537 mutantų gavimui buvo naudotas *Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit* (Thermo Fisher Scientific). Visa plazmidės DNR buvo pagausinta, naudojant fosforilintus pradmenis (2.5 lentelė). Pradmenų parinkimas, fosforilinimas ir genų pagausinimas, naudojant *Phusion HS II green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), atliktas pagal *Phusion Site – Directed Mutagenesis Kit* (Thermo Fisher Scientific) nurodytus protokolus. Pagausintas linijinis PGR produktas paveiktas DpnI restrikcijos endonukleaze (1 μl/50 μl reakcijos mišinio, 37 °C 15 min.), po to liguotas su T4 DNR ligaze (Thermo Fisher Scientific). Gautomis plazmidėmis transformuotos *E. coli* ląstelės. Pagausintos plazmidės išgrynintos, atlikta Sengerio sekoskaita.

#### 2.2.27. DMSO ir DMF tirpiklių įtakos 62Fuc1 fukozidzės aktyvumui vertinimas

Analizė atlikta reakcijos mišiniuose: 10 mM kalio fosfato buferio, pH 7,5, 15 mM 2'-deoksiuridino, 5 mM pNP-Fuc (naudotas 100 mM koncentratas DMSO arba DMF), 0,14 mg/ml 62Fuc1 fermento, bei 10%, 30%, 50%, ir 70% DMSO arba DMF galutinės koncentracijos. Reakcijos mišiniai su fermentu inkubuoti 2 valandas 37 °C temperatūros oriniame termostate (Ependroff),

purtant 500 aps./min. Kontrolinei reakcijai vietoj fermento naudotas fermento saugojimo buferinis tirpalas.

#### 2.2.28. Glikozidazių aktyvumo priklausomybės nuo pH ir temperatūros pokyčių vertinimas

Analizė atlikta reakcijos mišiniuose: 15 mM 2'-deoksiuridino, 5 mM pNP-Fuc (naudotas 100 mM koncentratas DMSO tirpiklyje), 0,14 mg/ml 62Fuc1 fermento ir buferinio tirpalo: 50 mM acetatinis buferis pH 5,0, 30 mM kalio fosfato – pH 6,0, pH 7,0, pH 7,5, pH 8,0 ir 30 mM glicininis buferis, pH 9,0. Reakcijos mišiniai su fermentu inkubuoti 2 valandas 37 °C temperatūros oriniame termostate (Ependroff), purtant 500 aps./min. Kontrolinei reakcijai vietoj fermento naudotas fermento saugojimo buferinis tirpalas.

#### 2.2.29. n-O-glikozilo darinių fermentinė sintezė

Galaktozil-dU sintezė atlikta reakcijos mišinyje: 0,3 M 2'-deoksiuridino, 0,1 M oNP-β-D-galaktopiranozido (naudotas 0,5 M koncentratas DMSO tirpiklyje), 30 mM kalio fosfato buferio, pH 6,0, 0,4 mg/ml Lactazyme B™ (iš *Bacillus circulans*) galaktozidazės. Reakcijos mišinys inkubuotas 50 °C 2 h.

Fermentinės fukozilo darinių sintezės atliktos ~20–30 mM kalio fosfato buferiniame tirpale, pH 7,5, naudojant 62Fuc1 fukozidazę (konstruota ir gryninta GMC, Biochemijos instituto MMBS skyriuje). Fukozės donoru naudotas *p*-nitrofenil-α-L-fukopiranozidas (pNP-Fuc), akceptoriumi – įvairūs nukleozidai ir angliavandenių dariniai. Reakcijos mišiniai su fermentu inkubuoti 2–3 valandas 37 °C temperatūros oriniame termostate (Ependroff), purtant 500 aps./min. Kontrolinei reakcijai vietoj fermento naudotas fermento saugojimo buferinis tirpalas. Reakcijos mišinių sudėtys:

- 2'-deoksiuridino, uridino, 2',3'-dideoksiuridino, 2',3'-dideoksiuridino ir 2'-deoksicitidino fukozilininimas atlikti reakcijos mišiniuose: 120 mM akceptoriaus, 40 mM pNP-Fuc (naudotas 200 mM koncentratas DMSO tirpiklyje), 30 mM kalio fosfato buferis, pH 7,5, 0,35 mg/ml 62Fuc1 fukozidazės.
- X-gal fukozilininimas atliktas reakcijos mišinyje: 45 mM X-gal (naudotas 450 mM koncentratas DMSO tirpiklyje), 15 mM pNP-Fuc (naudotas 200 mM koncentratas DMSO tirpiklyje), 0,35 mg/ml 62Fuc1 fukozidazės, 25 mM kalio fosfato, pH 7,5 buferiniame tirpale.
- IPTG fukozilininimas atliktas reakcijos mišinyje: 100 mM IPTG (naudotas 1 M koncentratas vandenyje), 30 mM pNP-Fuc (naudotas

- 200 mM koncentratas DMSO tirpiklyje), 0,35 mg/ml 62Fuc1 fukozidazės, 25 mM kalio fosfato, pH 7,5.
- Metil- $\alpha$ -L-fukopiranozido fukozilinimas atliktas reakcijos mišinyje: 100 mM metilfukozės (naudotas 400 mM koncentratas vandenyje), 30 mM pNP-Fuc (naudotas 200 mM koncentratas DMSO tirpiklyje), 0,35 mg/ml 62Fuc1 fukozidazės, 25 mM kalio fosfato, pH 7,5.
  - *o*-Nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozido (oNP-Gal) fukozilinimas atliktas reakcijos mišinyje: 45 mM oNP-Gal (naudotas 450 mM koncentratas DMSO tirpiklyje), 15 mM pNP-Fuc (naudotas 200 mM koncentratas DMSO tirpiklyje), 0,35 mg/ml 62Fuc1 fukozidazės, 25 mM kalio fosfato buferyje, pH 7,5.
  - *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-fukopiranozido (pNP-Fuc) (di)fukozilinimas atliktas 20  $\mu$ l reakcijos mišinyje: 30 mM pNP-Fuc (naudotas 200 mM koncentratas DMSO tirpiklyje), 0,35 mg/ml 62Fuc1 fukozidazės, 25 mM kalio fosfato buferyje, pH 7,5.

### 3. REZULTATAI

#### 3.1. Esterazių atrankos metodo kūrimas

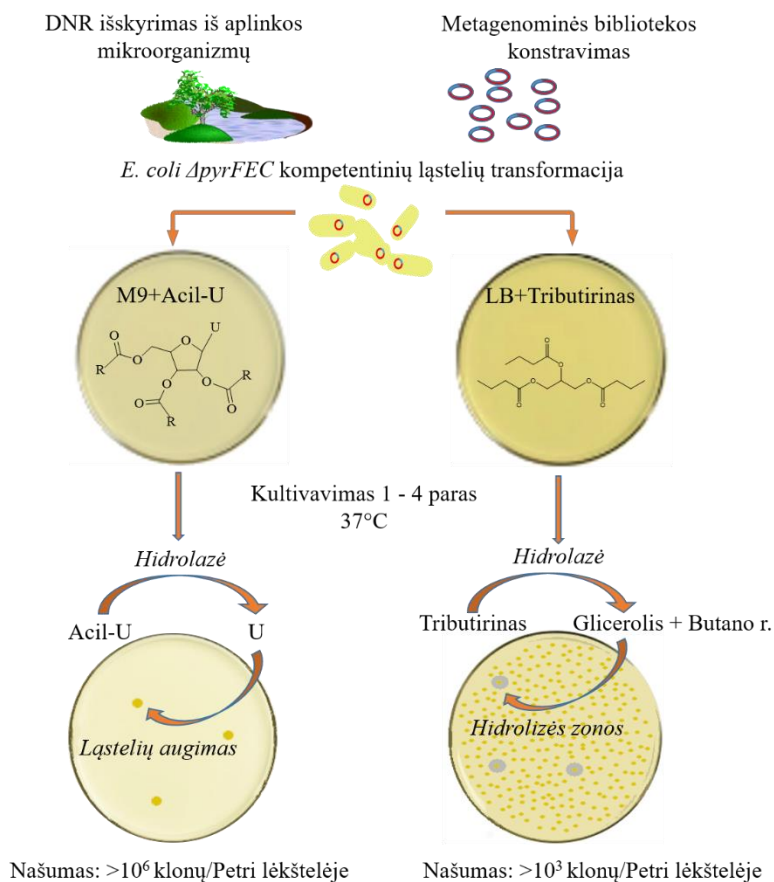
##### 3.1.1. Esterazių atrankos metodo principas

VU GMC Biochemijos institute tiriant katabolinius mikroorganizmų kelius dr. A. Aučynaitė parodė [31], kad uracilo auktrofinis *E. coli* kamienas gali būti sėkmingai naudojamas specifinių genų, koduojančių modifikuotos uracilo bazės katabolizmą, identifikavimui. Gauti rezultatai iškėlė mintį, kad uracilo auktrofo kamieno ląstelės gali būti panaudotos hidrolazių iš metagenomų paieškai. Taigi, pirmas šio darbo tikslas buvo sukurti didelio našumo esterazių atrankos metodą, įvertinti jo privalumus, lyginant su klasikiniu esterazių tributirino atrankos metodu, bei charakterizuoti atrinktas hidrolazes.

Principinė metodo schema ir jos palyginimas su klasikine esterazių/lipazių atranka, panaudojant tributiriną, pavaizduota 3.1 paveiksle. Metodas remiasi esterazių selektyvios atrankos iš metagenominių bibliotekų principu: iš aplinkos mikroorganizmų iškirta DNR hidrolizuojama viena iš pasirinktų restrikcijos endonukleazių (BamHI, HindIII arba SmaI), gauti fragmentai liguojami į pUC19 vektorių. Taip paruošta biblioteka transformuojamos *E. coli* DH10B  $\Delta pyrFEC::Km$  kamieno ląstelės. Ląstelės išsėjamos ant selektyvios M9 terpės su uridino analogu ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje 1–4 paras. Tikimasi, kad tokioje terpėje užaugs tik klonai, įgiję esterazę, hidrolizuojančią uridino esterį, o kiti klonai negalės daugintis.

##### 3.1.2. Esterazių selektyvios atrankos proceso eiga

Esterazių selektyvios atrankos idėja buvo patikrinta panaudojant auktrofinį uracilo *E. coli* DH10B  $\Delta pyrFEC::Km$  kamieną [31] ir du sintetinius nukleozidus – 2',3',5'-tri-*O*-acetiluridiną ir 2',3',5'-tri-*O*-heksanoiluridiną kaip uridino šaltinius [137]. Darbe naudotas *E. coli* trigubas genų, koduojančių uridino biosintezės kelią, mutantinis kamienas siekiant sumažinti klaidingai teigiamų klonų skaičių, o du substratai pasirinkti siekiant įvertinti, ar acilo grupės alifatinės grandinės ilgis turėtų įtakos atrinktų esterazių savitumui substratams. Atrankoms buvo panaudotos metagenominės bibliotekos (priedo 1P lentelė), paruoštos Molekulinės mikrobiologijos ir



**3.1 pav.** Esterazių selektyvios atrankos metodas ir jo palyginimas su klasikiniu tributirino atrankos metodu. Vykdamas selektyvią atranką, užauga tik klonai įgiję esterazę, gebančią hidrolizuoti uridino esterius. Tributirino metodu auga visi klonai, o esterazinis aktyvumas pasireiškia per tributirino hidrolizės zonų formavimą.

biotechnologijos skyriuje (Biochemijos institutas, GMC, VU) iš skirtingų dirvožemių mėginių [137]. Metodo kūrimo metu iš viso buvo patikrinta 19 bibliotekų (priedo 1P lentelė), iš kurių atrinkti 87 teigiami klonai selektyvioje agarizuotoje M9 terpėje. Visi klonai buvo pakartotinai patikrinti persėjus ant agarizuotos M9 terpės be uridino ar jo darinių, taip užtikrinant, kad klonai neturi visų trijų mutantinių uridino kelio genų viename operone, ko pasekoje įvyktų auksotrofinio požymio kompensavimas. Iš viso keturi klonai užaugę M9 terpėje be uridino, ar uridino esterių buvo priskirti klaidingai teigiamiems (tai sudaro maždaug 5% visų atrinktų klonų) ir toliau nebuvo analizuoti.

Apibendrinant galima teigti, kad pritaikius sukurtą metodą vienoje Petri lėkštelėje galima patikrinti >10<sup>6</sup> ląstelių klonų. Tuo tarpu naudojant klasikinį

esterazių atrankos tributirino metodą išauga visi klonai, o esteraziniu aktyvumu pasižymi tik tributirino hidrolizės zonas formuojantys klonai. Vienoje Petri lėkštelėje tributirino metodu galima patikrinti tik 1000–2000 klonų.

### 3.1.3. Atrinktų esterazių sekų analizė

Norint įsitikinti, kad *E. coli* ląstelių kolonijos tikrai augo dėl hidrolazių sintezės, iš jų išskirta plazmidinė DNR pirmiausia buvo hidrolizuota restrikcijos endonukleazėmis (nurodytos 1P lentelėje) fragmentų dydžių įvertinimui ir pasikartojančių sekų atmetimui, bei atlikta DNR fragmentų sekoskaita. Atmetus pasikartojančias sekas, tolesnei analizei buvo pasirinkti 30 klonų. Atlikus sekų analizę ir palyginus su sekomis NCBI duomenų bazėje, paaiškėjo, kad surastų fermentų sekų panašumas su NCBI duomenų bazėje pateiktomis sekomis yra 31–100 % identiško ribose (3.1 lentelė), o iš 30 analizuotų genų net 12 koduoja necharakterizuotus ar hipotetinius baltymus.

**3.1 Lentelė.** Atrinktų esterazių hidrolazių homologai. 1–24 esterazės atrinktos naudojant acetiluridino, o 25–30 esterazės – heksanoiluridino substratus.

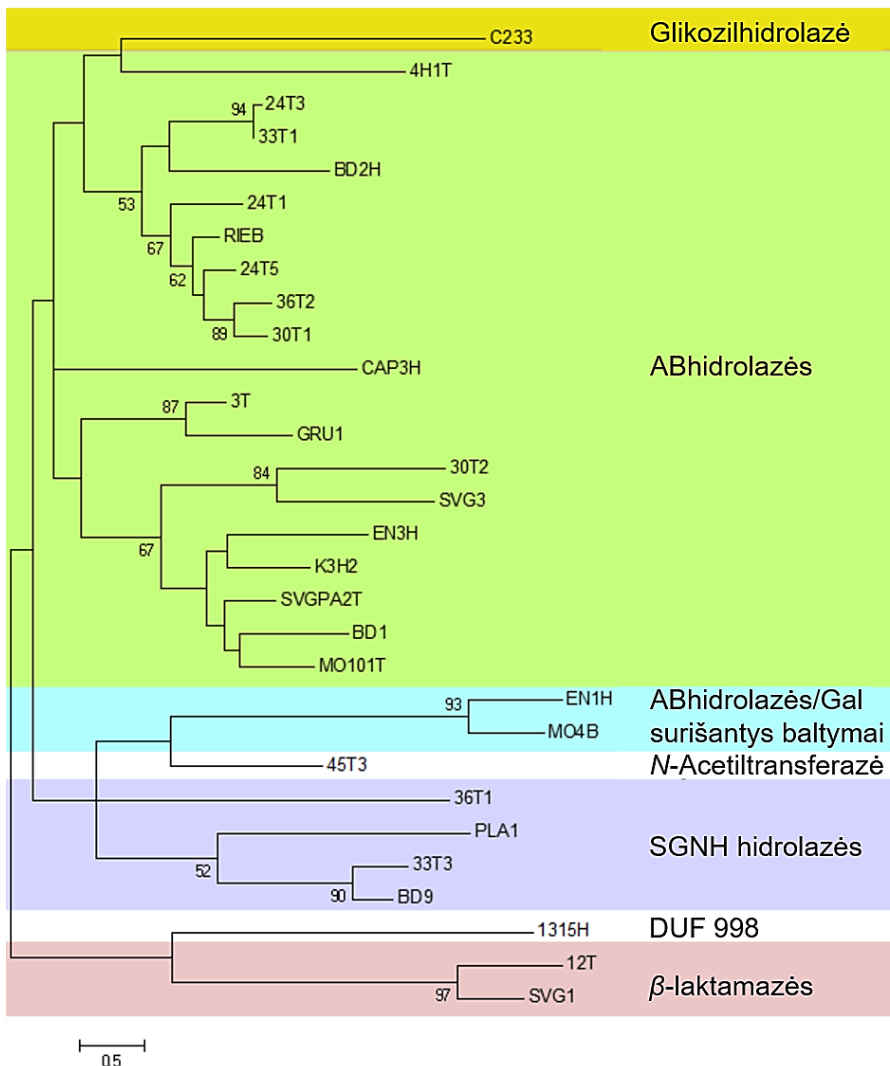
| Nr. | Esterazė,<br>GenBank Nr. | Artimiausias homologas                                 |                                    | Tapatumas,<br>% |
|-----|--------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------|
| 1.  | 24T5,<br>MH423251        | <i>Kaistia soli</i> ,<br>WP_073056985.1                | $\alpha/\beta$ hidrolazė           | 67              |
| 2.  | 33T1,<br>MH423252        | <i>Devosia</i> sp. Root685,<br>WP_082561207.1          | hipotetinis baltymas               | 95              |
| 3.  | 24T3,<br>MH423254        | <i>Devosia riboflavin</i> ,<br>WP_035086921.1          | hipotetinis baltymas               | 95              |
| 4.  | 24T1,<br>MH423255        | <i>Devosia epidermidihirudinis</i> ,<br>WP_046138431.1 | hipotetinis baltymas<br>WH87_03740 | 99              |
| 5.  | 3T,<br>MH423256          | <i>Roseiflexus</i> sp. RS-1,<br>WP_011955564.1         | acetilksilanesterazė               | 61              |
| 6.  | MO101T,<br>MH423257      | <i>Lysinibacillus</i> sp.<br>AR18-8,<br>WP_066036519.1 | $\alpha/\beta$ hidrolazė           | 99              |
| 7.  | SVG3,<br>MH423258        | <i>Rheinheimera</i> sp. KL1,<br>WP_053423444.1         | $\alpha/\beta$ hidrolazė           | 93              |
| 8.  | 4H1T,<br>MH423260        | <i>Sphingobacterium mizutaii</i> ,<br>WP_093095847.1   | esterazės šeimos<br>baltymas       | 87              |



| <b>Nr.</b> | <b>Esterazė,<br/>GenBank Nr.</b> | <b>Artimiausias homologas</b>                            |                                                                     | <b>Tapatumas,<br/>%</b> |
|------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 9.         | 30T1,<br>MH423263                | <i>Sinorhizobium</i> sp. GL2,<br>KSV78272.1              | hipotetinis baltymas<br>N182_21555                                  | 61                      |
| 10.        | GRU1,<br>MH423265                | <i>Paenibacillus<br/>phocaensis</i> ,<br>WP_068787184.1  | acetilesterazė                                                      | 100                     |
| 11.        | 30T2,<br>MH423266                | <i>Acidobacteria<br/>bacterium</i> , OLB17<br>KXK06970.1 | $\alpha/\beta$ hidrolazė                                            | 74                      |
| 12.        | BD1,<br>MH423279                 | <i>Rhizobium tropici</i> ,<br>WP_015341790.1             | $\alpha/\beta$ hidrolazės<br>katalizinį domena<br>turintis baltymas | 51                      |
| 13.        | 36T2,<br>MH423275                | <i>Paracoccus<br/>aminophilus</i> ,<br>WP_020950583.1    | $\alpha/\beta$ hidrolazė                                            | 74                      |
| 14.        | SVGPA2T,<br>MH423270             | <i>Sphingopyxis</i> sp. C-1,<br>WP_062186324.1           | $\alpha/\beta$ hidrolazė                                            | 93                      |
| 15.        | RIEB,<br>MH423273                | <i>Rhizobium</i> sp. P44RR-<br>XXIV,<br>WP_077472732.1   | $\alpha/\beta$ hidrolazė                                            | 68                      |
| 16.        | 12T,<br>MH423253                 | <i>Acidobacteria<br/>bacterium</i> ,<br>OFW37874.1       | hipotetinis baltymas<br>A3J29_14090                                 | 65                      |
| 17.        | SVG1,<br>MH423269                | <i>Ensifer</i> sp. LC163,<br>WP_083222508.1              | serino hidrolazė ( $\beta$ -<br>laktamazė)                          | 92                      |
| 18.        | C233,<br>MH423278                | <i>Paracoccus</i> sp. TRP,<br>WP_010397925.1             | glikozidų hidrolazė                                                 | 74                      |
| 19.        | 45T3,<br>MH423262                | <i>Brevundimonas</i> sp.<br>Leaf363,<br>WP_056098529.1   | ribosomų baltymas<br>alanino <i>N</i> -acetil-<br>transferazė       | 67                      |
| 20.        | BD9,<br>MH423268                 | <i>Mesorhizobium<br/>temperatum</i> ,<br>WP_095491896.1  | SGNH/GDSL<br>hidrolazė                                              | 50                      |
| 21.        | 33T3,<br>MH423272                | <i>Pseudohongiella<br/>acticola</i> ,<br>WP_047492018.1  | hipotetinis baltymas                                                | 61                      |

| Nr. | Esterazė,<br>GenBank Nr. | Artimiausias homologas                                       |                                      | Tapatumas,<br>% |
|-----|--------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------|
| 22. | PLA1,<br>MH392251        | <i>Gemmata</i> sp. SH-PL17,<br>AMV27246.1                    | GDSL<br>Lipazė/Acilhidrolazė         | 58              |
| 23. | 36T1,<br>MH423267        | <i>Firmicutes bacterium</i><br>CAG:272,<br>CDC74944.1        | sialato <i>O</i> -<br>acetilesterazė | 31              |
| 24. | MO4B,<br>MH423274        | <i>Microvirga ossetica</i> ,<br>WP_099513428.1               | peptidazė                            | 92              |
| 25. | EN1H,<br>MH423276        | <i>Bacillus</i> sp. J33,<br>WP_026581439.1                   | hipotetinis baltymas                 | 100             |
| 26. | BD2H,<br>MH423277        | MULTISPECIES:<br><i>Duganella</i> ,<br>WP_090189706.1        | $\alpha/\beta$ hidrolazė             | 70              |
| 27. | EN3H,<br>MH423261        | <i>Pseudomonas lini</i> ,<br>WP_048393178.1                  | $\alpha/\beta$ hidrolazė             | 95              |
| 28. | CAP3H,<br>MH423259       | MULTISPECIES:<br><i>Cupriavidus</i> ,<br>WP_092295063.1      | $\alpha/\beta$ hidrolazė             | 96              |
| 29. | K3H2,<br>MH423271        | <i>Dehalococcoidia</i><br><i>bacterium</i> ,<br>PWB48329.1   | hipotetinis baltymas<br>C3F10_01030  | 67              |
| 30. | 1315H,<br>MH423264       | <i>Microbacterium</i><br><i>gorillae</i> ,<br>WP_094770426.1 | DUF998 domeną<br>turintis baltymas   | 57              |

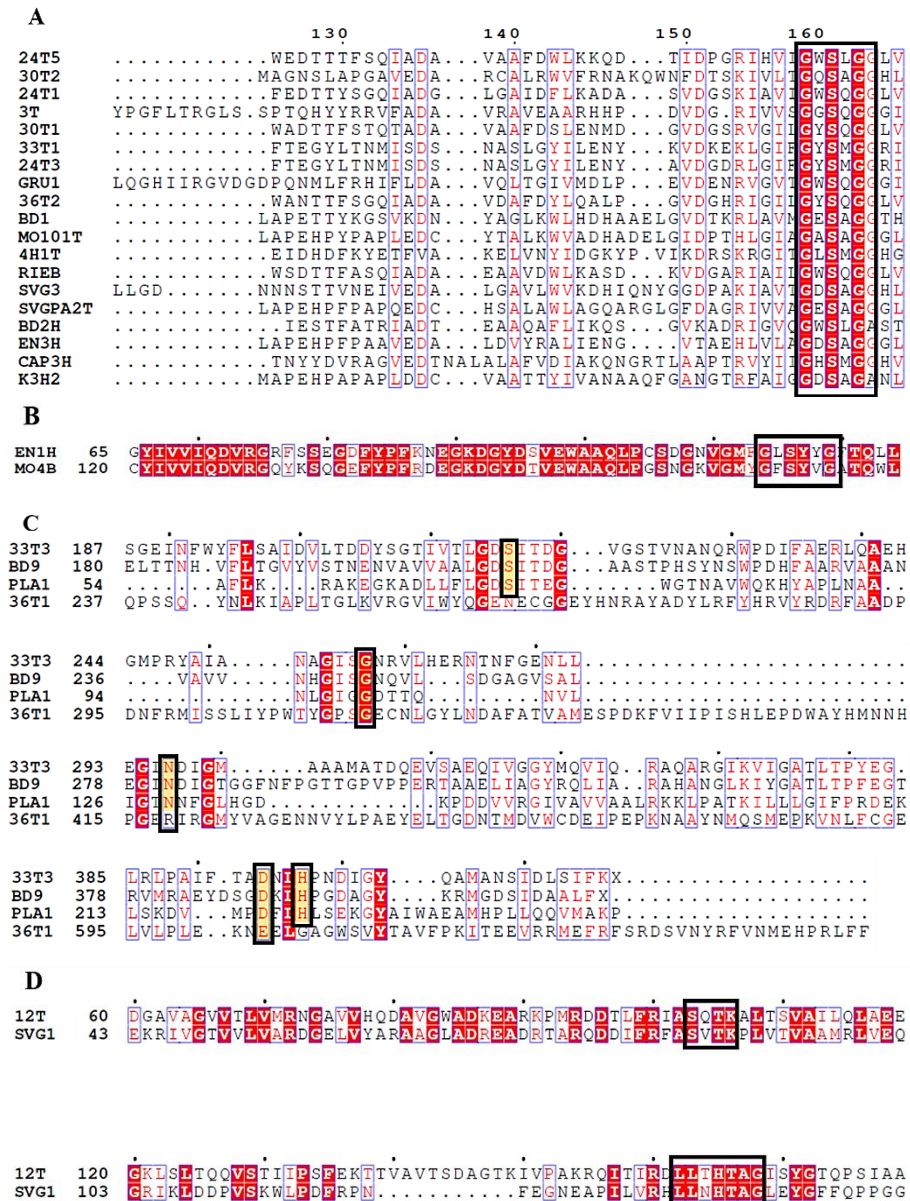
Atlikus filogenetinę analizę, paaiškėjo, kad atrinkti fermentai priklauso net septynioms fermentų superšeimoms, iš kurių devyniolika esterazių priklauso ABhidrolazėms, dvi – ABhidrolazėms/galaktozę surišantį domeną turintiems baltymams, dvi – laktamazėms, keturios – SGNH hidrolazėms, po vieną glikozidų hidrolazėms, DUF998 šeimos baltymams ir *N*-acetiltransferazėms (3.2 pav.).



**3.2 pav.** Atrinktų esterazių filogenetinis medis.

Identifikuotų baltymų sekų analizė parodė, kad visos ABhidrolazių grupės esterazės turi konservatyvę Gly-x-Ser-x-Gly katalizinį motyvą (3.3 A pav.) [42]. Dvi esterazės MO4B ir EN1H sudarytos iš dviejų domenų – ABhidrolazės ir galaktozę surišančio domeno, kurio tikėtina funkcija – tai sąveika su specifiniais ligandais, pavyzdžiui, ląstelių paviršiaus angliavandeniais. Abi hidrolazės turi konservatyvę serino peptidazių motyvą Gly-x-Ser-Tyr-x-Gly (3.3 B pav.) [147]. Remiantis filogenetika ir BLAST analize, 33T3, BD9, PLA1 ir 36T1 priklauso SGNH hidrolazių superšeimai.

