

**Shapla Bhattacharya**

**ENZĪMU INŽENIERIJA BIOMEDICĪNAS UN  
VIDES PROBLĒMU RISINĀJUMIEM**

Promocijas darba kopsavilkums

**ENZYME ENGINEERING FOR BIOMEDICAL AND  
ENVIRONMENTAL APPLICATION**

Summary of the Doctoral Thesis



# RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultāte  
Ķīmijas un ķīmijas tehnoloģijas institūts

## RIGA TECHNICAL UNIVERSITY

Faculty of Natural Sciences and Technology  
Institute of Chemistry and Chemical Technology

### **Shapla Bhattacharya**

Doktora studiju programmas “Ķīmija, materiālzinātne un tehnoloģijas” doktorante  
Doctoral Student of the Study Programme “Chemistry, Materials Science and Engineering”

## **ENZĪMU INŽENIERIJA BIOMEDICĪNAS UN VIDES PROBLĒMU RISINĀJUMIEM**

Promocijas darba kopsavilkums

## **ENZYME ENGINEERING FOR BIOMEDICAL AND ENVIRONMENTAL APPLICATIONS**

Summary of the Doctoral Thesis

Zinātniskais vadītājs / Scientific Supervisor  
docents, vadošais pētnieks / Prof. Dr. EMILIO PARISINI

Konsultanti / Consultants  
profesors / Prof. Dr. chem.  
AIGARS JIRGENSONS  
Dr. ROSSELLA CASTAGNA

Bhattacharya, S. Enzīmu inženierija biomedicīnas un vides problēmu risinājumiem. Promocijas darba kopsavilkums. – Rīga: RTU Izdevniecība, 2026. 90 lpp.

Bhattacharya, S. Enzyme Engineering for Biomedical and Environmental Application. Summary of the Doctoral Thesis. – Riga: RTU Press, 2026. 90 p.

Publicēts saskaņā ar promocijas padomes “RTU P-01” 2026. gada 22. aprīļa lēmumu Nr. 04030-9.1/82.

Published in accordance with the decision of the Promotion Council “RTU P-01” of 22 April 2026, Minutes No. 04030-9.1/82.

Promocijas darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu darbības programmas “Izaugsme un nodarbinātība” 8.2.2. specifiskā atbalsta mērķa “Stiprināt augstākās izglītības institūciju akadēmisko personālu stratēģiskās specializācijas jomās” projektā Nr. 8.2.2.0/20/I/008 “Rīgas Tehniskās universitātes un Banku augstskolas doktorantu un akadēmiskā personāla stiprināšana stratēģiskās specializācijas jomās” un Rīgas Tehniskās universitātes Doktorantūras grantu programmas atbalstu.

NACIONĀLAIS  
ATTĪSTĪBAS  
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA  
Eiropas Sociālais  
fonds

IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

This work has been supported by the European Social Fund within Project No. 8.2.2.0/20/I/008, “Strengthening of PhD students and academic personnel of Riga Technical University and BA School of Business and Finance in the strategic fields of specialization” of the Specific Objective 8.2.2 “To Strengthen Academic Staff of Higher Education Institutions in Strategic Specialization Areas” of the Operational Programme “Growth and Employment” and by Riga Technical University’s Doctoral Grant programme.

NATIONAL  
DEVELOPMENT  
PLAN 2020



EUROPEAN UNION  
European Social  
Fund

INVESTING IN YOUR FUTURE

Vāka attēla autore Shapla Bhattacharya.

Cover image by Shapla Bhattacharya.

<https://doi.org/10.7250/9789934373213>

ISBN 978-9934-37-321-3 (pdf)

## PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2026. gada 23. jūlijā plkst. 15.00 Rīgas Tehniskās universitātes Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultātē, Rīgā, Paula Valdena ielā 3/7, 272. auditorijā. Atklātajā sēdē būs iespējams piedalīties arī tiešsaistē Zoom platformā (<https://rtucloud1.zoom.us/j/9352086644>).

### OFICIĀLIE RECENZENTI

Profesors *Dr. chem.* Kristaps Jaudzems  
Latvijas Universitāte, Latvija

Profesors *Dr. chem.* Ioannis Pavlidis  
Krētas Universitāte, Grieķija

Profesors *Dr. biol.* Gianluca Molla  
Insubrijas Universitāte, Itālija

### APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājis šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšana. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Shapla Bhattacharya.....(paraksts)

Datums: .....

Promocijas darbs sagatavots kā tematiski saistītu zinātnisko publikāciju kopa. Tas ietver kopsavilkumu un četras zinātniskās publikācijas. Zinātniskās publikācijas ir uzrakstītas angļu valodā, to kopējais apjoms, ieskaitot elektroniski pieejo informāciju, ir 168 lappuses.

## SATURS

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS .....	5
Ievads .....	5
Mērķi un uzdevumi .....	6
Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti .....	7
Darba struktūra un apjoms .....	9
Publikācijas un disertācijas apstiprināšana .....	9
DISERTĀCIJAS GALVENIE REZULTĀTI .....	13
1. FPOX enzīmi .....	13
1.1. Racionāls dizains .....	13
1.2. Fermentu ekspresija un attīrīšana .....	19
1.3. Biofizikālā raksturošana .....	21
1.4. Funkcionālais tests .....	23
1.5. Rentgenkristalogrāfija .....	25
1.6. Struktūras un funkcijas korelācijas analīze .....	26
1.7. Pašreizējās tendences un nākotnes iespējas .....	27
2. PETase enzīmi .....	28
2.1. Inženierijas LCC-ICCG PETase fermenta izstrāde .....	30
2.1.1. Racionāls dizains .....	30
2.1.2. Fermentu ekspresija un attīrīšana .....	31
2.1.3. Biofizikālā raksturošana .....	32
2.1.4. Funkcionālais tests .....	33
2.1.5. Rentgenkristalogrāfija .....	34
2.2. Jaunā PETase SM14 raksturojums .....	36
2.2.1. Enzīma ekspresija un attīrīšana .....	36
2.2.2. Biofizikālā raksturošana .....	36
2.2.3. Funkcionālais tests .....	40
2.2.4. Rentgenkristalogrāfija .....	40
2.2.5. Struktūras un funkcijas korelācijas analīze .....	41
2.3. Pašreizējās tendences un nākotnes iespējas .....	43
SECINĀJUMI .....	44
AVOTI .....	87

# PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

## Ievads

Enzīmi ir ļoti efektīvi dabas biokatalizatori, kas ļauj veikt sarežģītas bioķīmiskas reakcijas maigos apstākļos ar augstu specifiskumu un selektivitāti. To lietojums aptver plašu nozaru spektru, tostarp farmāciju, lauksaimniecību, diagnostiku un vides sanācību. Tomēr dabiskajiem enzīmiem nereti ir novērojami tādi ierobežojumi kā zema stabilitāte rūpnieciskos apstākļos, nepietiekama aktivitāte vai slikta substrāta saderība, kas ierobežo to plašāku lietojumu.

Enzīmu inženierija ir sarežģīts process, kas ļauj modificēt dabā sastopamos enzīmus, lai uzlabotu to katalītisko efektivitāti, stabilitāti vai specifiskumu. Mērķtiecīgi mainot to aminoskābju secību un strukturālās īpašības, dabiskos enzīmus var pārvērst par efektīvākiem un izturīgākiem biokatalizatoriem, kas piemēroti plašam rūpniecisko lietojumu klāstam. Šajā sarežģītajā procesā bieži tiek izmantotas tādas metodes kā virzītā evolūcija, vietas virzītā mutagēze un datormodelēšana. Promocijas darba autore un viņas kolēģu laboratorijā plaši tiek izmantota strukturālā informācija, koncentrējoties uz racionālā dizaina pieejām.

Racionālajā dizainā tika izmantoti skaitļošanas rīki un molekulārā modelēšana, lai simulētu enzīma aminoskābju secības modifikāciju ietekmi. Analizējot enzīma trīsdimensiju struktūru, var identificēt kritiskos fragmentus, kas ietekmē katalītisko aktivitāti, stabilitāti un specifiskumu. Šī informācija ļauj ieviest mērķtiecīgas mutācijas, lai optimizētu īpašības, radot modificētus enzīmus, kas atbilst konkrētām rūpnieciskām vajadzībām.

Savā promocijas darbā autore strādāja ar divu enzīmu grupu dizainu – fruktozilpeptīdu oksidāzes (*FPOX*) un PETāzes. Abi šie enzīmi ir ļoti nozīmīgi biomedicīniskiem lietojumiem vai vides problēmu risinājumiem.

Fruktozilpeptīdu oksidāzes (*FPOX*) un fruktozilaminooksidāzes (*FAOX*) ir deglikozējoši fermenti, kas tiek izmantoti kā galvenās fermentatīvās sastāvdaļas diabēta uzraudzības ierīcēs. To izmantošana asins paraugos ļauj noteikt glikētā hemoglobīna un glikētā albumīna koncentrāciju, kas ir divi labi zināmi diabēta marķieri. Tomēr *FPOX*, ko pašlaik izmanto fermentu testos, nevar tieši noteikt visus glikētos proteīnus, tāpēc ir nepieciešams veikt mērķa proteīna proteolītisku pirmapstrādi, lai radītu mazus glikētus peptīdus, kas var darboties kā dzīvotspējīgi enzīma substrāti. Tas ir dārgs un laikietilpīgs process. Šis solis ir nepieciešams, lai piekļūtu grūti pieejamajai aktīvajai vietai, un šaurā tuneļa, kas nodrošina piekļuvi to katalītiskajai kabatai dēļ. Šie ierobežojumi ir pierādīti ar *FPOX* un *FAOX* enzīmu kristāliskajām struktūrām. Promocijas darbā tika veikta šīs enzīmu grupas dizaina izstrāde, lai

paplašinātu to substrātu klāstu un uzlabotu to termisko stabilitāti biomedicīniskiem lietojumiem. Mērķis ir izmantot šos enzīmus, lai deglikētu neskartus proteīnus vai samazinātu to glikācijas līmeni laikā. Ar uzlaboto enzīmu promocijas darba autore vēlas izstrādāt fermentatīvu rīku glikēta hemoglobīna vai glikēta albumīna, divu pazīstamu diabēta marķieru, mērīšanai asinīs.

Izmantojot to pašu enzīmu inženierijas pieeju, tika strādāts arī ar plastmasas depolimerizācijas fermentiem (PETāzēm), kas ir fermenti, kas var sadalīt polietilēntereftalātu (PET) tā monomēros – tereftālskābē un etilēnglikolā. Šie enzīmi pieder pie lielākas hidrolāžu saimes, kas darbojas, degradējot PET estera saites un izraisot tā sadalīšanos mazākās monomērās.

Lai gan ir aprakstītas vairākas PETāzes, to katalītiskā efektivitāte un termiskā stabilitāte joprojām ir nepietiekama ekonomiski dzīvotspējīgai PET depolimerizācijai rūpniecībā, jo īpaši salīdzinājumā ar tradicionālajiem ķīmiskajiem un mehāniskajiem pārstrādes procesiem. Ierobežotā enzīmu darbība, jo īpaši zemā aktivitāte un sliktā stabilitāte tuvu PET stiklošanās temperatūrai, ir galvenais šķērslis ekonomiski pamatotai PET enzimatiskai pārstrādei. Tāpēc tika izmantota datorizētu fermentu inženierijas pieeja, lai uzlabotu katalītisko efektivitāti un darbības stabilitāti rūpnieciskai lietošanai.

Kopumā šis darbs veicina racionālas enzīmu inženierijas attīstību, parādot efektīvu, reproducējamu dizaina validācijas darba plūsmu un piemērojot to diviem atšķirīgiem, bet rūpniecībā nozīmīgiem fermentiem. Šī pētījuma rezultāti ir nozīmīgi turpmākai biokatalizatoru attīstībai un kritisku problēmu risināšanai medicīniskajā un vides biotehnoloģijā.

## **Pētījuma mērķis un uzdevumi**

Promocijas darba galvenais mērķis ir veicināt enzīmu inženierijas attīstību, racionāli dizainējot, izstrādājot un raksturojot uzlabotus enzīmu variantus ar tiešu biomedicīnisko un vides lietojumu. Pētījums koncentrējas uz divām enzīmu saimēm – fruktozilpeptīdu oksidāzēm (*FPOX*) diabēta diagnostikai un polietilēntereftalāta hidrolāzēm (PETāzēm) plastmasas sadalīšanai.

## **Mērķi**

### **Lietojums biomedicinā – FPOX enzīmi diabēta diagnostikai**

1. Pēfīt savvaļas tipa *FPOX* enzīmu strukturālos ierobežojumus, kas kavē to spēju apstrādāt veselās glikētas olbaltumvielas.
2. Piemērot aprēķinu tunelēšanas paplašināšanas un struktūras vadītas inženierijas stratēģijas, lai radītu *FPOX* variantus ar uzlabotu substrāta pieejamību, uzlabotu termisko stabilitāti un paplašinātu substrāta specifiskumu.
3. Novērtēt inženierijas *FPOX* variantu aktivitāti uz glikētiem substrātiem, lai noteiktu to diagnostisko potenciālu.

### **Piemērošana vides jomā – PETāzes plastmasas sadalīšanai**

1. Identificēt kustīgus un nestabilus pazīstamu PETāžu reģionus, izmantojot strukturālos datus un molekulārās dinamikas simulācijas.
2. Izstrādāt un ieviest mērķtiecīgas mutācijas, kuru mērķis ir uzlabot PETāzes termisko stabilitāti un katalītisko efektivitāti.
3. Novērtēt inženierijas PETāzes variantu ietekmi uz polietilēna tereftalāta sadalīšanās efektivitāti apstākļos, kas atbilst rūpnieciskajai pārstrādei.
4. Veikt mehānisma pētījumus, lai noteiktu, kā konkrētas mutācijas ietekmē PET sadalīšanās procesu.

### **Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti**

Promocijas darba zinātniskā novitāte saistīta ar aprēķinu un eksperimentālo pieeju integrāciju uzlabotu enzīmu variantu racionālai dizainēšanai un raksturošanai, koncentrējoties uz divām atšķirīgiem enzīmiem – *FPOX* un PETāzi. Apvienojot *in silico* proteīnu inženieriju, molekulārās dinamikas simulācijas un strukturālo bioloģiju ar ekspresiju, attīrīšanu un detalizētu bioķīmisko un biofizikālo analīzi, šis darbs izveido starpdisciplināru validācijas darba plūsmu. Iegūtie rezultāti sniedz vērtīgas zināšanas un instrumentus enzīmu inženierijas jomā, vienlaikus piedāvājot potenciālu rūpnieciskai un vides lietošanai.

Promocijas draba pirmajā daļā autore koncentrējas uz termiski stabilizētu *FPOX* enzīmu. Tika piemērota *in silico* proteīnu inženierijas pieeja, lai uzlabotu enzīma kopējo termisko stabilitāti un tā katalītisko aktivitāti attiecībā uz lieliem substrātiem. Galīgais dizains uzrādīja ievērojamu termiskās stabilitātes uzlabojumu, salīdzinot ar savvaļas tipa fermentu, kā arī

izteiktu tā piekļuves tuneļa paplašināšanos. Šīs izmaiņas izpaudās kā nozīmīga fermentatīvā aktivitāte virknē glikēto substrātu, parādot datorizētā dizaina potenciālu enzīmu funkciju pielāgošanai.

Promocijas darba otrajā daļā PET hidrolizējošais enzīma ICCG variants no lapu-zaru komposta kutināzes (*LCC-ICCG*; zelta standarts) tika tālāk modificēts, izmantojot datorizētu dizainu. Šie pētījumi rezultējās ar mutāciju *LCC-ICCG-C09*, kam piemita par 3,5 °C augstāka kušanas temperatūra ( $T_m$ ), salīdzinot ar *LCC-ICCG*. Optimālos reakcijas apstākļos (68 °C) *LCC-ICCG-C09* hidrolizēja amorfo PET par tereftālskābi (TPA) ar divkārt augstāku efektivitāti, salīdzinot ar sākotnējo variantu. *LCC-ICCG-C09* ar uzlabotu termisko stabilitāti un katalītisko veiktspēju ir daudzsolis kandidāts turpmākai izmantošanai rūpnieciskajā PET pārstrādē.

Paralēli tika izstrādāts jauns PETāzei līdzīgs enzīms (PETāze SM14) no *Streptomyces sp. SM14*, kas tika ekspresēts *Escherichia coli* un novērtēts uz pēcpārstrādes plastmasas substrātiem. Aktivitātes analīzes kopā ar augstas veiktspējas šķidrums hromatogrāfiju (*HPLC*) produkta kvantificēšanai, kā arī skenējošo elektronu mikroskopiju un atomu spēku mikroskopiju substrāta virsmas analīzei atklāja, ka PETāze SM14 piemīt augsta sāls tolerance (līdz 1,5 M), laba siltuma izturība ( $T_m$  56,26 °C) un optimāla aktivitāte, ja pH = 9,0. Tās rentgena kristāla struktūra, ko autore izrēķināja 1,43 Å gadījumā, apstiprināja PETāzes saimes konservatīvās īpašības un nodrošināja pamatu turpmākajām inženierijas stratēģijām.

Lai turpinātu pētīt strukturālos un funkcionālos mehānismus, visu atomu molekulārās dinamikas (MD) simulācijas tika apvienotas ar *in vitro* testiem, lai salīdzinātu *PETase* SM14 un *Ideonella sakaiensis* PETāze (*IsPETase*) dažādās NaCl koncentrācijās (150 mM un 900 mM). Rezultāti parādīja, ka, pateicoties cilpas pagarinājumam, *IsPETase* izrāda elastīgu un plašu saistīšanās vietu, kas uzlabo substrāta uzņemšanu, bet arī izspiež katalītiskos fragmentus, izraisot ātru deaktivāciju, īpaši augstās sāls koncentrācijās. Savukārt *PETase* SM14 uzrāda stingru un šaurāku saistīšanās kabatu, kas paaugstinātā sāls koncentrācijā pakļaujas mērenai paplašināšanai, tādējādi veicinot ūdens un substrāta piesaistīšanu. Turklāt adsorbcijas uz PET plāksnītēm pētījumi parādīja, ka *PETase* SM14 augstās sāls koncentrācijas apstākļos un *IsPETase* zemas sāls koncentrācijas apstākļos saistās ar PET substrāta ķēdēm tādā pašā *trans:gauche* konformācijas sadalījumā, kāds novērots amorfa PET gadījumā. Šīs atziņas ne tikai izskaidro novērotos aktivitātes profilus, bet arī sniedz jaunas strukturālas detaļas, piemēram, substrāta saistīšanās plaisu arhitektūru un elektrostatisko vidi, galvenos aromātiskos

atlikumus, kas iesaistīti polimēru ķēžu stabilizācijā, un virsmas lādiņa sadalījumu, lai veiktu PET noārdošo enzīmu izstrādi dažādiem vides apstākļiem.

### **Praktiskais lietojums**

Šim darbam ir nozīmīgs praktisks potenciāls gan rūpnieciskajā, gan vides biotehnoloģijā. Inženierijas ceļā radītie *FPOX* varianti ar uzlabotu termisko stabilitāti un substrāta specifiskumu nodrošina stabilu pamatu jutīgu un praktisku biosensorisko platformu izstrādei tiešai glikēta hemoglobīna (HbA1c) noteikšanai. Uzlabotu PET hidrolizējošo enzīmu, tostarp *LCC-ICCG-C09* un *PETase SM14*, izstrāde piedāvā daudzsološus risinājumus polietilēna tereftalāta (PET) enzīmātiskai pārstrādei, ļaujot slēgtā ciklā atgūt tereftālskābi un veicinot ilgtspējīgu plastmasas atkritumu apsaimniekošanu.

### **Darba struktūra un apjoms**

Promocijas darbs ir tematiski saistītu zinātnisko publikāciju kopa par enzīnu inženieriju biomedicīniskiem un vides lietojumiem. Tajā apkopoti četru oriģinālo zinātnisko publikāciju rezultāti.

### **Darba aprobācija un publikācijas**

Promocijas darba galvenie rezultāti ir publicēti četros zinātniskajos rakstos, kā arī divos patenta pieteikumos. Pētījuma rezultāti ir prezentēti 13 zinātniskajās konferencēs.

### **Zinātniskās publikācijas**

1. Estiri, H.,\* **Bhattacharya, S.**,\* Rodriguez Buitrago, J. A., Castagna, R., Legzdiņa, L., Casucci, G., Ricci, A., Parisini, E., Gautieri, A. Tailoring FPOX Enzymes for Enhanced Stability and Expanded Substrate Recognition. *Scientific Reports*. 2023, 13, 18610. Pieejams: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45428-1>. \* Autori šajā darbā ir ieguldījuši vienlīdzīgu darbu.
2. Carletti, A., **Bhattacharya, S.**, Pedroni, S., Berto, M., Bonettini, R., Castagna, R., Parisini, E., Di Rocco, G. Functional and Structural Characterization of PETase SM14 from Marine-Sponge *Streptomyces* sp. Active on Polyethylene Terephthalate. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2025, 13, 7460. Pieejams: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5c00737>.
3. **Bhattacharya, S.**,\* Castagna, R.,\* Estiri,\* H., Upmanis, T., Gautieri, A., Parisini, E. Development of a Highly Active Engineered PETase Enzyme for Polyester Degradation. *FEBS Journal*. 2025, 23. augusts, raksta ID febs.70228. Pieejams: <https://doi.org/10.1111/febs.70228>. \* Autori šajā darbā ir ieguldījuši vienlīdzīgu darbu.

4. Berselli, A., Carletti, A., Menziani, M. C., **Bhattacharya, S.**, Castagna, R., Parisini, E., Di Rocco, G., & Muniz-Miranda, F. The effect of ionic strength on PETase enzymes: An experimental and computational study. *Protein Science*, 2026, 35, e70386. <https://doi.org/10.1002/pro.70386>.

### Patentu pieteikumi

1. Gautieri A, Parisini E, Estiri H, Castagna R, **Bhattacharya S**. “Thermostable engineered enzyme”. IT102023000014223, prioritātes datums 07.07.2023, piešķirts 25.07.2025. PCT/IB2024/056641, iesniegts 08.07.2024. <https://patents.google.com/patent/WO2025012799A1/en>.
2. Gautieri A, Perazzoli A, Castagna R, Parisini E, **Bhattacharya S**, Enzima fruttosil peptide ossidasi (FPOX) ingegnerizzato e suoi usi. Itālijas patenta pieteikums Nr. 102025000025639, iesniegts 2025. gada 8. oktobrī.

### Citas publikācijas par šo tēmu, kas nav iekļautas promocijas darbā

1. Brangulis, K., Akopjana, I., Drunka, L., Matisone, S., Zelencova-Gopejenko, D., **Bhattacharya, S.**, Bogans, J., Tars, K. Members of the Paralogous Gene Family 12 from the Lyme Disease Agent *Borrelia burgdorferi* Are Non-Specific DNA-Binding Proteins.. *PLOS ONE*. 2024, 19, e0296127. Pieejams: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296127>.
2. **Bhattacharya, S.**, Tempra, G., Colleoni, A., Matera, C., Castagna, R., Parisini, E. Synthesis, photochemical and biological evaluation of novel photoswitchable glycomimetic ligands of *Pseudomonas aeruginosa* LecB. *RSC Advances*. 2025, 15, 49796. Pieejams: <https://doi.org/10.1039/D5RA06897E>.

### Starptautiskās konferences, kurās prezentēti promocijas darba rezultāti

1. **Bhattacharya S**, Estiri H, Castagna R, Gautieri A, Parisini E, Enzyme engineering of fructosyl peptide oxidase to widen its active site access tunnel and improve its thermal stability, 15.–17. jūnijs, 2022, FEBS3+ konference Tallinā [https://biokeemiaselts.ee/wp-content/uploads/2022/06/ABSTRACT-BOOK\\_FEBS32022\\_Tallinn.pdf](https://biokeemiaselts.ee/wp-content/uploads/2022/06/ABSTRACT-BOOK_FEBS32022_Tallinn.pdf).
2. **Bhattacharya S**, Estiri H, Castagna R, Gautieri A, Parisini E, Enzyme engineering of fructosyl peptide oxidase to widen its active site access tunnel and improve its thermal stability, EMBO praktiskais kurss Augstas caurlaidspējas proteīnu ražošanas un kristalizācija, 2022. gada 4.–12. jūlijs, Marseļa, Francija [https://books.google.lv/books/about/High\\_Throughput\\_Protein\\_Production\\_and\\_C.htm?id=J\\_GYzWEACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.lv/books/about/High_Throughput_Protein_Production_and_C.htm?id=J_GYzWEACAAJ&redir_esc=y).
3. **Bhattacharya S**, Estiri H, Castagna R, Gautieri A, Parisini E, Enzyme engineering of fructosyl peptide oxidase to widen its active site access tunnel and improve its thermal stability, 2. ZĀĻU ATKLĀŠANAS KONFERENCE 2022. gada 22.–24. septembris, Rīga [https://drugdiscovery.osi.lv/content/files/DDC\\_Abstract\\_Book.pdf](https://drugdiscovery.osi.lv/content/files/DDC_Abstract_Book.pdf).