Visos, išskyrus 36T1, hidrolazės turi katalizinę Ser-His-Asp (Glu) triadą [148] (3.3 C pav.).

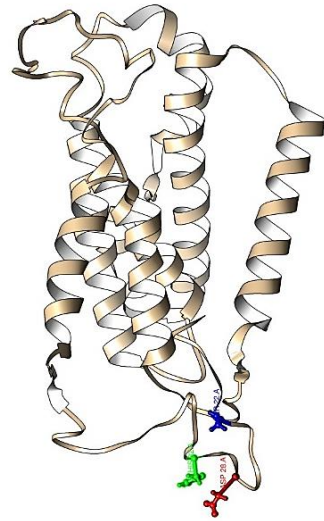


3.3 pav. Sekų palyginys. A – ABhidrolazės būdingas konservatyvus motyvas G-x-S-x-G aplink katalizinę seriną; B – ABhidrolazės ir galaktozę surišantį domenų turinčių MO4B ir EN1 katalizinių motyvų G-x-S-Y-x-G; C – SGNH hidrolazių katalizėje dalyvaujančios amino rūgščių liekanos S-G(N)-D/E-H; D – β-laktamazių S-x-x-K katalizinių motyvų. Palyginys darytas MUSCLE algoritmu MEGA programoje. Vizualizacija atlikta naudojant ESPrpt 3.0 serverio programą [150].

Dviejų esterazių – 12T ir SVG1 a. r. sekos panašios į  $\beta$ -laktamazių sekas ir turi konservatyvias laktamazėms būdingas Ser-x-x-Lys [148] ir Leu-Leu-x-His-x-x-Gly sekas [139] (3.3 D pav.), bet neturi AB hidrolazių VIII šeimos esterazėms (joms būdingas laktamazinis aktyvumas) būdingų dviejų labai konservatyvių motyvų (Y-A-N) ir (K-T/S-G) [149].

45T3 ir C233 esterazių sekos priskiriamos atitinkamai *N*-acetiltransferazių ir glikoziltransferazių šeimoms, bet jų konservatyvios ir katalizinės amino rūgštys pagal NCBI bazės duomenis nebuvo identifikuotos.

1315H geno baltymo sekos HHpred [151] analizė parodė, kad geriausias 1315H struktūrinis homologas yra laktozės permeazė (PDB 2CFQ) – transmembraninis baltymas, o NCBI BLAST UniprotKB/Swiss-Prot baltymų PDB bazėje artimu homologu (tapatumas 27%) priskiriama transmembraninė serino peptidazė (Q8BIK6.3). 1315H baltymas pagal I-Tasser [152] modelio struktūrą ir SMART analizę taip pat yra transmembraninis baltymas sudarytas iš šešių transmembraninių  $\alpha$  spiralių, o galimą katalizinę triadą sudaro Ser22-Asp28-His32 (3.4 pav.). Tokia triada būdinga SC klano peptidazėms, pvz., proliloligopeptidazei [147] [153]. Signalinę peptido seką identifikuoja tik Signal-3L 2.0 modelinis įrankis (1–18 a.r.seka), o SMART modelinis įrankis tokios sekos neidentifikuoja. Taigi iš amino rūgščių sekos ir struktūros modelio analizės galima spręsti, kad 1315H hidrolazė yra transmembraninis baltymas.

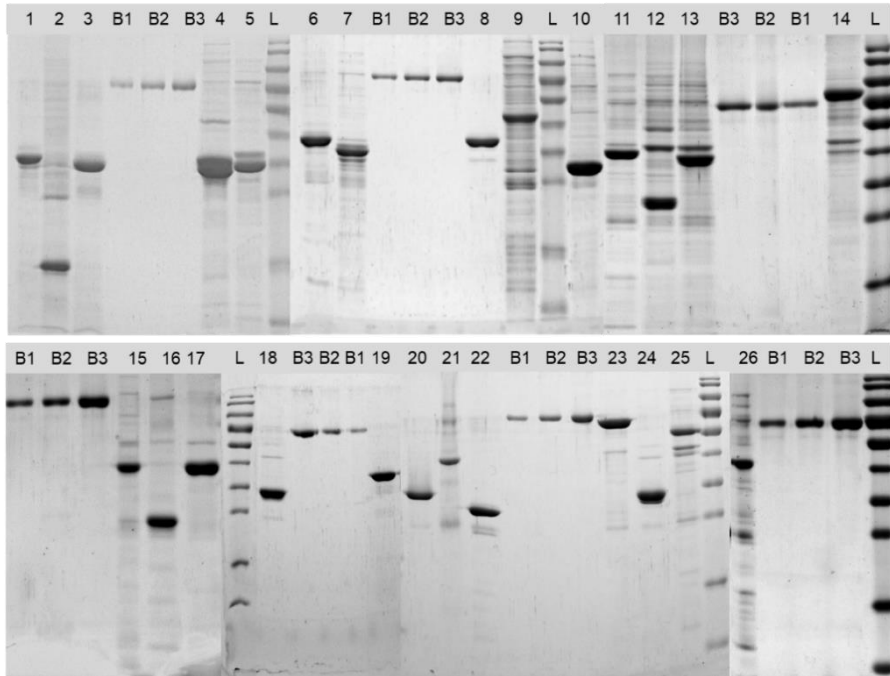


**3.4 pav.** DUF998 I-Tasser modelis (1-as iš 5-ių). Numanoma aktyvaus centro triada – Ser22-Asp28-His32.

#### 3.1.4. Atrinktų esterazių gryninimas

Norėdami patvirtinti, kad būtent įvardinti genai yra atsakingi už pasireiškusį esterazinį aktyvumą, pastarieji buvo amplifikuoti PGR metodu, gauti fragmentai įterpti į pET21 arba pLATE31 raiškos vektorius, o genų raiška analizuota *E. coli* BL21 (DE3) arba *E. coli* HMS174 (DE3) ląstelėse (2.2.13 skyrius). Iš viso Ni-NTA afininės chromatografijos būdu buvo išgryninti 27 rekombinantiniai baltymai (2.2.15 skyrius). 23-jų iš jų grynumas buvo didesnis nei 90% (3.5 pav, 3.3 lentelė). Baltymai koduojami RIEB,

4H1T ir SVGPA2T klonų nebuvo išgryninti dėl itin mažo jų kiekio *E. coli* ląstelėse.



**3.5 pav.** Išgrynintų esterazių SDS-PAG: B1 – 125 ng BSA, B2 – 250 ng BSA, B3 – 500 ng BSA; L – PageRuler™ Prestained Protein Ladder. 1 – 24T5, 2 – 45T3, 3 – 24T1, 4 – 24T3, 5 – 30T1; 6 – 3T, 7 – 33T1, 8 – GRU1, 9 – BD9, 10 – 30T2, 11 – SVG1, 12 – 36T2, 13 – BD1, 14 – 36T1, 15 – C233, 16 – PLA1, 17 – MO101T, 18 – EN3H, 19 – SVG3, 20 – K3H2, 21 – 33T3, 22 – BD2H, 23 – EN1H, 24 – Tb10-7, 25 – CAP3H; 26 – 12T.

RIEB, 4H1T ir SVGPA2T baltymų sintezės, keičiant biomasės auginimo ir indukcijos sąlygas, padidinti nepavyko. Menkos ekspresijos priežastys gali būti susiję tiek su pačių baltymų nestabilumu (greita degradacija *E. coli* ląstelėse), tiek su mažu baltymus koduojančių genų transkripcijos lygiu. Be to RIEB ir 4H1T esterazės galimai turi signalines polipeptidines sekas (3.2 lentelė), kurios taip pat gali sąlygoti mažą baltymų ekspresijos kiekį. Kadangi užląstelinėje frakcijoje esterazinis RIEB ir 4H1T aktyvumas nestebimas, greičiausiai šios signalinės sekos nėra atpažįstamos *E. coli* ląstelėse kaip signalinės sekos transportui į periplazminę erdvę. Bet literatūroje yra duomenų, kad signalinės sekos gali turėti įtakos baltymų ekspresijos lygiui. MO4B baltymo grynumas nebuvo vertintas, nes pavyko išgryninti tik mažą fermento kiekį esterazinio aktyvumo nustatymui dėl hidrofobinės MO4B

baltymo prigimties. Penkios esterazės (24T1, 24T3, 33T1, SVG1 ir SVG3) buvo pernešamos iš ląstelių į užląstelinę erdvę dėka turimų signalinių peptidų (3.2 lentelėje). Šie fermentai sėkmingai išgryninti iš auginimo terpės (2.2.16 skyrius). Viduląstelinų šių baltymų kiekiai taip pat buvo nemaži, bet užląstelinius fermentus pavyko gauti grynesnius ir, greičiausiai, be signalinių peptidinių sekų.

**3.2 Lentelė.** Galimos signalinių peptidų sekos.

| Esterazė      | Signalinio peptido dydis, a.r. |               | Signalinio peptido seka          | Detekcija užląstelinėje frakcijoje |
|---------------|--------------------------------|---------------|----------------------------------|------------------------------------|
|               | SMART                          | Signal-3L 2.0 |                                  |                                    |
| <b>24T5</b>   | 1–21                           | 1–21          | MLRKWLLASVMLAAI<br>VAPAAA        | Ne                                 |
| <b>33T1</b>   | 1–26                           | 1–26          | MKARRLGSSLIMAGIA<br>IFAASVAVRA   | Taip                               |
| <b>12T</b>    | 1–28                           | 1–28          | MLHRHCRPRHAAWLA<br>IGLLTVVSLNLRA | Ne                                 |
| <b>24T3</b>   | 1–26                           | 1–26          | MKARRLGSVLLVAGV<br>AIFAASVAACA   | Taip                               |
| <b>24T1</b>   | 1–23                           | 1–21          | MIKHFSLALASAVLLT<br>GAAFADA      | Taip                               |
| <b>3T</b>     | –                              | –             | –                                | n.a.                               |
| <b>MO101T</b> | –                              | –             | –                                | ne                                 |
| <b>SVG3</b>   | 1–25                           | 1–25          | MRKGQVAVFYAVFFI<br>VSLFSQQVFA    | Taip                               |
| <b>CAP3H</b>  | 1–23                           | 1–17          | MHRAVSQAALFVVAG<br>LLLAGCGG      | Ne                                 |
| <b>4H1T</b>   | 1–19                           | 1–19          | MRIILSLLAIFLSSGLVQ<br>A          | Ne                                 |
| <b>EN3H</b>   | –                              | –             | –                                | Ne                                 |
| <b>45T3</b>   | –                              | –             | –                                | n.a.                               |
| <b>30T1</b>   | 1–20                           | 1–20          | –                                | Ne                                 |
| <b>1315H</b>  | –                              | 1–18          | MWATSFSSILRVAISIS<br>A           | Ne                                 |
| <b>GRU1</b>   | –                              | –             | –                                | n.a.                               |
| <b>PLA1</b>   | 1–27                           | 1–26          | MRRRTLLRAAVGLLT<br>AWGLAGIPASAG  | n.a.                               |
| <b>30T2</b>   | 1–20                           | 1–20          | MKVKILIVFLMLISIFS<br>AQA         | n.a.                               |
| <b>36T1</b>   | –                              | –             | –                                | n.a.                               |

| Esterazė        | Signalinio peptido dydis, a.r. |               | Signalinio peptido seka                     | Detekcija užląstelinėje frakcijoje |
|-----------------|--------------------------------|---------------|---------------------------------------------|------------------------------------|
|                 | SMART                          | Signal-3L 2.0 |                                             |                                    |
| <b>BD9</b>      | 1–22                           | 1–18          | MKPTRWLALLCLALPL<br><u>LA</u> SCAS          | n.a.                               |
| <b>SVG1</b>     | 1–21                           | 1–21          | MSLHLKCAALVSALL<br>AFPFAFA                  | Taip                               |
| <b>SVGPA2T</b>  | –                              | –             | –                                           | Ne                                 |
| <b>K3H2</b>     | –                              | –             | –                                           | Ne                                 |
| <b>33T3</b>     | 1–23                           | 1–23          | MNFSKRTFLKLLSSVA<br>VIVITLA                 | Ne                                 |
| <b>RIEB</b>     | 1–22                           | 1–22          | MRTSLLSATASLLLLSS<br>GTAMA                  | Ne                                 |
| <b>MO4B</b>     | –                              | –             | –                                           | Ne                                 |
| <b>36T2</b>     | 1–21                           | 1–20          | MTLRLAALGLAALSAT<br>MAV <u>A</u> G          | n.a.                               |
| <b>EN1H</b>     | –                              | –             | –                                           | Ne                                 |
| <b>BD2H</b>     | 1–21                           | –             | MSSLRRLGLLLPLFTV<br>PLHA                    | Ne                                 |
| <b>C233</b>     | –                              | –             | –                                           | Ne                                 |
| <b>BD1</b>      | 1–29                           | 1–31          | MIRNIFGTLPKSAVLLS<br>ALALSTVMTVNS <u>QA</u> | n.a.                               |
| <b>Tb_10_7T</b> | –                              | –             | –                                           | Taip                               |
| <b>Tb_7_1T</b>  | –                              | –             | –                                           | Ne                                 |

n.a. – neanalizuota.

1315H baltymas nebuvo išgrynintas dėl jo hidrofobinės prigimties. Šio baltymo sintezės lygis buvo natyvių *E. coli* baltymų sintezės lygyje (nesimatė padidinto rekombinantinio baltymo kiekio SDS-PAG), tačiau esterazinis aktyvumas buvo stebimas tiek reakcijoje su neardytomis ląstelėmis, tiek ląstelių nuolaužų frakcijoje suardžius ląsteles ultragarsu. Siekiant gauti tirpų 1315H baltymą buvo išbandytos kelios strategijos: įvairūs *E. coli* kamienai (BL21 (DE3), HMS174 (DE3), Arctic Express (DE3), Rosseta (DE3)), kultivavimo terpės (LB, BHI, pusiau sintetinė), kultivavimo temperatūra (16–30 °C intervale), kultivavimo trukmė (4–18 h), IPTG koncentracija (0,01–0,5 mM). Deja, nei viena strategija nepasiteisino, fermento aktyvumas visais atvejais buvo aptinkamas tik ląstelių nuolaužų frakcijoje. Taip pat buvo mėginta ištirpinti membranas įvairiais detergentais – Triton-X100, MEGA-7, MEGA-9, MEGA-10. Nustatyta, kad 0,1% koncentracijos MEGA9 tirpalas efektyviausiai tirpino tikslinį baltymą. Tai pat buvo mėginta pašalinti menamą



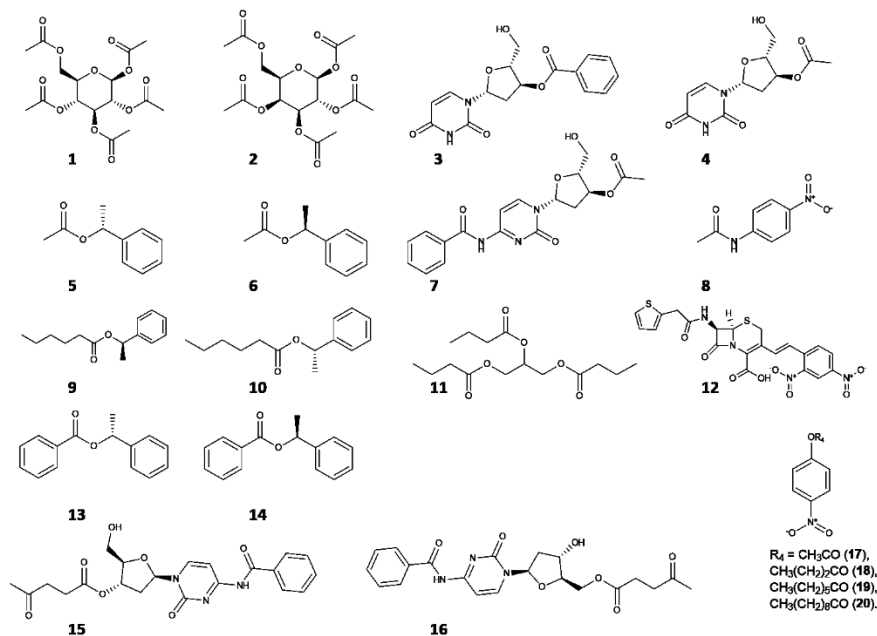
signalinę seką (2–18 amino rūgštis), bet 1315H konstruktas be teorinės signalinės sekos prarado esterazinį aktyvumą, o padidintos ekspresijos lygis SDS-PAG vis tiek nebuvo stebimas. Fermentinio aktyvumo praradimo priežastis gali būti susijusi su baltymo struktūra. Pagal baltymo struktūros modelį, 1315H esterazės aktyvusis centras yra iš karto už signalinės sekos (Ser22-Asp28-His32), o tolesnė seka formuoja transmembraninius segmentus. Galimai, pašalinus signalinę seką, nebesuformuojamas aktyvusis centras. Kita aktyvumo praradimo priežastis galėtų būti 1315H esterazės be signalinės sekos degradacija citozolyje.

Tolesnei analizei buvo sukonstruotas 1315H geno liejinys su GFP genu ir atlikta geno raiška *E. coli* HMS174 (DE3) kamieno ląstelėse. Sulieto baltymo ekspresija taip pat buvo maža, o fluorescencija po ląstelių ardymo ultragarsu buvo stebima ląstelių nuolaužų frakcijoje. Išgryninti sulieto baltymo nepavyko. Iš mokslinės literatūros duomenų yra žinoma, kad transmembraninių baltymų sintezės lygis *E. coli* ląstelėse įprastai yra žemas, o tokių baltymų gryninimai sudėtingi [154] [155]. Taigi, 1315H esterazės gryninimo strategijos ir šio baltymo detalesnis charakterizavimas reikalauja atskiros studijos ir todėl toliau šiame darbe nebuvo nagrinėjamas.

Apibendrinus 1315H esterazės analizės duomenis, galima daryti prielaidą, kad 1315H hidrolazė yra transmembraninė esterazė, kurios geno sekos artimiausias homologas NCBI duomenų bazėje yra nežinomos funkcijos DUF998 šeimos baltymas, o NCBI baltymų PDB bazėje – membraninė serino peptidazė.

### 3.1.5. Atrinktų esterazių katalizinių savybių nustatymas

Išgrynintų baltymų hidrolizinis aktyvumas buvo analizuojamas su įvairiais *p*-nitrofenolio (pNP) esteriais (**17–20**): acetatu, butiratu, valeratu, dekanoatu, taip pat cukrų (**1-2**), nukleozidų (**3, 4, 7, 15, 16**), aromatinių junginių (**5, 6, 9, 10, 13, 14**) esteriais, tributirinu (**11**), acetanilidu (**8**) bei nitrocefenu (**12**) (3.6 pav).



**3.6 pav.** Esterazių substratiniam savitumui tirti naudoti substratai.

Rekombinantiniai fermentai, atrinkti naudojant acetiluridiną, efektyviai hidrolizavo pNP trumpųjų grandinių esterius, tačiau tik keturi fermentai iš 22 hidrolizavo pNP-dekanoatą, be to trys iš jų (24T5, 21T1 ir 33T1) pasižymėjo labai silpnu aktyvumu šio esterio hidrolizėje. Šeši fermentai MO101T, SVG3, GRU1, PLA1, 3T ir 33T3 pasižymėjo išskirtinai didesniu aktyvumu pNP-acetato hidrolizės reakcijoje (3.3 lentelė). Su heksanoiluridino substratu atrinktų fermentų savitumas pasireiškė ilgesnių grandinių esteriams. Šios esterazės labai efektyviai hidrolizavo pNP-dekanoatą (3.3 lentelė), nors šių hidrolazių grupės didžiausias savitasis aktyvumas visgi pasireiškė pNP-butirato (EN3H, K3H2, CAP3H) arba pNP-valerato esterių hidrolizės reakcijose (EN1H, 1315H) (3.3 lentelė). Nei viena esterazė nehidrolizavo nei pNP-palmitato, nei pNP-stearato. Esterazė C233, kuri pagal seką priklauso glikozidazių šeimai, hidrolizavo trumpųjų grandinių pNP esterius, bet nehidrolizavo glikozido hidrolazių substratų:  $\alpha$ -L-arabinofuranozido,  $\alpha$ - ir  $\beta$ -L-arabinopiranozidų,  $\alpha$ - ir  $\beta$ -D-ksilopiranozidų, bei  $\beta$ -D-gliukopiranozido *p*-nitrofenolio darinių.

**3.3 Lentelė.** Rekombinantinių esterazių savitasis aktyvumas pNP-esteriams. 1–24 esterazės atrinktos naudojant acetiluridiną, 25–30 – heksanoiluridiną. 31 – atrinkta tributirino metodu (aprašyta 3.2 skyriuje). n.a. –neanalizuota.

| Nr. | Klonas            | Grynumas, % | Savitasis aktyvumas, U/ $\mu$ g |                |                 |                 |
|-----|-------------------|-------------|---------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
|     |                   |             | pNP-acetatas                    | pNP-butiratas  | pNP-valeratas   | pNP-dekanoatas  |
| 1.  | 24T5              | 96          | 38 $\pm$ 3,8                    | 26,4 $\pm$ 4,8 | 38,2 $\pm$ 3,8  | 0,3 $\pm$ 0,01  |
| 2.  | 33T1              | 96          | 49 $\pm$ 0,8                    | 80 $\pm$ 2,4   | 27,5 $\pm$ 6,5  | 0,9 $\pm$ 0,01  |
| 3.  | 24T3              | 85          | 45 $\pm$ 11                     | 46 $\pm$ 8,1   | 60,5 $\pm$ 6,2  | –               |
| 4.  | 24T1              | 94          | 66,6 $\pm$ 10,7                 | 10 $\pm$ 20,8  | 84 $\pm$ 8,7    | 0,9 $\pm$ 0,01  |
| 5.  | 3T                | 93          | 23 $\pm$ 4                      | 0,9 $\pm$ 0,2  | –               | –               |
| 6.  | MO101T            | 96          | 159 $\pm$ 19                    | 0,2 $\pm$ 0,1  | –               | –               |
| 7.  | SVG3              | 99          | 346 $\pm$ 7,5                   | 35 $\pm$ 9,6   | 33,6 $\pm$ 3,6  | –               |
| 8.  | 4H1T <sup>a</sup> | n.a.        | n.a.                            | n.a.           | n.a.            | n.a.            |
| 9.  | 30T1              | 93          | 55 $\pm$ 2,3                    | 54,4 $\pm$ 5,8 | 20 $\pm$ 2,1    | –               |
| 10. | Gru1              | 98          | 177 $\pm$ 0,3                   | 2,7 $\pm$ 0,8  | 1,3 $\pm$ 0,5   | –               |
| 11. | 30T2              | 93          | 52 $\pm$ 4,7                    | 8 $\pm$ 0,1    | 2,6 $\pm$ 0,8   | –               |
| 12. | BD1               | 93          | 12,9 $\pm$ 0,3                  | 5,7 $\pm$ 0,8  | 4,3 $\pm$ 0,5   | –               |
| 13. | 36T2              | 77          | 32,7 $\pm$ 2,9                  | 4,8 $\pm$ 0,3  | 2,2 $\pm$ 0,25  | –               |
| 14. | SVGPA2T           | n.a.        | n.a.                            | n.a.           | n.a.            | n.a.            |
| 15. | RIEB <sup>b</sup> | n.a.        | n.a.                            | n.a.           | n.a.            | n.a.            |
| 16. | 12T               | 77          | 4,1 $\pm$ 0,5                   | 0,3 $\pm$ 0,2  | 0,3 $\pm$ 0,2   | –               |
| 17. | SVG1              | 95          | 343 $\pm$ 15                    | 367 $\pm$ 15,8 | 189 $\pm$ 52,8  | 2,1 $\pm$ 0,34  |
| 18. | C233              | 90          | 3,7 $\pm$ 0,5                   | 5,8 $\pm$ 1,4  | 4,7 $\pm$ 1,6   | –               |
| 19. | 45T3              | 86          | 104 $\pm$ 12                    | 78 $\pm$ 5,4   | 49,5 $\pm$ 6,1  | –               |
| 20. | BD9               | 69          | 3,2 $\pm$ 1,4                   | 3 $\pm$ 2      | 3,2 $\pm$ 2,6   | –               |
| 21. | 33T3              | 82          | 80 $\pm$ 6,7                    | 7,6 $\pm$ 0,7  | 0,9 $\pm$ 0,4   | –               |
| 22. | PLA1              | 93          | 30 $\pm$ 0,8                    | 2,4 $\pm$ 0,02 | –               | –               |
| 23. | 36T1              | 95          | 4,5 $\pm$ 0,5                   | 6 $\pm$ 0,7    | 6,7 $\pm$ 3     | –               |
| 24. | MO4B              | –           | 1,3 $\pm$ 0,1                   | 0,12 $\pm$ 0,1 | –               | –               |
| 25. | EN1H              | 95          | 14,4 $\pm$ 2                    | 47 $\pm$ 17    | 74,4 $\pm$ 8,9  | 2,0 $\pm$ 0,2   |
| 26. | BD2H              | 93          | 1,9 $\pm$ 0,6                   | 18 $\pm$ 0,5   | 24,3 $\pm$ 1,1  | 3,1 $\pm$ 0,5   |
| 27. | EN3H              | 93          | 283 $\pm$ 15                    | 336 $\pm$ 15   | 196 $\pm$ 18    | 8,6 $\pm$ 0,6   |
| 28. | CAP3H             | 74          | 29,1 $\pm$ 6,2                  | 75 $\pm$ 10    | 34,3 $\pm$ 6,5  | 10,3 $\pm$ 0,34 |
| 29. | K3H2              | 98          | 349 $\pm$ 35                    | 425 $\pm$ 21   | 49,3 $\pm$ 2,5  | 16,9 $\pm$ 2,7  |
| 30. | 1315H             | –           | 2,2 $\pm$ 1,3                   | 17,1 $\pm$ 10  | 35,6 $\pm$ 17,4 | 1,0 $\pm$ 0,6   |
| 31. | Tb10_7T           | 94          | 122 $\pm$ 4,7                   | 133 $\pm$ 8,8  | 7,4 $\pm$ 0,6   | 2,6 $\pm$ 1,4   |

Atrinkti metagenominiai fermentai reakcijose *in vitro* hidrolizavo įvairius cukrų ir nukleozidų esterius su keliais pakaitais (3.7 pav.) iki skirtingų produktų. Pakaitų hidrolizės reakcijos buvo stebimos TLC plokštelėje UV šviesoje, arba junginius, nesugeriančius UV šviesos, dažant anyžių dažais (duomenys neparodyti). Dalis fermentų pasižymėjo regioselektyvumu 1-feniletilo esterių hidrolizės reakcijose (3.7 pav.). 14 iš 27 klonų hidrolizavo tributiriną agarizuotoje terpėje (bus aptarta žemiau). 17 iš 24 atrinktų fermentų pasižymėjo laktamaziniu aktyvumu – hidrolizavo nitrocefina, kitų laktamų, (Vince laktono (2-azobiciklo [2,2,1]hept-5-en-3-ono), 7-nitro-2*H*-1,4-benzooksiazin-3(4*H*)-ono, 5-nitro-2-oksindolo, 6-nitro-3,4-dihidrochinolin-2(1*H*)-ono, 6-nitrochinoksalin-2-ono, *tert*-butil-4-nitrofenilkarbamato) nehidrolizavo nei viena esterazė.

| Substratas                                                    | Klonas |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
|---------------------------------------------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|-----|------|--------|-------|------|----|------|------|------|---------|------|------|-----|------|------|------|-----|------|------|------|-------|--|
|                                                               | 24T5   | 24T1 | 24T3 | 33T1 | 30T1 | 30T2 | 36T2 | BD1 | EN3H | MO101T | CAP3H | BD2H | 3T | Gru1 | SVG3 | K3H2 | Tb10_7T | C233 | SVG1 | 12T | 45T3 | PLA1 | 33T3 | BD9 | 36T1 | MO4B | EN1H | 1315H |  |
| β-D-gliukozės pentaacetatas                                   | █      | █    |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| β-D- galaktozės pentaacetatas                                 |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| ( <i>R</i> )-1- feniletilo acetatas                           |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| ( <i>S</i> )-1-feniletilo acetatas                            |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| ( <i>R</i> )-1-feniletilo heksanoatas                         |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| ( <i>S</i> )-1- feniletilo heksanoatas                        |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| ( <i>R</i> )-1- feniletilo benzoatas                          |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| ( <i>S</i> )-1- feniletilo benzoatas                          |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| Tributirinas                                                  |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| p-nitroacetanilidas                                           |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| Nitrocefinas                                                  |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| 3'- <i>O</i> -Benzoil-2'dU                                    |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| 3'- <i>O</i> -Acetil-2'dU                                     |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| 3'- <i>O</i> -Acetil- <i>N</i> <sup>4</sup> -benzoil -2'dC    |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| 3'- <i>O</i> -Levulinil- <i>N</i> <sup>4</sup> -benzoil -2'dC |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| 5'- <i>O</i> -Levulinil- <i>N</i> <sup>4</sup> -benzoil 2'dC  |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| pNP-acetatas                                                  |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| pNP-butiratas                                                 |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| pNP-valeratas                                                 |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| pNP-dekanoatas                                                |        |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         |      |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| ABhidrolazės                                                  | █      |      |      |      |      |      | █    |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         | █    |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| SGNH hidrolazės                                               | █      |      |      |      |      |      | █    |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         | █    |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| β-Laktamazės                                                  | █      |      |      |      |      |      | █    |     |      |        |       |      |    |      |      |      |         | █    |      |     |      |      |      |     |      |      |      |       |  |
| ABhidrolazės/Gal surišantys baltymai                          | █      |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       | █    |    |      |      |      |         |      |      |     |      | █    |      |     |      |      |      |       |  |
| <i>N</i> -acetiltransferazė                                   | █      |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       | █    |    |      |      |      |         |      |      |     |      | █    |      |     |      |      |      |       |  |
| DUF998                                                        | █      |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       | █    |    |      |      |      |         |      |      |     |      | █    |      |     |      |      |      |       |  |
| Glikozilhidrolazė                                             | █      |      |      |      |      |      |      |     |      |        |       | █    |    |      |      |      |         |      |      |     |      | █    |      |     |      |      |      |       |  |

3.7 pav. Fermentų substratinio savitumo įvertinimas.