4. **Bhattacharya S**, Estiri H, Castagna R, Gautieri A, Parisini E, Enzyme engineering of fructosyl peptide oxidase to widen its active site access tunnel and improve its thermal stability, iNEXT DISCOVERY darbseminārs par kristalogrāfisko fragmentu skrīningu, 2023. gada 1.–3. marts, Berlīne [https://www.helmholtz-berlin.de/events/inext-discovery-workshop/index\\_en.html](https://www.helmholtz-berlin.de/events/inext-discovery-workshop/index_en.html).
5. **Bhattacharya S**, Estiri H, Castagna R, Gautieri A, Parisini E, Enzyme Engineering, mutiska prezentācija ALLIANCE4LIFE\_ACTIONS ESR atpūtas pasākums 2023. gada 23.–24. janvārī (pasākums Viļņā) [https://alliance4life.com/media/3803646/d35-report-on-early-stage-researchers-retreats\\_964997.pdf](https://alliance4life.com/media/3803646/d35-report-on-early-stage-researchers-retreats_964997.pdf).
6. **Bhattacharya S**, Castagna R, Estiri H, Gautieri A, Parisini E, Thermostable PETase enzyme for plastic degradation, BioDrug conference, BioDrug konference 22.–24. septembris, 2023, Rīga <https://biodrugconference.osi.lv/content/Abstract Book BioDrug Conference 2023.pdf>.
7. **Bhattacharya S**, Castagna R, Estiri H, Gautieri A, Parisini E, Enzyme engineering of fructosyl peptide oxidase to widen its active site access tunnel and improve its thermal stability, FEBS papildu kurss: Skaitļošanas pieejas enzīmu katalīzes izpratnei un inženierijai, kas notika Zagrebā no 2023. gada 25. līdz 29. septembrim. <https://digitalna.nsk.hr/?pr=i&id=658275>.
8. **Bhattacharya S**, Castagna R., Estiri H., Gautieri A., Parisini E., SPRINGBOARD projekta sasniegumi, pasākums 2024. gada 2. un 3. maijā Rīgā, nolasot referātu “Development of a highly optimized engineered PETase enzyme for plastic degradation” <https://springboard.osi.lv/content/abstracts/Springboard CONFERENCE Abstract .pdf>.
9. **Bhattacharya S**, Castagna R, Estiri H, Gautieri A, Parisini E, Tailoring Enzymes for tomorrow “Strukturālā bioloģija Latvijā un ārpus tās”, atzīmējot Latvijas dalību Instruct-ERIC, <https://instruct-eric.org/news/structural-biology-in-latvia-and-beyond/>.
10. **Bhattacharya S**, Development of a Highly Optimized Engineered PETase Enzyme for Polyester Degradation, WIDEnzymes darbnīca 1: Milāna, Itālija, aprēķinu metodes fermentu inženierijā, 2025. gada 27.–31. janvāris. <https://widenzymes.eu/workshops-series/workshop-1/>.
11. **Bhattacharya S**, Enzyme Engineering, uzstājās ar referātu WIDEnzymes darbnīcā 2, Enzīmu virzīta evolūcija, Ķīmijas fakultāte, Krētas Universitāte, 2025. gada 2.–6. jūnijs. <https://widenzymes.eu/workshops-series/workshop-2/>.
12. **Bhattacharya S**, Large Scale Production of PETase Enzyme, uzstājās ar referātu WIDEnzymes darbnīcā 3, Rekombinantā fermenta ražošana bioreaktorā, Slovākijas

Tehnoloģiju universitāte Bratislavā (STUBA), 2026. gada 26.–30. janvāris.  
<https://widenzymes.eu/workshops-series/widenzymes-workshop-3-stuba/>.

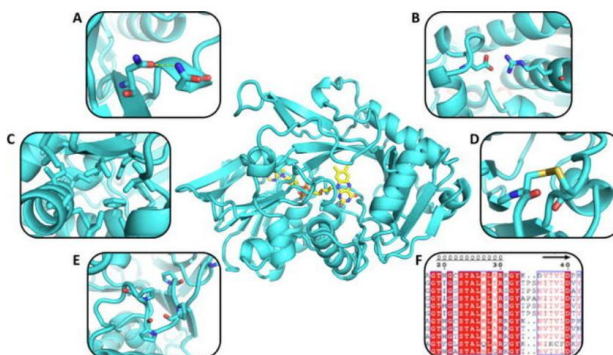
13. **Bhattacharya S**, pasniedzis OneHealthdrugs apmācību skolā (Cost Action CA21111), mērķa proteīnu paraugu ekspresija, attīrīšana un pamata raksturojums zāļu saistīšanās pētījumiem, Latvijas Organiskās sintēzes institūts, 2025. gada septembris.  
<https://onehealthdrugs.com/events/training-schools/expression-purification-and-basic-characterization-of-target-protein-samples-for-drug-binding-studies>.

## GALVENIE PROMOCIJAS DARBA REZULTĀTI

### 1. *FPOX* enzīmi

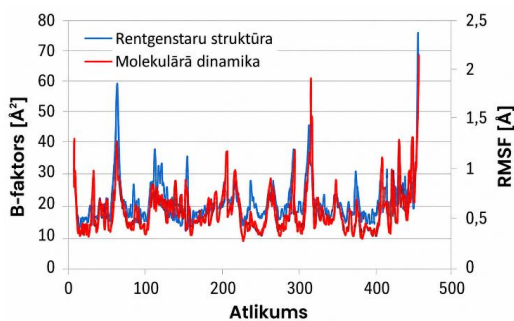
#### 1.1. Enzīmu racionāla projektēšana

Racionāla projektēšana ir datorizēta stratēģija enzīmu inženierijā, kas vērsta uz konkrētām proteīna daļām, lai uzlabotu stabilitāti, aktivitāti vai substrāta specifiskumu, risinot dabisko enzīmu ierobežojumus, kas bieži darbojas fizioloģiskajos apstākļos. Enzīmi slikti tolerē ar industriālo procesu apstākļiem, piemēram, augstu temperatūru, ekstremālu pH, augstu jonu spēku vai organiskajiem šķīdinātājiem.<sup>1</sup> Atšķirībā no *de novo* dizaina vai virzītas evolūcijas racionālais dizains ievieš rūpīgi atlasītas mutācijas, lai radītu ierobežotu mutantu kopumu, kas saglabā kopējo struktūru, vienlaikus uzlabojot vēlamās funkcionālās īpašības, izmantojot tādus paņēmienus kā polāro atlikumu ieviešana, lai veicinātu ūdeņraža saišu veidošanos, cisteīna fragmenta ievietošana, lai veidotu disulfīda tiltiņus, virsmas lādiņa mijiedarbības optimizēšana, mērķtiecīga ietekme uz kustīgajām zonām un termofilo homologu izmantošana<sup>2,3</sup> (1. att.).



1. attēls. Racionālā enzīmu dizainā izmantotas stabilizējošās stratēģijas: virsmas ūdeņraža saišu (a) un sāls tiltiņu (b) ieviešana, hidrofobā kodola (c) stabilizēšana, disulfīda tiltiņu ieviešana (d) un kustīgo cilpu stabilizēšana, izmantojot prolinu (e). Filoģenētisko analīzi (f) var izmantot atsevišķi vai kombinācijā ar iepriekšējām stratēģijām, lai vadītu fermentu racionālās projektēšanas procesu.

Mūsdienīgās pieejās tiek izmantotas daudzpunktu mutācijas un aprēķinu platformas, piemēram, *FirePro<sup>4</sup>*, lai ņemtu vērā sinerģiskas vai antagonistiskas mijiedarbības,<sup>5</sup> savukārt tādi rīki kā *CAVER<sup>6</sup>*, *Rosetta Remodel<sup>7</sup>* un molekulārās dinamikas (MD) simulācijas sniedz ieskatu proteīnu elastībā atomu līmenī, tuneļu arhitektūrā un konformāciju stabilitātē<sup>8</sup>. MD simulācijas modelē atomu kustības laika gaitā, identificējot reģionus, kas ir pakļauti nestabilitātei, un prognozējot ierosināto mutāciju ietekmi, tostarp izmaiņas ūdeņraža saites veidošanā, disulfīda tiltiņa veidošanā vai citās stabilizējošās mijiedarbībās pirms eksperimentālās testēšanas, tādējādi samazinot darba slodzi un minimizējot veidojamo mutāciju skaitu. Integrējot racionālo dizainu ar MD simulācijām, strukturālo modelēšanu un evolūcijas analīzi, enzīmu inženierija var paplašināt substrāta specifiskumu, optimizēt selektivitāti un uzlabot stabilitāti sarežģītos rūpnieciskos apstākļos. Inženierijas enzīmi ar paaugstinātu kušanas temperatūru vai samazinātu denaturācijas uzņēmību var efektīvi darboties augstā temperatūrā, ekstremālā pH līmenī vai paaugstinātā sāļumā, savukārt MD simulāciju vidējās kvadrātiskās svārstību (*RMSF*) analīzes var reproducēt eksperimentālos  $\beta$ -faktoros, lai precīzi noteiktu elastīgas zonas stabilizācijai<sup>5, 9, 10</sup> (2. att.).



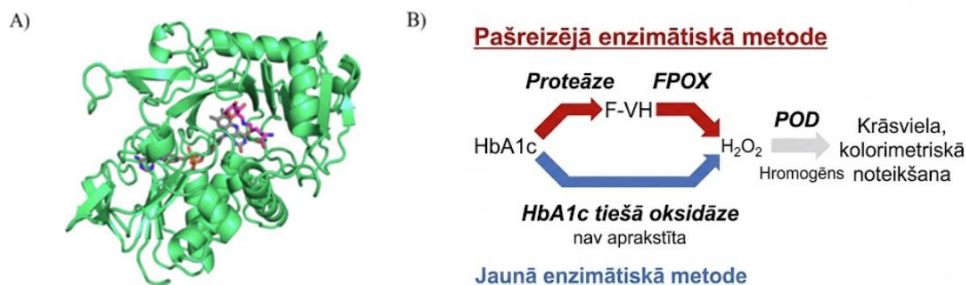
2. att. Savvaļas tipa *FPOX* fermenta *RMSF* un eksperimentālā  $\beta$ -faktora superpozīcija, kas parāda, kā MD simulāciju *RMSF* reproducē to pašu eksperimentālo  $\beta$ -faktoru tendenci un ļauj precīzi noteikt tos pašus maksimumus, kas pārstāv ļoti elastīgas proteīnu zonas.

Fruktozilaminoskābes (vai peptīdu) oksidāzes (*FPOX*), pazīstamas arī kā amadoriāzes, ir specializēta flavīna atkarīgu oksidāžu saime, kas katalizē glikēto aminoskābju vai īsu glikēto peptīdu deglikāciju. Šie enzīmi pieder oksidoreduktāžu klasei un ir plaši izplatīti raugos, sēnēs un baktērijās. Tie katalizē zemas molekulmasas Amadori produktu oksidatīvo sadalīšanos, dodot brīvus amīnus, glikozonus un ūdeņraža peroksīdu.<sup>11</sup> Reakcijā notiek C-N saites

oksidēšanās, kas savieno fruktozilgrupas C1 ar aminoskābes slāpekli, un šo procesu mediē *FAD* kofaktors, kura flavīna grupa veido fermenta katalītisko centru.

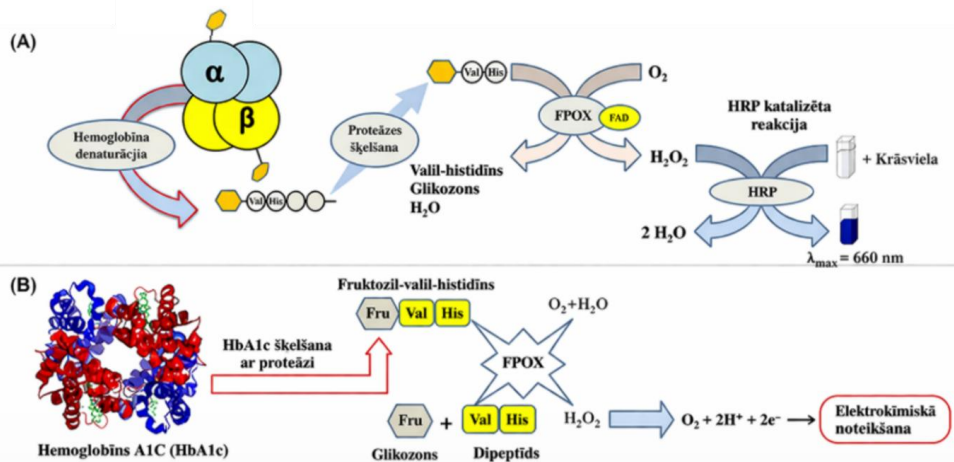
Strukturāli *FPOX* parāda labi definētus *FAD* saistīšanās motīvus un konservatīvas arhitektūras iezīmes, kas ir tipiskas glikozes–metanola–holīna oksidoreduktāzes klasei. Līdz šim ir aprakstītas vairākas *FPOX* kristāla struktūras, kas sniedz detalizētu ieskatu aktīvās vietas organizācijā un vārstu elementos, kas regulē substrāta piekļuvi.<sup>12</sup> Šie strukturālie pētījumi ir parādījuši, ka katalītiskā kabata atrodas dziļi proteīnā un ir savienota ar šķīdinātāju ar šauru piekļuves tuneli. Šai pazīmei ir galvenā nozīme substrāta specifiskuma noteikšanā (3. A att.).

*FPOX* ir nozīmīgi biomedicīnā, jo tos izmanto fermentu kompleksos glikēta hemoglobīna (HbA1c) mērīšanai, kas ir galvenais biomarķieris ilgtermiņa glikēmijas kontrolei diabēta pacientiem, tiem ir arī potenciāls glikēta albumīna noteikšanai.<sup>13</sup> Standarta diagnostikas testos hemoglobīns vispirms tiek denaturēts un proteolītiski sadalīts, lai atbrīvotu mazus glikētos peptīdus, piemēram, fruktozilvalilhistidīnu (F-VH), kas pēc tam tiek oksidēti ar *FPOX*. Tad izveidotais ūdeņraža peroksīds tiek kvantificēts vai nu kolorimetriski, izmantojot mārrutku peroksidāzi, vai elektromehāniski, kas ļauj netieši noteikt HbA1c līmeni<sup>13</sup> (3. B att.).



3. att. (A) Amadoriāzes I kristālstruktūra kompleksā ar fruktozilizīnu (PDB kods 4XWZ). (B) HbA1c fermentatīvās metodes reakcijas shēma (adaptēta no<sup>13</sup>).

Neskatoties uz to daudzpusību un diagnostisko vērtību, *FPOX* enzīmiem ir būtisks ierobežojums – tie nespēj efektīvi katalizēt neskartu proteīnu deglikāciju.<sup>14</sup> Struktūras pētījumi ir parādījuši, ka šī ierobežojuma pamatā ir šaurais substrāta piekļuves tunelis, kas savieno ar enzīma aktīvo vietu un atļaut piekļūt tikai mazām glikētām aminoskābēm vai īsiem peptīdiem.<sup>15</sup> Tā rezultātā dabiskie *FPOX* izrāda ierobežotu aktivitāti pret apjomīgiem substrātiem, piemēram, neskartām glikētajām olbaltumvielām.



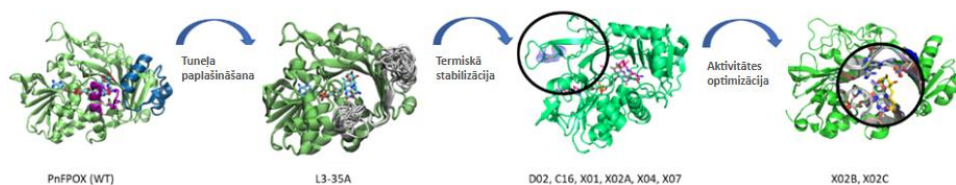
4. att. Hemoglobīna A1c (HbA1c) denaturācija un sadalīšana ar proteāzi, lai atbrīvotu fruktozilvalilhistidīnu (F-VH). (A) F-VH oksidējas ar fruktozilpeptīda oksidāzes (*FPOX*) palīdzību, un rezultātā iegūtais  $H_2O_2$  kalpo par *HRP* substrātu, veidojot krāsvielu, kuras absorbcija ir 660 nm un kas tiek izmantota, lai aprēķinātu HbA1c procentuālo daudzumu.

(B). HbA1c noteikšanas metode, elektromehāniski mērot  $H_2O_2$  (adaptēta no<sup>18</sup>).

Tomēr šīs pašas strukturālās atziņas ir nodrošinājušas stingru pamatu enzīmu inženierijai. Mērķējot uz atlikumiem, kas veido substrāta piekļuves tuneli, un stabilizējot *FAD* saistīšanās domēnu, pētnieki ir veiksmīgi radījuši *FPOX* mutācijas ar uzlabotu termisko stabilitāti, pastiprinātu katalītisko aktivitāti un palielinātu selektivitāti pret specifiskiem glikētiem substrātiem.<sup>16, 17</sup> Šādas inženierijas variācijas ne tikai nodrošina uzlabotu veiktspēju diagnostiskajos testos, tostarp kolorimetriskajos un elektroķīmiskajos HbA1c mērījumos<sup>18</sup>, bet arī kalpo kā vērtīgas modeļsistēmas, lai plašāk pētītu proteīnu inženierijas stratēģijas flavīna atkarīgajās oksidāzēs (4. att.).

Profesora Emilio Parisini grupa jau vairākus gadus strādā ar fruktozilpeptīdu oksidāzēm (*FPOX*), koncentrējoties uz to racionālu inženieriju, lai uzlabotu veiktspēju praktiskos lietojumos. Pētījumā tika veikts racionāls *Phaeosphaeria nodorum FPOX* (*Pn-FPOX*) pirmā mutanta, kas iegūts no savvaļas tipa enzīma, dizains, kam sekoja sistemātiskas modifikācijas, tostarp tuneļa paplašināšana, termiskā stabilizācija un aktivitātes optimizācija. Pēc vairākiem

inženierijas posmiem tika iegūts mutants L3-35A, kam ir platāks un īsāks piekļuves tunelis. Tas tika panākts, izdzēšot piecas aminoskābes, kas izklāj vārtu struktūru (5. att.). Promocijas darba izstrādes gaitā turpmākos pētījumus autore sāka ar šo iepriekš izstrādāto mutāciju L3-35A, kas saglabāja paplašināto piekļuves tuneli un kalpoja par sākuma punktu turpmākai optimizācijai. Balstoties L3-35A, tika piemērotas racionālas projektēšanas stratēģijas, lai atjaunotu stabilitāti un uzlabotu enzīmātisko aktivitāti, vienlaikus saglabājot paplašināto piekļuves tuneli, kas nepieciešams lielākiem substrātiem. Tika ieviestas trīs mutāciju klases: D sērija, kas vērsta uz strukturālo svārstību samazināšanu; C sērija, kas vērsta uz stabilizējošo sāls tiltnu veidošanās palielināšanu; X sērija, kas paredzēta disulfīda saišu ieviešanai papildu termiskai stabilitātei. Šīs mutācijas tika veidotas, izmantojot MD simulācijas, kas sniedza ieskatu enzīma dinamiskajā uzvedībā, elastībā un nestabilitātei pakļautajās zonās, ļaujot noteikt prioritātes daudzsoļšākajām modifikācijām.



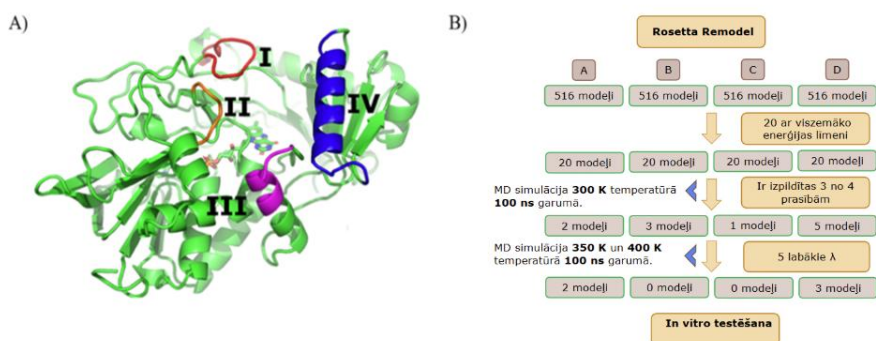
5. att. Racionālās projektēšanas stratēģijas shēma, kurā parādīti katrā posmā iegūto attiecīgo fermentu variantu nosaukumi.

Kombinētā daudzpusējā pieeja radīja *FPOX* variantus, kas bija gan termiski stabili, gan ļoti aktīvi. Labākos rezultātus uzrādīja mutācija X02C. Eksperimentālie testi apstiprināja, ka inženierijas mutācijas saglabāja strukturālo integritāti un nozīmīgu katalītisko aktivitāti, salīdzinot ar savvaļas tipa enzīmu.

Enzīms X02C ar labāko katalītisko spēju attiecībā uz dažāda garuma glikētiem substrātiem (glikēta valīna (f-V) un glikēta heksapeptīda, fruktozil-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu (F6P)) tika izvēlēts nākamajai inženierijas kārtai.

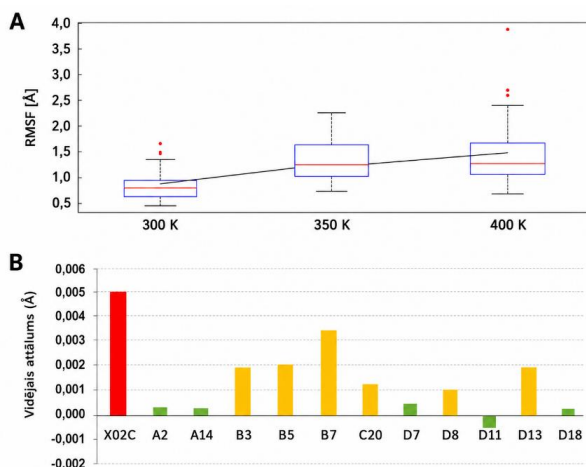
Nākamajā kārtā no enzīma X02C struktūras tika izņemts viens ceturtās spirāles pagrieziens (6. A att.) (zilā krāsā), lai paplašinātu piekļuves tuneli. Kopumā tika izņemtas deviņas aminoskābes. Šī spirāle pieder pie vienas no četrām vārstu struktūrām, kas apņem aktīvo vietu.

Pēc tam tā tika atjaunota, izmantojot mazāku atlieku skaitu (no divām līdz piecām). Turklāt, lai kompensētu šīs saīsināšanas izraisīto dabisko mijiedarbību zudumu, tika mutēti visi nekonservētie atlikumi 5 Å attālumā no pārveidotās posma. Šis 5 Å sliexsnis tika izvēlēts, ņemot vērā ūdeņraža saites attālumus (~3 Å) un tipiskās mugurkaula svārstības (*RMSD* ~1,5 Å). Tika nolemts atturēties no atlieku mutācijas, kas bija noteiktas, X02C salīdzinot ar diviem citiem ļoti aktīviem *FPOX* – *Coniochaeta* sp. *FPOX* (*FPOX-C*)<sup>19</sup> un *Aspergillus nidulans* *FPOX-47* (*AnFPOX-47*).<sup>20</sup>



6. att. A) X02C modelis, kas izmantots pārveidošanai. B) X02C enzīmu inženierijas aprēķinu daļas kopsavilkums.

Lai ieviestu izvēlētas mutācijas, tika izmantots *Rosetta Remodel*, radot 516 variantus katram rekonstruētajam cilpas garumam, kas ir divreiz vairāk nekā iepriekšējā pētījumā pārbaudīto mutāciju skaits. Katram cilpas garumam tika izvēlēti 20 radītie modeļi ar zemāko enerģētisko rādītāju, kas ir bezvienības *Rosetta Remodel* parametrs, kas kvalitatīvi apraksta modeļa kopējo stabilitāti (6. B att.). Pēc tam tika pētītas šīs struktūras, izmantojot molekulārās dinamikas 300 K, 350 K un 400 K simulācijas temperatūrā 100 ns simulētā laika periodā, un novērtēta šo mutāciju vidējā kvadrātiskā novirze (*RMSD*) un vidējā kvadrātiskā svārstība (*RMSF*). Mutanti, kas bija labāki par X02C vismaz trīs no četriem parametriem (vidējā *RMSD*, vidējā *RMSF*, mediāns *RMSF* un *RMSF* standarta novirze), tika izvēlēti nākamajai molekulārās dinamikas simulāciju kārtai (7. att.).



7. att. *RMSF* analīze pieaugošās temperatūrās. (A) *RMSF* pārveidotajai X02C cilpai kā funkcija no temperatūras ( $T$ ). Lineārās regresijas analīze nodrošināja leņķa koeficientu (slīpumu) *RMSF* pret  $T$  attiecībai. (B) Dažādu enzīmu variantu leņķa koeficients, mutanti ar zemākajām vērtībām (zaļā krāsā) tika izvēlēti eksperimentālai validācijai.

Optimizētie varianti tika eksperimentāli ekspresēti, attīrīti un bioloģiski raksturoti. Tika pārbaudīta arī to katalītiskā aktivitāte pret glikētiem peptīdiem un *ex vivo* glikētiem cilvēka audiem. Starp tiem *PnFPOX-A14* parādīja ievērojami uzlabotu aktivitāti, salīdzinot ar sākotnējo inženierijas variantu X02C, īpaši attiecībā uz apjomīgākiem substrātiem. Jāatzīmē, ka X02C saglabāja ierobežotu aktivitāti pret pilna garuma glikētiem proteīniem, savukārt PnFPOX-A14 spēja tieši atpazīt un iedarboties uz neskartu HbA1c, parādot uzlabotu substrāta pieejamību un katalītisko veikspēju. Šie rezultāti apstiprināja aprēķinu dizaina stratēģiju un parādīja *PnFPOX-A14* kā uzlabotu platformu turpmākai inženierijai diagnostikas un potenciālu terapeitisko lietojumu jomā. Šie rezultāti ir apkopoti zinātniskajā rakstā, kas pievienots 5. pielikumā.

## 1.2 Enzīmu ekspresija un attīrīšana

Promocijas darba ietvaros tika izmantota rekombinantā DNS tehnoloģija, lai ekspresētu visus enzīmus *Escherichia coli*, galvenokārt izmantojot BL21(DE3) prokariotiskās olbaltumvielas un BL21(DE3) atvasinājumus, kas papildināti ar retām tRNA eikariotiskajām olbaltumvielām, lai mazinātu kodonu novirzi, izmantojot ekspresijas vektoram atbilstošu

antibiotiku selekciju (ampicilīnu, kanamicīnu vai hloramfenikolu).<sup>21, 22</sup> Pirms liela mēroga ekspresijas tika veikti maza mēroga ekspresijas testi, kuros katrs mutants tika audzēts dažādās temperatūrās un inducēts ar dažādām *IPTG* koncentrācijām, lai identificētu optimālos apstākļus maksimālai šķīstošo proteīnu ekspresijai. Pēc optimālo parametru noteikšanas proteīnu ražošana tika palielināta, parasti līdz 4 litriem, un attīrīšana tika veikta, izmantojot divpakāpju darba plūsmas *ĀKTA* šķidrums hromatogrāfijas sistēmu (*Cytiva*). *FPOX* klasei ekspresija *E. coli* BL21 Star (DE3) 25 °C temperatūrā deva iznākumu no 10 mg/l līdz 30 mg/l, ar vislielāko iznākumu (30 mg/l) tika iegūts L3-35A. Vairāki *FPOX* mutanti, kam raksturīgas disulfīda saites, tika ekspresēti no SHuffle T7 celma<sup>23</sup> 18 °C temperatūrā, uzrādot dažādus ražošanas apjomus, sākot no zemas ekspresijas X01 (5 mg/l) līdz salīdzinoši augstiem līmeņiem X02C (29 mg/l) (1. tab.).

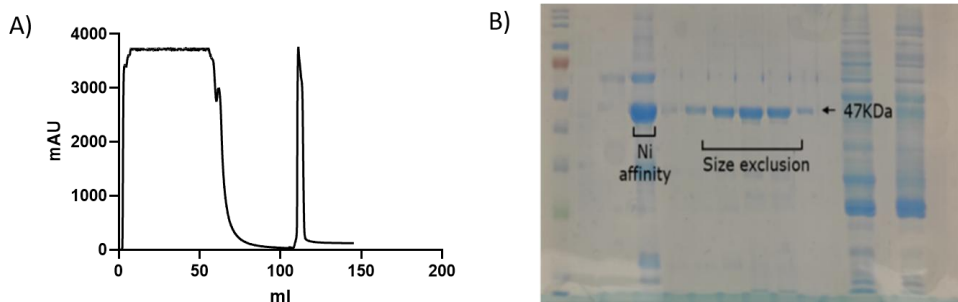
1. tabula

Enzīmu ekspresijas iznākumi

Enzīms	Ekspresijas iznākums (mg/L)	Ekspresijas temperatūra (°C)	Ekspresijas šūnas
<i>PnFPOX</i>	10	25	BL21 Star (DE3)
L3-35A	30	25	BL21 Star (DE3)
D02	15	25	BL21 Star (DE3)
C16	12	25	BL21 Star (DE3)
X01	5	18	SHuffle T7 E
X02A	20	18	SHuffle T7 E
1. tabulas turpinājums			
X04	10	18	SHuffle T7 E
X07	6	18	SHuffle T7 E
X02B	16	18	SHuffle T7 E
X02C	29	18	SHuffle T7 E

Pirmajā posmā tika veikta imobilizēta metāla afinitātes hromatogrāfija (*IMAC*), izmantojot *HisTrap* 5 ml niķeļa kolonnu ar *N* terminālo His<sub>6</sub> afinitātes marķieri uz rekombinantajiem proteīniem un imidazolu saturošu buferi kā eluentu (8. A att.). Otrajā posmā proteīni turpināti attīrīt ar izmēra izslēgšanas hromatogrāfiju (*SEC*), izmantojot *HiPrep* 26/60 *Sephacryl* S-200 kolonnu, kas noņēma agregātus, ļāva veikt bufera apmaiņu un nodrošināja enzīmu monodispersitāti.<sup>24</sup> Proteīnu koncentrācija tika mērīta, izmantojot *NanoDrop One* spektrofotometru (*Thermo Fisher Scientific*), molekulārais svārs un tīrība tika novērtēta ar *SDS-PAGE* ar *Coomassie* zilo krāsojumu, kas nodrošināja uzticamu proteīnu izmēra un viendabīguma apstiprinājumu<sup>25</sup> (8. B att.). Šī baktēriju ekspresijas, indukcijas apstākļu

optimizācijas un secīgas *IMAC* un *SEC* attīršanas kombinācija ļāva iegūt augstas tīrības funkcionālus enzīmus, kas piemēroti detalizētai bioloģiskai un strukturālai raksturošanai, veidojot stabilu pamatu turpmākiem enzīmu inženierijas pētījumiem.



8. att. A) Tipiska niķeļa afinitātes hromatogrāfijas (*IMAC*) hromatogramma (no *FPOX* fermenta *X02C* attīršanas). Zilā līkne attēlo UV absorbanci (A280), kas izmantota proteīna eluācijas uzraudzībai. B) *FPOX* fermenta-*X02C* elektroforēzes aina.

### 1.3 Biofizikālā raksturošana

Biofizikālā raksturošana ir būtiska proteīnu strukturālās integritātes, stabilitātes un funkcionalitātes novērtēšanai, jo pareiza salocīšanās un molekulārā integritāte ir enzimatiskās aktivitātes priekšnoteikums. Tādas metodes kā cirkulārā dihroisma (CD) spektroskopija, diferenciālā skenējošā fluorimetrija (DSF) un *MALDI* masspektrometrija sniedz papildu informāciju par sekundāro struktūru, termisko stabilitāti un molekulmasu.<sup>26</sup> CD spektroskopija novērtē sekundāro struktūru, mērot cirkulāri polarizētas gaismas diferenciālo absorbciju – tālais ultravioletais spektrs dod informāciju par  $\alpha$ -spirālēm,  $\beta$ -lapām un nesakārtotajiem reģioniem, savukārt no temperatūras atkarīgie CD mērījumi ļauj izpētīt termiskos izkļiedšanās procesus.<sup>27</sup> DSF, izmantojot uz vidi reaģējošas krāsvielas, piemēram, *SYPRO Orange*, mēra fluorescences izmaiņas proteīnu struktūras maiņas laikā un ļauj noteikt kušanas temperatūras ( $T_m$ ), un tā rezultātā ir iespējams kvantitatīvi salīdzināt stabilitāti dažādos variantos, buferu apstākļos vai liganda saistītos stāvokļos.<sup>28</sup> Šajā pētījumā gan DSF, gan CD tika izmantoti, lai novērtētu inženierijas *FPOX* variantu termisko stabilitāti, iegūstot konsekventas tendences un salīdzināmas absolūtās  $T_m$  vērtības, tādējādi apstiprinot mērījumu stabilitāti. Rezultāti liecina, ka piemērota racionālā dizaina stratēģija efektīvi uzlaboja references enzīma L3-35A termisko stabilitāti (9. att.). D02 variants, kas satur divas papildu mutācijas (V110R un D115G), uzrādīja kušanas temperatūras paaugstināšanos aptuveni par 1,5 °C, salīdzinot ar sākotnējo enzīmu. Turpmāka stabilizācija tika panākta, ieviešot plašus virsmas lādiņus un sāls tiltiņus mutācijā

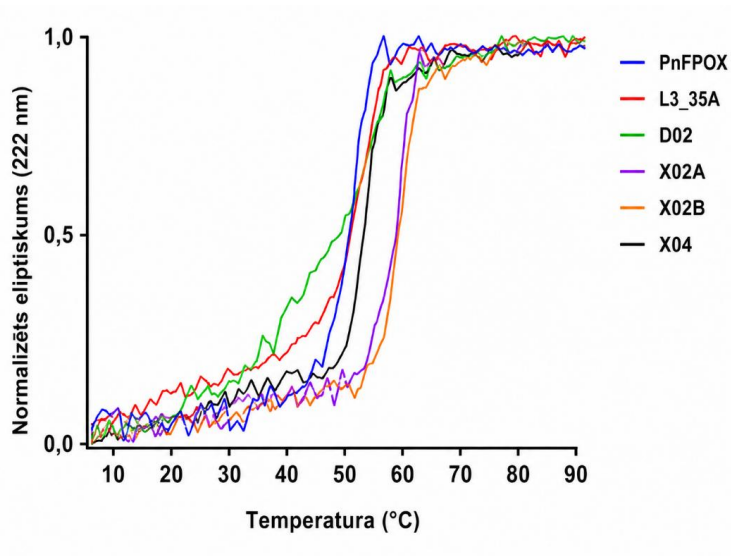
C16, kas radīja papildu  $T_m$  paaugstināšanos par aptuveni 1,5 °C, sasniedzot 55,2 °C (2. tab.). Vienas disulfīda saites iekļaušana dažādās pozīcijās L3-35A skeleta struktūrā radīja ievērojamus uzlabojumus termiskajā stabilitātē. Visas šīs sērijas variācijas – X01 (54,1 °C), X02A (60,0 °C), X04 (55,2 °C) un X07 (55,3 °C) – uzrādīja ievērojami paaugstinātu kušanas temperatūru, salīdzinot ar sākotnējo enzīmu (2. tab., 9. att.). Kopumā šie rezultāti liecina, ka gan elektrostatiskā optimizācija, gan disulfīda saites inženierija ir efektīvas stratēģijas *FPOX* termiskās stabilitātes uzlabošanai, un apstiprina papildu biofizikālo metožu izmantošanu proteīnu stabilizācijas rezultātu kvantitatīvai novērtēšanai.

2. tabula

References enzīma (L3-35A) un tā mutāciju kušanas temperatūra\*

<b>Ferments</b>	<b><math>T_m</math> [°C]<sup>a</sup></b>	<b><math>T_m</math> [°C]<sup>b</sup></b>
<i>PnFPOX</i> (WT)	53,2 ± 0,2	53,5 ± 0,1
L3-35A	52,3 ± 0,2	52,9 ± 0,1
D02	53,1 ± 0,5	54,8 ± 0,1
C16	55,2 ± 0,1	55,0 ± 0,1
X01	54,1 ± 0,1	54,2 ± 0,1
2. tabulas turpinājums		
X02A	60,0 ± 0,4	60,1 ± 0,1
X04	55,2 ± 0,3	55,0 ± 0,1
X07	55,3 ± 0,4	55,4 ± 0,1
X02B	60,2 ± 0,7	60,6 ± 0,1
X02C	64,0 ± 0,2	63,3 ± 0,1

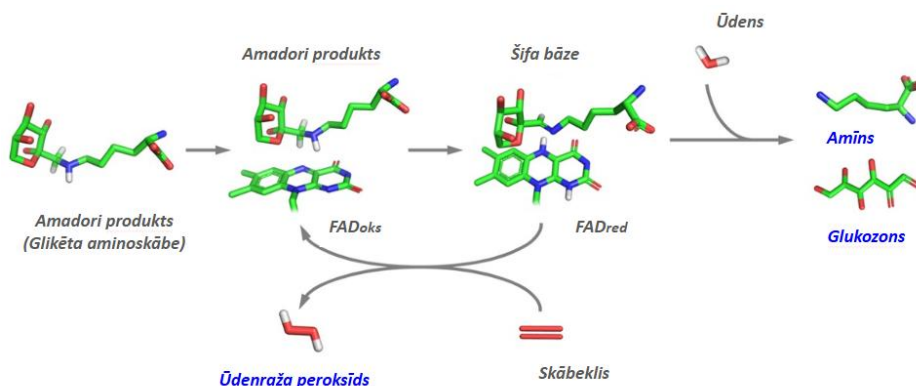
\* Temperatūra noteikta ar termiskās nobīdes analīzi (a) un cirkulāro dihroismu (b). Kā atsauce ir norādīta arī savvaļas tipa fermenta (*PnFPOX*) kušanas temperatūra.



9. att. Dažādu *FPOX* variantu  $T_m$  vērtību salīdzinājums, kas izmērīts ar cirkulāro dihiroismu 222 nm diapazonā no 5 °C līdz 95 °C.

#### 1.4 Funkcionālais tests

Visu *FPOX* variantu enzimatiskā aktivitāte tika novērtēta istabas temperatūrā, kvantitatīvi nosakot glikozona daudzumu, kas laika gaitā atbrīvojās no substrāta, ievērojot iepriekš izstrādātās metodes<sup>29</sup> (10. att.).



10. att. Amadoriāzes I katalizētās aminoskābju deglikācijas reakcijas shēma (adaptēta no Rigoldi u. c.<sup>30</sup>).

Absorbcijas pieaugums pie 322 nm ( $\epsilon_{322} = 149,25 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  glikozonam) nepārtraukti tika noteikts, izmantojot *Infinite M1000* mikroplašu lasītāju (*Tecan*) 25 °C temperatūrā. Katra reakcijas maisījuma (200  $\mu\text{L}$ ) sastāvā bija 20 mM Tris-HCl buferis, pH 7,4, kas saturēja 20 mM *o*-fenilēndiamīnu un 2 mM attiecīgā substrāta (fruktozilizīna (fK), fruktozilvalīna (fV), fruktozil-valīna-histidīnu (fVH) vai heksapeptīdu 1-dezoksifruktozil-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu (F6P)). *FPOX* katalizē fruktozilsubstrātu oksidēšanu, radot glikozonu kā reakcijas produktu. *OPD* reaģē ar glikozonu, veidojot hinoksalīna atvasinājumu, kas absorbē pie 322 nm. Pēc 1 minūtes iepriekšējas inkubācijas reakcijas maisījumam tika pievienots enzīms koncentrācijā 0,04–1 mg/ml, atkarībā no varianta aktivitātes (3. tab.).

3. tabula

Enzīmu specifiskās aktivitātes (U/mg) uz dažādiem glikētiem peptīdu substrātiem  
salīdzinājums

Enzīms	Specifiskā aktivitāte (U/mg)			
	fK	fV	fVH	F6P
<i>PnFPOX</i>	30,18 ± 0,67	29,67 ± 2,56	32,60 ± 1,18	0,78 ± 0,09
AnFPOX-47	–	–	–	0,082 ± 0,002
L3-35A	0,21 ± 0,02	0,16 ± 0,04	–	–
D02	0,30 ± 0,03	0,32 ± 0,01	–	–
C16	ND	ND	–	–
3. tabulas turpinājums				
X01	ND	ND	–	–
X02A	0,15 ± 0,01	0,11 ± 0,01	–	–
X04	ND	0,13 ± 0,01	–	–
X07	–	0,08 ± 0,01	–	–
X02B	2,24 ± 0,07	32,50 ± 0,44	0,87 ± 0,03	0,18 ± 0,06
X02C	1,06 ± 0,01	17,95 ± 2,46	1,62 ± 0,02	0,43 ± 0,06

Testi tika veikti trīs reizes. ND – nav konstatēts.

Viena enzīma aktivitātes vienība (U) tika definēta kā enzīma daudzums, kas noteiktos analīzes apstākļos 1 minūtē katalizē 1  $\mu\text{mol}$  glikozona veidošanos, specifiskā aktivitāte tika izteikta kā U  $\text{mg}^{-1}$  enzīma. Kinētiskās konstantes ( $V_{\text{max}}$ ,  $K_m$ ,  $k_{\text{cat}}$  un  $k_{\text{cat}}/K_m$ ) tika noteiktas ar testiem, kas veikti ar dažādām substrāta koncentrācijām (0,05–10 mM fruktozilvalīnam; 0,05–1 mM heksapeptīda substrātam), izmantojot *Michaelis-Menten* vienādojuma nelineāro regresijas analīzi, ko papildināja *Lineweaver-Burk* diagrammas pielāgojums. Visi dati atspoguļo vismaz divu neatkarīgu eksperimentu vidējos rādītājus (4. tab.).

Kinētiskie parametri savvaļas tipa *PnFPOX* un inženierijas X02C enzīmiem

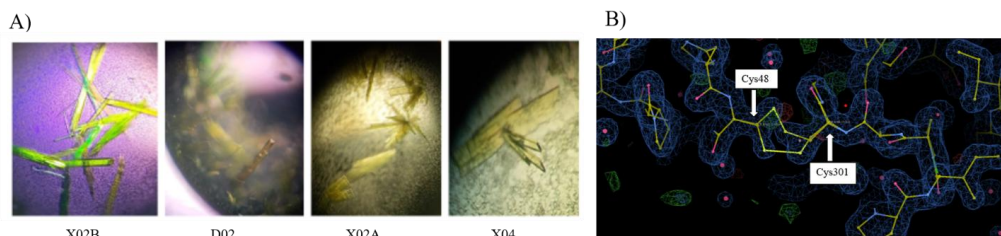
Enzīms	Substrāts	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mM/min)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $mM^{-1} s^{-1}$ )
<i>PnFPOX</i>	fV	$5,93 \pm 1,61$	$41,67 \pm 8,34$	$99,33 \pm 19,86$	16,75
X02C	fV	$0,94 \pm 0,06$	$10,56 \pm 0,56$	$20,83 \pm 1,10$	22,16
<i>PnFPOX</i>	F6P	$0,81 \pm 0,30$	$15,48 \pm 1,20$	$36,83 \pm 2,83$	45,47
X02C	F6P	$0,03 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,02$	17,22

Kinetiskā analīze parādīja, ka inženierijas variants X02C uzrādīja ievērojami zemāku  $K_m$  (0,94 mM) nekā savvaļas tips *PnFPOX* (5,93 mM), liecinot par uzlabotu substrāta afinitāti. Lai gan  $K_{cat}$  nedaudz samazinājās, katalītiskā efektivitāte ( $K_{cat}/K_m$ ) palika salīdzināma vai uzlabojās, uzsverot kompromisu starp substrāta saistīšanos un reakcijas ātrumu, ko bieži tiek novērota enzīmu inženierijā (3. tab.).

### 1.5 Rentgena kristalogrāfija

Rentgena kristalogrāfija tika izmantota, lai noteiktu inženierijas fruktozilpeptīda oksidāzes (*FPOX*) variantu trīsdimensiju struktūras, sniedzot atomāra līmeņa ieskatu to strukturālajā organizācijā, katalītiskajā arhitektūrā un stabilizējošajās īpašībās. Difrakcijai piemēroti kristāli tika iegūti, izmantojot tvaika difūzijas metodes optimizētos supersaturācijas apstākļos. Augstas izšķirtspējas difrakcijas dati tika ievākti sinhronizācijas avotā, kas ļāva precīzi noteikt un precizēt struktūru.<sup>31–33</sup>

Struktūras analīze atklāja galvenās iezīmes, kas ir enzīmu stabilitātes, substrāta pieejamības un katalītiskās efektivitātes pamatā. Vairāki inženierijas *FPOX* varianti tika veiksmīgi atrisināti un iesniegti proteīnu datu bankā, tostarp X02B (PDB ID: 8BJY), D02 (8BLZ), X02A (8BLX) un X04 (8BMU). Šīs struktūras sniedz detalizētu strukturālo pamatu, lai izprastu racionāli ieviesto mutāciju ietekmi, un apstiprina to nozīmi *FPOX* enzīmu stabilitātes un veikspējas uzlabošanā (11. att.).



11. att. A) *FPOX* variantu kristāli. B) X02A (PDB: 8BLX) elektronu blīvuma karte, kas parāda disulfīda saites veidošanos starp cisteīniem 48 un 301.

## 1.6 Struktūras un funkcijas korelācijas analīze

Rentģena kristalogrāfiskā struktūra skaidri parāda saikni starp molekulāro arhitektūru un proteīna funkcionālajām īpašībām. Augstas izšķirtspējas modelis atklāj labi definētus sekundāros un terciāros elementus, kas veido stabilu struktūru, kas atbalsta aktīvās vietas organizāciju un substrāta saistīšanos. Galvenie atlikumi ir precīzi novietoti, lai nodrošinātu katalīzi vai liganda mijiedarbību, kas atbilst bioķīmiskajiem novērojumiem. Struktūras īpatnības, piemēram, ūdeņraža saites, hidrofobie kontakti un elektrostātiskās mijiedarbības, vēl vairāk veicina substrāta specifiskumu un stabilitāti. Visos promocijas darba izstrādes gaitā veiktajos enzīmu pētījumos detalizēta kristalogrāfiskā analīze ir bijusi centrālā, lai izprastu, kā trīsdimensiju struktūra regulē bioloģisko funkciju un katalītisko mehānismu. *FPOX* enzīmu gadījumā tika novērots, ka visas kopējās *RMSD* vērtības starp mutantiem un savvaļas tipa *PnFPOX* (PDB 5T1E) bija 1,8 Å robežās, norādot, ka kopējā struktūra lielā mērā paliek nemainīga (5. tab.).

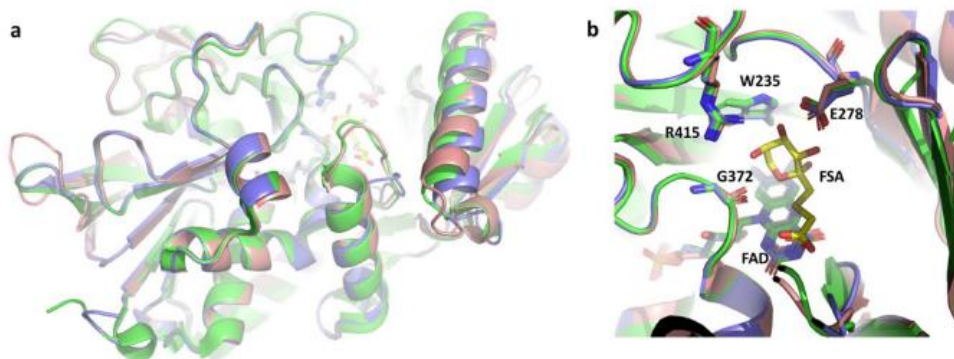
5. tabula

Aprēķinātās *RMSD* vērtības starp *WT* fermentu *PnFPOX* un dažādiem mutantiem, kā arī tuneļa ģeometrija

Ferments	<i>RMSD</i> [Å]	Tuneļa šaurākās vietas rādiuss [Å]	Tuneļa garums [Å]
<i>PnFPOX</i>	–	2,2	13,3
L3-35A	1,8	3,7	6,4
D02	1,4	2,9	11,7
X02A	1,7	3,1	9,4
X04	1,8	3,0	10,9
X02B	1,5	3,0	10,2

Salīdzinot katalītisko vietu veidojošos atlikumus (W235, E278, G372, R415), tika konstatēts, ka to orientācija ir saglabājusies visos variantos (12. att.). Šie atlikumi, kas ir ļoti konservatīvi *FPOX* enzīmos, ir atbildīgi par substrāta cukura daļas saistīšanu. Tāpēc variantu

katalītiskās aktivitātes atšķirības, visticamāk, nav saistītas ar izmaiņām katalītiskās struktūras ģeometrijā, bet gan ar smalkākām izmaiņām ap substrāta tuneli.



12. att. Attiecīgo *FPOX* enzīmu strukturālais salīdzinājums: *PnFPOX* (zaļš), *AnFPOX-47* (rozā) un *X02B* (violets). *FSA* inhibitors attēlots dzeltenā krāsā. (a) Kopējā strukturālā saskaņotība neuzrāda nozīmīgas atšķirības starp enzīmiem, izņemot ieejas tuneli. (b) Katalītiskās vietas pozīcija ir ļoti konservatīva.

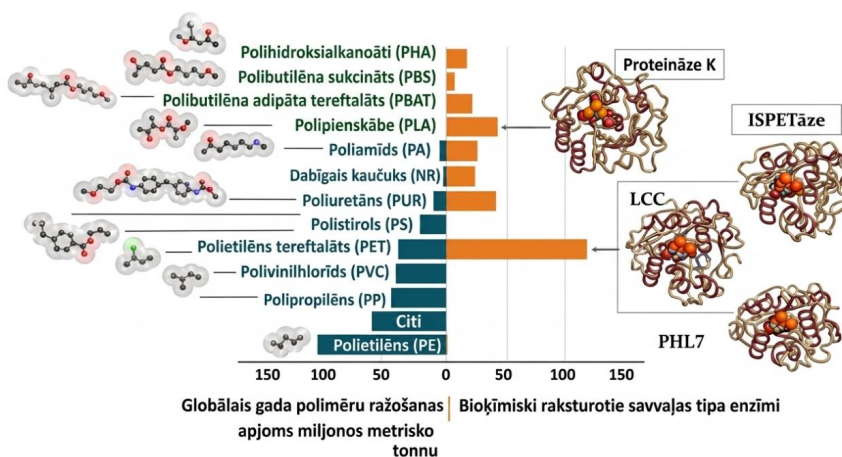
Tika novērots, ka mutācijas galvenokārt ietekmē tuneļa izklājuma atlieku ģeometriju un dinamisko uzvedību. Savvaļas tipa enzīmam ir šaurs un pagarināts tunelis (šaurākā vieta – 2,2 Å, garums – 13,3 Å), kas, visticamāk, ierobežo piekļuvi lielākiem substrātiem, vienlaikus stabilizējot mazākus. Turpretim L3-35A variants ir daudz platāks un īsāks tunelis (attiecīgi 3,7 Å un 6,4 Å), savukārt X02B mutants ir ar vidēju ģeometriju (3,0 Å, 10,2 Å). Šīs strukturālās atšķirības liecina, ka mutaģēze ir mainījusi ne tikai tuneļa statiskos izmērus, bet arī apkārtējo atlikumu korelēto elastību, tādējādi ietekmējot substrāta pieejamību un stabilizāciju.

### 1.7 Pašreizējie virzieni un nākotnes iespējas

Balstoties inženierijas *FPOX* variantos, pašreiz tiek strādāts, lai integrētu šos optimizētos enzīmus jutīgās biosensoros platformās HbA1c noteikšanai (5. pielikums). Pašreizējie centieni ir vērsti uz kolorimetrisko un elektroķīmisko sensoru formātu izstrādi, enzīmu imobilizācijas un signāla pārraides uzlabošanu, kā arī veiktspējas novērtēšanu ar klīniski nozīmīgiem paraugiem. *FPOX* bāzes sensori tiek izstrādāti, lai nodrošinātu tiešu, ātru un rentablu glikēto proteīnu mērīšanu.