Iš literatūros duomenų yra žinoma, kad ABhidrolazių šeimos esterazės gali pasižymėti amidohidrolaziniu aktyvumu [44] [48]. Atrinktų fermentų analizė parodė, kad trys esterazės 24T1, MO101T ir Gru1, priklausančios ABhidrolazėms, katalizavo *p*-nitroacetanilido hidrolizę. Kitų šeimų atstovai šio amido nehidrolizavo. Deoksicitidino darinių – 3'-*O*-acetil-*N*<sup>4</sup>-benzoil-2'-dC, 3'-*O*-levulinil-*N*<sup>4</sup>-benzoil-2'-dC ir 5'-*O*-levulinil-*N*<sup>4</sup>-benzoil-2'-dC buvo hidrolizuojama tik esterinė grupė, bet ne amidinė (3.7 pav.).

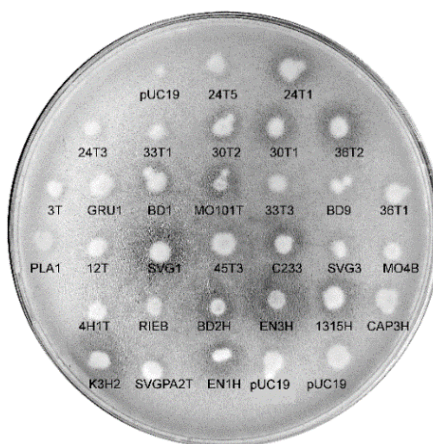
### 3.2. Esterazių atranka tributirino metodu

Palyginimui, ar galima atrinkti esterazes, gebančias hidrolizuoti uridino esterius klasikiniu tributirino metodu, buvo patikrintos kelios metagenominės bibliotekos su pastaruoju substratu. Tributirino metodu buvo atrinkti du klonai Tb7\_1T ir Tb10\_7T, sudarantys hidrolizės zonas.

Palyginus su NCBI duomenų bazėje esančiom sekom, Tb7\_1T (MH423281) klonu genas priskiriamas  $\beta$ -laktamazių baltymams, o Tb10\_7T (MH423280) seka labiausiai buvo panaši į ABhidrolazių superšeimos atstovus. Nei vienas iš dviejų klonų neaugo M9 terpėje su acetil- ar heksanoiluridino šaltiniu. Tb7\_1T klonu esterazė nebuvo išgryninta dėl hidrofobinės prigimties, o Tb10\_7T buvo išgrynintas ir įvertintas jo savitasis aktyvumas su pNP esteriais (3.3 lentelė), bei substratų spektras (3.8 pav.).

Taip pat buvo atliktas ir priešingas eksperimentas: visi klonai, atrinkti ant selektyvios terpės su uridino analogais, patikrinti tributirino metodu. Iš 30 klonų, atrinktų panaudojus acetiluridiną arba heksanoiluridiną, tik 14 klonų formavo tributirino hidrolizės zonas (3.8 pav.). Šie rezultatai taip pat parodo pasirenkamo metodo svarbą. Palyginus klonų aktyvumus su tributirinu ir hidrolizuojamų pNP esterių acilo grupių ilgį matoma tendencija, kad esterazės hidrolizuojančios tributiriną yra labiau savitos ilgesnių grandinių pNP esteriams. Bet plataus spektro CAP3H, BD2H, 24T5, 24T3 esterazių, efektyviai hidrolizuojančių pNP-valeratą, ląstelių klonai neformavo tributirino hidrolizės zonų. Iš to galima daryti prielaidą, kad tributirino metodas nėra pakankamai jautrus šių hidrolazių aptikimui.

Apibendrinant gautus rezultatus galima teigti, kad sukurtas selektyvus esterazių atrankos metodas yra jautresnis už klasikinį tributirino metodą, be to tributirino metodas nėra geriausias pasirinkimas esterazių, savitų trumpų grandinių esteriams, atrankai. Taip pat sukurtas metodas suteikia galimybę keičiant esterio grandinės ilgį atsirinkti pageidaujamų savybių fermentus.



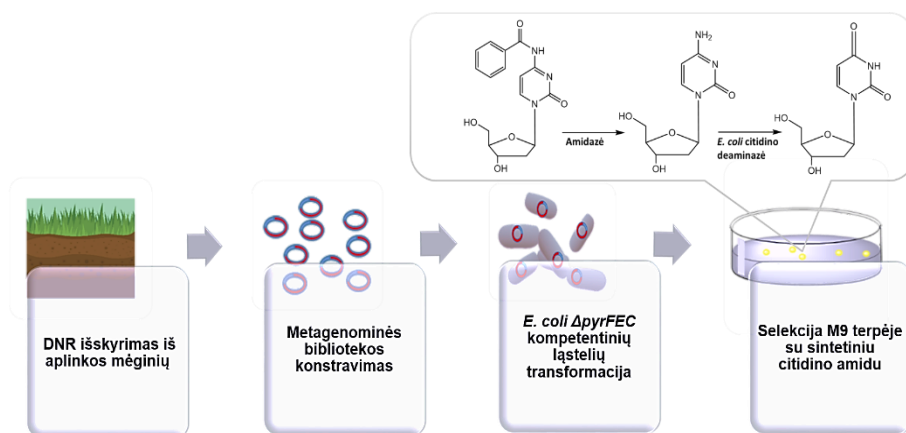
**3.8 pav.** Selektivoje M9 terpėje atrinktų esterazių klonų patikra tributirino atrankos metodu.

### 3.3. Amidohidrolazių atrankos metodo kūrimas

#### 3.3.1. Amidohidrolazių atrankos metodo principas

Sukūrus sėkmingą esterazių selekcijos metodą, šios atrankos sistema bandyta pritaikyti ir amidohidrolazių atrankai. Selektivaus metodo kūrimui buvo panaudotos *E. coli* DH10B  $\Delta$ *pyrFEC::Km* bakterijos, o substratu pradžioje buvo pasirinktas  $N^4$ -acetilcitudinas, kaip vienintelis uridino šaltinis M9 minimalioje terpėje. Tačiau paaiškėjo, kad *E. coli* ląstelės metabolizuoja  $N^4$ -acetilcitudiną ir formuoja kolonijas mineralinėje terpėje be papildomų genų. Kartu su Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus (Biochemijos institutas, GMC, VU) darbuotojais atlikti išsamūs tyrimai leido identifikuoti už  $N^4$ -acetilcitudino hidrolizę atsakingą fermentą – hipotetinį YqfB baltymą. Buvo nustatyta, kad amidohidrolazė YqfB yra 103 a.r. polipeptidas, turintis ASCH domeną, atsakingą už sąveiką su RNR. Šio fermento katalizinių savybių tyrimai pateikti publikacijoje (Stanislauskienė ir kiti, 2020) [136] ir šiame darbe detaliau nebus nagrinėjami.

Nustačius, kad YqfB baltymas trukdo atrankos sistemos kūrimui, panaudojant  $N^4$ -acetilcitudiną kaip substratą, YqfB koduojantis genas buvo pašalintas iš *E. coli* DH10B  $\Delta$ *pyrFEC::Km* ląstelių genomo. Deja, bet *E. coli* DH10B  $\Delta$ *pyrFEC* $\Delta$ *yqfB::Km* kamieno ląstelėse  $N^4$ -acetilcitudinas vis tiek buvo metabolizuojamas, todėl darbai buvo tęsiami su kitu substratu –  $N^4$ -benzoil-2'-deoksicitidinu kaip vieninteliu uridino šaltiniu minimalioje M9 terpėje. Atrankos metodo principas yra parodytas 3.9 paveiksle.



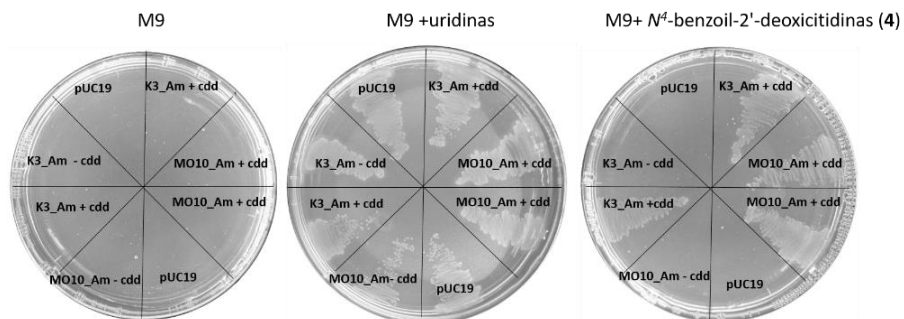
**3.9 pav.** Amidohidrolazių atrankos metodo principas. Vykdam selektyvę atranką, užauga tik klonai įgiję amidohidrolazę, kuri  $N^4$ -benzoil-2'-deoksicitidina hidrolizuoja iki 2'-deoksicitidino, o natyvi *E. coli* citidino deaminazė 2'-deoksicitidina deaminina iki 2'-deoksiuridino, ko pasekoje atstatomas uridino auktrofo fenotipas.

Pirmame etape *E. coli*  $\Delta$ pyrFEC::Km ląstelės transformuojamos metagenomine biblioteka. Po transformacijos ląstelės išsėjamos ant selektyvios M9 terpės su uridino analogu ir kultivuojamos 37 °C temperatūroje 1–3 paras. Buvo tikimasi, kad amidohidrolazės iš metagenomo pavers N<sup>4</sup>-benzoil-2'-deoksicitidiną į 2'-deoksicitidiną, o natyvi *E. coli* citidino deaminazė 2'-deoksicitidiną deaminins iki 2'-deoksiuridino, ko pasekoje bus atstatomas uridino auksotrofinių ląstelių gebėjimas dalintis.

### 3.3.2. Amidohidrolazių selektyvios atrankos proceso eiga

Šio darbo etapo metu iš viso buvo patikrinta 15 metagenominių bibliotekų, paruoštų Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje (Biochemijos institutas, GMC, VU) iš dirvožemio mikroorganizmų DNR fragmentų, klonuotų į pUC19 vektorių. Teigiami rezultatai buvo nustatyti penkiose bibliotekose (priedo 1P lentelė). Klonai, koduojantys amidohidrolazes, buvo surasti naudojant M9 terpę, su 100 µg/ml ampicilino, 40 µg/ml kanamicino ir 20 µg/ml N<sup>4</sup>-benzoil-2'-deoksicitidino. Iš viso buvo atrinkta 12 teigiamų klonų. Klaidingai teigiamų rezultatų eliminavimui visi klonai buvo pakartotinai patikrinti kultivuojant agarizuotoje M9 terpėje su citidino dariniu ir be jo. Iš atrinktų klonų buvo išskirta plazmidinė DNR, atlikta analizė restrikcijos endonukleazėmis ir Sengerio sekoskaita. Tolesnei analizei buvo pasirinktos 7 plazmidės.

Kad pagalbiniis fermentas yra būtent *E. coli* citidino deaminazė (Cdd) įrodyta išveiklinus ją koduojantį *cdd* geną *E. coli* DH10B $\Delta$ pyrFEC kamieno ir kultivuojant šias ląsteles selektyvioje terpėje (3.10 pav). Kaip ir manyta, nei



**3.10 pav.** *E. coli* DH10B  $\Delta$ pyrFEC*cdd*::Km kultivavimas M9 terpėje be uridino, su uridinu ir uridino amidu. +cdd – *E. coli* DH10B  $\Delta$ pyrFEC::Km kamienas (su deaminaze), - cdd – *E. coli* DH10B  $\Delta$ pyrFEC*cdd*::Km (be deaminazės). pUC19 – kamienas su pUC19 vektoriumi; K3Am ir MO10\_Am – kamienai su atitinkamų amidohidrolazių genais pUC19 vektoriuje.

vienas iš patikrintų klonų, turinčių amidohidrolazės geną, nekompensavo *E. coli* DH10B  $\Delta$ pyrFECdd::Km uridino auktrofinio požymio – ląstelės neaugo ant M9 agaro terpės, su  $N^4$ -benzoil-2'-deoksicitidinu (3.10 pav.).

Taip pat vietoj  $N^4$ -benzoil-2'-deoksicitidino, kaip substratas buvo išbandytas ir  $N^4$ -benzoilcitudinas: kolonijos buvo formuojamos vienodu intensyvumu tiek su ribo-, tiek deoksiribonukleozido analogu.

### 3.3.3. Atrinktų amidazių genų sekų analizė

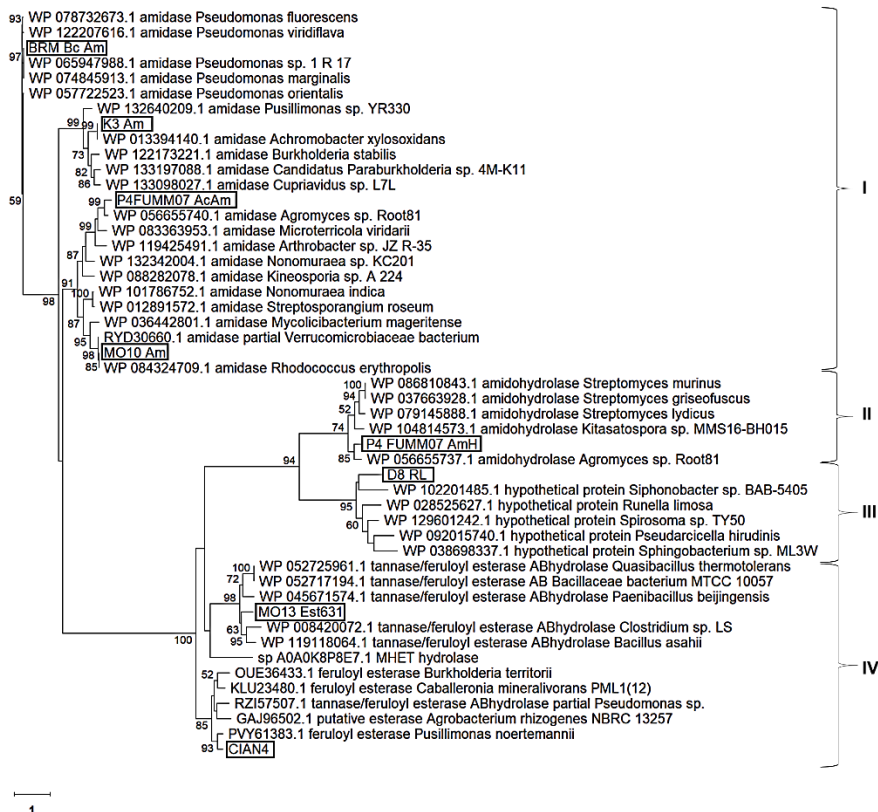
Atrinktų klonų plazmidžių DNR fragmentų sekų analizė parodė, kad šešių fragmentų sekos turi atviro skaitymo rėmelių (ORF) su 40–90% identiškumu hidrolazių sekoms, randamoms NCBI GenBank duomenų bazėje (3.4 lentelė), o P4FUMM07 klone yra du ORF, koduojantys potencialias amidohidrolazes – P4FUMM07\_AcAm ir P4FUMM07\_AmH.

**3.4 Lentelė.** Atrinktų amidohidrolazių homologai.

| Klonas, GenBank Nr.            | Artimiausias homologas                                                   | Tapatumas, % |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>BRM_Am, MN734430</b>        | <i>Pseudomonas</i> sp. 1 R 17, WP_065947988.1, amidazė                   | 99           |
| <b>K3_Am, MN734429</b>         | <i>Achromobacter xylooxidans</i> , WP_013394140.1, amidazė               | 97           |
| <b>MO10_Am, MN734431</b>       | <i>Rhodococcus erythropolis</i> , WP_084324709.1, amidazė                | 99           |
| <b>P4FUMM07_AcAm, MN734432</b> | <i>Agromyces</i> sp. Root80, Wp056655740.1, amidazė                      | 84           |
| <b>P4FUMM07_AmH, MN734432</b>  | <i>Agromyces</i> sp. Root81, Wp056655731.1, amidazė                      | 80           |
| <b>CIAN4, MN734434</b>         | <i>Pusillimonas noertemannii</i> , PVY61383.1, ferulo rūgšties esterazė  | 73           |
| <b>MO13_Est631, MN734432</b>   | <i>Bacillus asahii</i> , WP_119118064.1, tanazė/ferulo rūgšties esterazė | 56           |
| <b>D8_RL, MN734435</b>         | <i>Runella limosa</i> , WP_028525627.1, hipotetinis baltymas             | 40           |



Filogenetinė sekų analizė parodė, kad šie fermentai priklauso skirtingoms baltymų superšeimoms (3.11 pav.): keturi iš jų (BRM\_Am, MO10\_Am, K3\_Am ir P4FUMM07\_AcAm) priklauso Amidazinio žymens (AS) fermentų superšeimai SSF75304. Šiai šeimai būdingas glicino ir serino amino rūgštims turtingas regionas, o aktyvųjį centrą sudaro Lys-Ser-Ser triada (3.12 pav.).



**3.11 pav.** Atrinktų amidohidrolazių ir jų homologų filogenetinis medis. I – Amidazinio žymens superšeima (SSF75304), II – nuo metalų priklausomų amidohidrolazių superšeimoms (SSF51338 ir SSF51556), III – hipotetiniai baltymai, IV – ABhidrolazių superšeima (SSF53474).

Viena iš Amidazinio žymens superšeimoms amidohidrolazė BRM\_Am buvo išsamiau panagrinėta. Remiantis I-Tasser molekulinio įrankio pasiūlytu modeliu [152] buvo atliktos numanomo aktyvaus centro mutacijos K77A, S153A, S177A. Dvi iš trijų mutacijų – K77A ir S177A – išveiklino fermentą, o S153A mutacijos įvesti nepavyko (bandyta kelis kartus keičiant PGR sąlygas).

|                                                   |                                                                |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>A</b>                                          |                                                                |
| BHM_Bc_Am                                         | 38 ERVEPQLNVAERLYDQARQSVRASRPFGGVFAGVF...TIDKDLFSPVNGAAM       |
| WP_065947988.1_amidase_Pseudomonas_sp._1_R17      | 38 ERVEPQLNVAERLYDQARQSVRASRPFGGVFAGVF...TIDKDLFSPVNGAAM       |
| RI4845913.1_amidase_Pseudomonas_marginalis        | 38 ERVEPQLNVAERLYDQARQSVRASRPFGGVFAGVF...TIDKDLFSPVNGAAM       |
| WP_122207616.1_amidase_Pseudomonas_viridiflava    | 38 ERVEPQLNVAERLYDQARETARTRPFGGVFAGVF...TIDKDLFSPVNGAAM        |
| WP_057722523.1_amidase_Pseudomonas_orientalis     | 38 ERVEPQLNVAERLYDQARETARTRPFGGVFAGVF...TIDKDLFSPVNGAAM        |
| WP_078732673.1_amidase_Pseudomonas_fluorescens    | 38 ERVEPQLNVAERLYDQARETARTRPFGGVFAGVF...TIDKDLFSPVNGAAM        |
| P4FUM07_AcAm                                      | 41 ADLEPIVNALITG.EKILDVQTALDDSAARYVAGTARA...LEGLPVVKAHAHAGHTE  |
| WP_05665740.1_amidase_Agromyces_sp._Root81        | 36 DAVEPAINALITG.ERLDFVEALAESEARRYADGTARP...LEGLPVVKAHAHAGHTE  |
| WP_09363953.1_amidase_Microterricola_viridarii    | 36 NALNPTLNAVGHFTFQAAARQAKSERHYARGSDVS.LPLAGVPVVVKDEEPIVCGEP   |
| WP_119425491.1_amidase_Arthrobacter_sp._JZ_R-35   | 36 AEAEPTVNAITP.EVLDDVAALAESEARRYAGGTORP...LEGLPVVKAHEPIEGHSA  |
| WP_132342004.1_amidase_Noncomuraea_sp._KC201      | 59 EHIEPISVNAFAERWFDQAMDQARQAADRYARGTARP...LEGLPVVKAHEPIVAGHPL |
| WP_088282078.1_amidase_Kineosporia_sp._A_224      | 35 DAVEPITNALDERHDDFRAAVAARVRYG.CTGEPPALLEGLPVAKHEPIVGRASL     |
| Mo10_Am                                           | 38 EALNPTLNAVGHFTFQAAARQAKSERHYARGSDVS.LPLAGVPVVVKDEEPIVCGEP   |
| WP_084324709.1_amidase_Rhodococcus_erythropolis   | 38 EALNPTLNAVGHFTFQAAARQAKSERHYARGSDVS.LPLAGVPVVVKDEEPIVCGEP   |
| WP_036442801.1_amidase_Mycolicibacterium_magerite | 31 DKLNHEKVAHFLDFRDLALEAREEHRYLTDPPGA.RP.LEGLPVLKDEEPIVCGEP    |
| RI030660.1_amidase_partial_Verrucomicrobiaceae_ba | 38 EALNPTLNAVGHFTFQAAARQAKSERHYARGSDVS.LPLAGVPVVVKDEEPIVCGEP   |
| WP_101786752.1_amidase_Noncomuraea_indica         | 29 ERTEPVTNALICHRFFDEALRQAKSERHYAGDGGP.RF.LEGLPVTKDEEPIVCGEP   |
| WP_012891572.1_amidase_Streptosporangium_roseum   | 29 ERTEPVTNALICHRFFDEALRQAKSERHYAGDGGP.RF.LEGLPVTKDEEPIVCGEP   |
| K3_Am                                             | 36 QLNPFVFNPLITGICADQAKRAADAADAVRGGAPLG.LLHGVPVTKKANADLAGSAT   |
| WP_013394140.1_amidase_Achromobacter_xylosoxidans | 46 EQVNPVINAIVVEILDAMETAVKDAEALRGDQVJ.LLHGVPITIKNVDTAGCTTI     |
| WP_133197088.1_amidase_Candidatus_Paraburkholderi | 46 EQVNPVINAIVVEILDAMETAVKDAEALRGDQVJ.LLHGVPITIKNVDTAGCTTI     |
| WP_122173221.1_amidase_Burkholderia_stabilis      | 36 EQVNPVINAIVVDVLADALRAASEADAALARGAPVJ.PLHGVPVTKNVDTAGCAT     |
| WP_133098027.1_amidase_Cupriavidus_sp._L7L        | 36 DVNPEFLNAVVEVLADALHTAAEADANLARGEVJ.LLHGVPVTKNVDTAGCAT       |
| WP_132640209.1_amidase_Pusillimonas_sp._YR330     | 36 ANVPEFLNAVVAQSDAALGQADADQALAGQROVJ.LLHGVPVTKNVDTAGCAT       |
|                                                   |                                                                |
| BHM_Bc_Am                                         | 147 AHSAGGSSGGAAALVAARVVPFAHGDDGGSSRVPASCCGGLFPRSRLLPFGSMVVG   |
| WP_065947988.1_amidase_Pseudomonas_sp._1_R17      | 147 AHSAGGSSGGAAALVAARVVPFAHGDDGGSSRVPASCCGGLFPRSRLLPFGSMVVG   |
| RI4845913.1_amidase_Pseudomonas_marginalis        | 147 AHSAGGSSGGAAALVAARVVPFAHGDDGGSSRVPASCCGGLFPRSRLLPFGSMVVG   |
| WP_122207616.1_amidase_Pseudomonas_viridiflava    | 147 SHSGGSSGGAAALVAARVVPFAHGDDGGSSRVPASCCGGLFPRSRLLPFGSMVVG    |
| WP_057722523.1_amidase_Pseudomonas_orientalis     | 147 HSHAGGSSGGAAALVAARVVPFAHGDDGGSSRVPASCCGGLFPRSRLLPFGSMVVG   |
| WP_078732673.1_amidase_Pseudomonas_fluorescens    | 147 SHSAGGSSGGAAALVAARVVPFAHGDDGGSSRVPASCCGGLFPRSRLLPFGSMVVG   |
| P4FUM07_AcAm                                      | 153 EYSGGSSGGGAAIAAGYAPLATGCDGGSSRVPASCFNGGVPFPFGRVTFVGNVY     |
| WP_05665740.1_amidase_Agromyces_sp._Root81        | 148 EYSGGSSGGGAAIAAGYAPLATGCDGGSSRVPASCFNGGVPFPFGRVTFVGNVY     |
| WP_09363953.1_amidase_Microterricola_viridarii    | 148 EFAVGGSSGGGASIAAGYAPLGTGCDGGSSRVPASCFNGGVPFPFGRVTFVGNVY    |
| WP_119425491.1_amidase_Arthrobacter_sp._JZ_R-35   | 148 DYVGGSSGGGAAIAAGYAPLATGCDGGSSRVPASCFNGGVPFPFGRVTFVGNVY     |
| WP_132342004.1_amidase_Noncomuraea_sp._KC201      | 172 GSHSGGSSGGGAAIAAGTAMLATGCDGGSSRVPASCFNGGVPFPFGRVTFVGNVY    |
| WP_088282078.1_amidase_Kineosporia_sp._A_224      | 150 DPTGGSSGGGAAIAAGTALATGCDGGSSRVPASCFNGGVPFPFGRVTFVGNVY      |
| Mo10_Am                                           | 153 KYSGGSSGGGAAVAIATGMTHLATGCDVAGSRPPSSNLNGGVPFPFGRVTFVGNVY   |
| WP_084324709.1_amidase_Rhodococcus_erythropolis   | 153 KYSGGSSGGGAAVAIATGMTHLATGCDVAGSRPPSSNLNGGVPFPFGRVTFVGNVY   |
| WP_036442801.1_amidase_Mycolicibacterium_magerite | 146 AYSGGSSGGGAAVAIATGMTHLATGCDVAGSRPPSSNLNGGVPFPFGRVTFVGNVY   |
| RI030660.1_amidase_partial_Verrucomicrobiaceae_ba | 153 KYASGGSSGGGAAVAIATGMTHLATGCDVAGSRPPSSNLNGGVPFPFGRVTFVGNVY  |
| WP_101786752.1_amidase_Noncomuraea_indica         | 144 VFSGGSSGGGAAALAGSTVLATGCDVAGSRPPASFCNGGVPFPFGRVTFVGNVY     |
| WP_012891572.1_amidase_Streptosporangium_roseum   | 144 EFSGGSSGGGAAALAGSTVLATGCDVAGSRPPASFCNGGVPFPFGRVTFVGNVY     |
| K3_Am                                             | 150 ARTGGSSGGAAVAALQMGPLAHGDDGGSSRVPAYACGGLRPSQGRVFAFYAATQ     |
| WP_013394140.1_amidase_Achromobacter_xylosoxidans | 150 ARTGGSSGGAAVAALQMGPLAHGDDGGSSRVPAYACGGLRPSQGRVFAFYAATQ     |
| WP_133197088.1_amidase_Candidatus_Paraburkholderi | 160 MRTGGSSGGAAVAALQMGPLAHGDDGGSSRVPAYACGGLRPSQGRVFAFYAATQ     |
| WP_122173221.1_amidase_Burkholderia_stabilis      | 150 STTGGSSGGAAVAALQMGPLAHGDDGGSSRVPAYACGGLRPSQGRVFAFYAATQ     |
| WP_133098027.1_amidase_Cupriavidus_sp._L7L        | 150 TRTGGSSGGAAVAALQMGPLAHGDDGGSSRVPAYACGGLRPSQGRVFAFYAATQ     |
| WP_132640209.1_amidase_Pusillimonas_sp._YR330     | 150 AITGGSSGGAAVAALQMGPLAHGDDGGSSRVPAYACGGLRPSQGRVFAFYAATQ     |

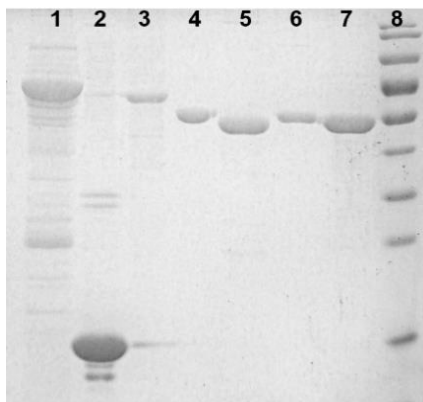
**3.12 pav.** Amidazinio žymens superšeimos fermentų konservatyvių motyvų palyginimas: katalizinę triadą sudaro K-S-S amino rūgščių liekanos.

MO13 ir CIAN4 yra ABhidrolazės superšeimos SSF53474 atstovai ir priklauso tanazės/ferulo rūgšties esterazių šeimos C grupei. Abi hidrolazės turi esterazėms būdingą G-x-S-x-G motyvą, o katalizinę triadą sudaro Ser-Asp-His (3.13 pav.). Palyginus su dauguma homologinių sekų NCBI duomenų bazėje, MO13\_Est631 turi ilgesnę C galinę amino rūgščių seką (maždaug 100 aminorūgščių). Tokią ilgesnę C galą turi tik keletas hipotetinių *Variovorax*, *Serratia* ir kelių kitų rūšių hidrolazių. Patikrinimui, ar C galinė sritis yra svarbi fermentiniam aktyvumui, buvo sukonstruotas trumpesnis MO13\_Est537 amidazės variantas, turintis 95 aminorūgščių deleciją C gale (atliko dr. J. Jakubovska). Trumpesnis konstruktas MO13\_Est537 buvo aktyvus ir tolesnėje analizėje buvo naudotas būtent šis variantas.



### 3.3.4. Amidohidrolazių gryninimas

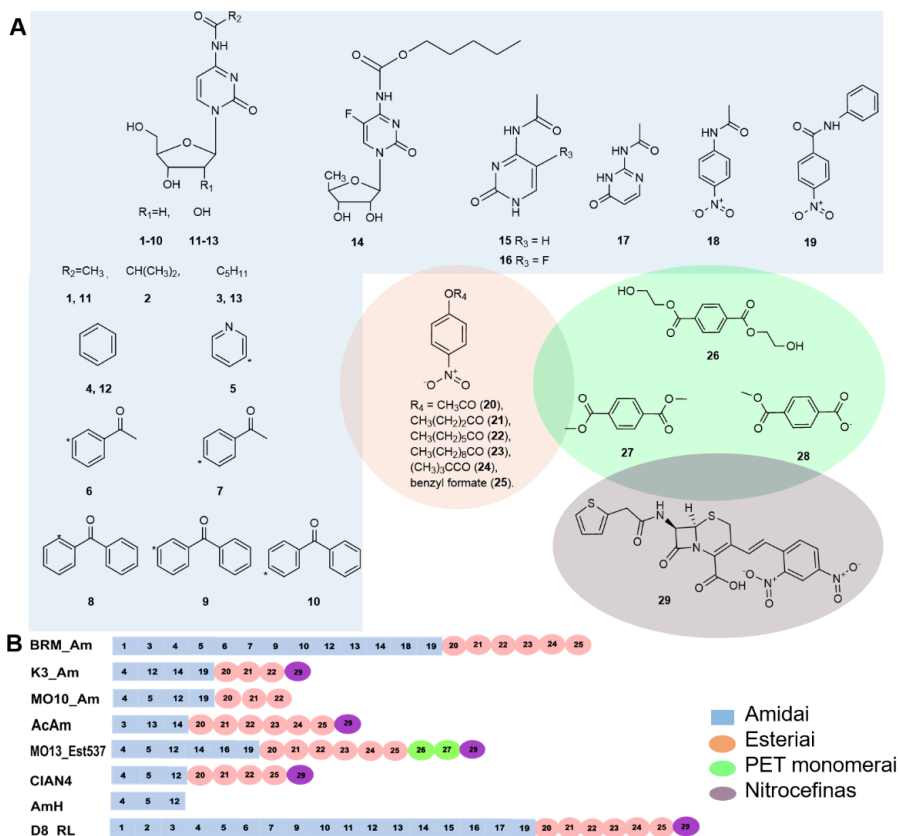
Norėdami patvirtinti, kad už amidohidrolazinį aktyvumą yra atsakingi būtent šie aprašyti fermentai, jų genai buvo amplifikuoti PGR metodu, o gauti fragmentai liguoti į pLATE31 arba pET21 raiškos vektorius. Rekombinantinių amidohidrolazių genų raiška tirta *E. coli* BL21 (DE3) arba HMS174 (DE3) ląstelėse. Iš viso, taikant afininę Ni-NTA chromatografiją, sėkmingai buvo išgryninti 7 rekombinantiniai baltymai (3.15 pav.). Dėl savo hidrofobinio pobūdžio P4FUMM07\_AmH baltymas nebuvo išgrynintas iki homogeniško, o aktyvumo tyrimams buvo naudojama iš dalies išgryninta baltymų frakcija. CIAN4 buvo išgrynintas iš užląstelinės frakcijos (turi 26 amino rūgščių signalinį polipeptidą, kurį identifikuoja Signal-3L 3,0, ir Uniprot molekuliniai įrankiai). Kitoms amidazėms nei signalinės sekos, nei amidohidrolazinis aktyvumas užląstelinėje frakcijoje neaptikti.



**3.15 pav.** Išgrynintų amidohidrolazių SDS-PAGE. **1** - CIAN4, **2** - D8\_RL, **3** - MO13\_Est537, **4** - MO10\_Am, **5** - K3\_Am, **6** - BRM\_Am, **7** - P4FUMM07\_AcAm, **8** - PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

### 3.3.5. Atrinktų amidohidrolazių katalizinių savybių tyrimas

Rekombinantinių fermentų hidrolizinis aktyvumas buvo ištirtas panaudojus 29 skirtingus substratus (3.16 pav. A):  $N^4$ -acilintus 2'-deoksicitidinus ir citozinas (**1–16**);  $N^2$ -acetilizocitozinas (**17**); chromogeninius amidus – *p*-nitroacetanilidą (**18**) ir *p*-nitrobenzanilidą (**19**); įvairius *p*-nitrofenilo (pNP) esterius (**20–24**); tereftalato darinius - bis (2-hidroksietil) tereftalatą (**26**), dimetil-tereftalatą (**27**) ir monometil-tereftalatą (**28**); bei  $\beta$ -laktamą – nitrocefina (**29**). Chromogeninių substratų (**18–25**) hidrolizė buvo tiriama spektrofotometriškai 405 nm ilgio bangoje, kitų substratų – spektrofotometriškai 240–320 nm bangoje, arba naudojant TLC ar HPLC-MS (priedo 1P-5P pav.). Visos reakcijos buvo stebimos 24 val. intervale.



**3.16 pav.** A – hidrolizinio aktyvumo nustatymui naudoti substratai, B – fermentai ir jų hidrolizuojami substratai.

Iš metagenominių bibliotekų atrinktos aštuonios hidrolazės pasižymėjo skirtingo veikimo profiliais *N*-acilintų nukleozidų trumpų ir ilgų alifatinių, aromatinių ir heterociklinių šoninių grupių hidrolizės reakcijose (3.16 pav. B). Visi identifikuoti fermentai, išskyrus P4FUMM07\_AcAm, hidrolizavo *N*<sup>4</sup>-benzoil-2'-deoksicitidiną **4** ir buvo aktyvūs *N*<sup>4</sup>-benzoilcitolino **12** atžvilgiu *in vitro* ir *in vivo*. Taigi klonu P4FUMM07 atveju galima daryti išvadą, kad *E. coli* DH10B  $\Delta$ *pyrFEC*::Km ląstelių augimas priklausė nuo amidohidrolazės P4FUMM07\_AmH aktyvumo, bet ne nuo P4FUMM07\_AcAm. Atlikta analizė parodė, kad visos tirtos hidrolazės yra savitos nukleozidams (tiek deoksi- tiek ribonukleozidams) kaip substratams, ir tik D8\_RL amidohidrolazė hidrolizavo heterociklinius bazinius darinius (**15–17**). Acilo grupės dydis taip pat turėjo didelę reikšmę – alifatinių radikalų atveju pasirinktos hidrolazės buvo labiau savitos ilgesnių acilų atžvilgiu (**1, 2, 3, 11,**



**13).** Ir vėlgi tik D8\_RL amidohidrolazė lėtai (po 24 valandų inkubacijos vis dar buvo stebima 10–20% nehidrolizuoto substrato) hidrolizavo  $N^4$ -acetil-2'-citidiną (**11**) iki citidino. Penki iš tirtų fermentų hidrolizavo kapecitabiną (**14**).  $N^4$ -nikotinoil-2'-deoksicitidino darinį (**5**) hidrolizavo šeši fermentai, tačiau tik dvi hidrolazės – BRM\_Am ir D8\_RL – katalizavo 2'-deoksicitidino junginių hidrolizę su didesnėmis aromatinėmis grupėmis (**6**, **7**, **9** ir **10**), išskyrus **8**. Tai rodo, kad fermentų BRM\_Am ir D8\_RL vykdomai katalizei svarbu ne tik pakaito dydis, bet ir substrato erdvinė struktūra.

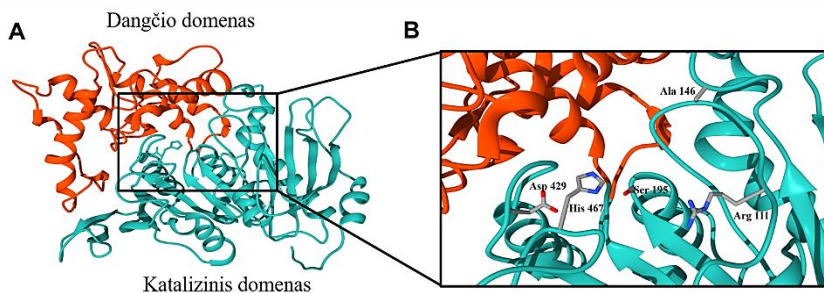
Esteraziniu aktyvumu pasižymėjo visos atrinktos hidrolazės, išskyrus P4FUMM07\_AmH, hidrolizuojanti tik keletą amidų. Priešingai nei amidų hidrolizės reakcijose, atrinkti fermentai buvo aktyviausi trumpų grandinių esterių atžvilgiu: visi hidrolizavo trumpųjų grandinių esterius (**20–22**), dauguma jų – **24** ir **25** junginius, tačiau tik trys amidazės – BRM\_Am, MO13Est537 ir D8\_RL – hidrolizavo pNP-dekanatą (**23**).

Penkios hidrolazės (MO13\_Est537, CIAN4, K3\_Am, D8\_RL ir P4FUMM07\_AcAm) pasižymėjo ir  $\beta$ -laktamaziniu aktyvumu – hidrolizavo nitrocefina.

Tarp atrinktų fermentų, MO13\_Est537 hidrolazė pasižymėjo išskirtinėmis katalizinėmis savybėmis. Be citidino substratų, fermentas hidrolizavo PET komponentus – dimetiltereftalatą (**27**, DMT) ir *bis*-(2-hidroksietil)-tereftalatą (**26**, BHET), bet nebuvo aktyvus monometiltereftalato (**28**, MMT) atžvilgiu (3.16 pav., priedo 1P ir 2P pav.). HHpred analizė parodė, kad geriausi MO13\_Est537 struktūriniai homologai yra *Aspergillus oryzae* ferulo rūgšties esterių hidrolazė (PDB 3WMT\_B ir 6G21\_A) ir mono (2-hidroksietil) tereftalio rūgšties esterių hidrolazė (MHETazė) iš *Ideonella sakaiensis*, 6QG9\_I). Tačiau aprašyta MHETazė nėra aktyvi DMT ir BHET atžvilgiu, o skaldo tik MMT. Tuo tarpu pirmosios PET hidrolizės reakcijos fermentas – PET hidrolazė (PETazių) katalizuoja DMT ir BHET hidrolizę, bet nehidrolizuoja mono modifikuotų tereftalatų. Taigi galima daryti išvadą, kad hidrolazė MO13\_Est537 priklauso MHETazės grupei pagal savo aminorūgščių seką, tačiau jos specifiškumas substratui yra panašesnis į PETazių. Duomenų apie feruloilo esterazių gebėjimą hidrolizuoti DMT ir BHET mokslinėje literatūroje nėra. Tik viena publikacija aprašo feruloilesterazę BS4 iš metagenomo, kuri hidrolizavo kitą junginį dimetilftalatą [156], bet ne dimetiltereftalatą. Tačiau yra aprašytų esterazių, lipazių ar kutinazių (ne viso klonuotos, tik kandidatai) hidrolizuojančių DMT iki MMT [157] [158] [159] ir BHET iki MHET [160] [161]. Mokslinėse publikacijose bandyta spėti, kas lemia, kad vienos esterazės/lipazės hidrolizuoja PET, o kitos ne. Ryšio tarp *p*-nitrofenolio esterių acilo grupės

ilgio ir gebėjimo hidrolizuoti PET nestebima [63] [162] [163], bet baltymų erdvinių struktūrų analizės rodo, kad PET hidrolizė priklauso nuo fermento struktūros. Esterazių ir lipazių aktyvusis centras yra tunelio formos struktūroje, kuri yra išsidėsčiusi po domenu, vadinamu dangčiu. Lipazės dangčio domenas gali būti dviejų konformacijų – uždaros ir atviros. Vandeniame tirpale, kai nėra substratų, vyrauja uždara fermento konformacija, o atvira konformacija yra indukuojama sąveika su substratu [164]. Kokie pokyčiai vyksta jungiantis su PET lieka neaišku, nes specifiniai esterazių struktūros pokyčiai tirpale buvo tiriama įvairiais būdais (FRET, BMR, ATM), o morfologiniai pokyčiai fermentinės poliesterio hidrolizės metu iki šiol nebuvo analizuoti [164]. Manoma, kad fermento paviršiaus hidrofobiškumo arba elektrostatinės savybės lemia PET substrato adsorbiciją, arba stabilizuoja aktyviają fermento formą.

MO13\_Est537 tretinės struktūros modelis (3.17 pav.) parodė, kad šis fermentas turi taip vadinamą dangčio domeną, o katalizinę triadą galimai sudaro Ser195, His467 ir Asp429. Tai patvirtino ir eksperimentiniai duomenys, atlikus šių aminorūgščių pakeitimą į alaninus. *In vivo* ir *in vitro* atlikti tyrimai parodė, kad visi trys mutantai prarado gebėjimą hidrolizuoti *N*<sup>4</sup>-benzoil-2'-deoksicitidiną.



**3.17 pav.** MO13Est537 struktūros modelis. A – struktūrą sudaro du domenai – katalizinis ir dangčio domenas. B – katalizinės amino rūgštys Ser195, Asp429 ir His467 išsidėsčiusios po dangčio domenu (struktūros modelį sukūrė M. Tiškus).

Taigi amidohidrolazių atrankos metu surastos kelios unikalios metagenominės amidohidrolazės, kurioms iki šiol nebuvo priskirtos aprašytos funkcijos: D8\_RL, YqfB hidrolizuoja nukleozidų ir heterociklinių bazių amidus, o MO13\_Est537 nukleozidų amidus ir PET komponentą dimiltereftalatą ir *bis*-(2-hidroksietil)-tereftalatą.

### 3.4. Glikozidazių atrankos metodo kūrimas

Sukūrus ir patikrinus esterazių ir amidohidrolazių selekcijos sistemas, buvo pabandyta analogišką metodą pritaikyti ir kitų hidrolazių atrankoms. Kaip jau aptarta literatūros apžvalgoje, glikozidazių atrankos sistemų sukurta labai nedaug, o atrankos selekcijos pagrindu iš metagenomų iš vis nėra publikuota. Tai greičiausiai susiję su menku atrankai tinkamų substratų ir galbūt silpna pačių glikozidazių genų raiška ląstelėse šeimininkėse.

Šios darbo dalies tikslas buvo patikrinti, ar metodas, panaudojus *E. coli* uridino auktrotrofo kamieną DH10B  $\Delta pyrFEC$  ir tam tikrus glikoziluridino darinius, yra tinkamas glikozidazių atrankai.

#### 3.4.1. Modelinio $\beta$ -D-galaktozidazių atrankos metodo kūrimas

Transformavus DH10B  $\Delta pyrFEC$  ląsteles plazmide su galaktozidazės genu ir jas kultivuojant M9 mineralinėje terpėje su galaktoziluridinu, kaip vieninteliu uridino šaltiniu, turėtų augti tik klonai, turintys galaktozidazės geną (3.18 pav.).



**3.18 pav.** Galaktozidazių modelinio atrankos metodo principas. M9 mineralinėje terpėje su galaktoziluridinu išsėjus *E. coli* uridino auktrotrofo DH10B  $\Delta pyrFEC$  kamieno ląsteles, augs tik klonai, turintys galaktozidazės geną.

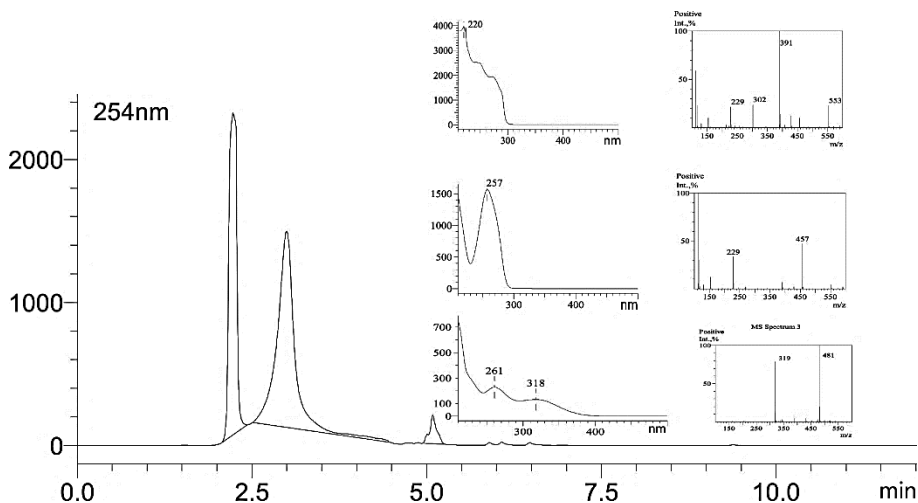
Metodo patikrinimui pirmiausia reikėjo susintetinti substratą –  $\beta$ -D-galaktoziluridiną, nes rinkoje nėra prieinamų glikozilnukleozidų. Glikozidų darinių sintezę galima atlikti cheminiu arba fermentiniu būdu [165]. Abu metodai turi savų privalumų ir trūkumų. Cheminės sintezės metu galima pasiekti gerų išeių ir atlikti modifikaciją norimoje pozicijoje, blokuojant ir deblokuojant funkcinės hidroksilo grupes. Bet tuo pačiu, tai yra ir trūkumas, nes glikozidų hidroksilo grupių blokavimas ir deblokavimas, ypač pavienis, yra labai rimtas iššūkis chemikui [166]. Be to angliavandeniai linę



karamelizuotis, juos sunku gryninti ir kristalinti cheminiais metodais. Fermentinė sintezė šiuo atveju yra palankesnė. Aprašyti fermentai, naudojami sintezei, daugiausia yra glikoziltransferazės (GTs) (EC 2.4), ir glikozidazės (GH) (EC 3.2). Iki šiol daugiau naudojama iš eukariotų išskirtos tiek GTs (pavyzdžiui karvės pieno GTs), tiek GH fermentai (moliuskų, žmogaus, šunų GH). GTs katalizuoja monosacharido pernešimą nuo aktyvuoto donoro, pavyzdžiui, UDP-Gal, akceptoriumi [35]. Komerciškai prieinamų glikoziltransferazių yra labai mažai, o jų substratai yra labai brangūs. Glikozidazių panaudojimas glikozilintų darinių sintezei yra patraukli alternatyva, lyginant su glikoziltransferazėmis, nes pastarosios gali naudoti įvairius santykinai nebrangius substratus-donorus, pavyzdžiui, aktyvintus glikozidus, tokius kaip nitrofenilglikozidai arba disacharidai transglikozilinimo reakcijose. Tačiau glikozidazių katalizuojamos reakcijos turi ir apribojimus: sunku atlikti reakciją palankią sintezės, o ne hidrolizės kryptimi, be to reakcijos produktas irgi yra glikozidazių substratas, kuris gali būti hidrolizuojamas. Taigi glikozidazių transglikozilinimo produktų išeigos yra nedidelės. Siekiant padidinti išeigas, yra naudojamos skirtingos strategijos, pagrįstos substratų koncentracijos, molinio donoro ir akceptoriaus santykio, temperatūros ir pH optimizavimu, arba kuriami aktyvesni fermentų mutantai [167].

#### 3.4.1.1. $\beta$ -D-galaktoziluridino fermentinė sintezė

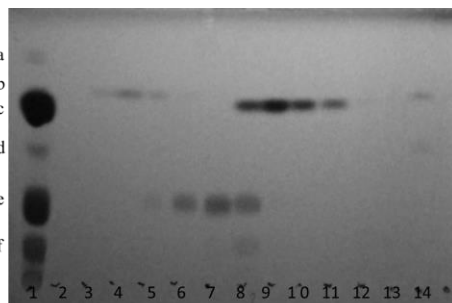
Fermentinė galaktozilnukleozidų sintezė buvo atlikta remiantis publikacijomis [168] [169] [170]. Atlikus keletą eksperimentų ir išanalizavus nukleozidų galaktozilinimo reakcijos efektyvumus, nuspręsta atrankoms naudoti modifikuotą 2'-deoksiuridiną, kaip labiausiai priimtina substratą. 2'-deoksiuridino galaktozilinimo reakcijoje galaktozės donoru pasirinktas *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozidas (*o*NP-Gal). Reakcija atlikta kaip nurodyta 2.2.29 skyriuje. Reakcijos eiga stebėta plonasluoksnės chromatografijos metodu. TLC ir HPLC-MS analizė parodė, kad reakcijos produktai yra mono-galaktozil-dU, di-galaktozi-dU ir *o*-NP-di-galaktozidas (3.19 ir 3.20 pav.).



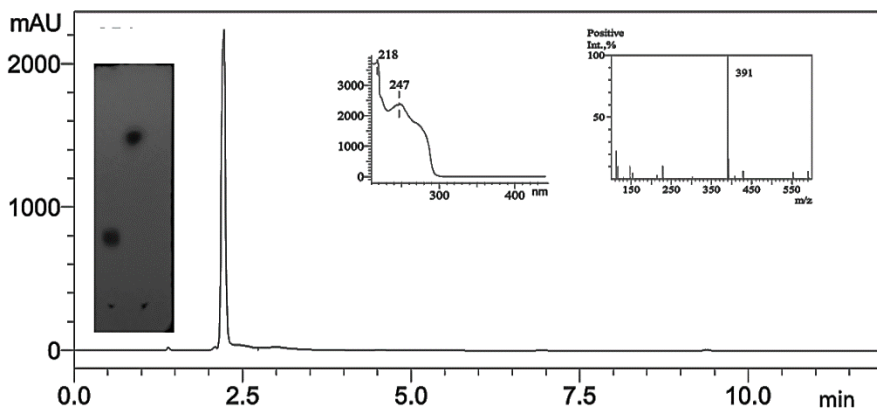
**3.19 pav.** Reakcijos mišinio HPLC-MC analizė. Pirmą smailę – mišinys iš dU (Mr 228), monogalaktozil-dU (Mr 390), digalaktozil-dU (Mr 552) ir *o*-NP-galaktozido (Mr 301), antrą smailę – 2'-deoksiuridinas, trečią smailę – *o*-NP – digalaktozidas (Mr 480). Visi produktai stebimi teigiamos jonizacijos spektre.