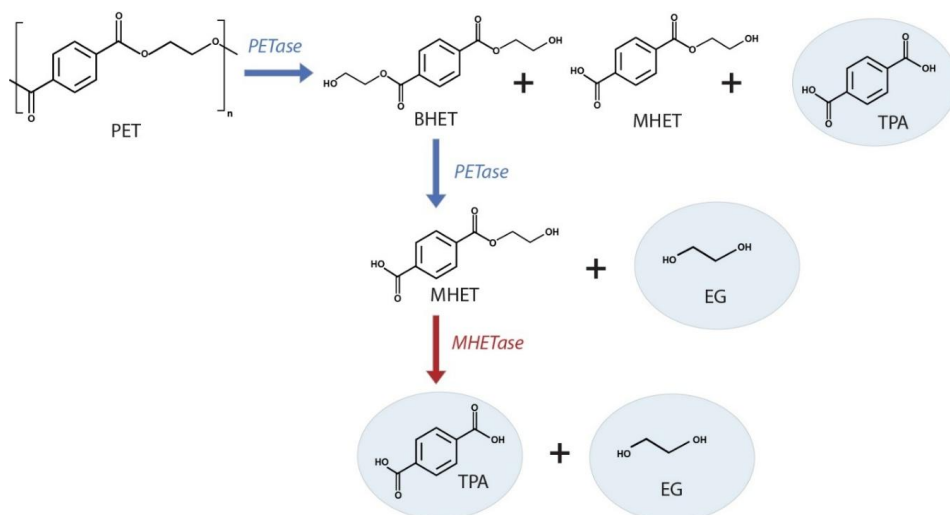
## 2. PETāzes enzīmi

Plastmasas piesārņojums ir būtiska vides problēma, un polietilēntereftalāts (PET) ir viens no visplašāk izmantotajiem un noturīgākajiem plastmasas veidiem. Tā izturība pret ķīmisko un bioloģisko sadalīšanos ir izraisījusi tā plašu uzkrāšanos atkritumu poligonos un dabiskajās ekosistēmās, savukārt tradicionālās apglabāšanas metodes, piemēram, sadedzināšana un mehāniskā pārstrāde, joprojām ir neefektīvas vai kaitīgas videi. PETāzes atklāšana, kas ir enzīms, kas spēj depolimerizēt PET mazākos bioloģiski noārdāmos produktos, ir nozīmīgs biotehnoloģisks sasniegums un daudzsoļa bioloģiska pieeja plastmasas piesārņojuma mazināšanai<sup>34, 35</sup> (13. att.).



13. att. Galveno plastmasas polimēru ražošana pasaulē un bioloģiski raksturotu savvaļas tipa depolimerāžu pieejamība.<sup>35</sup>

Nesenie pētījumi liecina, ka noteikti mikroorganismi var ražot hidrolītiskos enzīmus, kas spēj sadalīt un metabolizēt PET. Līdz šim pētnieki ir izolējuši un identificējuši dažādus PET sadalošos enzīmus, galvenokārt esterāzes, lipāzes, hidrolāzes un kutināzes. PET sadalošie proteīni tika nosaukti par PETāzēm, un tām ir piešķirts Enzīmu komisijas numurs EC 3.1.1.101. 2016. gadā no PET piesārņotas pārstrādes vietas Japānā, kas izmanto PET kā galveno oglekļa un enerģijas avotu, tika izolēta baktērija *Ideonella sakaiensis*, kurai ir unikāla spēja starp zināmajiem mikroorganismiem. Enzīms PETāze ļauj baktērijai hidrolizēt PET polimērā esošās estera saites, ražojot mazākas molekulas, piemēram, mono(2-hidroksietil)tereftalātu (MHET), tereftālskābi (TPA) un etilēnglikolu (EG)<sup>37, 38</sup> (14. att.).



14. att. PET depolimerizācijas shēma: PETāze katalizē PET depolimerizāciju līdz bis(2-hidroksietil)tereftalātam (BHET), mono(2-hidroksietil)tereftalātam (MHET) un tereftālskābei (TPA). MHETāze pārvērš MHET monomēros – tereftālskābē TPA un etilēnglikolā EG.

Šie sadalīšanās produkti ir mazāk kaitīgi videi un turpmāk var tikt metabolizēti ar baktēriju palīdzību vai izmantoti rūpnieciskos pārstrādes procesos. Struktūras ziņā PETāze pieder pie hidrolāžu cutināžu saimes, kas ir enzīmi, kas parasti sadala dabiskos poliesterus, piemēram, kutīnu un vaskus, kas atrodama augu kutikulās. PETāzei piemīt šīs evolūcijas mantojums, bet tā ir pielāgojusies atpazīt un iedarboties uz sintētisko PET. Tās aktīvā vieta satur galvenos aminoskābju atlikumus, kas veicina esteri saišu hidrolīzi, ļaujot sadalīt garās polimēru ķēdes mazākos fragmentos. Šīs strukturālās īpašības ir bijušas izšķirošas centienos izstrādāt PETāzes variantus ar uzlabotu aktivitāti, stabilitāti un termisko izturību.<sup>39, 40</sup>

Kopš PET depolimerizējošo enzīmu atklāšanas enzimātiska PET pārstrāde tiek uzskatīta par daudzsoļu plastmasas atkritumu apstrādes metodi, jo īpaši saistībā ar aprites ekonomikas stratēģiju.<sup>41</sup> Fermentatīvā pārstrāde piedāvā videi draudzīgu alternatīvu ķīmiskajām metodēm, pārvēršot PET tā monomēros, ko var atkārtoti izmantot jaunu plastmasas izstrādājumu sintēzei. Tomēr līdz šim izstrādātajiem PET sadalošajiem enzīmiem ir vairākas problēmas, kas ierobežo to izmantošanu rūpniecībā. Līdz šim PET rūpnieciskās enzīmu pārstrādes izmaksas ir ievērojami augstākas nekā jauna PET ražošanas izmaksas, jo pastāv vairāki ierobežojumi, kas saistīti ar pašlaik pieejamajām PETāzēm.<sup>42</sup> Lai gan rūpnieciskā ieviešana ir pierādīta, piemēram, Francijas uzņēmumā “Carbios”, daudzām PETāzes joprojām piemīt zema

termostabilitāte, ierobežota katalītiskā efektivitāte un degradācijas starpproduktu izsaukta PETāzes inhibīcija, kas padara liela mēroga PET pārstrādi nepraktisku.<sup>43, 44</sup> Lai pārvarētu šos ierobežojumus, promocijas darbs ir vērsts uz PETāzes enzīmu inženierijas izstrādi, izmantojot progresīvas racionālas projektēšanas stratēģijas, lai izstrādātu efektīvu variantu rūpnieciskai PET enzīmu degradācijai. Darba izstrādes gaitā tika modificēts pašreizējais PET hidrolizējošo enzīmu zelta standarts [*ICCG* variantu lapu un zaru komposta kutināzes (*LCC-ICCG*)], izmantojot *in silico* proteīnu projektēšanas metodes, lai izstrādātu PET hidrolizējošu enzīmu, kam ir uzlabota termiskā stabilitāte un PET depolimerizācijas aktivitāte.

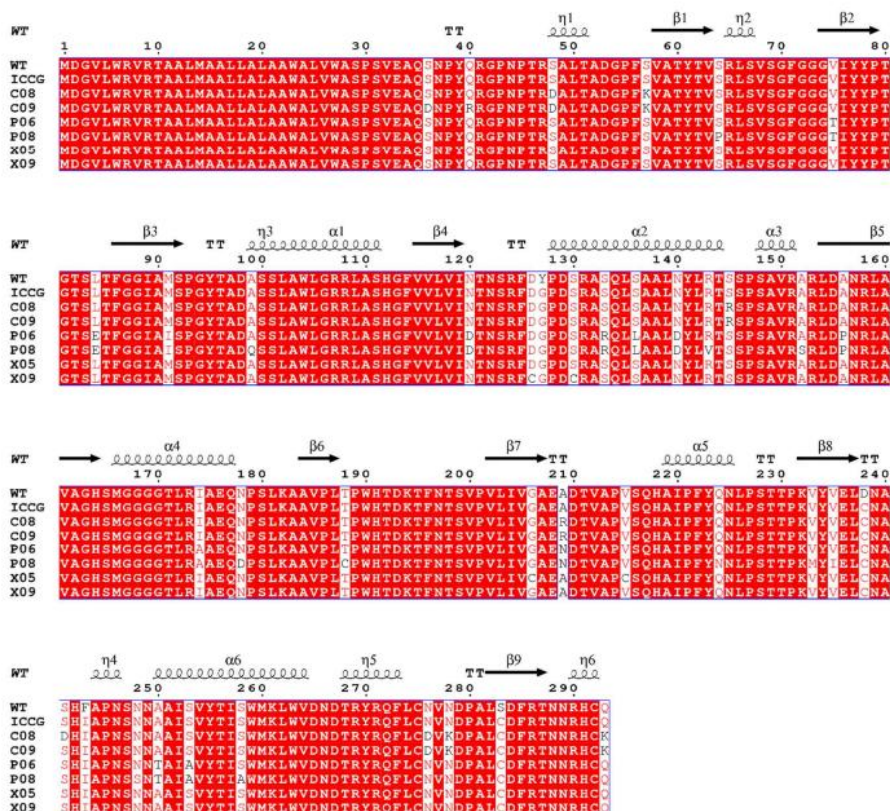
## 2.1. Inženierijas *LCC-ICCG* PETāzes fermenta izstrāde

Lapu un zaru komposta kutināze (*LCC*) ir ļoti efektīva, dabīgi sastopama PETāze, tās kušanas temperatūra ( $T_m$ ) ir 84,7 °C.<sup>45</sup> 2020. gadā *Tournier* u. c. to tālāk modificēja, lai radītu *ICCG* (*LCC-ICCG*) variantu, kas sasniedz  $T_m$  vērtības 91,7–94,0 °C un pašlaik tiek uzskatīts par zelta standartu PETāžu jomā.<sup>45, 46</sup> Neskatoties uz šo izcilo stabilitāti, *LCC* plašais sekvenču telpas diapazons piedāvā ievērojamu potenciālu turpmākai optimizācijai. Balstoties uz *LCC-ICCG* skeletu, tika sāka stabilāka un aktīvāka PETāzes izstrāde, vadoties no hipotēzes, ka uzlabota termiskā stabilitāte korelē ar uzlabotu ekspresiju un katalītisko veikspēju.

### 2.1.1. Racionālā inženierija

*In silico* enzīmu inženierija tika iesākta no *LCC-ICCG* varianta, stabilizēta lapu un zaru komposta kutināzes atvasinājuma, kas satur četras mutācijas (F243I, Y127G, S283C un D238C), tostarp papildu disulfīda saiti un 165. pozīcijā atjaunotu katalītisku serīna atlikumu.<sup>46, 45, 47</sup> Atlikumi 5 Å attālumā no aktīvās vietas tika izslēgti no mutāģēzes, lai saglabātu katalītisko funkciju. Lai radītu stabilizējošas variācijas, tika piemērotas trīs papildinošas aprēķinu stratēģijas: *Rosetta Supercharge*<sup>48</sup>, *PROSS*<sup>49</sup> un *Disulfide-by-Design*<sup>3</sup>. *Rosetta Supercharge* pieeja uzlabo proteīna stabilitāti, palielinot virsmas hidrofilītāti, kas parasti ir saistīta ar uzlabotu strukturālo izturību. Plaši izmantota un vienkārša stabilizācijas stratēģija ir viena vai vairāku disulfīda saišu ieviešana, kas var nostiprināt proteīna mugurkaulu un uzlabot stabilitāti<sup>50</sup>. Papildu stabilizācijas pieejas mērķis ir paplašināt iekšmolekulāro udeņraža saišu tīklus, ieviest stabilizējošas sāls tiltiņus vai uzlabot hidrofobisko kodolu iepakojumu, kā tas ir īstenots *PROSS*<sup>49</sup>. Šīs pieejas deva attiecīgi 1000, 9 un 125 kandidātu variantus, no kuriem tika atlasītas apakškopas ar vislabvēlīgākajiem rezultātiem (C01-C10, P01-P09 un X01-X10). Visas 29 atlasītās variācijas tika pakļautas 1 μs molekulārās dinamikas simulācijām eksplīcītā šķīdinātājā un klasificētas, pamatojoties uz *RMSF* atvasinātiem stabilitātes rādītājiem. Šī atlase

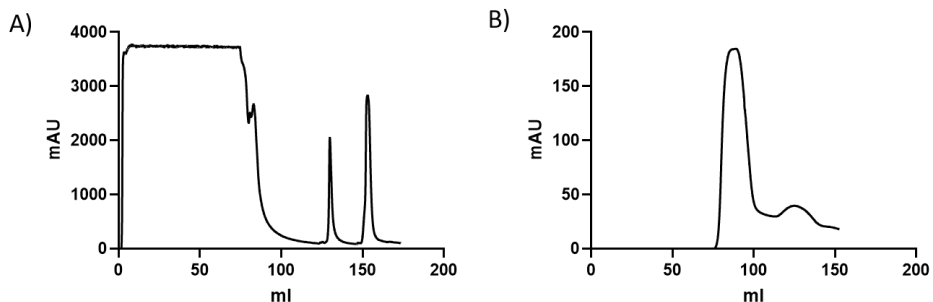
identificēja sešus vislabākos kandidātus – C08, C09, P06, P08, X05 un X09, kas tika atlasīti eksperimentālai ekspresijai un raksturošanai, pamatojoties uz to prognozēto uzlaboto strukturālo stabilitāti (15. att.).



15. att. Sekvenču salīdzinājums. Savvaļas tipa *LCC* fermenta (*Uniprot ID G9BY57*), *ICCG* varianta, ko izstrādāja *Tournier et al.*,<sup>46</sup> un šajā darbā izstrādāto inženierijas fermentu (C08, C09, P06, P08, X05, X09) sekvenču salīdzinājums. Saskaņošana veikta ar *Clustal Omega*, grafiskais attēlojums iegūts, izmantojot *ESPrIt 3* tīmekļa serveri<sup>51</sup>.

### 2.1.2. Fermentu ekspresija un attīršana

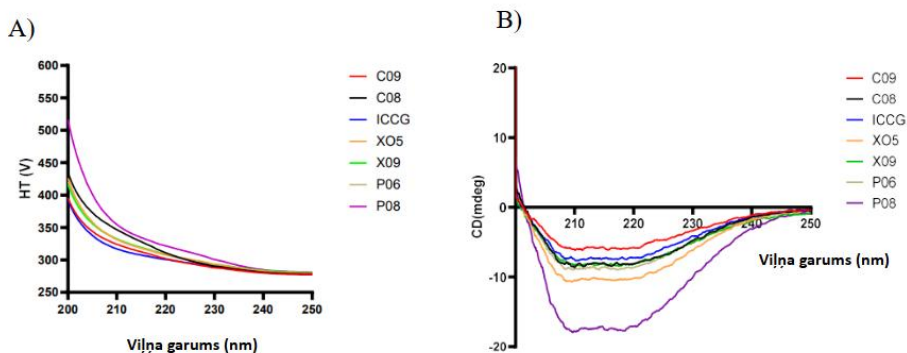
Izvēlētie enzīmu kandidāti tika ekspresēti *E. coli* un attīrīti, izmantojot niķeļa afinitātes hromatogrāfiju (*IMAC*) un izmēra izslēgšanas hromatogrāfiju (*SEC*) (16. att.). PETāze enzīmiem efektīvs izrādījās BL21 Star (DE3) 18 °C temperatūrā ar iznākumu no 12 mg/l līdz 22 mg/l. No tiem variants X09 ekspresēja vislielāko daudzumu (22 mg/l), P08 – vismazāko (12 mg/l).



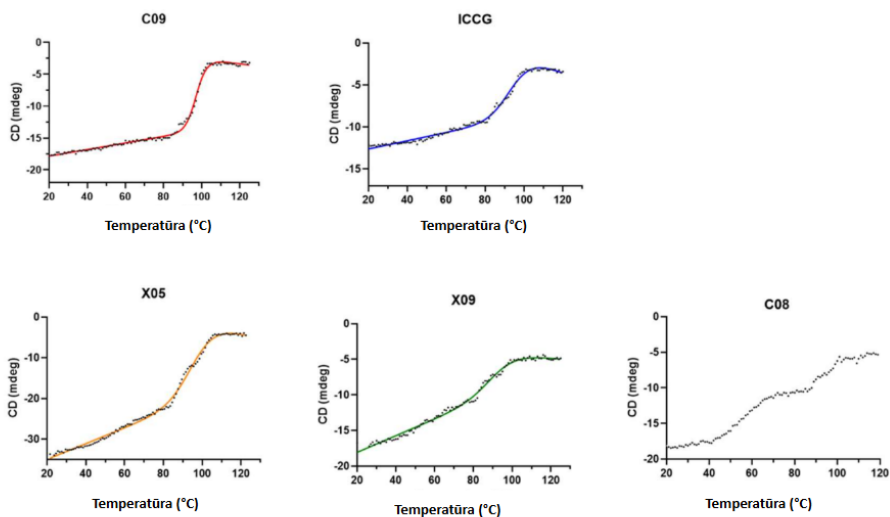
16. att. Tipiskas hromatogrammas no C09 enzīma attīrīšanas, kas parāda (A) niķeļa afinitātes hromatogrāfiju (*IMAC*) un (B) izmēra izslēgšanas hromatogrāfiju (*SEC*). Zilā līkne attēlo UV absorbanci (A280), kas izmantota proteīna eluācijas uzraudzībai.

### 2.1.3. Biofizikālā raksturošana

Pēc modificēto enzīmu izdalīšanas tika pārbaudīta sešu inženierijas variantu sekundārā struktūra (17. att.) un termiskā stabilitāte (18. att.). Tika atklāts, ka C09 ( $T_m = 97,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) un X05 ( $T_m = 96,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) variantiem ir augstāka  $T_m$  nekā references *LCC-ICCG* ( $T_m = 93,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). X09 ( $T_m = 93,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) variants uzrāda līdzīgu termisko stabilitāti kā *LCC-ICCG* (17. att.). P06 un P08 kušanas temperatūra netika noteikta, jo to enzimatiskā aktivitāte iepriekšējos eksperimentos bija niecīga, bet C08 gadījumā nebija iespējams iegūt uzticamu rezultātu.



17. att. Sekundārās struktūras mērījumi ar cirkulāro dihroismu. A) Dažādu enzīmu spriegumu atkarība no viļņa garumu. B) Dažādu enzīmu eliptiskumu atkarība no viļņa garuma.

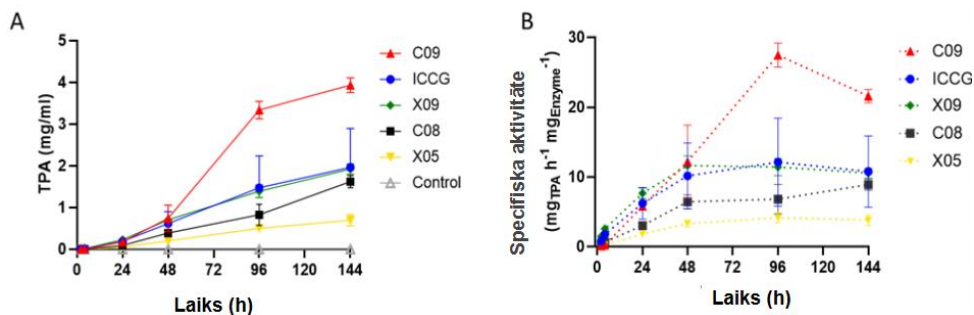


18. att. Tipiskas kušanas līknes. Katrs attēls parāda tipisku kušanas līkni, kas mērīta ar cirkulāro dihroismu 222 nm diapazonā no 20 °C līdz 120 °C atbilstošajam paraugam; melnie punkti attēlo eksperimentālos datus, nepārtraukta līnija norāda pielāgoto līkni.

#### 2.1.4. Funkcionālais tests

Polietilēntereftalāta (PET) fermentatīvā hidrolīze tika novērtēta, kvantitatīvi nosakot galveno depolimerizācijas produktu veidošanos – *bis*(hidroksietil)tereftalātu (BHET), mono(hidroksietil)tereftalātu (MHET), tereftālskābi (TPA) un etilēnglikolu (EG), izmantojot apgrieztās fāzes *HPLC*. Reakcijas tika veiktas 68 °C temperatūrā ar 40 nM enzīma klātbūtnē 20 mM Tris-HCl buferšķīdumā (pH 8,0), kas satur 300 mM NaCl. Amorfās PET plēves (biezums – 250 μm, *Goodfellow, USA*) tika izgrieztas 6 mm diskos (~8,4 mg) un inkubētas atsevišķi 2 ml mikrocentrifūgas mēģenēs. Visi testi tika veikti piecas reizes, lai nodrošinātu reproducējamību. Produkta kvantitatīvā noteikšana tika veikta, izmantojot *Shimadzu LC-2030C 3D Plus* sistēmu, kas aprīkota ar *Kinetex C18* kolonnu (2,7 μm, 4,6 mm × 150 mm) 40 °C temperatūrā, plūsmas ātrums – 1 ml min<sup>-1</sup>. Mobilā fāze sastāvēja no 0,1 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (A) un acetonitrila (B) ar lineāru gradientu. Alikvoti tika savākti dažādos laika punktos (0–144 h), atbilstoši atšķaidīti (21 reizi 0–72 h, 101 reizi 96–144 h) un analizēti pie 220 nm. Kalibrēšanas līknes *TPA* un *MHET* (0,1–50 μg ml<sup>-1</sup>) un *BHET* (0,09–43,9 μg ml<sup>-1</sup>) ļāva precīzi kvantificēt produkta veidošanos.

TPA un MHET uzkrāšanās laika gaitā atspoguļoja pakāpenisku PET hidrolīzi. No testētajiem variantiem daži uzrādīja paaugstinātu degradācijas ātrumu, salīdzinot ar savvaļas tipa PETāzi, kas labi korelēja ar uzlaboto termostabilitāti un salocīšanās īpašībām, kas noteiktas biofizikālajā raksturojumā.



19. att. Dažādu enzīmu ietekme uz polietilēntereftalāta (PET) depolimerizāciju. (A) Tereftālskābes (TPA) veidošanās laika gaitā 68 °C temperatūrā (*LCC-ICCG* – C09 – X05 – X09 – C08 40 n M, pH 8,0). (B) TPA veidošanās 68 °C temperatūrā pēc četrām stundām un pēc 144 stundām.

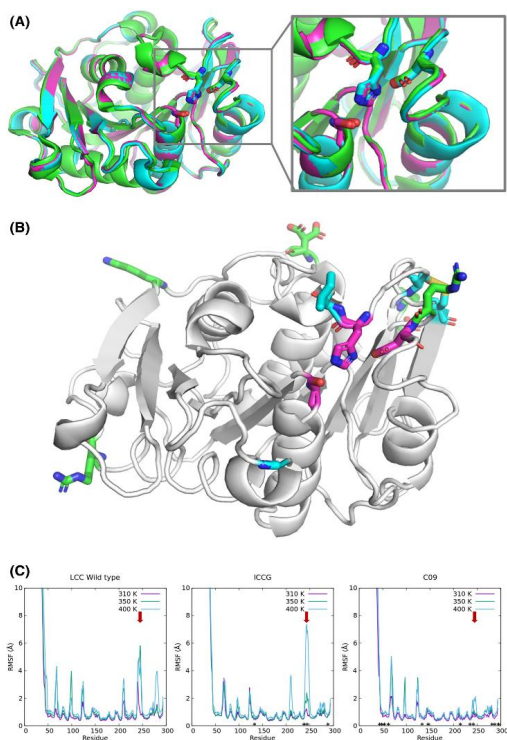
Rezultāti liecina, ka 68 °C temperatūrā vidējā TPA koncentrācija dažādos laika punktos ir ievērojami augstāka C09 mutācijai nekā *ICCG* līdz sestajai dienai (144 h). Turklāt C09 specifiskā aktivitāte ir arī ievērojami augstāka ( $\approx 2$  reizes) nekā zelta standartam *LCC-ICCG* tajā pašā laika periodā (19. att.).

### 2.1.5. Rentgena kristalogrāfija

C09 varianta kristāli tika iegūti ar tvaika difūziju 0,1 M nātrija citrāta pH 5,6, 20 % PEG 4000 un 20 % izopropanola vidē, un dati tika savākti pēc krioprotektīvas apstrādes ar 25 % glicerīnu. Rezultātā iegūtā struktūra, kas tika precizēta līdz 1,28 Å izšķirtspējai, sniedza atomāras detaļas par inženierijas ceļā radītajām stabilizējošajām mutācijām.

C09 enzīms satur 13 aizvietojumus, salīdzinot ar savvaļas tipa *LCC*, tostarp papildu lādētus atlikumus (piemēram, S36D, Q40R, S57K), kas stratēģiski izvietoti uz virsmas. Neskatoties uz šīm plašajām modifikācijām, kristalogrāfiskā analīze neuzrādīja nozīmīgas novirzes salocīšanā (*RMSD* 0,26 Å, salīdzinot ar *WT*; 0,15 Å, salīdzinot ar *LCC-ICCG*). Katalītiskā triāde (D210, H242, S265) saglabāja savu kanonisko ģeometriju, apstiprinot, ka struktūras integritāte ir saglabāta (24. att.).

Struktūras salīdzinājums un RMSF simulācijas parādīja, ka C09 uzrāda samazinātu lokālo elastību, īpaši ap katalītisko His242, kas izskaidro varianta izcilo termisko izturību ( $T_m > 95\text{ °C}$ ) un divkārt augstāku PET degradācijas efektivitāti, salīdzinot ar *LCC-ICCG*. Autore uzskata, ka papildu virsmas lādiņi stabilizē virsmai pakļautās cilpas un novērš katalītiskās vietas atkārtosanos ilgstošas augstas temperatūras katalīzes laikā. Tādējādi, lai gan katalītiskā arhitektūra paliek nemainīga, dinamiskā stabilizācija, izmantojot racionālu dizainu, šķiet, ir galvenais faktors, kas nosaka C09 uzlaboto veiktspēju (20. att.).



20. attēls. (A) PETāzes enzīmu struktūras salīdzinājums: savvaļas tips LCC (zaļā krāsā), *ICCG* variants (ciānkrāsas) un C09 variants (rozā krāsā). Kopējā struktūras salīdzinājumā nav redzamas nozīmīgas atšķirības starp enzīmiem, tostarp katalītiskās triādes pozīcija un orientācija. (B) mutāciju (stieņi) pozīcija *ICCG* (ciānkrāsā) un C09 (rozā krāsā) attiecībā pret katalītisko vietu (rozā stieņi). (C) *LCC*, *LCC-ICCG* un C09 vidējā kvadrātiskā svārstību amplitūdas (RMSF) salīdzinājums dažādās temperatūrās (310 K, 350 K un 400 K).