Reakcijos produktai buvo išgryninti atvirkščių fazių C18 sorbento kolonėlės pagalba, naudojant „AKTApurifier“ sistemą. Produktai išskirstyti naudojant vandens – 50% metanolio mišinį (10 kolonų tūrių, 0–100% gradientu). Produktų atskyrimui procesas kartotas kelis kartus. Gryninimo eiga stebėta TLC ir HPLC-MC metodais (3.19 ir 3.20 pav.).

Chromatografijos būdu pavyko išgryninti substratą monogalaktozil-dU (3.21 pav). Reakcijos produktas buvo pakartotinai patikrintas hidrolizės reakcijoje su  $\beta$ -D-galaktozidazę Lactazyme-B™: mono-galaktozil-dU buvo hidrolizuojamas iki deoksiuridino.



**3.20 pav.** Reakcijos produktų gryninimo eigos TLC plokštelės nuotrauka UV šviesoje: **1** – užnešimas, **2-14** – frakcijos. **a** – *o*-NP, **b** – *o*-NP-galaktozidas (likęs nehidrolizuotas substratas), **c** – dU (likęs nemodifikuotas), **d** – *o*-NP-digalaktozidas, **e** – monogalaktozil-dU, **f** – digalaktozil-dU.



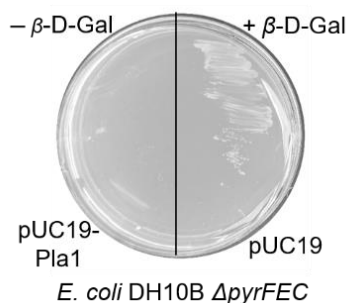
**3.21 pav.** Išgryninto monogalaktozil-dU analizė. TLC plokštelė: **1** – galaktozil-dU, **2** – dU, HPLC-MC smailė atitinka mono galaktozil-dU molekulinę masę Mr 390.

Išgrynintas produktas buvo panaudotas  $\beta$ -D-galaktozidazės geno raiškos patikrai *in vivo*.

#### 3.4.1.2. $\beta$ -galaktozidazių raiškos patikra selektyvioje M9 terpėje

$\beta$ -D-galaktozidazės raiška *in vivo* buvo patikrinta selektyvioje agarizuotoje M9 terpėje su išgrynintu  $\beta$ -D-galaktozilideoksiuridinu. pUC19 (su LacZ  $\beta$ -D-galaktozidaze) ir pUC19\_Pla1 (pertrauktas galaktozidazės genas) plazmidėmis transformuotos *E. coli* DH10B  $\Delta$ pyrFEC ląstelės inkubuotos 2 paras 37 °C temperatūroje M9 terpėje su  $\beta$ -D-galaktozil-dU kaip vieninteliu uridino šaltiniu. Ląstelės su galaktozidazės genu užaugo, o be šio geno – ne (3.22 pav.) Tai parodo, kad toks metodas gali būti taikomas glikozidazių atrankoms.

Kitas darbo etapas buvo sukurti fukozidazių atrankos metodą uridino *E. coli* auksotrofo ir tinkamo substrato pagrindu.



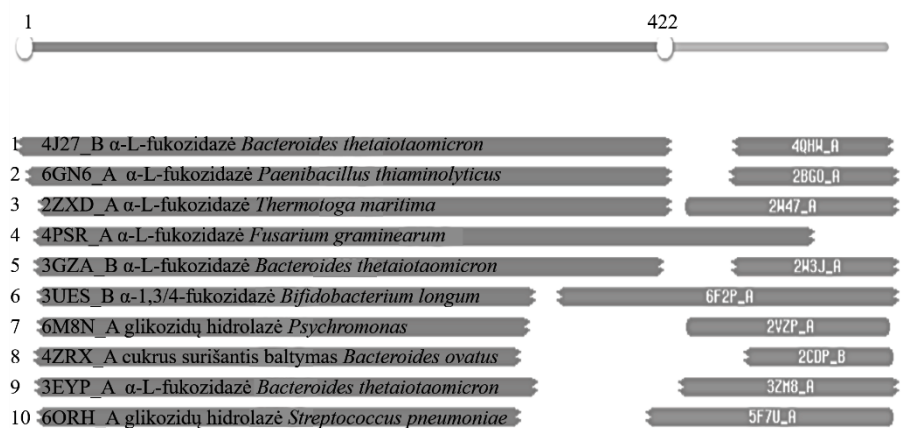
**3.22 pav.**  $\beta$ -D-galaktozidazės selekcija M9 terpėje su  $\beta$ -D-galaktozil-dU kaip vieninteliu uridino šaltiniu. -  $\beta$ -D-gal – ląstelės be galaktozidazės geno, +  $\beta$ -D-gal – su galaktozidazės genu.

### 3.4.2. $\alpha$ -L-Fukozidazių atrankos modelinio metodo kūrimas

Kaip ir galaktozidazių atrankos modeliniame metode, fukozidazių atranka paremta *E. coli* uridino auksotrofo kamieno DH10B  $\Delta$ pyrFEC panaudojimu, substratu naudojant  $\alpha$ -L-fukozildeoksiuridiną. Jei į M9 mineralinę terpę įdedamas fukoziluridinas kaip vienintelis uridino šaltinis, tai augs tik klonai, kuriuose yra fukozidazės genas ir vyksta šio geno raiška. Atrankai reikalingo substrato rinkoje nėra, tai pirmiausia reikėjo atlikti fukozilnukleozido sintezę. Deja, bet fukozidazių prieinamumas irgi yra labai mažas, o patys fermentai be galo brangūs ar nepakankamo aktyvumo. Dėl šių priežasčių  $\alpha$ -L-fukozidazė buvo klonuota ir gryninta Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje (Biochemijos institutas, GMC, VU). Fukozidazių paieškai buvo pasinaudota galimybe bioinformatiniais metodais patyrinėti metagenominę DNR, išskirtą iš Kuršių marių vandenių mikroorganizmų. Genominę DNR išskirta ir naujos kartos sekoskaita buvo atlikta kolegų iš Klaipėdos universiteto Jūrų tyrimų instituto. Pagal sekų homologus NCBI duomenų bazėje buvo pasirinktos keturios fukozidazės. Parinkus pradmenis, šios fukozidazės buvo sėkmingai klonuotos į pLATE31 vektorius. Ištyrus genų raišką *E. coli* ląstelėse, nustatyta, kad viena iš keturių glikozidazių – 62Fuc1 – hidrolizavo chromogeninį substratą  $\alpha$ -L-fukopiranozidą (aktyvumui įvertinti buvo naudoti *p*-nitrofenolio  $\alpha$ -L-fukopiranozidas ir  $\beta$ -D-fukopiranozidas). Šis fermentas buvo plačiau panagrinėtas ir panaudotas biokatalizatoriumi fukozilnukleozido sintezės reakcijoje. Kitų fukozidazių tolimesni sėkmingi tyrimai buvo atlikti MMB (BCHI, GMC, VU) skyriaus darbuotojų ir šiame darbe nebus aptarti.

### 3.4.3. 62Fuc1 sekos analizė

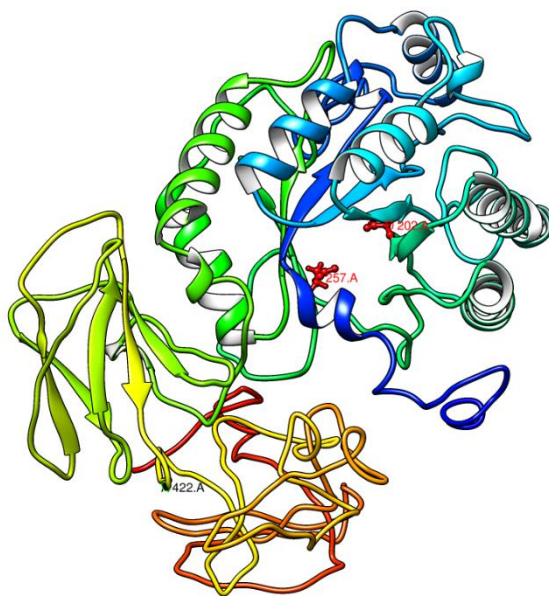
62Fuc1 yra 569 amino rūgščių polipeptidas (64 kDa). Remiantis HHPred analize, 62Fuc1 fukozidazės artimiausias homologas (identiškas 27%) yra  $\alpha$ -L-fukozidazė iš *Bacteroides thetaiotaomicron* (PDB 4J27), priklausanti GH29 glikozidazių šeimai.  $\alpha$ -L-fukozidazė iš *Bacteroides thetaiotaomicron* yra 450 amino rūgščių polipeptidas, kurios tretinė struktūra sudaryta iš dviejų identiškų polipeptidinių grandinių. Palyginus homologiškų baltymų sekas, analizuojama 62Fuc1 fukozidazė turi daugiau negu 100 amino rūgščių ilgesnę C galinės srities seką (3.23 pav.).



**3.23 pav.** 62Fuc1 vizualus sekų ilgių ir homologijos palyginys.

62Fuc1 fukozidazės 1–422 amino rūgščių seka (3.24 pav.) yra homologiška *Bacteroides thetaiotaomicron* fukozidazei, tuo tarpu C galinės srities 465–569 a. r. seka artima (identiškas tik 10%) galaktozės surišančio domeno sekai (PDB 4QHW).





**3.25 pav.** 62Fuc1 polipeptidinės grandinės A modelis (modeliuota I-Tasser). C galinė sritis pažymėta geltona ir raudona spalvomis. Galimai katalizinės amino rūgštys yra aspartatas 202 ir glutamatas 257 (D202 ir E257 pažymėti raudonai).

Detaliau struktūros modelis nenagrinėtas, o vertintos fermento katalizinės savybės, aprašytos sekančiame skyriuje.

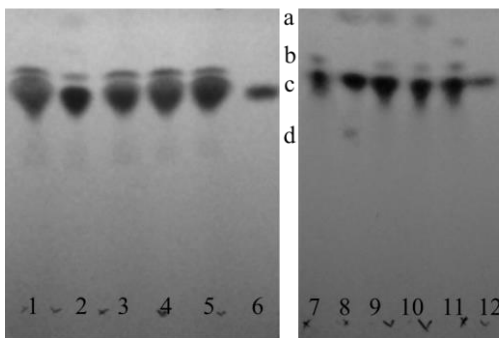
#### 3.4.4. Fukoziideoksiuridino fermentinė sintezė

Remiantis publikacijomis [171] [35] buvo atliktos fukožilinimo reakcijos su įvairiais nukleozidais, fukožilo donoru panaudojant  $\alpha$ -L-fukožilpiranozidą (pNP-Fuc). TLC plokštelėje buvo stebimas kai kurių produktų susidarymas, tačiau reakcijų efektyvumai buvo labai maži. Išėigai pagerinti buvo remtasi tokiomis strategijomis: keisti akceptorius ir donoro santykį, tai yra didinti jų koncentraciją, buferinio tirpalo pH ir temperatūrą. Siekiant padidinti donoro ir akceptorius molinę koncentraciją mišinyje, pirmiausia reikėjo išspręsti *p*-nitrofenilfukopiranozido tirpumo problemą – vandeniame tirpale jo tirpumas yra nepakankamas (~5 mM), bet šis junginys puikiai tirpsta DMSO ir DMF tirpaluose, todėl pirmiausia buvo įvertintas fermento 62Fuc1 jautrumas šioms tirpikliams (3.26 pav.). Iš gautų rezultatų nustatyta, kad 62Fuc1 fukožidazė yra jautri DMF tirpikliui ir jau esant 10% DMF koncentracijai, slopinama pNP-Fuc hidrolizė, o esant 50% jau pilnai blokuojamas fermentinis aktyvumas. DMSO tolerancija yra gerokai didesnė: reakcijos slopinimas stebimas, kai DMSO koncentracija yra 30% ir daugiau,

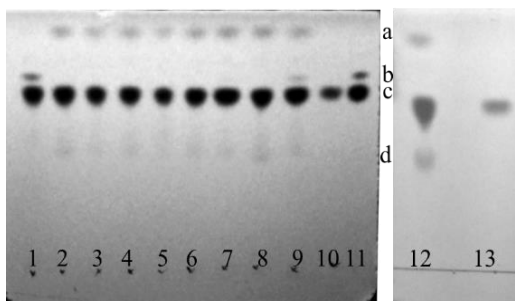
o hidrolizė nebevyksta esant 70% DMSO. Reakcija atlikta mišinyje su 2'-dU ir pNP-Fuc kalio fosfato buferiniame tirpale pH 8,0 (2.2.27 skyrius).

Įvertinus buferinio tirpalo pH įtaką, nustatyta, kad geriausias transglikozilinimo reakcijos efektyvumas stebimas buferiniame tirpale, kurio pH 7,5 (3.27 pav. 12 takas). Fermentinis aktyvumas buvo tikrinamas pH 5,0–9,0 ribose, kaip aprašyta 2.2.28 skyriuje. Taip pat įvertinta temperatūros įtaka – keliant temperatūrą iki 40°C reakcijos efektyvumas nedidėja, o esant 45°C fermento hidrolizinis aktyvumas mažėja (3.27 pav.). Taigi, išlaikant donoro ir akceptorius santykį 3:1, reagentų koncentracija reakcijos mišinyje padidinta iki 120 mM akceptorius ir 40 mM donoro. Inkubacijos laiko ilginimas šiuo atveju nėra tikslingas, kadangi pats produktas yra tuo pačiu ir substratas, kas greičiausiai mažintų išeigą.

Atlikus 2'-deoksiuridino fukozilo grupės prijungimo reakciją, produktas n-O-fukozil-dU grynintas atvirksčių fazių C18 kolonėlės pagalba, naudojant „AKTApurifier“ sistemą. Produktai išskirstomi naudojant vandens – 50% metanolio mišinį (10 kolonos tūrių 0–100% gradiente). Produktų atskyrimui procesas kartotas kelis kartus. Išgrynintas produktas analizuotas TLC ir



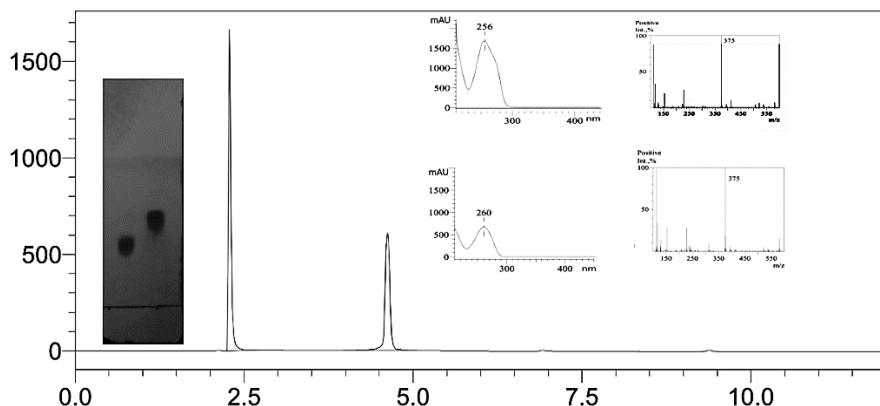
**3.26 pav.** DMF ir DMSO įtaka 62FucI aktyvumui. Reakcijos mišinys susideda iš dU ir pNP-Fuc DMF ar DMSO atitinkamai koncentracija reakcijos mišiniuose: **1** ir **7** – kontrolė (reakcijos mišinys be fermento, su 70% tirpiklio), **2, 8** – 10%, **3, 9** – 30%, **4, 10** – 50%, **5, 11** – 70%, **6, 12** – dU. **a** – pNP, **b** – pNP-Fuc, **c** – dU, **d** – Fukozil-dU.



**3.27 pav.** pH įtakos 62FucI fukozidazei vertinimas. **1** – pH 5,0, **2** – pH 6,0, **3** – pH 7,0, **4** – pH 8,0, **5** – pH 9,0, **6 – 8** pH8,0, 40°C, 62FucI fermento kiekiai 1x, , ½ x, 2x atitinkamai, **9** – pH 8,0 45°C, **10** – dU, **11** – kontrolė – reakcijos mišinys be fermento, **12** – pH 7,5, **13** – dU (kontrolė). **a** – pNP, **b** – pNP-Fuc, **c** – dU, **d** – produktas n-



HPLC-MC metodais (3.28 pav.). TLC plokštelėje matomas vienas produktas, tuo tarpu HPLC-MC matomos dvi smailės su vienoda 374 g/mol moline mase, kas atitinka apskaičiuotą monofukozildeoksiuridino molinę masę.



**3.28 pav.** Išgryninto fukozil-dU HPLC-MC analizė. Abi smailės atitinka 374 molinę masę. TLC- plokštelėje matoma viena dėmė: **1**- fukozil-dU, **2** –dU (kontrolė).

Taigi reakcijos produktai greičiausiai yra du – 5'- ir 3'-O-fukozil-2'-deoksiuridiniai.

Kitos fukozilinimo reakcijos su įvairiais akceptoriais buvo atliktos kalio fosfato buferiniame tirpale pH 7,5, 37 °C temperatūroje, išlaikant 3:1 molinį santykį tarp akceptorius ir pNP-Fuc (2.2.29 skyrius). Gauti rezultatai pateikti 3.5 lentelėje. Produktai buvo detektuojami TLC ir HPLC-MS. HPLC-MS spektrai pateikti priede 6P–7P paveiksluose.

**3.5 lentelė.** Fukozilo grupės prijungimas prie įvairių organinių junginių.

| Akceptorius                      | Produktų susidarymas |
|----------------------------------|----------------------|
| <b>U</b>                         | taip                 |
| <b>2',3'-ddU</b>                 | nedetektuotas        |
| <b>2',5'-ddU</b>                 | Labai mažas kiekis   |
| <b>2'dC</b>                      | nedetektuotas        |
| <b>X-gal</b>                     | taip                 |
| <b>Metil-α-L-fukopiranozidas</b> | nedetektuotas        |
| <b>IPTG</b>                      | nedetektuotas        |
| <b>pNP-Fuc</b>                   | taip                 |
| <b>oNP-Gal</b>                   | nedetektuotas        |

Atlikus analizę, paaiškėjo, kad 62Fuc1 fukozidazė katalizuoja glikozilo pernašos reakciją ant uridino ir 2'-deoksiuridino, bet ne ant 2'dC ir 2',3'-ddU.

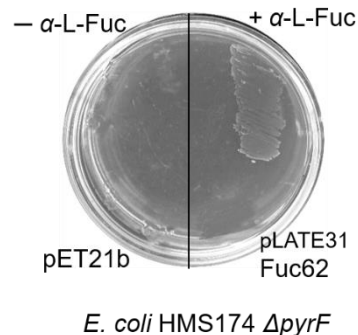
2',5'-ddU glikozilinio reakcijoje susidariusio produkto kiekis yra labai mažas. Fukozilo grupės pernaša taip pat vykdoma ant X-Gal ir pNP-Fuc, bet ne ant metil- $\alpha$ -L-fukopiranozido, IPTG ar oNP-Gal.

### 3.4.5. 62Fuc1 fukozidazės geno raiškos patikra

62Fuc1 raiška *in vivo* buvo patikrinta selektyvioje agarizuotoje M9 terpėje su pagamintu fukozildeoksiuridinu. *E. coli* HMS174  $\Delta$ pyrFEC ląstelės transformuotos plazmidėmis pLATE31-62Fuc1 (su fukozidaze) ir pET21b (be fukozidazės, kaip kontrolė) inkubuotos M9 terpėje su fukozil-dU kaip vieninteliu uridino šaltiniu 37 °C temperatūroje. Silpnas klonų augimas buvo stebimas tik po 4 parų (3.29 pav.).

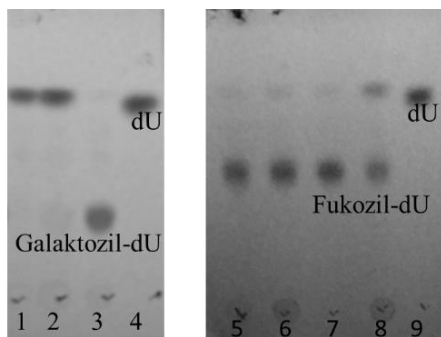
Silpno augimo priežastys gali būti susijusios su nepakankama 62Fuc1 geno raiška arba dėl apsunkinto substrato patekimo į ląsteles iš mitybinės terpės. Iš raiškos sąlygų tyrimų yra žinoma, kad 62Fuc1 ekspresija *E. coli* HMS174 kamiene yra labai silpna. Dėl to 62Fuc1 genas buvo klonuotas į pUC19 vektorių (apimant numanomo natyvaus promotoriaus sritį), šia plazmide transformuotos kompetentinės *E. coli* DH10B  $\Delta$ pyrFEC ląstelės ir 62Fuc1 geno raiška patikrinta selektyvioje M9 terpėje su fukozil-dU. Deja, bet klonų augimas nebuvo stebimas (duomenys neparodyti).

Siekiant nustatyti silpno augimo priežastį, *E. coli* HMS174  $\Delta$ pyrFEC/pLATE31-62Fuc1 (fukozidazės raiškos patikrai) ir DH10B  $\Delta$ pyrFEC/pUC19 (galaktozidazės raiškos patikrai) ląstelės buvo kultivuotos, indukuota glikozidazių genų raiška ir analizuotos galaktozil-dU ir fukozil-dU hidrolizės reakcijos produktai ardytų ultragarsu ir neardytų ląstelių reakcijos mišiniuose (3.30 pav.).



**3.29 pav.** 62Fuc1 fukozidazės selekcija M9 terpėje su  $\alpha$ -L-fukozil-dU kaip vieninteliu uridino šaltiniu. -  $\alpha$ -L-Fuc – ląstelės be fukozidazės geno, +  $\alpha$ -L-Fuc – su fukozidazės genu.

Tokiu būdu norėta patikrinti, ar ląstelėse tiesiog nevyksta geno raiška, ar fukozil-dU substratas nepatenka į ląsteles ir dėl to ląstelių kolonijos neauga. Buvo iškelta prielaida, kad jei substratas nepatenka į ląsteles, tai hidrolizės produktus turėtume matyti tik suardytų ląstelių frakcijoje, o jei vyksta silpna glikozidazių genų raiška, tai substratų hidrolizė turėtų lėtai vykti tiek ardytų, tiek neardytų ląstelių frakcijose. Atlikus TLC analizę, paaiškėjo, kad galaktozidazė hidrolizuoja Gal-



**3.30 pav.** Galaktozil-dU hidrolizė: **1** – pUC19 neardytos ląstelės, **2**- pUC19 ardytos ląstelės, **3**- pET21b ląstelės (kontrolė), **4** ir **9** – dU; fukozil-dU hidrolizė: **5** – pET21b neardytos, **6** – pET21b ardytos ląstelės, **7** – pLATE31-62Fuc1 neardytos, **8** – pLATE31-62Fuc1 ardytos UG ląstelės.

dU (**1** ir **2** takas) mišiniuose tiek su ardytomis, tiek su neardytomis ląstelėmis. Tuo tarpu fukozidazė labai silpnai hidrolizuoja Fuc-dU suardžius ląsteles (**8** takas), o mėginyje su neardytomis ląstelėmis hidrolizė iš vis nevyksta (**7** takas). Iš hidrolizės analizės rezultatų galima daryti išvadą, kad 62Fuc1 geno raiška pLATE31 vektoriuje HMS174  $\Delta pyrFEC$  kamiene yra labai silpna, nes po 2 val inkubacijos tik nedidelė fukozil-dU substrato dalis yra hidrolizuojama ardytų ląstelių frakcijoje. Kai tuo tarpu galaktozidazė pilnai hidrolizuoja galaktozil-dU tomis pačiomis sąlygomis. Fuc-dU substrato patekimas į ląsteles taip pat yra apsunkintas. Jei vyktų aktyvus Fuc-dU substrato transportas į ląsteles, stebėtume substrato dėmės intensyvumo mažėjimą, bet gauti rezultatai to neparodė.

### 3.5. Rezultatų apibendrinimas

Šio darbo metu sukurti ir patikrinti du selektyvios atrankos metodai, skirti esterazių ir amidohidrolazių atrankai iš metagenominių bibliotekų, bei parodytas modelinis glikozidazių atrankos metodas.

Sukurtas esterazių atrankos metodas yra greitas, didelio našumo ir patogus naudoti. Iš 30 klonų, atrinktų panaudojus acetil- ar heksanoil-uridinių substratus, tik 14 klonų formavo tributirino hidrolizės zonas, o atrinkti naudojant substratą tributiriną Tb7\_1T ir Tb10\_7T klonai nehidrolizavo modifikuotų uridino esterių. Selektiviai atrankai reikalingas substrato kiekis (1–2 mg/100 ml terpės) yra tūkstantį kartų mažesnis lyginant su naudojamu

tributirino kiekiu (1g/100 ml terpės), o selektyviai atrinktų klonų gauta dvigubai daugiau. Tai rodo, kad sukurtas selektyvus metodas yra jautresnis. Be to patikrinamų klonų kiekis viename procese yra bent trim eilėm didesnis.

Šiuo metodu atrenkamos esterazės yra labai įvairios savo sekomis ir katalizinėmis savybėmis. Išanalizavus baltymų sekas ir atlikus filogenetinę jų analizę, paaiškėjo, kad atrinktos esterazės priklauso net 8 fermentų superšeimoms. Dešimties esterazių sekų artimiausi homologai priskiriami hipotetiniams baltymams, trys iš atrinktų fermentų priklauso glikozidų hidrolazių, *N*-acetiltransferazių ar DUF998 šeimoms. Literatūroje nėra duomenų, kad klasikiniiais atrankos metodais ieškant esterazių ar lipazių būtų rasta šių šeimos atstovų. Tai įrodo, kad metodas tinka ir fermentų su nežinomu esteraziniu aktyvumu paieškai.

Darbo metu įvykdyta 27 atrinktų esterazių genų raiška *E. coli* ląstelėse, išgryninti aktyvūs fermentai, bei patikrintas jų aktyvumas ir savitumas substratams, panaudojus pNP acetatą, butiratą, valeratą, dekanatą, palmitatą ir stearatą. Nustatyta, kad dalis surastų fermentų pasižymi ne tik esteraziniu, bet taip pat laktamaziniu ir amidaziniu aktyvumais, bei pasižymi regio- ir stereo-savitaisiais aktyvumais. Esterazių atrankoje panaudojus acetiluridiną, atrinkti fermentai, efektyviau hidrolizuojantys pNP trumpų grandinių esterius, o heksanoiluridiną, rasti fermentai, gebantys hidrolizuoti ilgesnių grandinių esterius. Šie rezultatai parodė, kad substrato esterio grupė, naudojama atrankai, bent iš dalies lėmė pasirinkto fermentų specifiškumą.

Sukurtas amidohidrolazių atrankos metodas leidžia greitai atrinkti unikalius fermentus tokius kaip D8\_RL amidohidrolazę, pažymintį labai plačiu substratų spektru, ar MO13\_Est631 (MO13\_Est537) katalizuojančią PET komponentų hidrolizę. Darbo metu vykdyta 8 atrinktų amidohidrolazių genų raiška *E. coli* ląstelėse, išgryninti 7 fermentai. Nustatyta, kad dalis surastų fermentų pasižymi amidohidrolaziniu, esteraziniu, o keletas iš jų ir laktamaziniu aktyvumais, kai kurie taip pat pasižymi regio-savitaisiais aktyvumais (BRM\_Am, D8\_RI). Alifatinių amidų radikalų hidrolizės reakcijose atrinktos amidohidrolazės buvo labiau savitos ilgesnių acilų atžvilgiu, o esterinių jungčių hidrolizės reakcijose buvo stebimas atvirkščias efektas – efektyvesnė trumpų grandinių esterių hidrolizės katalizė. Atrinktų amidohidrolazių substratų spektras leidžia daryti išvadą, kad atrankai naudotas tiek substrato tipas (nukleozidas), tiek substrato šoninės amido grupės dydis (aromatinė grupė) bent iš dalies nulemia atrinktų fermentų biokatalizines savybes – atrinkti fermentai hidrolizavo nukleozidų amidus, bet

ne heterociklinių bazių amidus, išskyrus D8\_RL hidrolazę, ir parodė didesnę savitumą aromatinių grupių pakaitams.