## 2.2 Jaunās PETāzes SM14 raksturojums

Lai gan fermentatīvā PET sadalīšanās ir kļuvusi par daudzsološu ilgtspējīgu alternatīvu tradicionālajām pārstrādes metodēm, lielākā daļa pazīstamo PET sadalīšanās fermentu uzrāda ierobežotu katalītisko efektivitāti un šauru darbības diapazonu, jo īpaši vides apstākļos. Šis ierobežojums ir īpaši kritisks jūras piesārņojuma kontekstā, kur lielos daudzumos uzkrājas un saglabājas PET, jo tur ir augsts sāļums, zema temperatūra un trūkst efektīvu dabisko sadalīšanās procesu. Šajā kontekstā tika raksturots jauns PET sadalošs ferments, kas izdalīts no pie jūras sūkļiem saistītas baktērijas *Streptomyces* sp. SM14 (*PETase* SM14). Šis projekts tiek īstenots sadarbībā ar prof. *Giulia Di Rocco* no Modenas un *Reggio Emilia* Universitātes (Itālija), kur tika veikta daļa no projekta.

### 2.2.1. Enzīma ekspresija un attīrīšana

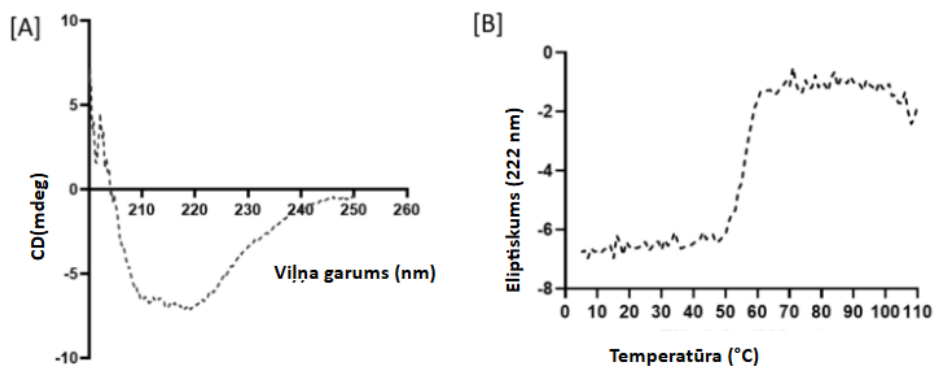
Gēns, kas kodē nobriedušu PETāzi SM14 no *Streptomyces* sp. SM14, tika klonēts pLATE52 vektorā, izmantojot ligācijas neatkarīgu klonēšanu, un ekspresēts *E. coli* BL21 (DE3). Proteīna ekspresija tika inducēta ar *IPTG*, pēc tam sekoja šūnu līze un attīrīšana ar niķeļa afinitātes hromatogrāfiju, izmantojot *HisTrap HP* kolonnu. PETāze SM14 tika eluēta ar imidazola gradientu, un tika savāktas frakcijas ar augstāko proteīna koncentrāciju, nosakot to ar UV absorbciju pie 280 nm un pamatojoties uz tā aprēķinātajām molekulārām īpašībām.

### 2.2.2. Biofizikālā raksturošana

Tālās UV CD spektroskopija tika izmantota, lai novērtētu PETāzes SM14 sekundārās struktūras saturu un salīdzinātu tās salocīšanos ar references PETāzi no *Ideonella sakaiensis*.<sup>36,52</sup> CD spektri parādīja labi definētas minimālās vērtības aptuveni pie 208 nm un 222 nm, kas ir raksturīgas  $\alpha/\beta$ -hidrolāzes salocījumam, kurā dominē  $\alpha$ -spirāles un  $\beta$ -lapu elementi. (18. att.) PETāzes SM14 spektrālais profils ļoti līdzinājās *I. sakaiensis* PETāzes spektrālam profilam, norādot, ka enzīms saglabā līdzīgu kopējo sekundāro struktūru, neskatoties uz sekvenču atšķirībām. Dati apstiprina pareizu proteīna salocīšanos un atbilstību PETāzes SM14 struktūrai, kas noteikta ar rentgenkristalogrāfijas metodi.

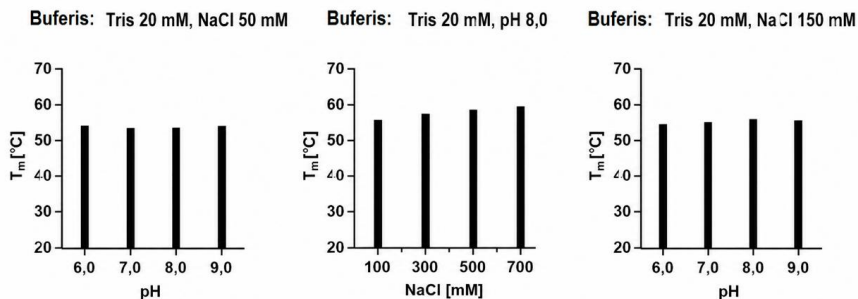
Termiskās denaturācijas eksperimenti, kas tika kontrolēti, mērot eliptiskumu 222 nm kā funkciju no temperatūras, noteica PETāzes SM14 kušanas temperatūru ( $T_m$ ) 56,3 °C, kas liecina par ievērojamu termisko stabilitāti. Salīdzinājumā ar *Ideonella sakaiensis* PETase  $T_m$  tika noteikta 45,0 °C, kas liecina, ka SM14 ir vairāk nekā par 10 °C termiski stabilāka (21. att.).

Šis  $T_m$  pieaugums liecina par uzlabotu struktūras stingrību vai uzlabotām iekšmolekulārām mijiedarbībām PETāzē SM14, kas, visticamāk, veicina tās izturību vides apstākļos. Atvērtā pāreja liecināja par labi salocītu monomēru proteīnu.



21. att. Cirkulārā dichroisma (CD) analīze, lai noteiktu fermenta sekundāro struktūru (A) un enzīma termostabilitāti (B).

Proteīna termiskā stabilitāte tika novērtēta, izmantojot arī diferenciālo skenēšanas fluorimetriju (DSF) ar *SYPRO Orange* krāsvielu (*Thermo Fisher Scientific*) uz *7500 Real-Time PCR* sistēmas (*Applied Biosystems*). Katra reakcija saturēja 5  $\mu\text{M}$  fermentu un 5 $\times$  krāsvielu analizējamajā tilpumā 25  $\mu\text{L}$ , kas tika sagatavots, sajaucot vienādus fermenta šķīduma (10  $\mu\text{M}$ ) un 10 $\times$  krāsvielas (atšķaidīta no 5000 $\times$  stamndartšķīduma) tilpumus atbilstošajā proteīna buferšķīdumā. Fluorescence tika novērota temperatūras paaugstināšanās laikā no 15  $^{\circ}\text{C}$  līdz 95,3  $^{\circ}\text{C}$ , kušanas temperatūras ( $T_m$ ) tika noteiktas no denaturācijas līkņu infleksijas punktiem. Lai novērtētu stabilitāti dažādos fizikāli ķīmiskajos apstākļos, tika veikti testi pH diapazonā no 6,0 līdz 9,0 un NaCl koncentrācijās no 100 Mm līdz 700 Mm (22. att.). pH izmaiņas minimāli ietekmēja  $T_m$ , kas palika salīdzinoši nemainīga, savukārt NaCl koncentrācijas palielināšana līdz 700 mM Tris buferšķīdumā (pH 8,0) neizraisīja proteīna struktūras izmaiņas. Šie rezultāti liecina, ka enzīms saglabā augstu strukturālo stabilitāti plašā sāls koncentrācijas un pH vērtību diapazonā.

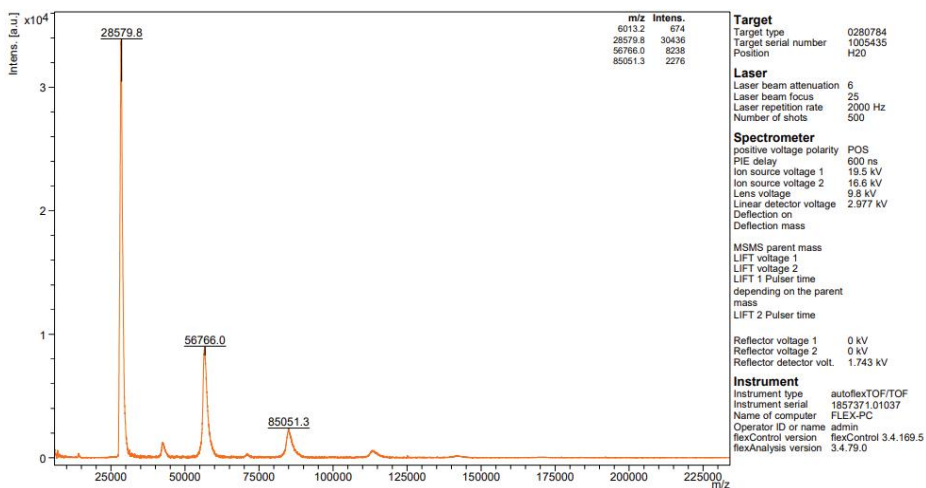


22. att. *PETase* SM14 kušanas temperatūras izmaiņas dažādos buferšķīdumos, kas noteiktas ar *SYPRO Orange* temperatūras atkarīgo fluorescences izmaiņu palīdzību.

*MALDI* masspektrometrija nodrošina precīzu molekulasmasas noteikšanu un sekvenču verifikāciju, ļaujot noteikt degradāciju, pēctranslācijas modifikācijas un apstiprināt ekspresijas produktus<sup>53</sup>. *MALDI-TOF* masspektrometrija tika izmantota, lai apstiprinātu attīrīta *PETāzes* SM14 fermenta molekulasmasu un sekvenču integritāti.

Mērījumi tika reģistrēti ar *FLEX-PC autoflex TOF/TOF (Bruker)*. Datu ieguves režīms bija lineārs, polaritātes spriegums *POS*. Uzņēmumu skaits bija 500. Tika sajaukti proteīns un skābeņskābe (viens paraugs ar 1  $\mu\text{L}$  un viens ar 0,5  $\mu\text{L}$ ). Viens piliens šī šķīduma tika sajaukts ar matricu *SA* (sinapīnskābe), ļaujot tai sacietēt. Proteīna koncentrācija bija 10 mg/ml.

Ekspimentālā molekulasmasa (aptuveni 28 kDa) precīzi atbilda teorētiskajai masai, kas aprēķināta no aminoskābju secības (23. att.), apstiprinot veiksmīgu neizmainīta proteīna ekspresiju un attīrīšanu. Netika novērotas proteolītiskas sadalīšanās, saīsināšanas vai pēctranslācijas modifikācijas pazīmes. Masas precizitāte ( $\pm 0,1$  kDa) un nozīmīgu piemaisījumu pīķu neesamība apstiprināja parauga, kas iegūts pēc divpakāpju hromatogrāfiskās attīrīšanas, augsto tīrību.



23. att. PETāzes SM14 *MALDI-TOF* analīze. Šī vērtība tika iegūta ar 5 mg/ml proteīna koncentrāciju, atšķaidītu ar 50 % TFA un sinapīnskābi (SA) kā matricu.

Turklāt peptīda masas nospiedums pēc triptona hidrolīzes apstiprināja sekvenču pārklājumu virs 90 %, apstiprinot, ka ekspresētais produkts precīzi atbilst paredzētajam PETāzes SM14 konstruktam (24. att.). Saskaņa starp sagaidāmo un novēroto masu vēl vairāk apstiprināja strukturālos datus, kas iegūti CD un DSF analīzēs, kopumā apstiprinot, ka PETāze SM14 ir stabils, pareizi salocīts un strukturāli neskarts enzīms.

1     **AQNPHERGPD PSNSYIEQAR GSYSVSQRSI SRLGSDGFRD GTMYYPTSTA**  
51     **DGRFGVVAIS PGYTASESTI AWLGPRLASF GFVVVTINTD SRYDQPRQRA**  
101    **TQLHAALDHA IGSVVGPR I DTSRQAVMGH SMGGGGALQA AEERDEIRAA**  
151    **VPLTPWNLKK GWSGVDAATL VIGAENDAIA PVRSHSIPFY ESLTNAERRA**  
201    **YLELRREGHF APNSSNTLIA KYVSWLKRY VDNDLRYDQF IDPGPRTGIT**  
251    **TGVSDYRLG**

24. att. MS/MS spektri (100–1200 m/z), kas iegūti no *PETase* SM14 joslas pēc atšķīšanas, ekstrahēti un hidrolizēti ar tripsīnu un analizēti ar ESI-MS/MS spektrometriju.

Sekvenču pārklājums 95 %.

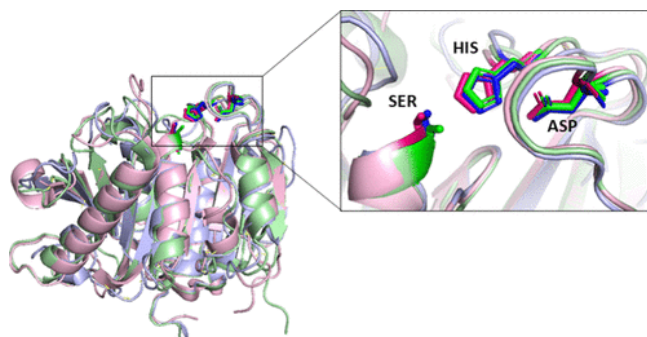
### 2.2.3. Funkcionālais tests

PETāzes SM14 enzimatiskā aktivitāte tika novērtēta, izmantojot PET pēcpārstrādes plastmasu (PCP) kontrolētos reakcijas apstākļos, mainot galvenos parametrus, tostarp pH, temperatūru un NaCl koncentrāciju. PETāze SM14 efektīvi sadalīja PCP, atbrīvojot tereftālskābi (TPA), kas kvantitatīvi noteikta ar *HPLC*, un optimāla aktivitāte tika novērota pie pH 9,0. TPA iznākums palielinājās aptuveni 10 reizes bāziskos apstākļos un bija lielā mērā neatkarīga no temperatūras starp 40 °C un 50 °C. Enzimātiskā aktivitāte tika ievērojami pastiprināta ar sāļumu, parādot vairāk nekā 100 reizes palielinātu TPA atbrīvošanu NaCl klātbūtnē, ar optimālo koncentrāciju pie apmēram 900 mM.

### 2.2.4. Rentgena kristalogrāfija

Promocijas darba izstrādes gaitā tika noteikta PETāzes SM14 augstas izšķirtspējas kristāla struktūra no *Streptomyces* sugas, kas izolēta no jūras sūkļa. Enzīma kristāli bez marķiera tika audzēti, izmantojot tvaika difūzijas metodi, un difraktēti līdz 1,43 Å izšķirtspējai *Diamond Light Source* I03 staru līnijā Oksfordā, Apvienotajā Karalistē. Struktūra tika atrisināta, izmantojot molekulāro aizstāšanu, kā meklēšanas šablonu izmantojot *AlphaFold* prognozēto modeli, kam sekoja iteratīva manuāla precizēšana *Coot*<sup>54</sup> un automatizēti cikli *REFMAC5*<sup>55</sup>.

PETāzes SM14 struktūra uzrādīja klasisko  $\alpha/\beta$ -hidrolāzes locījumu ar konservētu Ser–His–Asp katalītisko triādi, kas atradās sekla substrāta saistīšanās plaisā. Struktūras superpozīcija ar *Ideonella sakaiensis* PETāze (IsPETāze) un poliestera hidrolāzi (PE-H) (25. att.) atklāja augstu struktūras konservatīvumu ar *RMSD* 0,69 Å (IsPETāze) un 0,81 Å (PE-H). Katalītiskie atlikumi precīzi saskaņojās, apstiprinot kopīgu serīna hidrolāzes mehānismu.



25. att. PETāzes SM14 (gaiši zilā krāsā), IsPETāzes (PDB kods 6ILW, gaiši zaļā krāsā) un PE-H no *P. aestusnigri* (PDB kods: 6SBN, gaiši rozā krāsā) struktūras salīdzinājums, kas veikts, izmantojot *PyMOL*.

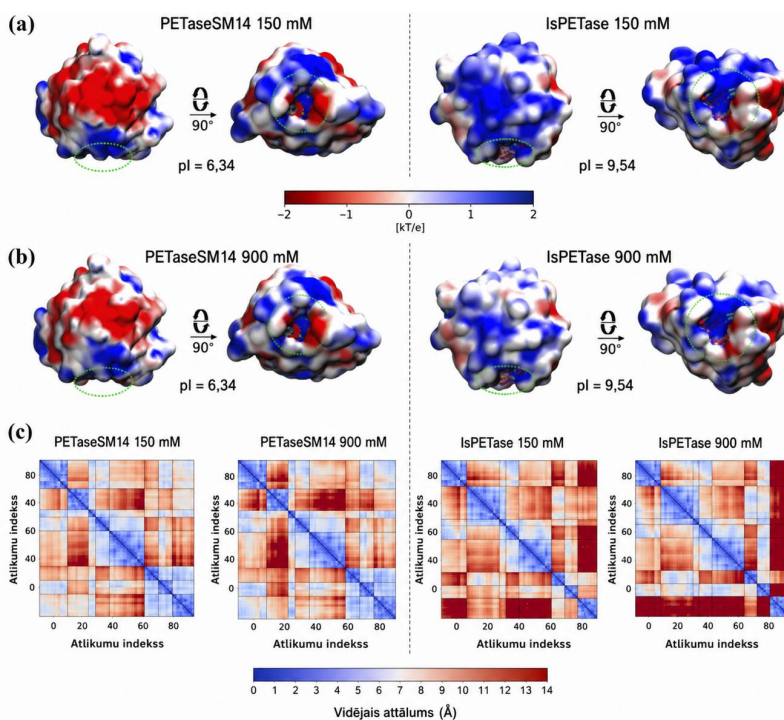
Jāatzīmē, ka SM14 izrādīja izteiktas cilpas konformācijas blakus aktīvajai vietai, kas sašaurināja katalītisko kabatu, salīdzinot ar IsPETāzi. Šī nelielā aizvēršanās var nodrošināt uzlabotu substrāta saistīšanos un palielinātu stingrību, kas atbilst enzīma augstajai kušanas temperatūrai ( $T_m$  56,3 °C) un izteiktajai sāls toleranci līdz 1,5 M NaCl. Elektrostatiskās virsmas analīzes liecināja par mazāk polarizētu un vienmērīgāk sadalītu lādiņa potenciālu, salīdzinot ar IsPETāzi (pI 6,67 pret 9,41), kas potenciāli stabilizē proteīnu jūras vai sārmainā vidē. Kopumā šīs īpašības liecina, ka PETāze SM14 ir attīstījusies, lai nodrošinātu katalītisko noturību augsta sāļuma un viegli termofilos apstākļos, kas ir daudzsoļa pielāgošanās PET sadalīšanai vidē.

### 2.2.5. Struktūras un funkcijas korelācijas analīze

Promocijas darba izstrādes gaitā detalizēti tika pētīta PETāzes SM14 struktūra, lai izprastu jonu stipruma ietekmi uz PETāzes fermentiem. Lai padziļināti izpētītu korelētas elastības ietekmi uz enzīmu adaptāciju, tika apvienotas molekulārās dinamikas (MD) simulācijas ar *in vitro* enzīmu testiem uz IsPETāzi (no *Ideonella sakaiensis*) un PETāzi SM14. Mērķis bija noteikt, kā lokālas kustības un dinamiskā saistība ietekmē katalītisko efektivitāti dažādās jonu vidēs. IsPETāze, ko izdalīja *Ideonella Sakaiensis* 201-f6, un PETāze SM14, ko izdalīja jūras sūklis *Streptomyces sp.* SM14, raksturo vienāds katalītiskais skelets, tomēr ir attīstījušās būtiskas atšķirības, lai katrs enzīms pielāgotos savai dabiskajai videi. Šajā pētījumā veiktie PET pulvera sadalīšanās aktivitātes testi un literatūrā atrodami pierādījumi liecina, ka NaCl koncentrācija pozitīvi ietekmē PETāzes SM14 aktivitāti, kas atbilst tās hipersāļajai jūras izcelsmei, bet negatīvi ietekmē IsPETāzi. Līdz šim šis fenomens ir novērots, izmantojot analītiskas metodes, piemēram, *HPLC*, *SEM* un *AFM*, kas neizskaidro šo efektu strukturālo pamatu.

Lai novērstu šo nepilnību, tika izmantota molekulārā modelēšana un MD simulācijas, lai veiktu detalizētu strukturālo salīdzinājumu un molekulāra līmeņa izskaidrojumu eksperimentā novērotajām atšķirībām starp diviem homoloģiskiem plastmasas sadalīšanas enzīmiem. No 500 ns garām MD simulācijām iegūtie rezultāti liecina, ka IsPETāzes saistīšanās vieta ir ievērojami plataka un elastīgāka nekā PETāzē SM14 atrastā saistīšanās vieta, ko apstiprina lielāki vidējie atlieku attālumi un atvērtāka elektrostatiskā virsma (26. att.). Šo inaktivāciju galvenokārt izraisa konformācijas pārkārtošanās, kas saistīta ar atlieku W159 apgriešanu, kas izspiež katalītisko histidīnu (H237) no serīna (S160), traucējot aktīvās vietas ģeometriju. Pretstatā PETāze SM14 saglabāja stingrāku struktūru, kas augsta sāls satura apstākļos piedzīvoja nelielas, bet labvēlīgas konformācijas izmaiņas. Šīs smalkās pārkārtošanās veicināja aktīvās

vietas hidratāciju, un papildu ūdens molekulas atvieglota substrāta mijiedarbību un uzturēja katalītisko efektivitāti.



26. att. Jonu koncentrācijas ietekme uz PETāzi SM14 un IsPETāzi. PETāzes SM14 un IsPETāzes elektrostātiskā potenciāla virsma pie (A) 150 mM un (B) 900 mM NaCl koncentrācijas. Saistīšanās vietu atrašanās vietas un galvenie atlikumi ir norādīti ar zaļas krāsas punktētiem apliem. (C) Atlikumu, kas veido PETāzes SM14 un IsPETāzes saistīšanās vietas, attāluma kartes abās jonu koncentrācijās. Kartēs norādītas vidējās vērtības katram krustattālumam, kas aprēķināts, izmantojot trīs 500 ns MD simulācijas replikas. Krāsu skala ir no 0 Å (punkti zilā krāsā) līdz  $\geq 14$  Å (punkti sarkanā krāsā).

PET saistīšanās modelēšana, izmantojot deviņu monomēru PET ķēdes, apstiprināja, ka PETāze SM14 augstā sāļumā un IsPETāze zemā sāļumā sasniedz optimālu substrāta pielāgošanos un katalītisko izlīdzināšanu. Pie 900 mM NaCl PETāze SM14 uzrādīja aptuveni divas reizes vairāk reaktīvo enzīmu-substrātu konfigurāciju, salīdzinot ar tā darbību pie 150 mM, savukārt IsPETāze parādīja 50 % samazinājumu šādos stāvokļos tādos pašos apstākļos. Šie atklājumi labi korelē ar novērotajām eksperimentālajām aktivitātes tendencēm un sniedz molekulāra līmeņa izskaidrojumu abu enzīmu atšķirīgajām jonu adaptācijām.

### 2.3. Pašreizējās tendences un nākotnes iespējas

Balstoties izveidotajā aprēķinu un eksperimentuā, promocijas darba autore un viņas kolēģi ir iesākuši turpmākos pētījumus, lai izstrādātu racionālu un simulāciju vadītu inženierijas risinājumu, kura mērķis ir uzlabot PETāzes SM14 stabilitāti un katalītisko efektivitāti. Paralēli tiek strādāts pie fermentatīvās PET depolimerizācijas mēroga palielināšanas, izmantojot inženierijas *LCC-ICCG-C09* variantu bioreaktoru sistēmās, ar mērķi uzlabot procesa stabilitāti, substrāta pieejamību un kopējo katalītisko produktivitāti, lai to varētu ieviest rūpniecībā.

## SECINĀJUMI

Šajā darbā tika izstrādāta integrēta skaitļošanas un eksperimentālā sistēma racionālai enzīmu inženierijai ar uzlabotu stabilitāti, aktivitāti un izturību pret vides ietekmi. Šajā pieejā tika apvienota molekulārā modelēšana, molekulārās dinamikas simulācijas, proteīnu inženierija, bioķīmiskā raksturošana un strukturālā analīze, lai nodrošinātu efektīvu enzīmu optimizāciju.

- Fruktozilpeptīda oksidāzes (FPOX) variantiem tika uzlabota termostabilitāte, izmantojot tādas enzīmu inženierijas metodes kā RMSF vadītas mutācijas, sāls tiltiņi un disulfīda saites (1. pielikums).
- Lai gan optimizētie FPOX varianti uzrāda uzlabotu stabilitāti un aktivitāti, turpmākā attīstība ir vērsta uz to veikspējas uzlabošanu attiecībā uz glikēto hemoglobīnu. Pašreizējie dati par šo mērķi ir atrodamī manuskripta 5. pielikumā.
- PET noārdošo enzīmu inženierija parādīja šīs sistēmas plašāku pielietojamību rūpnieciskajā biokatalīzē. LCC-ICCG-C09 variants uzrādīja uzlabotu termisko stabilitāti un aptuveni divas reizes augstāku PET depolimerizācijas efektivitāti salīdzinājumā ar sākotnējo enzīmu, nodrošinot daudzsoļu pamatu enzīmu izmantošanai plastmasas pārstrādē, neskatoties uz atlikušajām nepilnībām, kas ir saistītas ar substrāta kristāliskumu, jutību pret pH un mērogojamību (3. pielikums).
- Tika atklāts un raksturots jauns no jūras sūkļiem iegūts enzīms PETāze SM14. Tika konstatēts, ka tas saglabā augstu aktivitāti sārmainā vidē, pie augsta sāls satura un paaugstinātas temperatūras (2. pielikums).
- PETāzes SM14 strukturālās un molekulārās dinamikas analīzes atklāja adaptīvās īpašības, kas atbalsta katalīzi hipersālā vidē, uzsverot tās potenciālu jūras plastmasas bioloģiskajā attīrīšanā (4. pielikums).

**DOCTORAL THESIS PROPOSED TO RIGA TECHNICAL UNIVERSITY FOR PROMOTION TO THE SCIENTIFIC DEGREE OF DOCTOR OF SCIENCE**

To be granted the scientific degree of Doctor of Science (PhD), the present Doctoral Thesis has been submitted for defence at the open meeting of RTU Promotion Council on 23 July 2026 at 15.00 at the Faculty of Natural Sciences and Technology of Riga Technical University, 3/7 Paula Valdena Street, Room 272, with online participation option at the Zoom link <https://rtucloud1.zoom.us/j/9352086644>.

**OFFICIAL REVIEWERS**

Professor Dr. Kristaps Jaudzems  
University of Latvia, Latvia

Professor Dr. Ioannis Pavlidis  
University of Crete, Greece

Professor Dr. Gianluca Molla  
University of Insubria, Italy

**DECLARATION OF ACADEMIC INTEGRITY**

I hereby declare that the Doctoral Thesis submitted for review to Riga Technical University for promotion to the scientific degree of Doctor of Science (PhD) is my own. I confirm that this Doctoral Thesis has not been submitted to any other university for promotion to a scientific degree.

Shapla Bhattacharya.....(signature)

Date: .....

The Doctoral Thesis has been prepared as a collection of thematically related scientific publications complemented by summaries in both Latvian and English. The Doctoral Thesis unites four scientific publications. The scientific publications have been written in English, with a total volume of 168 pages, including supplementary data.

## CONTENTS

GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS .....	47
Introduction .....	47
Aims and objectives .....	48
Scientific novelty and main results .....	49
Structure and volume of the Thesis .....	51
Publications and approbation of the Thesis .....	51
MAIN RESULTS OF THE THESIS .....	55
1. FPOX enzymes .....	55
1.1. Rational design .....	55
1.2. Enzyme expression and purification .....	61
1.3. Biophysical characterization .....	63
1.4. Functional assay .....	65
1.5. X-ray crystallography .....	67
1.6. Structure-function correlation analysis .....	68
1.7. Current directions and future opportunities .....	69
2. PETase enzymes .....	70
2.1. Development of engineered LCC-ICCG PETase enzyme .....	72
2.1.1. Rational design .....	72
2.1.2. Enzyme expression and purification .....	73
2.1.3. Biophysical characterization .....	74
2.1.4. Functional assay .....	75
2.1.5. X-ray crystallography .....	76
2.2. Characterization of novel PETase SM14 .....	78
2.2.1. Enzyme expression and purification .....	79
2.2.2. Biophysical characterization .....	79
2.2.3. Functional assay .....	82
2.2.4. X-ray crystallography .....	82
2.2.5. Structure-function correlation analysis .....	83
2.3. Current directions and future opportunities .....	85
CONCLUSIONS .....	86
REFERENCES .....	87

## **GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS**

### **Introduction**

Enzymes are nature's highly efficient biocatalysts, enabling complex biochemical reactions under mild conditions with remarkable specificity and selectivity. Their applications span a wide range of industries, including pharmaceuticals, agriculture, diagnostics, and environmental remediation. However, native enzymes often exhibit limitations such as low stability under industrial conditions, suboptimal activity, or poor substrate compatibility, which restrict their broader application.

Enzyme engineering is a sophisticated process that enables naturally occurring enzymes to be modified in order to enhance their catalytic efficiency, stability, or specificity. Through targeted alterations of their amino acid sequence and structural features, biological catalysts can be transformed into more effective and resilient biocatalysts, tailored for a wide array of industrial applications. This intricate process often employs techniques such as directed evolution, site-directed mutagenesis, and computational modeling. In the lab, the author makes extensive use of structural information, and focuses on rational design approaches.

In rational design, the author leverages computational tools and molecular modeling to simulate the effects of modifications to the amino acid sequence of the enzyme. By analyzing the enzyme's three-dimensional structure, the author can identify critical residues that influence catalytic activity, stability, and specificity. This insight allows us to introduce targeted mutations to optimize these properties, ultimately creating engineered enzymes that meet specific industrial needs.

For my PhD project, the author has been working on the engineering of two groups of enzymes: Fructosyl Peptide Oxidases (FPOX) and PETases. Both of these enzymes are highly relevant for either biomedical or environmental applications.

Fructosyl peptide oxidases (FPOX), and fructosyl amino oxidases (FAOX) alike, are deglycating enzymes that find application as key enzymatic components in diabetes monitoring devices. Indeed, their use with blood samples can provide a measurement of the concentration of glycated hemoglobin and glycated albumin, two well-known diabetes markers. However, the FPOX currently employed in enzymatic assays cannot directly detect whole glycated proteins, making it necessary to perform a preliminary proteolytic treatment of the target protein to generate small glycated peptides that can act as viable substrates for the enzyme. This is a costly and time-consuming step. This preliminary step is due to their buried active

site and to the narrow tunnel that provides access to their catalytic pocket, as shown by multiple crystal structures of FPOX and FAOX enzymes. In this project, the author is engineering this group of enzymes to expand their substrate range and to improve their thermal stability for biomedical applications. In particular, the aim is to use these enzymes for deglycating intact proteins, or for mitigating their level of glycation over time. Ultimately, with the improved enzyme, the author aims to develop an enzymatic tool for the measurement of glycated hemoglobin or glycated albumin, two known diabetes markers, in the blood.

Using the same enzyme engineering approach, the author is also working on plastic depolymerizing enzymes (PETases), which are enzymes that can break down polyethylene terephthalate (PET) into its monomeric subunits, terephthalic acid and ethylene glycol. These enzymes belong to the larger family of hydrolases, which work by cleaving the ester bonds in PET and lead to its degradation into smaller monomers.

Although several PETases from different origins have been reported, their catalytic efficiency and thermal stability remain insufficient for economically viable industrial PET depolymerization, particularly compared to conventional chemical and mechanical recycling processes. Limited enzyme performance, especially low activity and poor stability near PET's glass transition temperature, is a major bottleneck for cost-effective enzymatic recycling. Therefore, the author applies a computer-aided enzyme engineering approach to enhance catalytic efficiency and operational stability for industrial application.

Overall, this work contributes to the advancement of rational enzyme engineering by demonstrating an efficient, reproducible design-validation workflow and applying it to two distinct yet industrially relevant enzymes. The outcomes of this research have implications for future biocatalyst development and for addressing critical challenges in medical and environmental biotechnology.

## **The Aims of the Doctoral Thesis**

The primary aim of this Doctoral Thesis is to advance enzyme engineering through the rational design, development, and characterization of improved enzyme variants with direct biomedical and environmental applications. The research focuses on two enzyme families: fructosyl peptide oxidases (FPOXs) for diabetes diagnostics and polyethylene terephthalate hydrolases (PETases) for plastic degradation.

## Objectives

### **Biomedical application: FPOX enzymes for diabetes diagnostics**

4. To investigate the structural limitations of wild-type FPOX enzymes that hinder their ability to process whole glycosylated proteins.
5. To apply computational tunnel-widening and structure-guided engineering strategies to generate FPOX variants with improved substrate accessibility, enhanced thermostability, and broadened substrate specificity.
6. To evaluate the activity of engineered FPOX variants directly on glycosylated substrates for their diagnostic potential.

### **Environmental application: PETases for plastic degradation**

5. To identify flexible and unstable regions of known PETases using structural data and molecular dynamics simulations.
6. To design and introduce targeted mutations aimed at improving PETase thermal stability and catalytic efficiency.
7. To assess the degradation efficiency of engineered PETase variants on polyethylene terephthalate under conditions relevant to industrial recycling.
8. To conduct mechanistic studies to determine how specific mutations influence the PET degradation pathway.

## Scientific novelty and main results

The scientific novelty of this Doctoral Thesis lies in the integration of computational and experimental approaches for the rational design and characterization of improved enzyme variants, focusing on two distinct enzyme families: FPOX and PETase. By combining *in silico* protein engineering, molecular dynamics simulations, and structural biology with expression, purification, and detailed biochemical and biophysical analysis, this study establishes a multi-disciplinary validation workflow. The resulting findings contribute valuable knowledge and tools to the field of enzyme engineering while offering potential for industrial and environmental applications.

In the first part of my doctoral study, where I focused on a thermally stabilized FPOX enzyme, an *in silico* protein engineering approach was applied to further enhance the overall thermal stability of the enzyme and to improve its catalytic activity toward large substrates.

The final design exhibited a marked improvement in thermal stability relative to the wild-type enzyme, along with a distinct widening of its access tunnel. These changes translated into significant enzymatic activity across a range of glycosylated substrates, underscoring the potential of computational design for tailoring enzyme function.

Building upon this framework, in the second part of my doctoral study, the PET-hydrolyzing enzyme gold standard, the ICCG variant of the leaf-branch compost cutinase (LCC-ICCG), was further engineered using computational design. This effort yielded the mutant LCC-ICCG-C09, which displayed a 3.5 °C increase in melting temperature ( $T_m$ ) compared to LCC-ICCG. Under optimal reaction conditions (68 °C), LCC-ICCG-C09 hydrolyzed amorphous PET into terephthalic acid (TPA) with a two-fold higher efficiency relative to the parental variant. With its improved thermal stability and catalytic performance, LCC-ICCG-C09 represents a promising candidate for future applications in industrial PET recycling.

In parallel, a novel PETase-like enzyme (PETase SM14) from *Streptomyces* sp. SM14 was expressed in *Escherichia coli* and evaluated on post-consumer plastic substrates. Activity assays coupled with high-performance liquid chromatography (HPLC) for product quantification, as well as scanning electron microscopy and atomic force microscopy for substrate surface analysis, revealed that PETase SM14 possesses high salt tolerance (up to 1.5 M), good heat resistance ( $T_m$  56.26 °C), and optimal activity at pH 9.0. Its X-ray crystal structure, which I solved at 1.43 Å, confirmed conserved PETase family features and provided a foundation for future engineering strategies.

To further probe structural and functional mechanisms, all-atom molecular dynamics (MD) simulations were combined with *in vitro* assays to compare PETase SM14 and *Ideonella sakaiensis* PETase (IsPETase) under different NaCl concentrations (150 mM and 900 mM). The results demonstrated that, due to loop elongation, IsPETase exhibits a flexible and wide binding site that enhances substrate accommodation but also displaces catalytic residues, leading to rapid deactivation, especially at high-salt concentrations. Conversely, PETase SM14 displays a rigid and narrower binding pocket, which undergoes moderate widening at elevated salt concentrations, thereby facilitating water and substrate recruitment. Moreover, adsorption studies on PET slabs revealed that PETase SM14 under high-salt conditions and IsPETase under low-salt conditions bind PET substrate chains in the same *trans:gauche* conformational distribution observed in amorphous PET. These insights not only explain the observed activity

profiles but also provide novel structural details such as the architecture and electrostatic environment of the substrate-binding cleft, key aromatic residues involved in polymer chain stabilization, and surface charge distribution to guide the engineering of PET-degrading enzymes for diverse environmental conditions.

### **Practical application**

This study holds significant practical potential in both industrial and environmental biotechnology. The engineered FPOX variants with enhanced thermal stability and substrate specificity provide a robust foundation for the development of sensitive and practical biosensing platforms for direct glycosylated hemoglobin (HbA1c) detection. The development of improved PET-hydrolyzing enzymes, including LCC-ICCG-C09 and PETase SM14, offers promising solutions for the enzymatic recycling of polyethylene terephthalate (PET), enabling closed-loop recovery of terephthalic acid and contributing to sustainable plastic waste management.

### **Structure and volume of the Thesis**

This Thesis is a collection of thematically related scientific publications on enzyme engineering for biomedical and environmental applications. It compiles results from four original scientific papers indexed in Scopus and Web of Science.

### **Publications and approbation of the Thesis**

The results of the Thesis have been published in four scientific papers. Additionally, the results have also been disseminated at 13 scientific conferences and two pitch sessions.

### **Scientific publications**

5. Estiri, H.,\* **Bhattacharya, S.**,\* Rodriguez Buitrago, J. A., Castagna, R., Legzdina, L., Casucci, G., Ricci, A., Parisini, E., Gautieri, A. Tailoring FPOX Enzymes for Enhanced Stability and Expanded Substrate Recognition. *Scientific Reports*. 2023, 13, 18610. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45428-1>.\*These authors contributed equally to this work.
6. Carletti, A., **Bhattacharya, S.**, Pedroni, S., Berto, M., Bonettini, R., Castagna, R., Parisini, E., Di Rocco, G. Functional and Structural Characterization of PETase SM14 from Marine-Sponge *Streptomyces* sp. Active on Polyethylene Terephthalate. *ACS*

*Sustainable Chemistry & Engineering*. 2025, 13, 7460. Available from: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5c00737>

7. **Bhattacharya, S.**, \* Castagna, R.,\* Estiri,\* H., Upmanis, T., Gautieri, A., Parisini, E. Development of a Highly Active Engineered PETase Enzyme for Polyester Degradation. *The FEBS Journal*. 2025, 23 August, article ID febs.70228. Available from: <https://doi.org/10.1111/febs.70228>. \*These authors contributed equally to this work.
8. Berselli, A., Carletti, A., Menziani, M. C., **Bhattacharya, S.**, Castagna, R., Parisini, E., Di Rocco, G., & Muniz-Miranda, F. The effect of ionic strength on PETase enzymes: An experimental and computational study. *Protein Science*, 2026, 35, e70386. <https://doi.org/10.1002/pro.70386>

### Patent applications

3. Gautieri, A., Parisini, E., Estiri, H., Castagna, R., **Bhattacharya, S.** “Thermostable engineered enzyme”. IT102023000014223, priority date 07.07.2023, granted 25.07.2025. PCT/IB2024/056641, filed on 08.07.2024 <https://patents.google.com/patent/WO2025012799A1/en>
4. Gautieri, A., Perazzoli, A., Castagna, R., Parisini, E., **Bhattacharya, S.** Enzima fruttosil peptide ossidasi (FPOX) ingegnerizzato e suoi usi. Italian Patent Application No. 102025000025639, filed on 8 October 2025.

### Other publications on the topic not included in the Doctoral Thesis

3. Brangulis, K., Akopjana, I., Drunka, L., Matisone, S., Zelencova-Gopejenko, D., **Bhattacharya, S.**, Bogans, J., Tars, K. Members of the Paralogueous Gene Family 12 from the Lyme Disease Agent *Borrelia burgdorferi* Are Non-Specific DNA-Binding Proteins. *PLOS ONE*. 2024, 19, e0296127. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296127>.
4. **Bhattacharya, S.**, Tempura, G., Colleoni, A., Matera, C., Castagna, R., Parisini, E. Synthesis, photochemical and biological evaluation of novel photoswitchable glycomimetic ligands of *Pseudomonas aeruginosa* LecB. *RSC Advances*. 2025, 15, 49796. Available from: <https://doi.org/10.1039/D5RA06897E>.

### The results of this Thesis were presented at the following international conferences

14. **Bhattacharya, S.**, Estiri, H., Castagna, R., Gautieri, A., Parisini, E. Enzyme engineering of fructosyl peptide oxidase to widen its active site access tunnel and improve its thermal stability, June 15–17, 2022, FEBS3+ Conference in Tallinn, Estonia. [https://biokeemiaselts.ee/wp-content/uploads/2022/06/ABSTRACT-BOOK\\_FEBS32022\\_Tallinn.pdf](https://biokeemiaselts.ee/wp-content/uploads/2022/06/ABSTRACT-BOOK_FEBS32022_Tallinn.pdf)
15. **Bhattacharya, S.**, Estiri, H., Castagna, R., Gautieri, A., Parisini, E. Enzyme engineering of fructosyl peptide oxidase to widen its active site access tunnel and improve its thermal stability, EMBO practical course High throughput protein

production and crystallization, 04–12 July 2022, Marseille, France  
[https://books.google.lv/books/about/High Throughput Protein Production and C.ht ml?id=J\\_GYzwEACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.lv/books/about/High+Throughput+Protein+Production+and+C.ht ml?id=J_GYzwEACAAJ&redir_esc=y)

16. **Bhattacharya, S.**, Estiri, H., Castagna, R., Gautieri, A., Parisini, E. Enzyme engineering of fructosyl peptide oxidase to widen its active site access tunnel and improve its thermal stability, 2nd DRUG DISCOVERY CONFERENCE, September 22–24, 2022, Riga, Latvia.  
[https://drugdiscovery.osi.lv/content/files/DDC Abstract Book.pdf](https://drugdiscovery.osi.lv/content/files/DDC+Abstract+Book.pdf)
17. **Bhattacharya, S.**, Estiri, H., Castagna, R., Gautieri, A., Parisini, E. Enzyme engineering of fructosyl peptide oxidase to widen its active site access tunnel and improve its thermal stability, iNEXT DISCOVERY workshop on crystallographic fragment screening, 1–3 March 2023, Berlin, Germany. [https://www.helmholtz-berlin.de/events/inext-discovery-workshop/index\\_en.html](https://www.helmholtz-berlin.de/events/inext-discovery-workshop/index_en.html)
18. **Bhattacharya, S.**, Estiri, H., Castagna, R., Gautieri, A., Parisini, E. Enzyme Engineering, Oral presentation ALLIANCE4LIFE\_ACTIONS ESR retreat, 23–24 January 2023 (Vilnius, Lithuania) [https://alliance4life.com/media/3803646/d35-report-on-early-stage-researchers-retreats\\_964997.pdf](https://alliance4life.com/media/3803646/d35-report-on-early-stage-researchers-retreats_964997.pdf)
19. **Bhattacharya, S.**, Castagna, R., Estiri, H., Gautieri, A., Parisini, E. Thermostable PETase enzyme for plastic degradation, BioDrug conference, September 22–24, 2023, Riga, Latvia.  
[https://biodrugconference.osi.lv/content/Abstract Book BioDrug Conference 2023.pdf](https://biodrugconference.osi.lv/content/Abstract+Book+BioDrug+Conference+2023.pdf)
20. **Bhattacharya, S.**, Castagna, R., Estiri, H., Gautieri, A., Parisini, E. Enzyme engineering of fructosyl peptide oxidase to widen its active site access tunnel and improve its thermal stability, FEBS advanced course: Computational Approaches to understanding and Engineering Enzyme Catalysis held in Zagreb, Croatia, 25–29 September 2023. <https://digitalna.nsk.hr/?pr=i&id=658275>
21. **Bhattacharya, S.**, Castagna, R., Estiri, H., Gautieri, A., Parisini, E. Achievements of the SPRINGBOARD project, event on 2–3 May 2024, Riga, Latvia. A delivered presentation titled “Development of a highly optimized engineered PETase enzyme for plastic degradation”.  
[https://springboard.osi.lv/content/abstracts/Springboard\\_CONFERENCE\\_Abstract\\_.pdf](https://springboard.osi.lv/content/abstracts/Springboard_CONFERENCE_Abstract_.pdf)
22. **Bhattacharya, S.**, Castagna, R., Estiri, H., Gautieri, A., Parisini, E. Tailoring Enzymes for tomorrow, Structural Biology in Latvia and Beyond, conference Instruct-ERIC, <https://instruct-eric.org/news/structural-biology-in-latvia-and-beyond/> held in Riga, Latvia on 3 December 2024.

23. **Bhattacharya, S.** Development of a Highly Optimized Engineered PETase Enzyme for Polyester Degradation, WIDEnzymes Workshop 1: Milan, Italy, Computational Methods for Enzyme Engineering, 27–31 January 2025. <https://widenzymes.eu/workshops-series/workshop-1/>
24. **Bhattacharya, S.** Enzyme Engineering, presentation at WIDEnzymes Workshop 2, Directed Evolution of Enzymes, Department of Chemistry, University of Crete, Greece, 2–6 June 2025. <https://widenzymes.eu/workshops-series/workshop-2/>
25. **Bhattacharya, S.** Large Scale Production of PETase Enzyme, presentation at WIDEnzymes Workshop 3, Bioreactor Production of Recombinant Enzymes, Slovak University of Technology in Bratislava (STUBA), Slovakia, 26–30 January 2026. <https://widenzymes.eu/workshops-series/widenzymes-workshop-3-stuba/>
26. **Bhattacharya, S.** served as a trainer at OneHealthdrugs Training School (Cost Action CA21111), Expression, Purification and Basic Characterization of Target Protein Samples for Drug Binding Studies, Latvian Institute of Organic Synthesis, Riga, Latvia, September 2025. <https://onehealthdrugs.com/events/training-schools/expression-purification-and-basic-characterization-of-target-protein-samples-for-drug-binding-studies>

## MAIN RESULTS OF THE THESIS

### 1. FPOX enzymes

#### 1.1. Rational design of enzymes

Rational design is a computationally guided strategy for enzyme engineering that targets specific regions of a protein to enhance stability, activity, or substrate specificity, addressing the limitations of natural enzymes, which often operate at mild physiological conditions. Generally speaking, enzymes are poorly tolerant to industrial stresses such as high temperature, extreme pH, high ionic strength, or organic solvents<sup>1</sup>. Unlike *de novo* design or directed evolution, rational design introduces carefully selected mutations to generate a limited set of mutants that retain the overall fold while improving desired functional traits, using strategies such as introducing polar residues to strengthen hydrogen bonding, inserting cysteines to form disulfide bridges, optimizing surface charge interactions, targeting flexible regions, and leveraging thermophilic homologs<sup>2,3</sup> (Fig. 1).

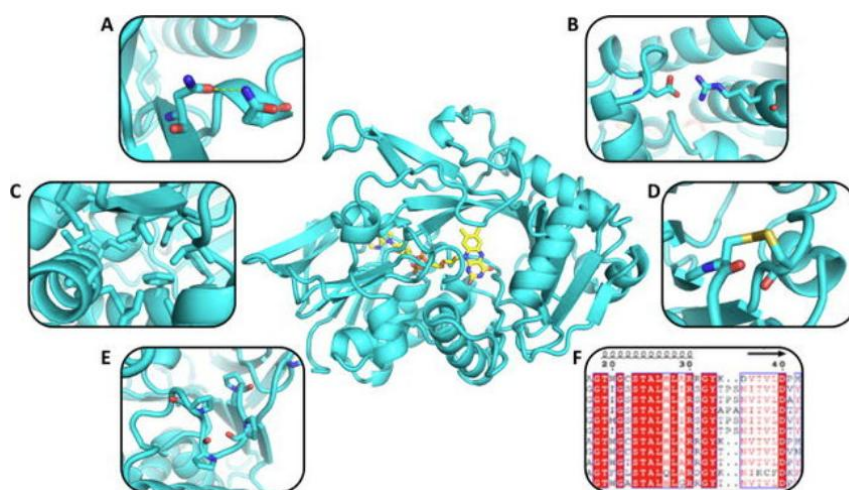


Fig. 1. Stabilizing strategies used in rational enzyme design. The most common strategies involve the introduction of surface hydrogen bonds (A) and salt bridges (B), the stabilization of the hydrophobic core (C), the introduction of disulfide bridges (D), and the stabilization of mobile loops using prolines (E). Phylogenetic analysis (F) can be used alone or in combination with previous strategies to guide the enzyme rational design process.

Modern approaches employ multiple-point mutations and computational platforms like FireProt<sup>4</sup> to account for synergistic or antagonistic interactions<sup>5</sup>, while tools such as CAVER<sup>6</sup>, Rosetta Remodel<sup>7</sup>, and molecular dynamics (MD) simulations provide atomistic insights into protein flexibility, tunnel architecture, and conformational stability<sup>8</sup>. MD simulations model atomic movements over time, identifying regions prone to instability and predicting the effects of proposed mutations, including changes in hydrogen bonding, disulfide formation, or other stabilizing interactions prior to experimental testing, thereby reducing workload and minimizing the number of mutants to construct. By integrating rational design with MD simulations, structural modeling, and evolutionary analysis, enzyme engineering projects can expand substrate specificity, optimize selectivity, and improve stability under challenging industrial conditions. Engineered enzymes with increased melting temperatures or reduced denaturation susceptibility can function efficiently at high temperatures, extreme pH, or elevated salinity, while Root Mean Square Fluctuation (RMSF) analyses from MD simulations can reproduce experimental  $\beta$ -factors to pinpoint highly flexible regions for stabilization<sup>5, 9, 10</sup> (Fig. 2).

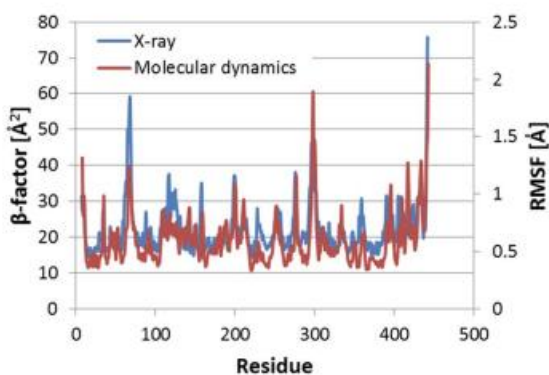


Fig. 2. Superposition of the RMSF of wild-type FPOX enzyme and experimental  $\beta$ -factor, showing how the RMSF from MD simulations reproduces the same trend of the experimental  $\beta$ -factors and allows pinpointing the same peaks, which represent highly flexible protein regions.

Fructosyl amino acid (or peptide) oxidases (FPOXs), also known as Amadoriases, are a specialized family of flavin-dependent oxidases that catalyze the deglycation of glycosylated amino acids or short glycosylated peptides. These enzymes belong to the oxidoreductase family and are widely distributed in yeasts, fungi, and bacteria. They catalyze the oxidative cleavage of low-molecular-weight Amadori products, yielding a free amine, glucosone, and hydrogen

peroxide<sup>11</sup>. The reaction involves oxidation of the C-N bond linking the C1 of the fructosyl moiety to the amino nitrogen, a process mediated by the FAD cofactor, whose flavinic moiety forms the catalytic center of the enzyme.

Structurally, FPOXs display well-defined FAD-binding motifs and conserved architectural features typical of the glucose–methanol–choline oxidoreductase family. To date, numerous FPOX crystal structures have been solved, providing detailed insight into the organization of the active site and the gating elements that regulate substrate access<sup>12</sup>. These structural studies have revealed that the catalytic pocket is buried within the protein and connected to the solvent by a narrow access tunnel, a feature that plays a key role in determining substrate specificity (Fig. 3 A)).