Glikozidazių atrankos modelinio metodo rezultatai parodė, kad principinė metodo schema gali būti taikoma glikozidazių atrankai. Darbo eigoje susidurta su dviejų tipų problemomis – maža substrato sintezės išeiga ir nepakankama fukozidazės geno raiška. Esant gerai geno raiškai (LacZ galaktozidazė), uridino auktrofo požymio kompensavimas *in vivo* yra stebimas, o kai geno raiška silpna (62Fuc1 fukozidazė), tai kolonijų augimas yra pernelyg lėtas. Siekiant padidinti glikozidazių atrankos efektyvumą reikia ieškoti geresnių fermento raiškos sąlygų, o efektyviai fukoilnukleozidų sintezei reakcijos pusiausvyrą paslinkti produkto sintezės, o ne hidrolizės kryptimi. Galimas sprendimo būdas yra 62Fuc1 mutagenezė (atsitiktinė arba tikslinė) ir patobulintų variantų atranka. Tai pat literatūroje yra duomenų [172] [173], kad pakeitus fukozidazės katalizinį nukleofilą, prarandamas hidrolizinis aktyvumas ir fukozidazė virsta fukosintaze.

Šio darbo metu atrinkti fermentai turi potencialų panaudojimą įvairiuose srityse – nukleozidų modifikacijos reakcijose, vykdant stereoselektyvias, regioselektyvias sintezes. Atrinkta unikali amidohidrolazė D8\_RL, kaip ir YqfB, turi ir industrinį, ir mokslinį susidomėjimą, nes ASCH domenų turinčių fermentų funkcijos dar yra labai menkai ištirtos, be to abu fermentai pasižymi puikiomis biokatalizinėmis savybėmis. 1315H esterazė gali būti panaudota kaip inkarinis membraninis baltymas, o MO13\_Est537 turi panaudojimo potencialą PET perdirbimo srityje. Mutagenezės pagalba galima būtų sukurti MO13\_Est537 mutantų biblioteką ir ją patikrinti selektyvios atrankos metodu vietoj  $N^4$ -benzoil-2'-deoksicitidino panaudojant struktūriškai artimesnę PET monomerams substratą.

Didelį potencialą panaudojimui įvairiose chemofermentinėse sintezėse turi ir plataus substratų spektro esterazės ir amidohidrolazės SVG1, BRM\_Am, D8\_RL, MO13Est537, bei enantioselektyvios esterazės 24T1, 30T1, 30T2, SVG3, SVG1, 1315H.

Didelis nukleozidų kaip substratų panaudojimo atrankoms privalumas yra tame, kad keičiant substrato acilo pakaitų grupes, galima atrinkti įvairius pageidaujamus fermentus. Šio metodo principą galima būtų pritaikyti ir kitų hidrolazių, pavyzdžiui nukleozidų/nukleotidų hidrolazių, atrankoms. Taip pat šios selektyvios atrankos turi potencialą plėstis, panaudojant kitų biosintezės kelių auktrofo mutantus bei atitinkamus nukleozidus, nukleotidus ar heterociklinių bazių darinius, arba yra galimi metodų variantai paremti išgyvenimą sąlygojančių junginių sintezės, o ne hidrolizės principu.

## IŠVADOS

1. Sukurti selektyvios atrankos metodai, panaudojant uracilo auksotrofo *E. coli* kamieną bei sintetinius uridino esterius ar amidus, leidžia atrinkti iš metagenominių bibliotekų fermentus, pasižyminčius įvairaus atrankumo hidroliziniiais aktyvumais ir priklausančius skirtingoms hidrolazių šeimoms.
2. Sukurtas esterazių atrankos metodas lyginat su klasikiniu tributirino metodu yra jautresnis. Atrankai naudojamo substrato kiekis yra  $10^3$  kartų mažesnis, o fermentų atrenkama dvigubai daugiau.
3. Atrinktos esterazės priklauso septynioms, o amidohidrolazės – keturioms fermentų šeimoms. Fermentai pasižymi skirtingu atrankumu tirtiems substratams.
4. Esterazių ir amidohidrolazių metodai leidžia atrinkti fermentus su nežinomu ar nenustatytu aktyvumu. 50% atrinkų esterazių artimiausi homologai yra hipotetiniai baltymai arba su iki šiol nenustatytu esteraziniu aktyvumu, o amidohidrolazių atrankos metu rastos unikalios amidohidrolazės D8\_R1 ir MO13\_Est537.
5. Atrankoms naudojamas tiek substratas, tiek substrato pakaito grupė lemia atrenkamų fermentų savitumą hidrolizuojamiems substratams reakcijose *in vitro*.
6. Metagenominė 62Fuc1 fukozidazė yra  $\alpha$ -L-fukozidazė, katalizuojanti transglikozilinimo reakciją, kai akceptorius yra (deoksi)uridinas, o glikozilo pakaito donoras – *p*-nitrofenol- $\alpha$ -L-fukopiranozidas.
7. Parodytas glikozidazių atrankos metodo principas, panaudojant uracilo auksotrofo *E. coli* kamieną bei *O*-glikozilų deoksiuridinus, gali būti taikomas glikozidazių atrankai iš metagenomų.

## PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

### Paskelbti straipsniai

1. **Urbelienė, N.**; Kutanovas, S.; Meškienė, R.; Gasparavičiūtė, R.; Tauraitė, D.; Koplūnaitė, M.; Meškys, R. Application of the uridine auxotrophic host and synthetic nucleosides for a rapid selection of hydrolases from metagenomic libraries. *Microbial Biotechnology*, 2019, 12, 148–160, doi:10.1111/1751-7915.13316.
2. Stanislauskienė, R.; Laurynėnas, A.; Rutkienė, R.; Aučynaitė, A.; Tauraitė, D.; Meškienė, R.; **Urbelienė, N.**; Kaupinis, A.; Valius, M.; Kaliniene, L., Meškys, R. YqfB protein from *Escherichia coli*: an atypical amidohydrolase active towards N<sup>4</sup>-acylcytosine derivatives. *Scientific Reports*, 2020, 10, 788, doi:10.1038/s41598-020-57664-w.
3. **Urbelienė, N.**; Meškienė, R.; Tiškus, M.; Stanislauskienė, R.; Aučynaitė, A.; Laurynėnas, A.; Meškys, R. A rapid method for the selection of amidohydrolases from metagenomic libraries by applying synthetic nucleosides and a uridine auxotrophic host. *Catalysts*, 2020, 10, 445, doi:10.3390/catal10040445.

### Pranešimai disertacijos tema

1. N. Urbelienė, S. Kutanovas, R. Meškienė, R. Gasparavičiūtė, D. Tauraitė, R. Meškys. The use of the auxotrophic host and synthetic nucleosides for a rapid selection of hydrolases from metagenomic libraries. *BioCat*, August 26-30, 2018, Hamburg, Germany.
2. N. Urbelienė; R. Meškienė; E. Gustaitė; R. Meškys. Application of *E. coli* auxotrophic host and synthetic nucleosides for a selection of hydrolases from metagenomic libraries. COINS 2019 - 14th international conference of life sciences, February 26-28, 2019, Vilnius, Lithuania.

## PADĖKA

Norėčiau padėkoti darbo vadovui prof. dr. Rolandui Meškiui už suteiktą galimybę atlikti šį darbą ir už visokeriopą pagalbą mano doktorantūros studijų metu. Taip pat esu dėkinga visiems Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus darbuotojams ir studentams. Ypač norėčiau padėkoti Ritai Meškienei ir dr. Renatai Gasparavičiūtei už paruoštas metagenomines bibliotekas, dr. Daivai Tauraitei už daugelio substratų sintezes, dr. Aurelijai Samuilovienei, dr. Mindaugui Žiliui iš Jūrų tyrimų instituto, Klaipėdos universiteto už Kuršių marių vandenų genominę DNR ir dr. Rūtai Stanislauskienei už fukozidazes, dr. Agotai Aučynaitei ir Justui Vaitekūnui už sukonstruotus auksotrofų kamienus, dr. Simonui Kutanovui už mokymą ir pagalbą pirmaisiais metais, dr. Jevgenijai Jakubovskai, dr. Audriui Laurynėnui, studentams Eglei Gustaitei ir Matui Tiškui, , dr. Jonitai Stankevičiūtei, dr. Vidai Časaitei ir dr. Mikui Sadauskui už pagalbą ruošiant šį darbą, dr. Laurai Kalinienei už straipsnių redagavimą, didelis ačiū laborantėms Virginijai Dzekevičienei, Linai Juškienei ir Nijolei Uždavinienei.

Atskirai už palaikymą norėčiau padėkoti sutuoktiniui Gintarui Urbeliui ir mylimoms dukrytėms, šeimos nariams ir draugams, bei buvusiems kolegoms iš Thermo Fisher Scientific kompanijos už nenutrūkusią draugystę.



## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Sanchez, S.; Demain, A.L. Chapter 1 - Useful microbial enzymes—an introduction. In *Biotechnology of Microbial Enzymes*; Brahmachari, G., Ed.; Academic Press, 2017; pp. 1–11 ISBN 978-0-12-803725-6.
2. Arbige, M.V.; Shetty, J.K.; Chotani, G.K. Industrial enzymology: the next chapter. *Trends in Biotechnology* **2019**, *37*, 1355–1366, doi:10.1016/j.tibtech.2019.09.010.
3. National Research Council. 2007. The New science of metagenomics: Revealing the secrets of our microbial planet. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/11902>.
4. Locey, K.J.; Lennon, J.T. Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113*, 5970–5975, doi:10.1073/pnas.1521291113.
5. Nguyen, T.M.; Seo, C.; Ji, M.; Paik, M.-J.; Myung, S.-W.; Kim, J. Effective soil extraction method for cultivating previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **2018**, *84*, 14.
6. Colin, P.-Y.; Kintsès, B.; Gielen, F.; Miton, C.M.; Fischer, G.; Mohamed, M.F.; Hyvönen, M.; Morgavi, D.P.; Janssen, D.B.; Hollfelder, F. Ultrahigh-throughput discovery of promiscuous enzymes by picodroplet functional metagenomics. *Nat Commun* **2015**, *6*, 10008, doi:10.1038/ncomms10008.
7. Bornscheuer, U.T. The fourth wave of biocatalysis is approaching. *Phil. Trans. R. Soc. A* **2018**, *376*, 20170063, doi:10.1098/rsta.2017.0063.
8. Lorenz, P.; Eck, J. Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology* **2005**, *3*, 510, doi:10.1038/nrmicro1161.
9. Martínez-Martínez, M.; Bargiela, R.; Ferrer, M. Chapter 7 - Metagenomics and the search for industrial enzymes. In *Biotechnology of Microbial Enzymes*; Brahmachari, G., Ed.; Academic Press, 2017; pp. 167–184 ISBN 978-0-12-803725-6.
10. Carvalho, C.C.C.R. de Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry. *Microbial Biotechnology* **2017**, *10*, 250–263, doi:10.1111/1751-7915.12363.
11. Colin, P.-Y.; Kintsès, B.; Gielen, F.; Miton, C.M.; Fischer, G.; Mohamed, M.F.; Hyvönen, M.; Morgavi, D.P.; Janssen, D.B.; Hollfelder, F. Ultrahigh-throughput discovery of promiscuous enzymes by picodroplet functional metagenomics. *Nature Communications* **2015**, *6*, doi:10.1038/ncomms10008.

12. Webb, E.C. Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. *Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*. **1992**.
13. Javed, S.; Azeem, F.; Hussain, S.; Rasul, I.; Siddique, M.H.; Riaz, M.; Afzal, M.; Kouser, A.; Nadeem, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **2018**, *132*, 23–34, doi:10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014.
14. Wenda, S.; Illner, S.; Mell, A.; Kragl, U. Industrial biotechnology—the future of green chemistry? *Green Chemistry* **2011**, *13*, 3007, doi:10.1039/c1gc15579b.
15. Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* **2006**, *39*, 235–251, doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.
16. Rajendran, A.; Palanisamy, A.; Thangavelu, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2009**, *52*, 207–219, doi:10.1590/S1516-89132009000100026.
17. Borrelli, G.M.; Trono, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16*, 20774–20840, doi:10.3390/ijms160920774.
18. Filho, D.G.; Silva, A.G.; Guidini, C.Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **2019**, *103*, 7399–7423, doi:10.1007/s00253-019-10027-6.
19. Anobom, C.D.; Pinheiro, A.S.; De-Andrade, R.A.; Agueiras, E.C.G.; Andrade, G.C.; Moura, M.V.; Almeida, R.V.; Freire, D.M. From structure to catalysis: Recent developments in the biotechnological applications of lipases. *BioMed Research International* **2014**, *2014*, 1–11, doi:10.1155/2014/684506.
20. Yoshida, S.; Hiraga, K.; Takehana, T.; Taniguchi, I.; Yamaji, H.; Maeda, Y.; Toyohara, K.; Miyamoto, K.; Kimura, Y.; Oda, K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* **2016**, *351*, 1196–1199, doi:10.1126/science.aad6359.
21. Tournier, V.; Topham, C.M.; Gilles, A.; David, B.; Folgoas, C.; Moya-Leclair, E.; Kamionka, E.; Desrousseaux, M.-L.; Texier, H.; Gavalda,

- S.; et al. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature* **2020**, *580*, 216–219, doi:10.1038/s41586-020-2149-4.
22. Buchholz, K. A breakthrough in enzyme technology to fight penicillin resistance—industrial application of penicillin amidase. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2016**, *100*, 3825–3839, doi:10.1007/s00253-016-7399-6.
  23. Mehta, P.K.; Bhatia, S.K.; Bhatia, R.K.; Bhalla, T.C. Bench scale production of nicotinic acid using a versatile amide-hydrolysing *Geobacillus subterraneus* RL-2a isolated from thermal spring of Manikaran, India. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, *105*, 58–65, doi:10.1016/j.molcatb.2014.04.001.
  24. Tang, X.-L.; Jin, J.-Q.; Wu, Z.-M.; Jin, L.-Q.; Zheng, R.-C.; Zheng, Y.-G. Structure-based engineering of amidase from *Pantoea* sp. for Efficient 2-chloronicotinic Acid biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e02471-18, doi:10.1128/AEM.02471-18.
  25. Kang, X.-M.; Zhang, X.-J.; Hong, L.-L.; Peng, F.; Liu, Z.-Q.; Zheng, Y.-G. Establishment of a novel high-throughput screening method for the detection and quantification of L-phosphinothricin produced by a biosynthesis approach. *Process Biochemistry* **2019**, *76*, 136–141, doi:10.1016/j.procbio.2018.10.015.
  26. Ghonemy, D.H.E. Microbial amidases and their industrial applications: A Review. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis* **2015**, *04*, doi:10.4172/2161-0703.1000173.
  27. Sharma, M.; Sharma, N.N.; Bhalla, T.C. Amidases: versatile enzymes in nature. *Rev Environ Sci Biotechnol* **2009**, *8*, 343, doi:10.1007/s11157-009-9175-x.
  28. Yamada, H.; Kobayashi, M. Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1996**, *60*, 1391–1400, doi:10.1271/bbb.60.1391.
  29. Nagasawa, T.; Mathew, C.D.; Mauger, J.; Yamada, H. Nitrile hydratase-catalyzed production of nicotinamide from 3-cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1766–1769.
  30. Bateman, A.; Coggill, P.; Finn, R.D. DUFs: families in search of function. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **2010**, *66*, 1148–1152, doi:10.1107/S1744309110001685.
  31. Aučynaitė, A.; Rutkienė, R.; Gasparavičiūtė, R.; Meškys, R.; Urbonavičius, J. A gene encoding a DUF523 domain protein is

- involved in the conversion of 2-thiouracil into uracil. *Environ Microbiol Rep* **2018**, *10*, 49–56, doi:10.1111/1758-2229.12605.
32. Nasseri, S.A.; Betschart, L.; Opaleva, D.; Rahfeld, P.; Withers, S.G. A Mechanism-based approach to screening metagenomic libraries for discovery of unconventional glycosidases. *Angewandte Chemie* **2018**, *130*, 11529–11534, doi:10.1002/ange.201806792.
  33. Yu, Z.-T.; Chen, C.; Kling, D.E.; Liu, B.; McCoy, J.M.; Merighi, M.; Heidtman, M.; Newburg, D.S. The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology* **2013**, *23*, 169–177, doi:10.1093/glycob/cws138.
  34. Rodríguez-Díaz, J.; Monedero, V.; Yebra, M.J. Utilization of natural fucosylated oligosaccharides by three novel  $\alpha$ -1-fucosidases from a probiotic *Lactobacillus casei* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **2011**, *77*, 703–705, doi:10.1128/AEM.01906-10.
  35. Guzmán-Rodríguez, F.; Alatorre-Santamaría, S.; Gómez-Ruiz, L.; Rodríguez-Serrano, G.; García-Garibay, M.; Cruz-Guerrero, A. Employment of fucosidases for the synthesis of fucosylated oligosaccharides with biological potential. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **2019**, *66*, 172–191, doi:10.1002/bab.1714.
  36. Lenfant, N.; Hotelier, T.; Velluet, E.; Bourne, Y.; Marchot, P.; Chatonnet, A. ESTHER, the database of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. *Nucleic Acids Res* **2013**, *41*, D423–D429, doi:10.1093/nar/gks1154.
  37. Upton, C.; Buckley, J.T. A new family of lipolytic enzymes? *Trends in Biochemical Sciences* **1995**, *20*, 178–179, doi:10.1016/S0968-0004(00)89002-7.
  38. Akoh, C.C.; Lee, G.-C.; Liaw, Y.-C.; Huang, T.-H.; Shaw, J.-F. GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research* **2004**, *43*, 534–552, doi:10.1016/j.plipres.2004.09.002.
  39. Arpigny, J.L.; Jaeger, K.E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* **1999**, *343*, 177–183.
  40. Ferrer, M.; Bargiela, R.; Martínez-Martínez, M.; Mir, J.; Koch, R.; Golyshina, O.V.; Golyshin, P.N. Biodiversity for biocatalysis: A review of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold superfamily of esterases-lipases discovered in metagenomes. *Biocatalysis and Biotransformation* **2015**, *33*, 235–249, doi:10.3109/10242422.2016.1151416.
  41. Sood, S.; Sharma, A.; Sharma, N.; Kanwar, S.S. Carboxylesterases: sources, characterization and broader applications. *Insights in Enzyme Research* **2016**, *1*, doi:10.21767/2573-4466.100002.

42. Bornscheuer, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews* **2002**, *26*, 73–81, doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00599.x.
43. Ollis, D.L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S.M.; Harel, M.; Remington, S.J.; Silman, I.; Schrag, J.; et al. The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection* **1992**, *5*, 197–211, doi:10.1093/protein/5.3.197.
44. Dimitriou, P.S.; Denesyuk, A.; Takahashi, S.; Yamashita, S.; Johnson, M.S.; Nakayama, T.; Denessiouk, K. Alpha/beta-hydrolases: A unique structural motif coordinates catalytic acid residue in 40 protein fold families. *Proteins* **2017**, *85*, 1845–1855, doi:10.1002/prot.25338.
45. Oh, C.; Kim, T.D.; Kim, K.K. Carboxylic ester hydrolases in bacteria: active site, structure, function and application. *Crystals* **2019**, *9*, 597, doi:10.3390/cryst9110597.
46. Nardini, M.; Dijkstra, B.W.  $\alpha/\beta$  Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology* **1999**, *9*, 732–737, doi:10.1016/S0959-440X(99)00037-8.
47. Rauwerdink, A.; Kazlauskas, R.J. How the same core catalytic machinery catalyzes 17 different reactions: the serine-histidine-aspartate catalytic triad of  $\alpha/\beta$ -Hydrolase fold enzymes. *ACS Catalysis* **2015**, *5*, 6153–6176, doi:10.1021/acscatal.5b01539.
48. Suplatov, D.A.; Besenmatter, W.; Švedas, V.K.; Svendsen, A. Bioinformatic analysis of alpha/beta-hydrolase fold enzymes reveals subfamily-specific positions responsible for discrimination of amidase and lipase activities. *Protein Eng Des Sel* **2012**, *25*, 689–697, doi:10.1093/protein/gzs068.
49. Reetz, M.T.; Carballeira, J.D.; Vogel, A. Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 7745–7751, doi:10.1002/anie.200602795.
50. Zha, D.; Wilensek, S.; Hermes, M.; Jaeger, K.-E.-; Reetz, M.T. Complete reversal of enantioselectivity of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Chem. Commun.* **2001**, 2664–2665, doi:10.1039/B109913M.
51. Jochens, H.; Hesseler, M.; Stiba, K.; Padhi, S.K.; Kazlauskas, R.J.; Bornscheuer, U.T. Protein engineering of  $\alpha/\beta$ -Hydrolase fold enzymes. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1508–1517, doi:10.1002/cbic.201000771.
52. Kourist, R.; Jochens, H.; Bartsch, S.; Kuipers, R.; Padhi, S.K.; Gall, M.; Böttcher, D.; Joosten, H.-J.; Bornscheuer, U.T. The  $\alpha/\beta$ -Hydrolase

- fold 3DM database (ABHDB) as a tool for protein engineering. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1635–1643, doi:10.1002/cbic.201000213.
53. Jochens, H.; Stiba, K.; Savile, C.; Fujii, R.; Yu, J.-G.; Gerassenkov, T.; Kazlauskas, R.J.; Bornscheuer, U.T. Converting an esterase into an epoxide hydrolase. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 3532–3535, doi:10.1002/anie.200806276.
54. Yin, D.L. (Tyler); Bernhardt, P.; Morley, K.L.; Jiang, Y.; Cheeseman, J.D.; Purpero, V.; Schrag, J.D.; Kazlauskas, R.J. Switching catalysis from hydrolysis to perhydrolysis in *Pseudomonas fluorescens* esterase. *Biochemistry* **2010**, *49*, 1931–1942, doi:10.1021/bi9021268.
55. Reyes-Duarte, D.; Polaina, J.; López-Cortés, N.; Alcalde, M.; Plou, F.J.; Elborough, K.; Ballesteros, A.; Timmis, K.N.; Golyshin, P.N.; Ferrer, M. Conversion of a carboxylesterase into a triacylglycerol lipase by a random mutation. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 7553–7557, doi:10.1002/anie.200502461.
56. Chen, B.; Cai, Z.; Wu, W.; Huang, Y.; Pleiss, J.; Lin, Z. Morphing activity between structurally similar enzymes: from heme-free bromoperoxidase to lipase. *Biochemistry* **2009**, *48*, 11496–11504, doi:10.1021/bi9014727.
57. Crepin, V.F.; Faulds, C.B.; Connerton, I.F. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2004**, *63*, 647–652, doi:10.1007/s00253-003-1476-3.
58. Dilokpimol, A.; Mäkelä, M.R.; Aguilar-Pontes, M.V.; Benoit-Gelber, I.; Hildén, K.S.; de Vries, R.P. Diversity of fungal feruloyl esterases: updated phylogenetic classification, properties, and industrial applications. *Biotechnology for Biofuels* **2016**, *9*, 231, doi:10.1186/s13068-016-0651-6.
59. Suzuki, K.; Hori, A.; Kawamoto, K.; Thangudu, R.R.; Ishida, T.; Igarashi, K.; Samejima, M.; Yamada, C.; Arakawa, T.; Wakagi, T.; et al. Crystal structure of a feruloyl esterase belonging to the tannase family: A disulfide bond near a catalytic triad. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2014**, *82*, 2857–2867, doi:10.1002/prot.24649.
60. de las Rivas, B.; Rodríguez, H.; Anguita, J.; Muñoz, R. Bacterial tannases: classification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **2019**, *103*, 603–623, doi:10.1007/s00253-018-9519-y.
61. Oliveira, D.M.; Mota, T.R.; Oliva, B.; Segato, F.; Marchiosi, R.; Ferrarese-Filho, O.; Faulds, C.B.; dos Santos, W.D. Feruloyl esterases: Biocatalysts to overcome biomass recalcitrance and for the production

- of bioactive compounds. *Bioresource Technology* **2019**, 278, 408–423, doi:10.1016/j.biortech.2019.01.064.
62. Taniguchi, I.; Yoshida, S.; Hiraga, K.; Miyamoto, K.; Kimura, Y.; Oda, K. Biodegradation of PET: Current status and application aspects. *ACS Catalysis* **2019**, 9, 4089–4105, doi:10.1021/acscatal.8b05171.
63. Kawai, F.; Kawabata, T.; Oda, M. Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2019**, 103, 4253–4268, doi:10.1007/s00253-019-09717-y.
64. Palm, G.J.; Reisky, L.; Böttcher, D.; Müller, H.; Michels, E.A.P.; Walczak, M.C.; Berndt, L.; Weiss, M.S.; Bornscheuer, U.T.; Weber, G. Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate. *Nature Communications* **2019**, 10, doi:10.1038/s41467-019-09326-3.
65. Leščić Ašler, I.; Štefanić, Z.; Maršavelski, A.; Vianello, R.; Kojić-Prodić, B. Catalytic dyad in the SGNH hydrolase superfamily: In-depth insight into structural parameters tuning the catalytic process of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *ACS Chem. Biol.* **2017**, 12, 1928–1936, doi:10.1021/acscchembio.6b01140.
66. Mølgaard, A.; Kauppinen, S.; Larsen, S. Rhamnogalacturonan acetyltransferase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure* **2000**, 8, 373–383, doi:10.1016/S0969-2126(00)00118-0.
67. Yu, T.; Ding, J.; Zheng, Q.; Han, N.; Yu, J.; Yang, Y.; Li, J.; Mu, Y.; Wu, Q.; Huang, Z. Identification and characterization of a new alkaline SGNH hydrolase from a thermophilic bacterium *Bacillus* sp. K91. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, 26, 730–738, doi:10.4014/jmb.1507.07101.
68. Hwang, B.-Y.; Oh, J.-M.; Kim, J.; Kim, B.-G. Pro-antibiotic substrates for the identification of enantioselective hydrolases. *Biotechnol. Lett.* **2006**, 28, 1181–1185, doi:10.1007/s10529-006-9069-8.
69. Bielen, A.; Četković, H.; Long, P.F.; Schwab, H.; Abramić, M.; Vujaklija, D. The SGNH-hydrolase of *Streptomyces coelicolor* has (aryl)esterase and a true lipase activity. *Biochimie* **2009**, 91, 390–400, doi:10.1016/j.biochi.2008.10.018.
70. Kikuta, Y.; Yamada, G.; Mitsumori, T.; Takeuchi, T.; Nakayama, K.; Katsuda, Y.; Hatanaka, A.; Matsuda, K. Requirement of catalytic-triad and related amino acids for the acyltransferase activity of *Tanacetum cinerariifolium* GDSL lipase/esterase TcGLIP for ester-bond