FPOXs are of considerable biomedical relevance, as they are used in enzymatic kits for the measurement of glycated hemoglobin (HbA1c), a key biomarker for long-term glycemic control in diabetic patients, and they also show potential for detecting glycated albumin<sup>13</sup>. In standard diagnostic assays, hemoglobin is first denatured and proteolytically digested to release small glycated peptides, such as fructosyl-valylhistidine (F-VH), which are subsequently oxidized by FPOX. The generated hydrogen peroxide is then quantified either colorimetrically via horseradish peroxidase or electrochemically, enabling indirect determination of HbA1c levels<sup>13</sup> (Fig. 3 B)).

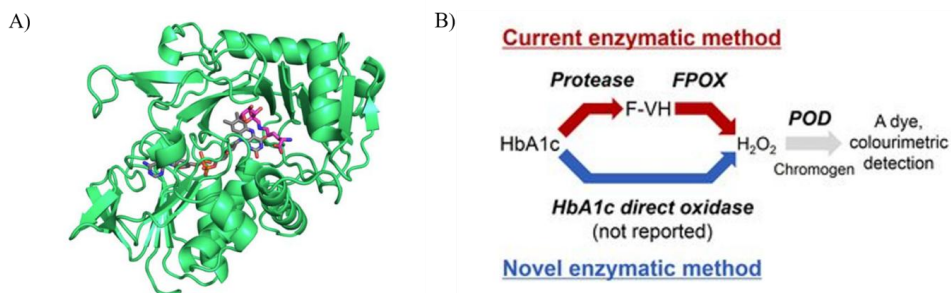


Fig. 3. A) – Crystal structure of Amadoriase I in complex with fructosyl-lysine (PDB code 4XWZ). B) – Reaction scheme of the HbA1c enzymatic method (adapted from<sup>13</sup>).

Despite their versatility and diagnostic value, FPOXs exhibit an important limitation: they are unable to efficiently catalyze the deglycation of intact proteins<sup>14</sup>. Structural studies have shown that this limitation arises from the narrow substrate-access tunnel leading to the buried active site, which restricts entry to small glycated amino acids or short peptides<sup>15</sup>.

Consequently, native FPOXs display limited activity toward bulky substrates such as intact glycosylated proteins.

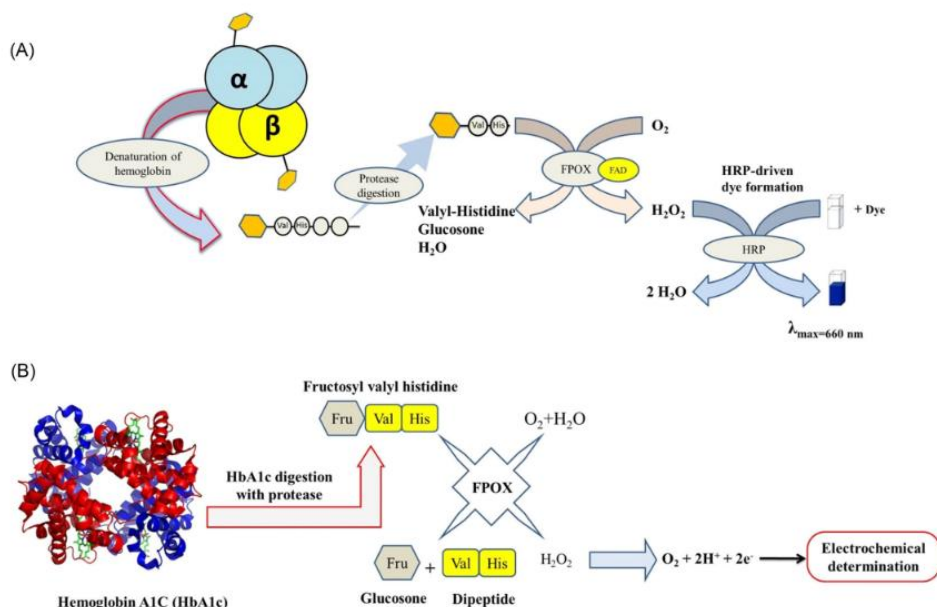


Fig 4. The denaturation and digestion of hemoglobin A1c (HbA1c) by protease to release fructosyl-valylhistidine (F-VH). (A) – F-VH undergoes oxidation by fructosyl peptide oxidase (FPOX), and the resulting  $H_2O_2$  serves as a substrate for HRP, forming a dye whose absorbance at 660 nm is used to calculate the HbA1c percentage. (B) – HbA1c assay by electrochemical measurement of  $H_2O_2$  (adapted from<sup>18</sup>).

Nevertheless, these same structural insights have provided a strong foundation for enzyme engineering. By targeting residues lining the substrate-access tunnel and stabilizing the FAD-binding domain, researchers have successfully generated FPOX mutants with improved thermal stability, enhanced catalytic activity, and increased selectivity toward specific glycosylated substrates<sup>16, 17</sup>. Such engineered variants not only offer improved performance in diagnostic assays, including colorimetric and electrochemical HbA1c measurements<sup>18</sup>, but also serve as valuable model systems for studying protein engineering strategies in flavin-dependent oxidases more broadly (Fig. 4).

Professor Emilio Parisini's group has been working on fructosyl peptide oxidases (FPOX) for several years, focusing on their rational engineering to enhance performance for practical

applications. The research involved the rational design of the first mutant of *Phaeosphaeria nodorum* FPOX (Pn-FPOX), derived from the wild-type enzyme, followed by systematic modifications including tunnel widening, thermal stabilization, and activity optimization. After several rounds of engineering, the mutant L3-35A was obtained, featuring a wider and shorter access tunnel achieved by deleting five amino acids lining the gate structure (Fig. 5). In the first year of my PhD, I began working on this previously engineered mutant, L3-35A, which retained the enlarged access tunnel and served as the starting point for further optimization. Building on L3-35A, I applied rational design strategies to restore stability and enhance enzymatic activity while preserving the widened access tunnel necessary for larger substrates. Three classes of mutations were introduced: the D-series, targeting reduction of structural fluctuations; the C-series, aimed at increasing the formation of stabilizing salt bridges; and the X-series, designed to introduce disulfide bonds for additional thermal stability. These mutations were guided by MD simulations, which provided insights into the enzyme's dynamic behavior, flexibility, and regions prone to instability, allowing to prioritize the most promising modifications.

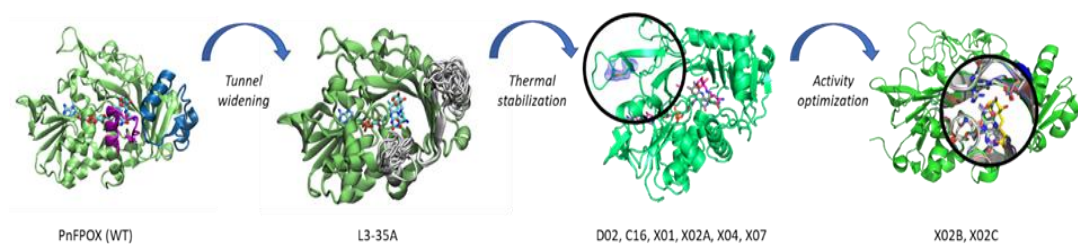


Fig. 5. Schematic of the rational design strategy, showing the names of the relevant enzyme variants obtained at each stage.

The combined multi-pronged approach successfully produced FPOX variants that were both thermostable and highly active, with the best mutant X02C. Experimental testing confirmed that the engineered mutants maintained structural integrity and significant catalytic activity relative to the wild-type enzyme.

The enzyme (X02C) with the best catalytic ability towards glycosylated substrates of different lengths (glycosylated valine (f-V), and the glycosylated hexa-peptide, fructosyl-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu (F6P)) was chosen for another round of engineering.

Starting from the X02C structure, the author removed one turn of helix 4 (Fig. 6 A)) (highlighted in blue) to widen the access tunnel. In total, nine amino acids were removed. This helix belongs to one of the four gating structures surrounding the active site. It was then rebuilt using a smaller number of residues (two to five). Additionally, to compensate for the loss of native interactions caused by this truncation, the author mutated all non-conserved residues within 5 Å of the remodeled section. This 5 Å threshold was chosen to account for hydrogen bond distances (~3 Å) and typical backbone fluctuations (RMSD ~1.5 Å). The author refrained from mutating residues that were conserved in the alignment of X02C with the other two highly active FPOXs, such as *Coniochaeta* sp. FPOX (FPOX-C)<sup>19</sup> and *Aspergillus nidulans* FPOX-47 (AnFPOX-47)<sup>20</sup>.

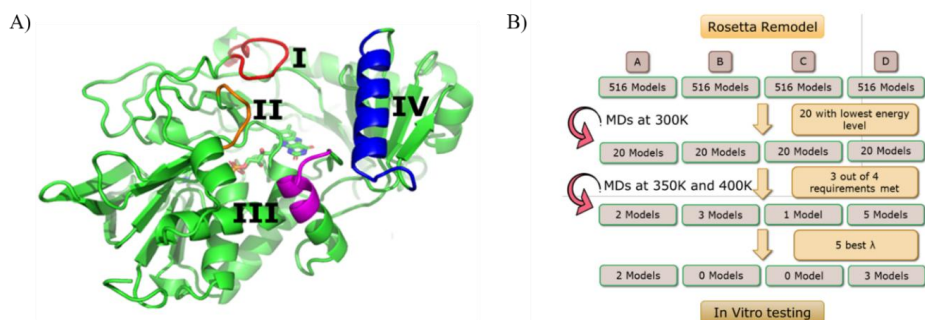


Fig. 6. A) – Model of X02C used for redesign. B) – Summary scheme of the computational part of enzyme engineering on X02C.

The author used Rosetta Remodel to introduce the selected mutations, generating 516 variants for each reconstructed loop length, twice the number of mutants screened in the previous study. For each loop length, the author selected the 20 generated models with the lowest energetic score, a unitless Rosetta Remodel parameter that qualitatively describes the overall stability of the model (Fig. 6 B)). The author then studied these structures using molecular dynamics simulations at a temperature of 300 K, 350 K, and 400 K for a simulated time period of 100 ns. The author evaluated the root mean square deviation (RMSD) and root mean square fluctuation (RMSF) from these simulations. The mutants that bested X02C on at least three of the four parameters (mean RMSD, mean RMSF, median RMSF and standard deviation of RMSF) were chosen for another round of molecular dynamic simulations (Fig. 7).

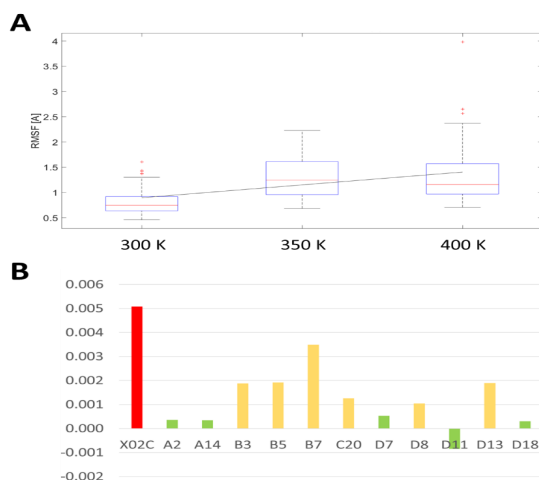


Fig. 7. RMSF analysis at increasing temperatures. A – RMSF of the redesigned loop of X02C as a function of the temperature (T). The linear regression analysis provided the angular coefficient (slope) of the RMSF vs. T relationship. B – The angular coefficient of the different enzyme variants is compared, and those with the lower values (green) are selected for experimental validation.

These optimized variants were experimentally expressed, purified, and biochemically characterized. They were also screened for catalytic activity against glycosylated peptides and *ex vivo* glycosylated human tissues. Among them, PnFPOX-A14 showed significantly enhanced activity compared to the parental engineered variant X02C, particularly toward bulkier substrates. Notably, while X02C retained limited activity on full-length glycosylated proteins, PnFPOX-A14 was able to directly recognize and act on intact HbA1c, demonstrating improved substrate accessibility and catalytic performance. These results validate the computational design strategy and establish PnFPOX-A14 as an improved platform for further engineering toward diagnostic and potential therapeutic applications. These results are summarized in Appendix 5 of the manuscript attached.

## 1.2. Enzyme expression and purification

For my Doctoral Thesis, recombinant DNA technology was employed to express all enzymes in *Escherichia coli*, primarily using BL21(DE3) for prokaryotic proteins and BL21(DE3) derivatives supplemented with rare tRNAs for eukaryotic proteins to mitigate codon bias, with antibiotic selection (ampicillin, kanamycin, or chloramphenicol) chosen

according to the expression vector<sup>21, 22</sup>. Prior to large-scale production, small-scale expression tests were conducted in which each mutant was grown under varying temperatures and induced with different IPTG concentrations to identify the optimal conditions for maximal soluble protein expression. Once optimal parameters were established, protein production was scaled up, typically to 4 liters, and purification was performed using a two-step workflow on an ÄKTA liquid chromatography system (Cytiva). For the FPOX family, expression in *E. coli* BL21 Star (DE3) at 25 °C resulted in yields ranging from 10 mg/L to 30 mg/L, with L3-35A producing the highest yield (30 mg/L). Alternatively, several FPOX mutants that feature disulfide bonds were expressed in the SHuffle T7 strain<sup>23</sup> at 18 °C, showing diverse yields, from low expression in X01 (5 mg/L) to relatively high levels in X02C (29 mg/L) (Table 1).

Table 1

Expression Yield of Enzymes

Enzyme	Expression yield (mg/L)	Expression temperature (°C)	Expression cells
PnFPOX	10	25	BL21 Star (DE3)
L3-35A	30	25	BL21 Star (DE3)
D02	15	25	BL21 Star (DE3)
C16	12	25	BL21 Star (DE3)
X01	5	18	SHuffle T7 E
X02A	20	18	SHuffle T7 E
X04	10	18	SHuffle T7 E
X07	6	18	SHuffle T7 E
X02B	16	18	SHuffle T7 E
X02C	29	18	SHuffle T7 E

In the first step, immobilized metal affinity chromatography (IMAC) was carried out using a HisTrap 5 mL nickel column, exploiting the N-terminal His<sub>6</sub> affinity tag on the recombinant proteins, with elution achieved using imidazole-containing buffer (Fig. 8 A)). In the second step, proteins were further polished by size-exclusion chromatography (SEC) using a HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 column, which removed aggregates, enabled buffer exchange, and ensured monodispersity of the enzyme preparations<sup>24</sup>. Protein concentration was measured using a NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), while molecular weight and purity were assessed by SDS-PAGE with Coomassie blue staining, providing reliable confirmation of protein size and homogeneity<sup>25</sup> (Fig. 8 B)). This combination of bacterial expression, optimization of induction conditions, and sequential IMAC and SEC purification enabled the production of high-purity, functional enzymes suitable for detailed biochemical

and structural characterization, forming a robust foundation for downstream enzyme engineering studies.

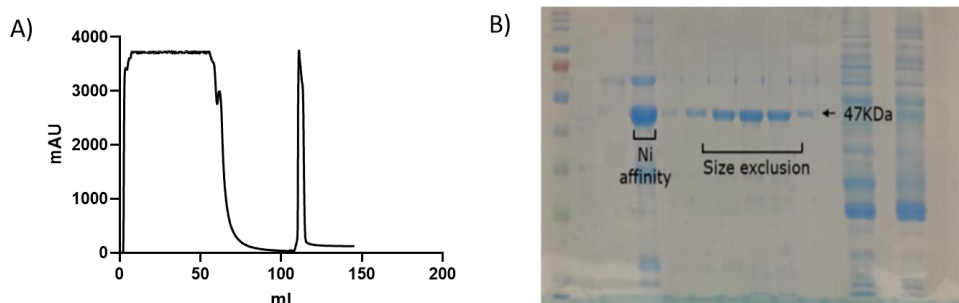


Fig. 8. A) – Representative nickel affinity chromatography (IMAC) chromatogram from the purification of the FPOX enzyme-X02C. The blue trace represents UV absorbance (A280) used to monitor protein elution. B) – Electrophoresis results for FPOX enzyme-X02C.

### 1.3. Biophysical characterization

Biophysical characterization is essential for assessing the structural integrity, stability, and functionality of proteins, as correct folding and molecular integrity are prerequisites for enzymatic activity. Techniques such as Circular Dichroism (CD) spectroscopy, Differential Scanning Fluorimetry (DSF), and MALDI mass spectrometry provide complementary information on secondary structure, thermal stability, and molecular mass, respectively<sup>26</sup>. CD spectroscopy evaluates secondary structure by measuring the differential absorption of circularly polarized light, with far-UV spectra revealing  $\alpha$ -helices,  $\beta$ -sheets, and disordered regions, while temperature-dependent CD measurements enable monitoring of thermal unfolding processes<sup>27</sup>. DSF, using environment-sensitive dyes such as SYPRO Orange, detects fluorescence changes during protein unfolding and provides melting temperatures ( $T_m$ ) that allow quantitative comparison of stability across different variants, buffer conditions, or ligand-bound states<sup>28</sup>. In this study, both DSF and CD were employed to assess the thermal stability of engineered FPOX variants, yielding consistent trends and comparable absolute  $T_m$  values, thereby validating the robustness of the measurements. The results demonstrate that the applied rational design strategy effectively enhanced the thermal stability of the reference enzyme L3-35A (Fig. 9). Specifically, the D02 variant, containing two additional mutations (V110R and D115G), exhibited an increase in melting temperature of approximately 1.5 °C relative to the parent enzyme. Further stabilization was achieved through the introduction of extensive surface

charges and salt bridges in mutant C16, which produced an additional  $\approx 1.5$  °C increase in  $T_m$ , reaching 55.2 °C (Table 2). Moreover, incorporation of a single disulfide bond at different positions within the L3-35A scaffold resulted in pronounced improvements in thermal stability. All variants in this series X01 (54.1 °C), X02A (60.0 °C), X04 (55.2 °C), and X07 (55.3 °C) displayed significantly elevated melting temperatures compared with the parent enzyme, as determined by both DSF and CD measurements (Table 2) (Fig. 9). Collectively, these results demonstrate that both electrostatic optimization and disulfide bond engineering are effective strategies for enhancing FPOX thermal stability and validate the use of complementary biophysical techniques for quantitatively evaluating protein stabilization outcomes.

Table 2

Melting Temperature of the Parent Enzyme (L3-35A) and Its Mutants

Enzyme	$T_m$ [°C] <sup>a</sup>	$T_m$ [°C] <sup>b</sup>
PnFPOX (WT)	53.2 ± 0.2	53.5 ± 0.1
L3-35A	52.3 ± 0.2	52.9 ± 0.1
D02	53.1 ± 0.5	54.8 ± 0.1
C16	55.2 ± 0.1	55.0 ± 0.1
X01	54.1 ± 0.1	54.2 ± 0.1
X02A	60.0 ± 0.4	60.1 ± 0.1
X04	55.2 ± 0.3	55.0 ± 0.1
X07	55.3 ± 0.4	55.4 ± 0.1
X02B	60.2 ± 0.7	60.6 ± 0.1
X02C	64.0 ± 0.2	63.3 ± 0.1

<sup>a</sup> Determined by thermal shift assay.

<sup>b</sup> Determined by circular dichroism.

The melting temperature of the wild-type enzyme (PnFPOX) is provided as a reference.

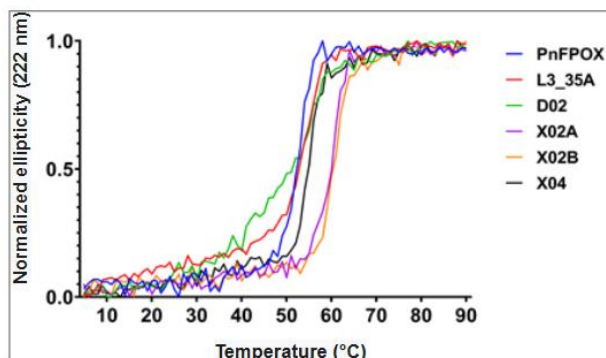


Fig. 9. Comparison of the  $T_m$  values of the different FPOX variants as measured by circular dichroism at 222 nm from 5 °C to 95 °C.

#### 1.4. Functional assay

The enzymatic activity of all FPOX variants was assessed at room temperature by quantifying the amount of glucosone released from the substrate over time, following previously established methods<sup>29</sup> (Fig. 10).

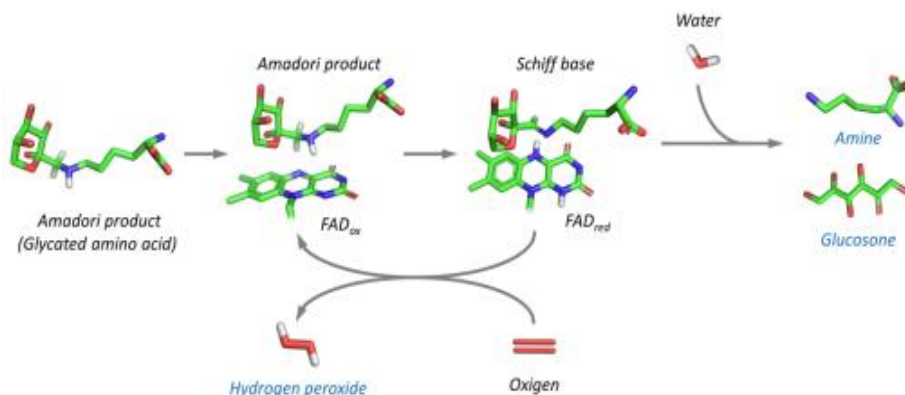


Fig. 10. Schematic of the amino acid deglycation reaction catalyzed by Amadoriase I (adapted from<sup>30</sup>).

The increase in absorbance at 322 nm ( $\epsilon_{322} = 149.25 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for glucosone) was continuously monitored using an Infinite M1000 microplate reader (Tecan) at 25 °C. Each reaction mixture (200  $\mu\text{L}$ ) contained 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, supplemented with 20 mM o-phenylenediamine and 2 mM of the respective substrate: *fructosyl-lysine* (*fK*), *fructosyl-valine* (*fV*), *fructosyl-valine-histidine* (*fVH*), or the hexapeptide *1-Deoxyfructosyl-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu* (*F6P*). FPOX catalyzes the oxidation of fructosyl substrates, generating glucosone as a reaction product. OPD reacts with glucosone to form a quinoxaline derivative, which absorbs at 322 nm. Following a 1 min pre-incubation, reactions were initiated by adding enzyme to final concentrations between 0.04 mg/mL and 1 mg/mL, depending on variant activity (Table 3).

Table 3

Comparison of the Enzymatic Specific Activity (U/mg) on Different Glycated Peptide Substrates

Enzyme	Specific activity (U/mg)			
	fK	fV	fVH	F6P
PnFPOX	30.18 ± 0.67	29.67 ± 2.56	32.60 ± 1.18	0.78 ± 0.09
AnFPOX-47	-	-	-	0.082 ± 0.002
L3-35A	0.21 ± 0.02	0.16 ± 0.04	-	-
D02	0.30 ± 0.03	0.32 ± 0.01	-	-
C16	ND	ND	-	-
X01	ND	ND	-	-
X02A	0.15 ± 0.01	0.11 ± 0.01	-	-
X04	ND	0.13 ± 0.01	-	-
X07	-	0.08 ± 0.01	-	-
X02B	2.24 ± 0.07	32.50 ± 0.44	0.87 ± 0.03	0.18 ± 0.06
X02C	1.06 ± 0.01	17.95 ± 2.46	1.62 ± 0.02	0.43 ± 0.06

Note: Tests are performed in triplicates. ND – not detected.

One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme catalyzing the formation of 1  $\mu$ mol of glucosone per minute under the specified assay conditions, and the specific activity was expressed as U mg<sup>-1</sup> of enzyme. Kinetic constants ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}$ , and  $k_{cat}/K_m$ ) were derived from assays performed with varying substrate concentrations (0.05–10 mM for fructosyl-valine; 0.05–1 mM for the hexapeptide substrate) using nonlinear regression analysis of the Michaelis-Menten equation, confirmed by Lineweaver-Burk plot fitting. All data represent the mean of at least two independent experiments (Table 4).

Table 4

Kinetic Parameters of Wild-Type PnFPOX and the Engineered X02C Enzymes

Enzyme	Substrate	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mM/min)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
PnFPOX	fV	5.93 ± 1.61	41.67 ± 8.34	99.33 ± 19.86	16.75
X02C	fV	0.94 ± 0.06	10.56 ± 0.56	20.83 ± 1.10	22.16
PnFPOX	F6P	0.81 ± 0.30	15.48 ± 1.20	36.83 ± 2.83	45.47
X02C	F6P	0.03 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.52 ± 0.02	17.22

The kinetic analysis revealed that the engineered variant X02C demonstrated a significantly lower  $K_m$  (0.94 mM) than the wild-type PnFPOX (5.93 mM), indicating enhanced substrate

affinity. Although  $K_{cat}$  decreased slightly, the catalytic efficiency ( $K_{cat}/K_m$ ) remained comparable or improved, highlighting a trade-off between substrate binding and turnover rate often observed in enzyme engineering (Table 3).

### 1.5. X-ray crystallography

X-ray crystallography was used to determine the three-dimensional structures of engineered fructosyl peptide oxidase (FPOX) variants, providing atomic-level insight into their structural organization, catalytic architecture, and stabilizing features. Crystals suitable for diffraction were obtained using vapor-diffusion methods under optimized supersaturation conditions, and high-resolution diffraction data were collected at a synchrotron source, enabling accurate structure determination and refinement<sup>31–33</sup>.

Structural analysis revealed key features underlying enzyme stability, substrate accessibility, and catalytic efficiency. Several engineered FPOX variants were successfully solved and deposited in the Protein Data Bank, including X02B (PDB ID: 8BJY), D02 (8BLZ), X02A (8BLX), and X04 (8BMU). These structures provide a detailed structural basis for understanding the effects of rationally introduced mutations and support their role in enhancing the stability and performance of FPOX enzymes (Fig. 11).