- formation in pyrethrin biosynthesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2013**, *77*, 1822–1825, doi:10.1271/bbb.130143.
71. Sheffield, P.J.; McMullen, T.W.P.; Li, J.; Ho, Y.-S.; Garrard, S.M.; Derewenda, U.; Derewenda, Z.S. Preparation and crystal structure of the recombinant  $\alpha 1/\alpha 2$  catalytic heterodimer of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase Ib. *Protein Eng Des Sel* **2001**, *14*, 513–519, doi:10.1093/protein/14.7.513.
  72. Rosenthal, P.B.; Zhang, X.; Formanowski, F.; Fitz, W.; Wong, C.-H.; Meier-Ewert, H.; Skehel, J.J.; Wiley, D.C. Structure of the haemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein of influenza C virus. *Nature* **1998**, *396*, 92–96, doi:10.1038/23974.
  73. Lo, Y.-C.; Lin, S.-C.; Shaw, J.-F.; Liaw, Y.-C. Crystal Structure of *Escherichia coli* thioesterase I/protease I/lysophospholipase L1: consensus sequence blocks constitute the catalytic center of SGNH-hydrolases through a conserved hydrogen bond network. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *330*, 539–551, doi:10.1016/S0022-2836(03)00637-5.
  74. Swarbrick, C.M.D.; Nanson, J.D.; Patterson, E.I.; Forwood, J.K. Structure, function, and regulation of thioesterases. *Progress in Lipid Research* **2020**, *79*, 101036, doi:10.1016/j.plipres.2020.101036.
  75. Fournand, D.; Arnaud, A. Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity. *Journal of Applied Microbiology* **2001**, *91*, 381–393, doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01378.x.
  76. Pace, H.C.; Brenner, C. The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biol* **2001**, *2*, reviews0001.1-reviews0001.9.
  77. Bork, P.; Koonin, E.V. A new family of carbon-nitrogen hydrolases. *Protein Science* **1994**, *3*, 1344–1346, doi:10.1002/pro.5560030821.
  78. Seibert, C.M.; Raushel, F.M. Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily <sup>†</sup>. *Biochemistry* **2005**, *44*, 6383–6391, doi:10.1021/bi047326v.
  79. Sugrue, E.; Fraser, N.J.; Hopkins, D.H.; Carr, P.D.; Khurana, J.L.; Oakeshott, J.G.; Scott, C.; Jackson, C.J. Evolutionary expansion of the amidohydrolase superfamily in bacteria in response to the synthetic compounds molinate and diuron. *Applied and Environmental Microbiology* **2015**, *81*, 2612–2624, doi:10.1128/AEM.04016-14.
  80. Labahn, J.; Neumann, S.; Büldt, G.; Kula, M.-R.; Granzin, J. An alternative mechanism for amidase signature enzymes. *Journal of*



- Molecular Biology* **2002**, 322, 1053–1064, doi:10.1016/S0022-2836(02)00886-0.
81. Kobayashi, M.; Fujiwara, Y.; Goda, M.; Komeda, H.; Shimizu, S. Identification of active sites in amidase: Evolutionary relationship between amide bond- and peptide bond-cleaving enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, 94, 11986–11991, doi:10.1073/pnas.94.22.11986.
  82. McKinney, M.K.; Cravatt, B.F. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annual Review of Biochemistry* **2005**, 74, 411–432, doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133450.
  83. Shin, S. Structure of malonamidase E2 reveals a novel Ser-cisSer-Lys catalytic triad in a new serine hydrolase fold that is prevalent in nature. *The EMBO Journal* **2002**, 21, 2509–2516, doi:10.1093/emboj/21.11.2509.
  84. Curnow, A.W.; Hong, K.; Yuan, R.; Kim, S.; Martins, O.; Winkler, W.; Henkin, T.M.; Söll, D. Glu-tRNAGln amidotransferase: A novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation. *PNAS* **1997**, 94, 11819–11826, doi:10.1073/pnas.94.22.11819.
  85. Roodveldt, C.; Tawfik, D.S. Shared promiscuous activities and evolutionary features in various members of the amidohydrolase superfamily †. *Biochemistry* **2005**, 44, 12728–12736, doi:10.1021/bi051021e.
  86. Gebler, J.; Gilkes, N.R.; Claeysens, M.; Wilson, D.B.; Béguin, P.; Wakarchuk, W.W.; Kilburn, D.G.; Miller, R.C.; Warren, R.A.; Withers, S.G. Stereoselective hydrolysis catalyzed by related beta-1,4-glucanases and beta-1,4-xylanases. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 12559–12561.
  87. Henrissat, B.; Bairoch, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **1996**, 316 ( Pt 2), 695–696, doi:10.1042/bj3160695.
  88. Davies, G.; Henrissat, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **1995**, 3, 853–859, doi:10.1016/S0969-2126(01)00220-9.
  89. Koshland, D.E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews* **1953**, 28, 416–436, doi:10.1111/j.1469-185X.1953.tb01386.x.
  90. Berteau, O.; Bielicki, J.; Kilonda, A.; Machy, D.; Anson, D.S.; Kenne, L.  $\alpha$ -L-Fucosidases: exoglycosidases with unusual transglycosylation

- properties. *Biochemistry* **2004**, *43*, 7881–7891, doi:10.1021/bi036066z.
91. Sulzenbacher, G.; Bignon, C.; Nishimura, T.; Tarling, C.A.; Withers, S.G.; Henrissat, B.; Bourne, Y. Crystal structure of *Thermotoga maritima* alpha-L-fucosidase. Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13119–13128, doi:10.1074/jbc.M313783200.
92. Rogowski, A.; Briggs, J.A.; Mortimer, J.C.; Tryfona, T.; Terrapon, N.; Lowe, E.C.; Baslé, A.; Morland, C.; Day, A.M.; Zheng, H.; et al. Glycan complexity dictates microbial resource allocation in the large intestine. *Nature Communications* **2015**, *6*, doi:10.1038/ncomms8481.
93. Léonard, R.; Pabst, M.; Bondili, J.S.; Chambat, G.; Veit, C.; Strasser, R.; Altmann, F. Identification of an *Arabidopsis* gene encoding a GH95 alpha1,2-fucosidase active on xyloglucan oligo- and polysaccharides. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1983–1988, doi:10.1016/j.phytochem.2008.03.024.
94. Katayama, T.; Sakuma, A.; Kimura, T.; Makimura, Y.; Hiratake, J.; Sakata, K.; Yamanoi, T.; Kumagai, H.; Yamamoto, K. Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2-alpha-L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95). *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 4885–4893, doi:10.1128/JB.186.15.4885-4893.2004.
95. Nagae, M.; Tsuchiya, A.; Katayama, T.; Yamamoto, K.; Wakatsuki, S.; Kato, R. Structural basis of the catalytic reaction mechanism of novel 1,2- $\alpha$ -L-Fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 18497–18509, doi:10.1074/jbc.M702246200.
96. Illanes, A.; Cauerhff, A.; Wilson, L.; Castro, G.R. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology* **2012**, *115*, 48–57, doi:10.1016/j.biortech.2011.12.050.
97. Taupp, M.; Mewis, K.; Hallam, S. The art and design of functional metagenomic screens. *Current opinion in biotechnology* **2011**, *22*, 465–72, doi:10.1016/j.copbio.2011.02.010.
98. Ferrer, M.; Martínez-Martínez, M.; Bargiela, R.; Streit, W.R.; Golyshina, O.V.; Golyshin, P.N. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends. *Microbial Biotechnology* **2016**, *9*, 22–34, doi:10.1111/1751-7915.12309.
99. Steele, H.L.; Jaeger, K.-E.; Daniel, R.; Streit, W.R. Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *Journal of*

- Molecular Microbiology and Biotechnology* **2009**, *16*, 25–37, doi:10.1159/000142892.
100. Peña-García, C.; Martínez-Martínez, M.; Reyes-Duarte, D.; Ferrer, M. High throughput screening of esterases, lipases and phospholipases in mutant and metagenomic libraries: a review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2016**, *19*, 605–615.
  101. Martínez-Martínez, M.; Coscolín, C.; Santiago, G.; Chow, J.; Stogios, P.J.; Bargiela, R.; Gertler, C.; Navarro-Fernández, J.; Bollinger, A.; Thies, S.; et al. Determinants and prediction of esterase substrate promiscuity patterns. *ACS Chemical Biology* **2018**, *13*, 225–234, doi:10.1021/acscchembio.7b00996.
  102. Bunzel, H.A.; Garrabou, X.; Pott, M.; Hilvert, D. Speeding up enzyme discovery and engineering with ultrahigh-throughput methods. *Current Opinion in Structural Biology* **2018**, *48*, 149–156, doi:10.1016/j.sbi.2017.12.010.
  103. Santiago, G.; Martínez-Martínez, M.; Alonso, S.; Bargiela, R.; Coscolín, C.; Golyshin, P.N.; Guallar, V.; Ferrer, M. Rational engineering of multiple active sites in an ester hydrolase. *Biochemistry* **2018**, *57*, 2245–2255, doi:10.1021/acs.biochem.8b00274.
  104. Packer, M.S.; Liu, D.R. Methods for the directed evolution of proteins. *Nature Reviews Genetics* **2015**, *16*, 379–394, doi:10.1038/nrg3927.
  105. Bornscheuer, U.T.; Altenbuchner, J.; Meyer, H.H. Directed evolution of an esterase: screening of enzyme libraries based on pH-Indicators and a growth assay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, *7*, 2169–2173, doi:10.1016/S0968-0896(99)00147-9.
  106. Fernández-Álvaro, E.; Snajdrova, R.; Jochens, H.; Davids, T.; Böttcher, D.; Bornscheuer, U.T. A Combination of *in vivo* selection and cell sorting for the identification of enantioselective biocatalysts. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 8584–8587, doi:10.1002/anie.201102360.
  107. Distaso, M.A.; Tran, H.; Ferrer, M.; Golyshin, P.N. Metagenomic mining of enzyme diversity. In *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals*; Lee, S.Y., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp. 1–25 ISBN 978-3-319-31421-1.
  108. Turner, N.J. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends in Biotechnology* **2003**, *21*, 474–478, doi:10.1016/j.tibtech.2003.09.001.

109. Leemhuis, H.; Kelly, R.M.; Dijkhuizen, L. Directed evolution of enzymes: Library screening strategies. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 222–228, doi:10.1002/iub.165.
110. Rabausch, U.; Juergensen, J.; Ilmberger, N.; Böhnke, S.; Fischer, S.; Schubach, B.; Schulte, M.; Streit, W.R. Functional screening of metagenome and genome libraries for detection of novel flavonoid-modifying enzymes. *Applied and Environmental Microbiology* **2013**, *79*, 4551–4563, doi:10.1128/AEM.01077-13.
111. Kodzius, R.; Gojobori, T. Single-cell technologies in environmental omics. *Gene* **2016**, *576*, 701–707, doi:10.1016/j.gene.2015.10.031.
112. Ngara, T.R.; Zhang, H. Recent advances in function-based metagenomic screening. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* **2018**, *16*, 405–415, doi:10.1016/j.gpb.2018.01.002.
113. Glogauer, A.; Martini, V.P.; Faoro, H.; Couto, G.H.; Müller-Santos, M.; Monteiro, R.A.; Mitchell, D.A.; de Souza, E.M.; Pedrosa, F.O.; Krieger, N. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microbial Cell Factories* **2011**, *10*, 54, doi:10.1186/1475-2859-10-54.
114. Reetz, M.T.; Zonta, A.; Schimossek, K.; Jaeger, K.-E.; Liebeton, K. Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by *in vitro* evolution. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1997**, *36*, 2830–2832, doi:10.1002/anie.199728301.
115. Badalassi, F.; Wahler, D.; Klein, G.; Crotti, P.; Reymond, J.-L. A versatile periodate-coupled fluorogenic assay for hydrolytic enzymes. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 4067–4070, doi:10.1002/1521-3773(20001117)39:22<4067::AID-ANIE4067>3.0.CO;2-9.
116. Henke, E.; Bornscheuer, U.T. Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by error-prone PCR or a mutator strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescence assay. *Biol. Chem.* **1999**, *380*, 1029–1033, doi:10.1515/BC.1999.128.
117. Rossum, T.; Kengen, S.W.M.; Oost, J. Reporter-based screening and selection of enzymes. *The FEBS Journal* **2013**, *280*, 2979–2996, doi:10.1111/febs.12281.
118. Zheng, R.-C.; Zheng, Y.-G.; Shen, Y.-C. A screening system for active and enantioselective amidase based on its acyl transfer activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2007**, *74*, 256–262, doi:10.1007/s00253-006-0642-9.

119. Zapata-Pérez, R.; García-Saura, A.G.; Jebbar, M.; Golyshin, P.N.; Sánchez-Ferrer, Á. Combined whole-cell high-throughput functional screening for identification of new nicotinamidases/pyrazinamidases in metagenomic/polygenomic libraries. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.01915.
120. Časaitė, V.; Sadauskas, M.; Vaitekūnas, J.; Gasparavičiūtė, R.; Meškienė, R.; Skikaitė, I.; Sakalauskas, M.; Jakubovska, J.; Tauraitė, D.; Meškys, R. Engineering of a chromogenic enzyme screening system based on an auxiliary indole-3-carboxylic acid monooxygenase. *MicrobiologyOpen* **2019**, *8*, e00795, doi:10.1002/mbo3.795.
121. Uchiyama, T.; Miyazaki, K. Product-induced gene expression, a product-responsive reporter assay used to screen metagenomic libraries for enzyme-encoding genes. *Applied and Environmental Microbiology* **2010**, *76*, 7029–7035, doi:10.1128/AEM.00464-10.
122. Tannières, M.; Beury-Cirou, A.; Vigouroux, A.; Mondy, S.; Pellissier, F.; Dessaux, Y.; Faure, D. A Metagenomic study highlights phylogenetic proximity of quorum-quenching and xenobiotic-degrading amidases of the AS-family. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e65473, doi:10.1371/journal.pone.0065473.
123. Ahmad, T.; Singh, R.; Gupta, G.; Sharma, A.; Kaur, B. Metagenomics in the search for industrial enzymes. In; 2019; pp. 419–451 ISBN 978-0-444-64114-4.
124. Lezyk, M.; Jers, C.; Kjaerulff, L.; Gotfredsen, C.H.; Mikkelsen, M.D.; Mikkelsen, J.D. Novel  $\alpha$ -L-fucosidases from a soil metagenome for production of fucosylated human milk oligosaccharides. *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0147438, doi:10.1371/journal.pone.0147438.
125. Maruthamuthu, M.; Jiménez, D.J.; Stevens, P.; van Elsas, J.D. A multi-substrate approach for functional metagenomics-based screening for (hemi)cellulases in two wheat straw-degrading microbial consortia unveils novel thermoalkaliphilic enzymes. *BMC Genomics* **2016**, *17*, 86, doi:10.1186/s12864-016-2404-0.
126. Rashamuse, K.; Tendai, W.S.; Mathiba, K.; Ngcobo, T.; Mtimka, S.; Brady, D. Metagenomic mining of glycoside hydrolases from the hindgut bacterial symbionts of a termite (*Trinervitermes trinervoides*) and the characterization of a multimodular  $\beta$ -1,4-xylanase (GH11). *Biotechnology and Applied Biochemistry* **2017**, *64*, 174–186, doi:10.1002/bab.1480.
127. Armstrong, Z.; Rahfeld, P.; Withers, S.G. Chapter One - Discovery of new glycosidases from metagenomic libraries. In *Methods in*

- Enzymology*; Imperiali, B., Ed.; Chemical Glycobiology Part A. Synthesis, manipulation and applications of glycans; Academic Press, 2017; Vol. 597, pp. 3–23.
128. Gabor, E.M.; de Vries, E.J.; Janssen, D.B. Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. *Environmental Microbiology* **2004**, *6*, 948–958, doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00643.x.
  129. Boersma, Y.L.; Dröge, M.J.; van der Sloot, A.M.; Pijning, T.; Cool, R.H.; Dijkstra, B.W.; Quax, W.J. A novel genetic selection system for improved enantioselectivity of *Bacillus subtilis* lipase A. *Chembiochem* **2008**, *9*, 1110–1115, doi:10.1002/cbic.200700754.
  130. Delauney, A.J.; Hu, C.A.; Kishor, P.B.; Verma, D.P. Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 18673–18678.
  131. Dong, W.-R.; Xiang, L.-X.; Shao, J.-Z. Novel antibiotic-free plasmid selection system based on complementation of host auxotrophy in the NAD *de novo* synthesis pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2295–2303, doi:10.1128/AEM.02462-09.
  132. Forney, L.J.; Wong, D.C.; Ferber, D.M. Selection of amidases with novel substrate specificities from penicillin amidase of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **1989**, *55*, 2550–2555.
  133. Reetz, M.T.; Höbenreich, H.; Soni, P.; Fernández, L. A genetic selection system for evolving enantioselectivity of enzymes. *Chemical Communications* **2008**, 5502, doi:10.1039/b814538e.
  134. Krieg, L.; Ansorge-Schumacher, M.B.; Kula, M.-R. Screening for Amidases: isolation and characterization of a novel D-amidase from *Variovorax paradoxus*. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2002**, *344*, 965–973, doi:10.1002/1615-4169(200210)344:9<965::AID-ADSC965>3.0.CO;2-Z.
  135. Jakubovska, J.; Tauraite, D.; Birštonas, L.; Meškys, R. N4-acyl-2'-deoxycytidine-5'-triphosphates for the enzymatic synthesis of modified DNA. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 5911–5923, doi:10.1093/nar/gky435.
  136. Stanislauskienė, R.; Laurynėnas, A.; Rutkienė, R.; Aučynaitė, A.; Tauraitė, D.; Meškienė, R.; Urbelienė, N.; Kaupinis, A.; Valius, M.; Kaliniene, L.; et al. YqfB protein from *Escherichia coli*: an atypical amidohydrolase active towards N4-acylcytosine derivatives. *Scientific Reports* **2020**, *10*, doi:10.1038/s41598-020-57664-w.

137. Urbelienė, N.; Kutanovas, S.; Meškienė, R.; Gasparavičiūtė, R.; Tauraitė, D.; Koplūnaitė, M.; Meškys, R. Application of the uridine auxotrophic host and synthetic nucleosides for a rapid selection of hydrolases from metagenomic libraries. *Microbial Biotechnology* **2019**, *12*, 148–160, doi:10.1111/1751-7915.13316.
138. Popovic, A.; Hai, T.; Tchigvintsev, A.; Hajighasemi, M.; Nocek, B.; Khusnutdinova, A.N.; Brown, G.; Glinos, J.; Flick, R.; Skarina, T.; et al. Activity screening of environmental metagenomic libraries reveals novel carboxylesterase families. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 44103, doi:10.1038/srep44103.
139. Ranjan, R.; Grover, A.; Kapardar, R.K.; Sharma, R. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *335*, 57–65, doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.046.
140. Beisson, F.; Tiss, A.; Rivière, C.; Verger, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, *102*, 133–153, doi:10.1002/(SICI)1438-9312(200002)102:2<133::AID-EJLT133>3.0.CO;2-X.
141. Hernández-García, S.; García-García, M.I.; García-Carmona, F. An improved method to measure lipase activity in aqueous media. *Analytical Biochemistry* **2017**, *530*, 104–106, doi:10.1016/j.ab.2017.05.012.
142. Janes, L.E.; Löwendahl, A.C.; Kazlauskas, R.J. Quantitative screening of hydrolase libraries using pH indicators: identifying active and enantioselective hydrolases. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2324–2331, doi:10.1002/(SICI)1521-3765(19981102)4:11<2324::AID-CHEM2324>3.0.CO;2-I.
143. Lee, H.W.; Jung, W.K.; Kim, Y.H.; Ryu, B.H.; Kim, T.D.; Kim, J.; Kim, H. Characterization of a novel alkaline family VIII ssterase with S-enantiomer preference from a compost metagenomic library. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **2016**, *26*, 315–325, doi:10.4014/jmb.1509.09081.
144. Petersen, E.I.; Valinger, G.; Sölkner, B.; Stubenrauch, G.; Schwab, H. A novel esterase from *Burkholderia gladioli* which shows high deacetylation activity on cephalosporins is related to  $\beta$ -lactamases and dd-peptidases. *Journal of Biotechnology* **2001**, *89*, 11–25, doi:10.1016/S0168-1656(01)00284-X.
145. Ohlhoff, C.W.; Kirby, B.M.; Van Zyl, L.; Mutepefa, D.L.R.; Casanueva, A.; Huddy, R.J.; Bauer, R.; Cowan, D.A.; Tuffin, M. An unusual feruloyl esterase belonging to family VIII esterases and

- displaying a broad substrate range. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2015**, *118*, 79–88, doi:10.1016/j.molcatb.2015.04.010.
146. Chow, C.; Xu, H.; Blanchard, J.S. Kinetic Characterizations of nitrocefin, cefoxitin, and meropenem hydrolysis by  $\beta$ -lactamase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **2013**, *52*, 4097–4104, doi:10.1021/bi400177y.
147. Rawlings, N.D.; Barrett, A.J. [2] Families of serine peptidases. In *Methods in Enzymology*; Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases; Academic Press, 1994; Vol. 244, pp. 19–61.
148. Wagner Ulrike G.; Petersen Evamaria I.; Schwab Helmut; Kratky Christoph EstB from *Burkholderia gladioli*: A novel esterase with a  $\beta$ -lactamase fold reveals steric factors to discriminate between esterolytic and  $\beta$ -lactam cleaving activity. *Protein Science* **2009**, *11*, 467–478, doi:10.1110/ps.33002.
149. Joris, B.; Ghuysen, J.M.; Dive, G.; Renard, A.; Dideberg, O.; Charlier, P.; Frère, J.M.; Kelly, J.A.; Boyington, J.C.; Moews, P.C. The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the Streptomyces R61 DD-peptidase family. *Biochemical Journal* **1988**, *250*, 313–324.
150. Robert, X.; Gouet, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42*, W320–W324, doi:10.1093/nar/gku316.
151. Zimmermann, L.; Stephens, A.; Nam, S.-Z.; Rau, D.; Kübler, J.; Lozajic, M.; Gabler, F.; Söding, J.; Lupas, A.N.; Alva, V. A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. *Journal of Molecular Biology* **2018**, *430*, 2237–2243, doi:10.1016/j.jmb.2017.12.007.
152. Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* **2010**, *5*, 725–738, doi:10.1038/nprot.2010.5.
153. Polgár, L. The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2005**, *62*, 2161–2172, doi:10.1007/s00018-005-5160-x.
154. Wagner, S.; Bader, M.L.; Drew, D.; de Gier, J.-W. Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends in Biotechnology* **2006**, *24*, 364–371, doi:10.1016/j.tibtech.2006.06.008.
155. Baumgarten, T.; Schlegel, S.; Wagner, S.; Löw, M.; Eriksson, J.; Bonde, I.; Herrgård, M.J.; Heipieper, H.J.; Nørholm, M.H.H.; Slotboom, D.J.; et al. Isolation and characterization of the *E. coli*



- membrane protein production strain Mutant56(DE3). *Scientific Reports* **2017**, *7*, 45089, doi:10.1038/srep45089.
156. Wu, S.; Nan, F.; Jiang, J.; Qiu, J.; Zhang, Y.; Qiao, B.; Li, S.; Xin, Z. Molecular cloning, expression and characterization of a novel feruloyl esterase from a soil metagenomic library with phthalate-degrading activity. *Biotechnol. Lett.* **2019**, *41*, 995–1006, doi:10.1007/s10529-019-02693-3.
  157. Luo, Z.-H.; Wu, Y.-R.; Chow, R.K.K.; Luo, J.-J.; Gu, J.-D.; Vrijmoed, L.L.P. Purification and characterization of an intracellular esterase from a *Fusarium* species capable of degrading dimethyl terephthalate. *Process Biochemistry* **2012**, *47*, 687–693, doi:10.1016/j.procbio.2012.01.015.
  158. Cheng, X.; Dong, S.; Chen, D.; Rui, Q.; Guo, J.; Dayong Wang; Jiang, J. Potential of esterase DmtH in transforming plastic additive dimethyl terephthalate to less toxic mono-methyl terephthalate. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2020**, *187*, 109848, doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109848.
  159. Li, J.; Gu, J.-D.; Pan, L. Transformation of dimethyl phthalate, dimethyl isophthalate and dimethyl terephthalate by *Rhodococcus ruber* Sa and modeling the processes using the modified Gompertz model. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2005**, *55*, 223–232, doi:10.1016/j.ibiod.2004.12.003.
  160. Barth, M.; Oeser, T.; Wei, R.; Then, J.; Schmidt, J.; Zimmermann, W. Effect of hydrolysis products on the enzymatic degradation of polyethylene terephthalate nanoparticles by a polyester hydrolase from *Thermobifida fusca*. *Biochemical Engineering Journal* **2015**, *93*, 222–228, doi:10.1016/j.bej.2014.10.012.
  161. Gamerith, C.; Vastano, M.; Ghorbanpour, S.M.; Zitzenbacher, S.; Ribitsch, D.; Zumstein, M.T.; Sander, M.; Herrero Acero, E.; Pellis, A.; Guebitz, G.M. Enzymatic degradation of aromatic and aliphatic polyesters by *P. pastoris* expressed cutinase 1 from *Thermobifida cellulosilytica*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fmicb.2017.00938.
  162. Fischer-Colbrie, G.; Heumann, S.; Liebming, S.; Almansa, E.; Cavaco-Paulo, A.; Guebitz, G.M. New enzymes with potential for PET surface modification. *Biocatalysis and Biotransformation* **2004**, *22*, 341–346, doi:10.1080/10242420400024565.
  163. Heumann, S.; Eberl, A.; Pobeheim, H.; Liebming, S.; Fischer-Colbrie, G.; Almansa, E.; Cavaco-Paulo, A.; Guebitz, G.M. New model substrates for enzymes hydrolysing polyethyleneterephthalate and

- polyamide fibres. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2006**, *69*, 89–99, doi:10.1016/j.jbbm.2006.02.005.
164. Biundo, A.; Ribitsch, D.; Guebitz, G.M. Surface engineering of polyester-degrading enzymes to improve efficiency and tune specificity. *Appl Microbiol Biotechnol* **2018**, *102*, 3551–3559, doi:10.1007/s00253-018-8850-7.
165. Trincone, A. Uncommon Glycosidases for the enzymatic preparation of Glycosides. *Biomolecules* **2015**, *5*, 2160–2183, doi:10.3390/biom5042160.
166. Seeberger, P.H. Automated carbohydrate synthesis as platform to address fundamental aspects of glycobiology—current status and future challenges. *Carbohydrate Research* **2008**, *343*, 1889–1896, doi:10.1016/j.carres.2008.05.023.
167. Hancock, S.M.; Vaughan, M.D.; Withers, S.G. Engineering of glycosidases and glycosyltransferases. *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, *10*, 509–519, doi:10.1016/j.cbpa.2006.07.015.
168. Andreotti, G.; Trincone, A.; Giordano, A. Convenient synthesis of  $\beta$ -galactosyl nucleosides using the marine  $\beta$ -galactosidase from *Aplysia fasciata*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2007**, *47*, 28–32, doi:10.1016/j.molcatb.2007.03.006.
169. Blažek, J.; Jansa, P.; Baszczyński, O.; Kaiser, M.M.; Otmar, M.; Krečmerová, M.; Drančinský, M.; Holý, A.; Králová, B. An enzymatic glycosylation of nucleoside analogues using  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20*, 3111–3118, doi:10.1016/j.bmc.2012.02.062.
170. Li, N.; Smith, T.J.; Zong, M.-H. Biocatalytic transformation of nucleoside derivatives. *Biotechnology Advances* **2010**, *28*, 348–366, doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.006.
171. Yan, L.-Q.; Li, N.; Zong, M.-H. First and facile enzymatic synthesis of  $\beta$ -fucosyl-containing disaccharide nucleosides through  $\beta$ -galactosidase-catalyzed regioselective glycosylation. *J. Biotechnol.* **2012**, *164*, 371–375, doi:10.1016/j.jbiotec.2013.01.024.
172. Cobucci-Ponzano, B.; Conte, F.; Bedini, E.; Corsaro, M.M.; Parrilli, M.; Sulzenbacher, G.; Lipski, A.; Dal Piaz, F.; Lepore, L.; Rossi, M.; et al.  $\beta$ -glycosyl azides as substrates for  $\alpha$ -glycosynthases: preparation of efficient  $\alpha$ -L-fucosynthases. *Chemistry & Biology* **2009**, *16*, 1097–1108, doi:10.1016/j.chembiol.2009.09.013.
173. Wang, L.-X. Expanding the repertoire of glycosynthases. *Chem Biol* **2009**, *16*, 1026–1027, doi:10.1016/j.chembiol.2009.10.003.

PRIEDAI

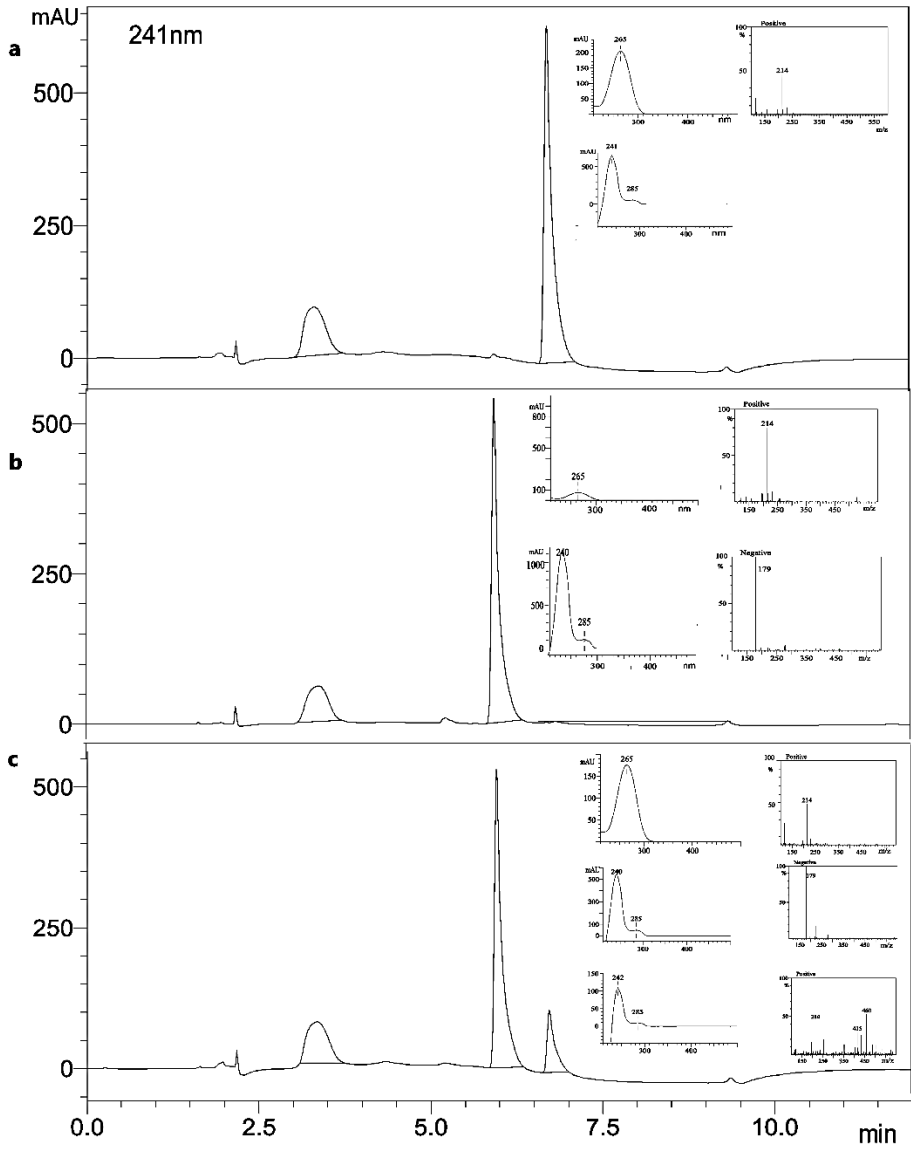
**1P lentelė.** Esterazių ir amidohidrolazių atrankoms panaudotos bibliotekos

| <b>Meta-genominė biblioteka</b> | <b>DNR šaltinis</b>                                 | <b>Vektorius/fragmento įterpimo vieta</b> | <b>Klonų ~ skaičius bibliotekoje</b> | <b>Atrinkti fermentai</b> |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| L500                            | Dirvožemis, po praturtinimo su pentaacetilgliukoze  | pUC19/PstI                                | 1 200 000                            | 3 (24T5, 24T1, 24T3)      |
| 5CRK9                           | Dirvožemis                                          | pUC19/PstI                                | 170 000                              | 2 (33T1, 33T3)            |
| KAU                             | Dirvožemis                                          | pUC19/PstI                                | 220,000                              | 3 (30T1, 30T2, 45T3)      |
| RK7                             | Dirvožemis                                          | pUC19/PstI                                | 1,120,000                            | 3 (36T1, 36T2, 3T)        |
| GRU1                            | Dirvožemis                                          | pUC19/PstI                                | 1,770,000                            | 1 (GRU1)                  |
| 442                             | Dirvožemis                                          | pUC19/PstI                                | 472,500                              | 1 (12T)                   |
| MO10                            | Dirvožemis, po praturtinimo su ketonais (dujų fazė) | pUC19/HindI II                            | 246,000                              | 3 (MO101T, MO4B, MO10_Am) |
| SVGPA                           | Dirvožemis                                          | pUC19/HindI II                            | 100,000                              | 3 (SVG1 SVG3, SVGPA2)     |
| K3                              | Dirvožemis, po praturtinimo su aminais              | pUC19/Bam HI                              | 20,000                               | 2 (K33H2, K3_Am)          |
| BD2                             | Dirvožemis                                          | pUC19/PstI                                | 20,000                               | 1 (BD2H)                  |
| BD                              | Dirvožemis                                          | pUC19/PstI                                | 30,000                               | 2 (BD1, BD9)              |
| PLA1                            | Nuosėdos*                                           | pUC19/Bam HI                              | 400,000                              | 1 (PLA1)                  |
| EN1                             | Dirvožemis, po praturtinimo su aromatiniais aminais | pUC19/HindI II                            | 20,000                               | 1 (EN1H)                  |

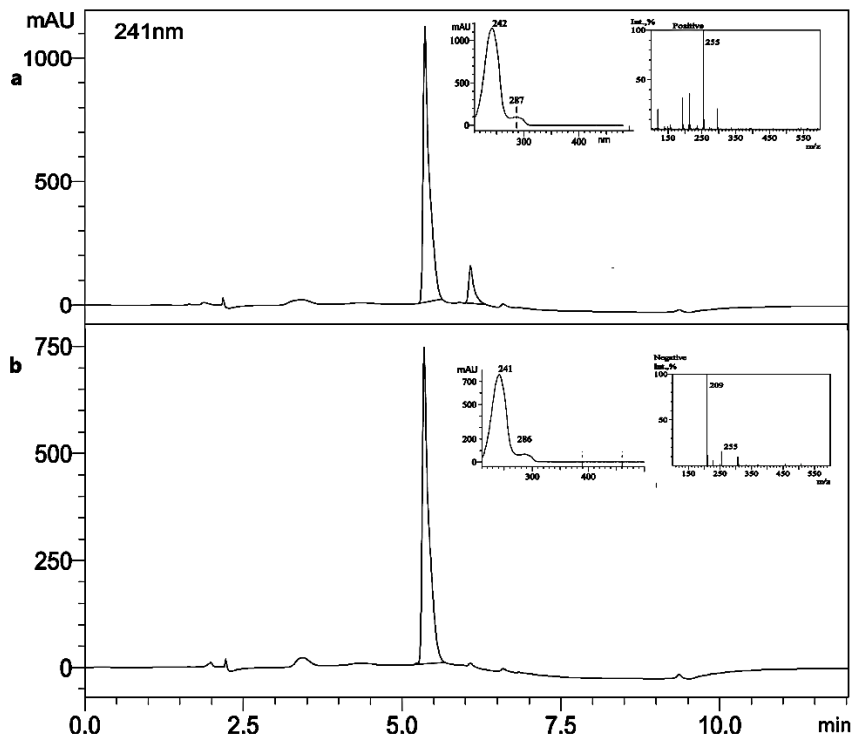
| <b>Meta-<br/>genominė<br/>biblioteka</b> | <b>DNR šaltinis</b>                                 | <b>Vektorius/fra-<br/>gmento<br/>įterpimo vieta</b> | <b>Klonų ~<br/>skaičius<br/>biblioteko-<br/>je</b> | <b>Atrinkti<br/>fermentai</b>                   |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| EN2                                      | Dirvožemis, po praturtinimo su aromatiniais aminais | pUC19/HindI<br>II                                   | 20,000                                             | 1 (EN3H)                                        |
| CAP1                                     | Dirvožemis                                          | pUC19/PstI                                          | 80,000                                             | 1 (CAP3H)                                       |
| 1315                                     | Dirvožemis                                          | pUC19/HindI<br>II                                   | 20,000                                             | 1 (1315H)                                       |
| RIE                                      | Dirvožemis po praturtinimo su aromatiniais aminais  | pUC19/HindI<br>II                                   | 10,000                                             | 1 (RIEB)                                        |
| 4H                                       | Dirvožemis po praturtinimo su aromatiniais aminais  | pUC19/HindI<br>II                                   | 10,000                                             | 1 (4H1T)                                        |
| CBD                                      | Dirvožemis                                          | pUC19/PstI                                          | 24,000                                             | 1 (C233)                                        |
| BLU13_BL<br>U mix                        | Dirvožemis                                          | pUC19/HindI<br>II                                   | 10,000                                             | 2 (BRM_Am,<br>D8_RL)                            |
| MO13                                     | Dirvožemis, po praturtinimo su toluenu (dujų fazė)  | pUC19/PstI                                          | 110,000                                            | 3<br>(MO13_Est631,<br>P4FUMM07_Ac<br>Am ir AmH) |
| CIANURA                                  | Dirvožemis po praturtinimo su 5-cianuracilu         | pUC19/PstI                                          | 100,000                                            | 1 (CIAN4)                                       |

Žemių pavyzdžiai rinkti Vilniaus regione, Lietuvoje (54°40'N25°16'E); \*nuosėdos - iš Platelių ežero, Plungės rajonas, Lietuva (56° 2'N21° 51')

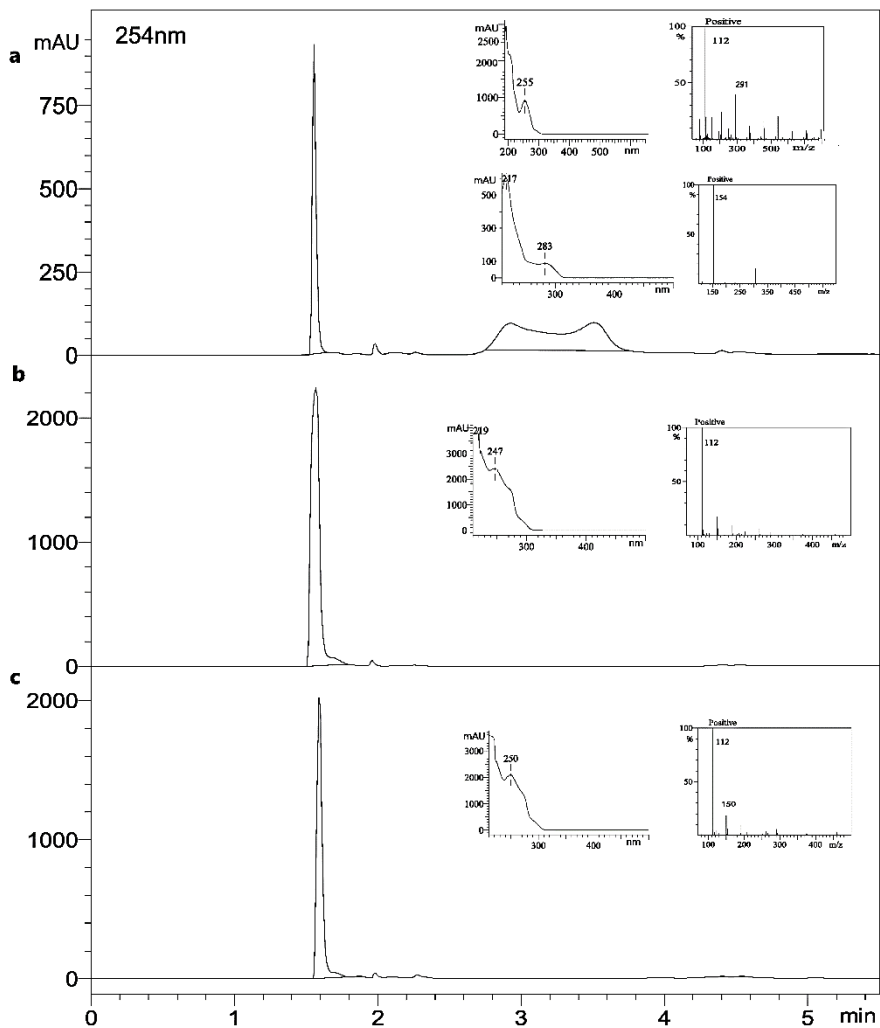
**1P pav.** DMT hidrolizės produkto analizė HPLC-MS. **a:** dimetil tereftalatas (DMT) (Mr 194), nesijonizuoja, **b:** monometil tereftalatas (MMT) standartas (Mr 179), **c:** reakcijos produktas po DMT inkubacijos su MO13\_Est631.



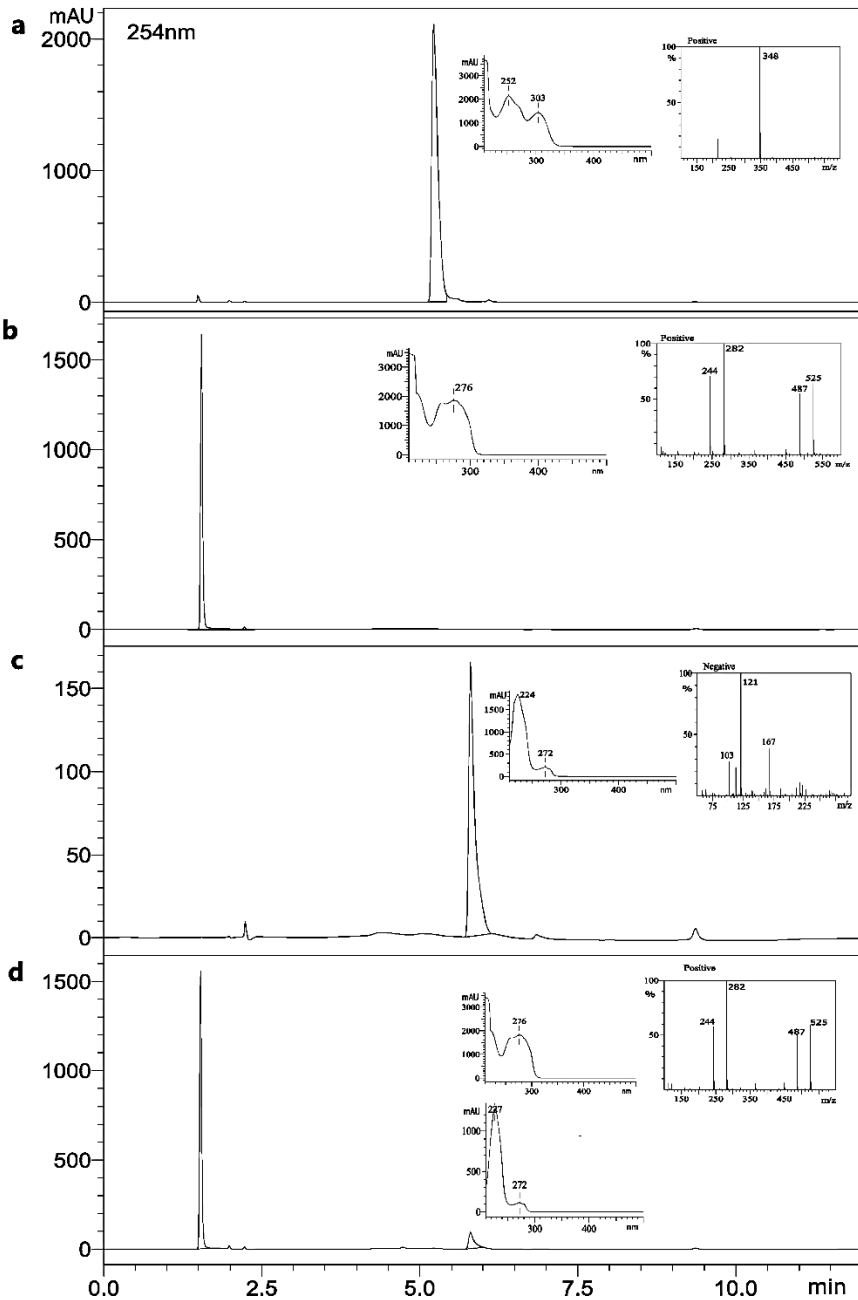
**2P pav.** BHET hidrolizės produkto analizė HPLC-MS. **a:** bis(2-hidroksietil) tereftalatas (BHET) (Mr 254), **b:** reakcijos produktas po BHET inkubacijos su MO13\_Est537.



**3P pav.** Acetilizocitozino hidrolizēs produkto analizē HPLC-MS. **a:** *N*<sup>4</sup>-acetilizocitozinas (Mr 153), **b:** izocitozino standarts (Mr 111), **c:** reakcijas produktas po *N*<sup>4</sup>-acetil-izocitozino inkubācijas su fermentu D8\_RL.

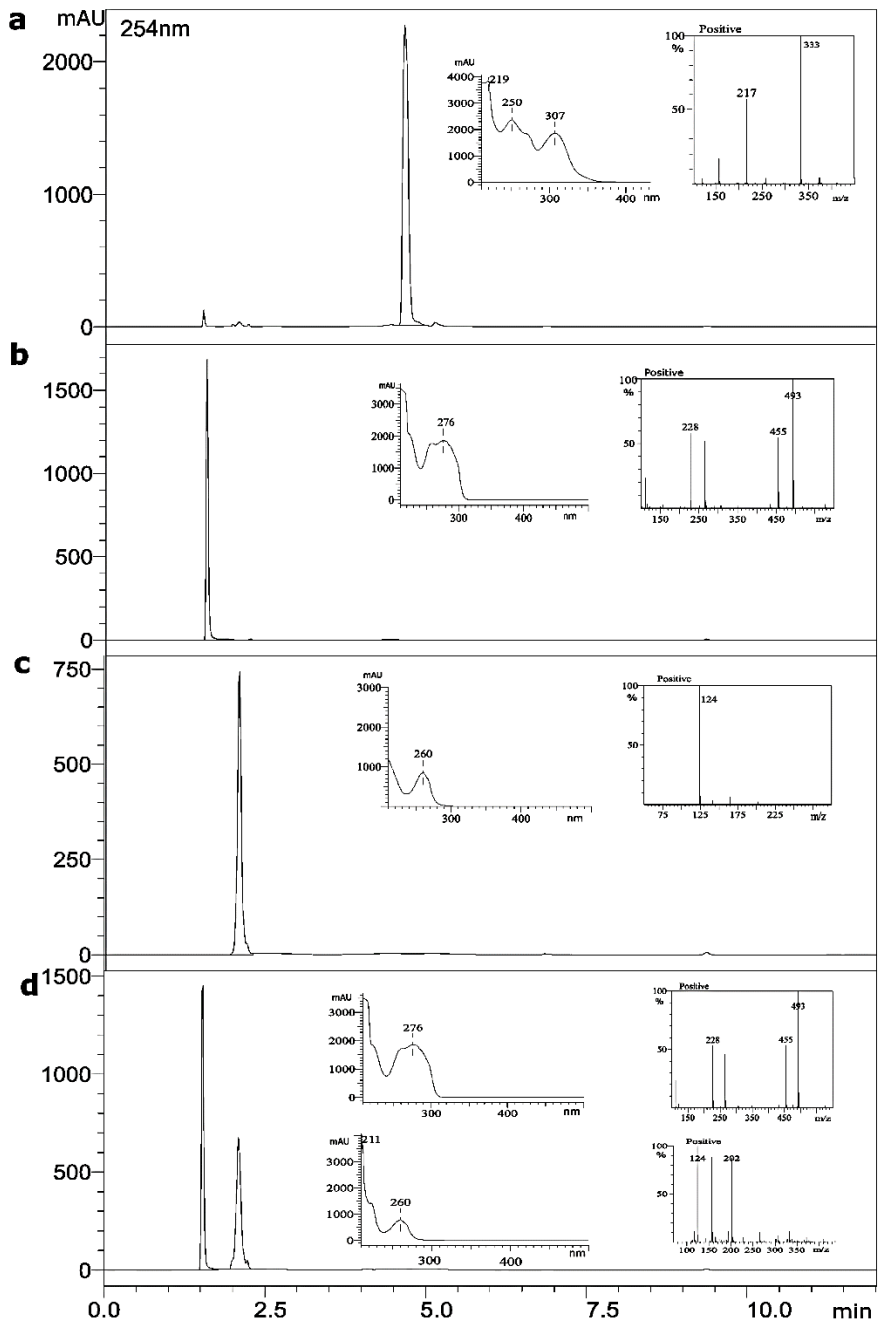


**4P pav.** *N*<sup>4</sup>-benzoilcitudino hidrolizės produkto analizė HPLC-MS: *N*<sup>4</sup>-benzoilcitudinas (**a**), citidino standartas (**b**), benzoinės rūgšties standartas (**c**), reakcijos produktas po *N*<sup>4</sup>-benzoilcitudino inkubacijos su D8\_RL (**d**).

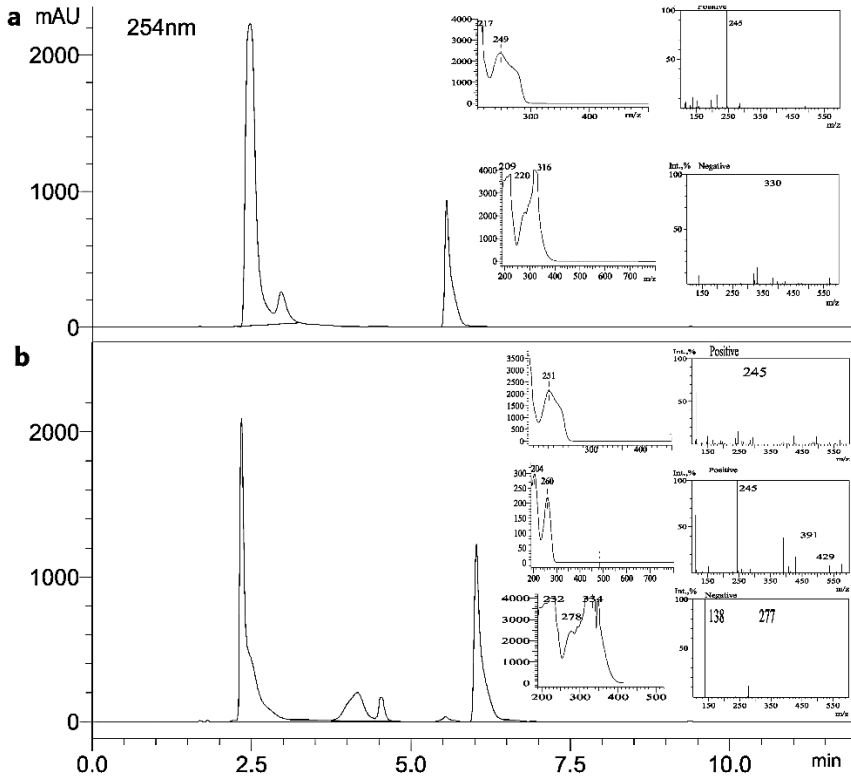




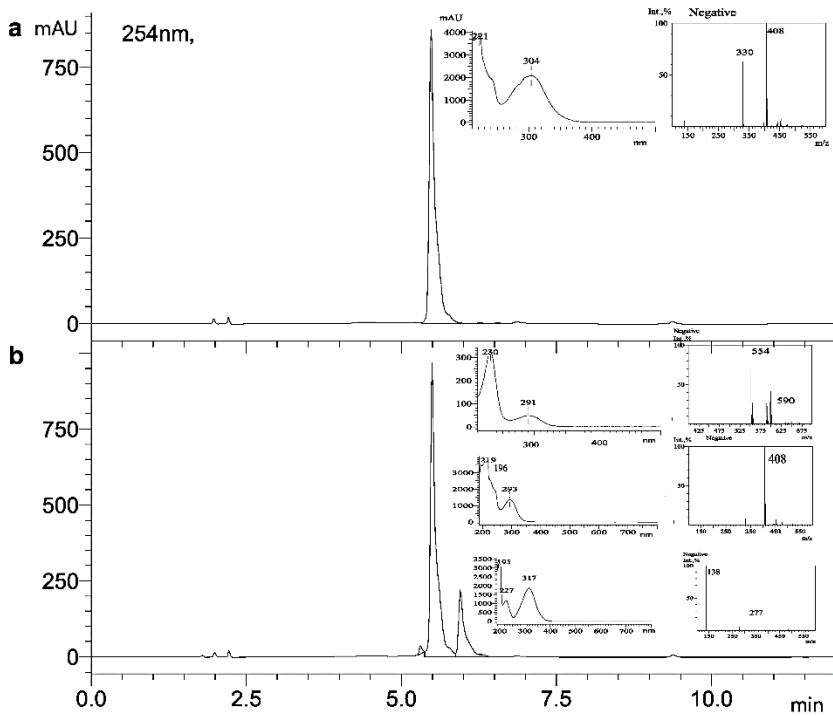
**5P pav.**  $N^4$ -nicotinoil-2'-deoksicitidino hidrolizės produkto analizė HPLC-MS. **a:**  $N^4$ -nicotinoil-2'-deoksicitidinas (Mr 332), **b:** 2'-deoksicitidino standartas (Mr 227), **c:** nikotino rūgšties standartas (Mr 123), **d:** reakcijos produktas po  $N^4$ -nicotinoil-2'-deoksicitidino inkubacijos su D8\_RL.



**6P pav.** Fukoziluridino HPLC-MS analizės spektras. **a** – reakcijos mišinys be fermento uridinas (Mr 244), pNP-fukopiranozidas (Mr 331); **b** – reakcijos mišinys po inkubacijos su fermentu fukoziluridinas (Mr 390), *p*-nitrofenolis (Mr 139).



**7P pav.** Fukozil-X-gal HPLC-MS analizės spektras. **a** – reakcijos mišinys be fermento X-Gal (Mr 409), pNP-fukopiranozidas (Mr 331); **b** – reakcijos mišinys po inkubacijos su fermentu fukoziluridinas (Mr 555), *p*-nitrofenolis (Mr 139).



Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p.: [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Tiražas 15 egz.