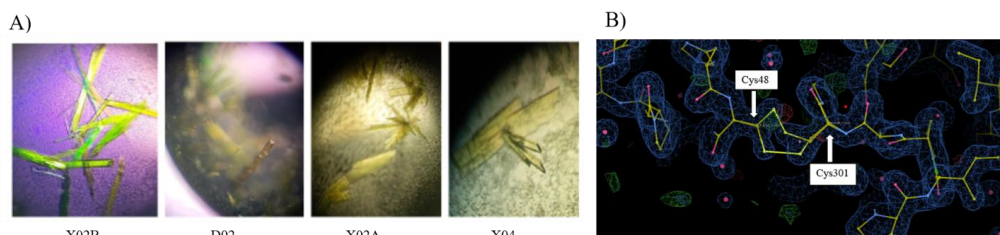


Fig. 11. A) – Crystals of FPOX variants. B) – Electron density map of X02A (PDB: 8BLX) showing the formation of a disulfide bond between Cysteines 48 and 301.

### 1.6. Structure-function correlation analysis

The X-ray crystallographic structure clearly illustrates the link between the molecular architecture and functional properties of the protein. The high-resolution model reveals well-defined secondary and tertiary elements forming a stable framework that supports active site organization and substrate binding. Key residues are precisely positioned to enable catalysis or ligand interaction, consistent with biochemical observations. Structural features such as hydrogen bonds, hydrophobic contacts, and electrostatic interactions further contribute to substrate specificity and stability. Across all these enzyme studies, detailed crystallographic

analysis has been central to understanding how three-dimensional structure governs biological function and catalytic mechanism. In the case of FPOX enzymes, the author observed that the overall RMSD values between the mutants and wild-type PnFPOX (PDB 5T1E) were all within 1.8 Å, indicating that the global fold remained largely conserved (Table 5).

Table 5

Calculated RMSDs Between the WT Enzyme PnFPOX and the Different Mutants, and Tunnel Geometry

Enzyme	RMSD [Å]	Tunnel bottleneck radius [Å]	Tunnel length [Å]
PnFPOX	-	2.2	13.3
L3-35A	1.8	3.7	6.4
D02	1.4	2.9	11.7
X02A	1.7	3.1	9.4
X04	1.8	3.0	10.9
X02B	1.5	3.0	10.2

When the author compared the residues forming the catalytic site (W235, E278, G372, R415), it was found that their orientation was preserved across all variants (Fig. 12). These residues, which are highly conserved among FPOX enzymes, are responsible for binding the sugar moiety of the substrate. Therefore, the differences in catalytic activity among the variants are unlikely to result from changes in the core catalytic geometry, but rather from subtler alterations in the regions surrounding the substrate tunnel.

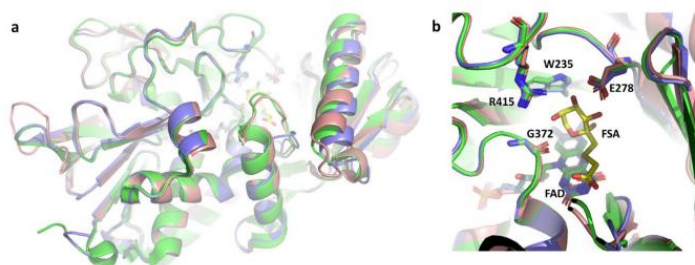


Fig.12. Structural comparison of relevant FPOX enzyme: PnFPOX (green), AnFPOX-47 (pink) and X02B (violet). The FSA inhibitor is depicted in yellow. a – The overall structural alignment shows no significant differences between the enzymes, except for the entrance tunnel. b – The position of the catalytic site is also highly conserved.

The author observed that the mutations primarily affected the geometry and dynamic behavior of the tunnel-lining residues. The wild-type enzyme features a narrow and elongated tunnel (bottleneck radius 2.2 Å, length 13.3 Å), which likely restricts access to larger substrates while stabilizing smaller ones. In contrast, the L3-35A variant exhibits a much wider and shorter tunnel (3.7 Å and 6.4 Å, respectively), while the X02B mutant presents an intermediate geometry (3.0 Å, 10.2 Å). These structural differences suggest that mutagenesis reshaped not only the static dimensions of the tunnel but also the correlated flexibility of the surrounding residues, thereby influencing substrate accessibility and stabilization.

### **1.7. Current directions and future opportunities**

Building on the engineered FPOX variants, the author is now working to integrate these optimized enzymes into sensitive biosensing platforms for HbA1c detection (Appendix 5). Current efforts focus on the development of colorimetric and electrochemical sensor formats, improving enzyme immobilization and signal transduction, and evaluating performance with clinically relevant samples. FPOX-based sensors are being developed to enable direct, rapid, and cost-effective measurement of glycosylated proteins.

## 2. PETase enzymes

Plastic pollution is a major environmental challenge, with polyethylene terephthalate (PET) being one of the most widely used and persistent plastics. Its resistance to chemical and biological degradation has led to extensive accumulation in landfills and natural ecosystems, while conventional disposal methods such as incineration and mechanical recycling remain inefficient or environmentally harmful. The discovery of PETase, an enzyme capable of depolymerizing PET into smaller, biodegradable products, represents a significant biotechnological advance and a promising biological approach to mitigating plastic pollution<sup>34,35</sup> (Fig. 13).

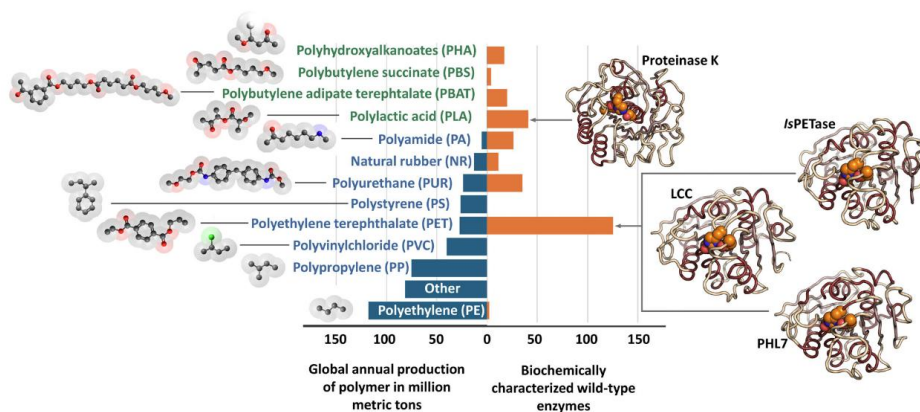


Fig. 13. Global production of major plastic polymers and availability of biochemically characterized wild-type depolymerases<sup>35</sup>.

Recent studies have shown that certain microorganisms can produce hydrolytic enzymes that are capable of degrading and metabolizing PET. To date, researchers have isolated and identified various PET-degrading enzymes, primarily esterases, lipases, hydrolases and cutinases. The PET-degrading proteins were named PETase and given the Enzyme Commission number EC 3.1.1.101. In 2016, the bacterium *Ideonella sakaiensis* was isolated from a PET-contaminated recycling site in Japan, which uses PET as its primary carbon and energy source, a unique capability among known microorganisms<sup>36</sup>. The enzyme PETase enables the bacterium to hydrolyze the ester bonds present in the PET polymer, producing smaller molecules such as mono(2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET), terephthalic acid (TPA), and ethylene glycol (EG)<sup>37,38</sup> (Fig. 14).

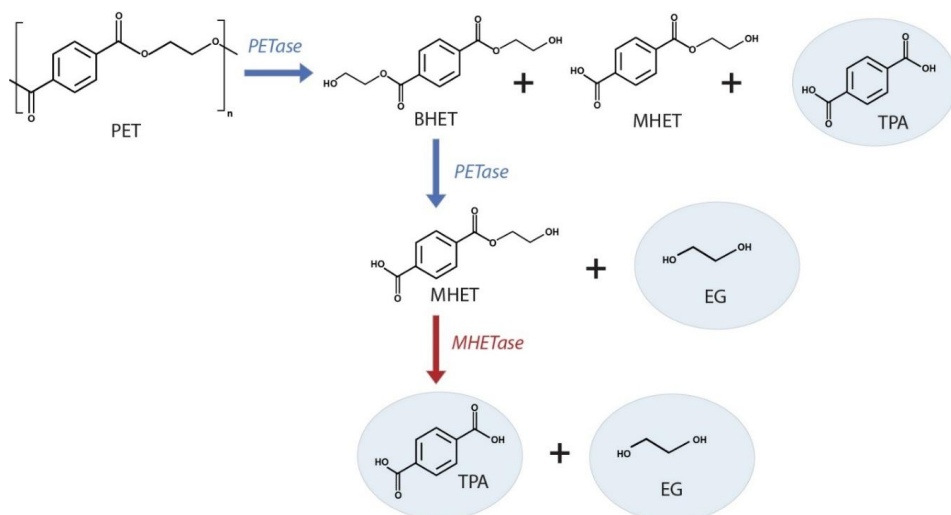


Fig. 14. PET depolymerization scheme: PETase catalyzes the depolymerization of PET to bis(2-hydroxyethyl)-TPA (BHET), mono(2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET), and terephthalic acid (TPA). MHETase converts MHET to monomers TPA and ethylene glycol (EG).

These breakdown products are less harmful to the environment and can be further metabolized by the bacterium or used in industrial recycling processes. Structurally, PETase belongs to the cutinase family of hydrolases, enzymes that typically degrade natural polyesters such as cutin, a waxy substance found in plant cuticles. PETase shares this evolutionary heritage but has adapted to recognize and act on synthetic PET. Its active site contains key amino acid residues that facilitate the hydrolysis of ester bonds, allowing it to break down long polymer chains into smaller fragments. These structural insights have been crucial for efforts to engineer PETase variants with improved activity, stability, and thermal tolerance<sup>39, 40</sup>.

Since the discovery of PET-depolymerizing enzymes, enzymatic PET recycling has been regarded as a promising method for plastic disposal, particularly in the context of a circular economy strategy<sup>41</sup>. Enzyme-based recycling offers an environmentally friendly alternative to chemical methods by converting PET into its monomers, which can be reused to synthesize new plastic products. However, the PET-degrading enzymes developed so far face several challenges that limit their industrial application. To date, the cost of industrial enzymatic recycling of PET is significantly higher than the production of virgin PET due to several limitations associated with currently available PETases<sup>42</sup>. Although industrial implementation

has been demonstrated, for example by the French company Carbios, many PETases still suffer from low thermostability, limited catalytic efficiency, and inhibition by degradation intermediates, making large-scale PET recycling impractical<sup>43,44</sup>. To overcome these limitations, the author's Doctoral Thesis focused on the engineering of PETase enzymes through advanced rational design strategies to develop an efficient variant for industrial enzymatic PET degradation. The author engineered the current PET-hydrolyzing enzyme gold standard [the ICCG variant of leaf-branch compost cutinase (LCC-ICCG)] using *in silico* protein design methods to develop a PET-hydrolyzing enzyme that features enhanced thermal stability and PET depolymerization activity.

## **2.1. Development of engineered LCC-ICCG PETase enzyme**

Leaf-branch compost cutinase (LCC) is a highly efficient, naturally occurring PETase with a melting temperature ( $T_m$ ) of 84.7 °C<sup>45</sup>. It was further engineered by Tournier et al. in 2020 to generate the ICCG (LCC-ICCG) variant, reported to reach  $T_m$  values of 91.7–94.0 °C and currently regarded as the gold-standard PETase<sup>45,46</sup>. Despite this exceptional stability, the vast sequence space of LCC offers substantial potential for further optimization. Building on the LCC-ICCG scaffold, the author set out to design more stable and active PETases, guided by the hypothesis that enhanced thermal stability correlates with improved expression and catalytic performance.

### **2.1.1. Rational engineering**

*In silico* enzyme engineering was initiated from the LCC-ICCG variant, a stabilized derivative of leaf-branch compost cutinase containing four substitutions (F243I, Y127G, S283C, and D238C), including an additional disulfide bond, with the catalytic serine restored at position 165<sup>46,45,47</sup>. Residues within 5 Å of the active site were excluded from mutagenesis to preserve catalytic function. Three complementary computational strategies were applied to generate stabilizing variants: Rosetta Supercharge<sup>48</sup>, PROSS<sup>49</sup> and Disulfide-by-Design<sup>3</sup>. The Rosetta Supercharge approach enhances protein stability by increasing surface hydrophilicity, a property commonly associated with improved structural robustness<sup>48</sup>. A widely used and straightforward stabilization strategy is the introduction of one or more disulfide bonds, which can rigidify the protein backbone and enhance stability<sup>50</sup>. Additional stabilization approaches aim to extend intramolecular hydrogen-bonding networks, introduce stabilizing salt bridges, or improve hydrophobic core packing, as implemented in PROSS<sup>49</sup>. These approaches yielded 1000, 9, and 125 candidate variants, respectively, from which subsets with the most favorable

scores were selected (C01-C10, P01-P09, and X01-X10). All 29 selected variants were subjected to 1  $\mu$ s molecular dynamics simulations in explicit solvent and ranked based on RMSF-derived stability metrics. This screening identified six top-performing candidates, C08, C09, P06, P08, X05, and X09, which were selected for experimental expression and characterization based on their predicted enhanced structural stability (Fig. 15).

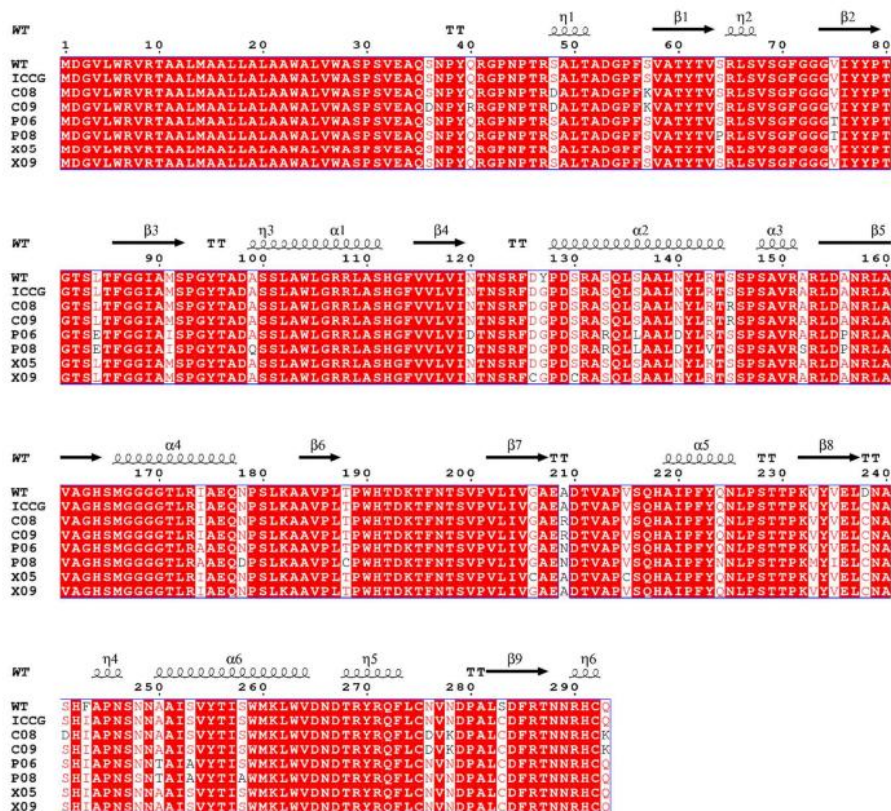


Fig. 15. Sequence alignment. Sequence alignment of the wild-type LCC enzyme (Uniprot ID G9BY57), the ICCG variant developed by Tournier et al.<sup>46</sup>, and the engineered enzymes developed in this study (C08, C09, P06, P08, X05, X09). Alignment is performed with Clustal Omega, while the graphical representation is obtained using ESPrIT 3 web server<sup>51</sup>.

### 2.1.2. Enzyme expression and purification

The selected candidate enzymes were expressed in *E. coli* and purified using nickel affinity chromatography (IMAC) and size-exclusion chromatography (SEC) (Fig. 16). For PETase enzymes, BL21 Star (DE3) at 18 °C proved effective, with yields ranging from 12 mg/L to

22 mg/L. Among these, variant X09 expressed the highest amount (22 mg/L), while P08 produced the lowest (12 mg/L).

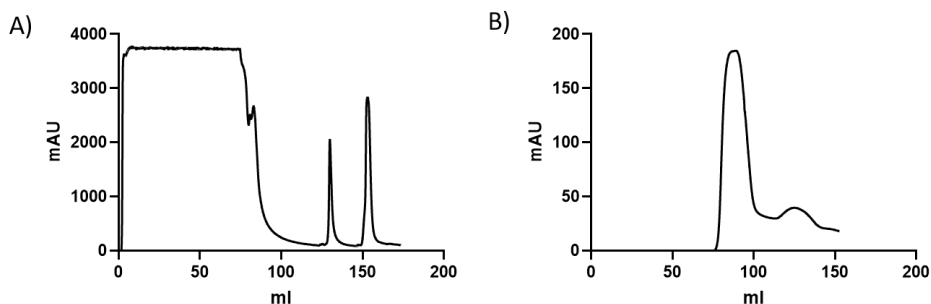


Fig. 16. Representative chromatograms from the purification of the C09 enzyme showing A) nickel affinity chromatography (IMAC) and B) Size-exclusion chromatography (SEC).

The blue trace represents UV absorbance (A<sub>280</sub>) used to monitor protein elution.

### 2.1.3. Biophysical characterization

After enzyme design campaign, the author tested the secondary structure (Fig. 17) and the thermal stability of the six engineered variants (Fig. 18). It was found that the C09 ( $T_m = 97.1$  °C) and X05 ( $T_m = 96.9$  °C) variants have a higher  $T_m$  than the reference LCC-ICCG ( $T_m = 93.6$  °C). The X09 ( $T_m = 93.8$  °C) variant exhibits similar thermal stability to LCC-ICCG (Fig. 17). The author did not determine the melting temperature of P06 and P08 due to their negligible enzymatic activity in preliminary experiments, while for C08, it was not possible to obtain a reliable fit.

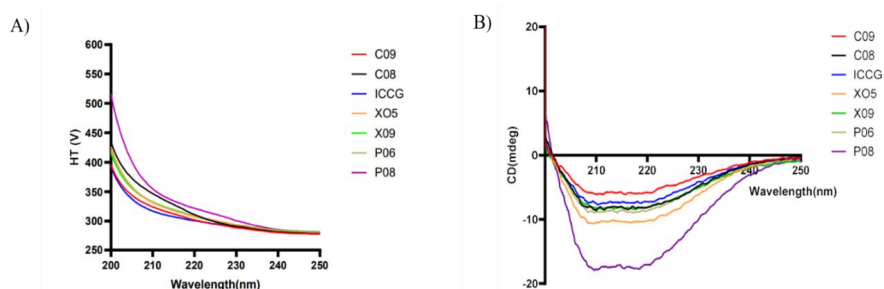


Fig. 17. Secondary structure measurements by circular dichroism. A) – The plot shows voltage vs. wavelength for the different enzymes. B) – The plot shows ellipticity vs. wavelength for the different enzymes.

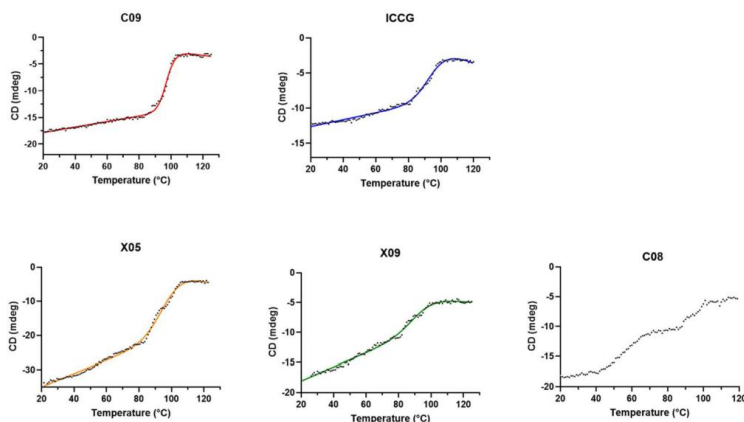


Fig. 18. Representative melting curves. Each panel shows a representative melting curve measured by circular dichroism at 222 nm from 20 °C to 120 °C for the corresponding sample; black dots represent experimental data points, and the solid line indicates the fitted curve.

#### 2.1.4. Functional assay

The enzymatic hydrolysis of polyethylene terephthalate (PET) was evaluated by quantifying the formation of major depolymerization products – bis(hydroxyethyl) terephthalate (BHET), mono(hydroxyethyl) terephthalate (MHET), terephthalic acid (TPA), and ethylene glycol (EG) using reversed-phase HPLC. Reactions were carried out at 68 °C with 40 nM enzyme in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 300 mM NaCl. Amorphous PET films (250  $\mu\text{m}$  thickness, Goodfellow USA) were punched into 6 mm discs ( $\sim 8.4$  mg) and incubated individually in 2 mL microcentrifuge tubes. All assays were performed in quintuplicate to ensure reproducibility. Product quantification was conducted using a Shimadzu LC-2030C 3D Plus system equipped with a Kinetex C18 column (2.7  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  150 mm) at 40 °C and 1 mL  $\text{min}^{-1}$  flow rate. The mobile phase consisted of 0.1 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (A) and acetonitrile (B) with a linear gradient. Aliquots were collected at various time points (0–144 h), diluted accordingly (21 $\times$  for 0–72 h, 101 $\times$  for 96–144 h), and analyzed at 220 nm. Calibration curves for TPA and MHET (0.1–50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and BHET (0.09–43.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) enabled precise quantification of product formation.

The accumulation of TPA and MHET over time reflected progressive PET hydrolysis. Among the tested variants, some demonstrated enhanced degradation rates compared to wild-type PETase, correlating well with the improved thermostability and folding properties revealed by biophysical characterisation.

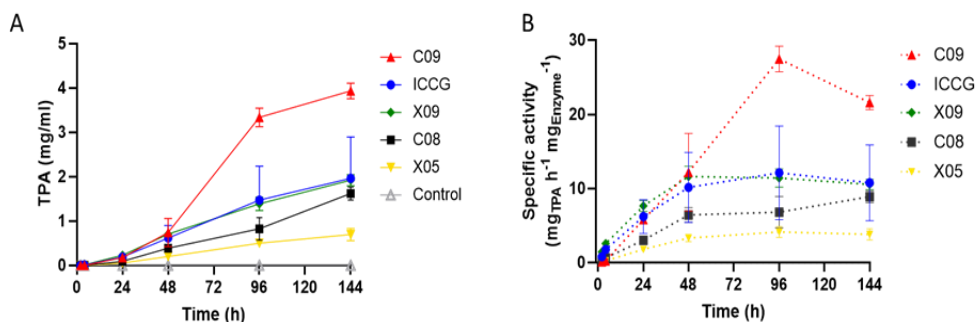


Fig. 19. Comparison of polyethylene terephthalate (PET) depolymerization over time for all enzymes. A – Terephthalic acid (TPA) production over time at 68 °C (LCC-ICCG – C09 – X05 – X09 – C08 40 n M, pH 8.0). B – Comparison of TPA production at 68 °C at 4 h and at 144 h.

The results show that at 68 °C, the mean TPA concentration at the different time points is significantly higher for the C09 mutant than for ICCG up until day 6 (144 h). Moreover, the specific activity of C09 is also significantly higher ( $\approx 2$ -fold) than that of the gold standard LCC-ICCG over the same length of time (Fig. 19).

### 2.1.5. X-ray crystallography

Crystals of the C09 variant were obtained by vapor diffusion in 0.1 M sodium citrate pH 5.6, 20 % PEG 4000, and 20 % isopropanol, and data were collected after cryoprotection with 25 % glycerol. The resulting structure, refined to 1.28 Å resolution, provided atomic detail of the engineered stabilizing mutations.

The C09 enzyme contains thirteen substitutions relative to wild-type LCC, including additional charged residues (e.g., S36D, Q40R, S57K) strategically positioned on the surface. Despite these extensive modifications, the crystallographic analysis showed no significant deviation in folding (RMSD 0.26 Å vs. WT; 0.15 Å vs. LCC-ICCG). The catalytic triad (D210,

H242, S265) retained its canonical geometry, confirming that structural integrity was preserved (Fig. 24).

Structural comparison and RMSF simulations demonstrated that C09 exhibited reduced local flexibility, particularly around the catalytic His242, explaining the variant's exceptional thermal resilience ( $T_m > 95$  °C) and 2-fold higher PET degradation efficiency relative to LCC-ICCG. The added surface charges are hypothesized to stabilize surface-exposed loops and prevent unfolding of the catalytic site during prolonged high-temperature catalysis. Thus, while catalytic architecture remains unchanged, dynamic stabilization through rational design appears to be the key determinant of enhanced performance in C09 (Fig. 20).

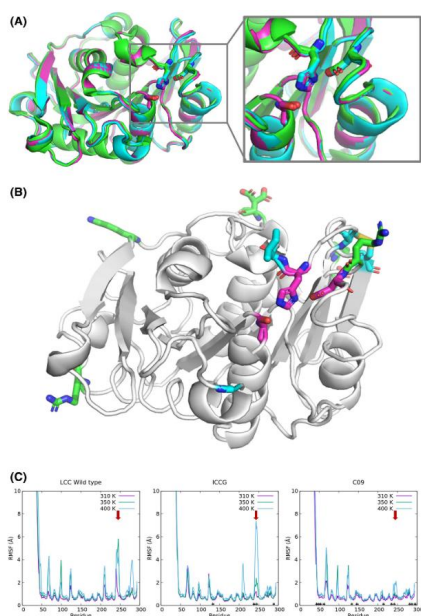


Fig. 20. Structural comparison of relevant PETase enzymes: wild-type LCC (green), ICCG variant (cyan), and C09 variant (pink). (A) – The overall structural alignment shows no significant differences between the enzymes, including the position and the orientation of the catalytic triad. Panel (B) shows the position of mutations (sticks) in ICCG (cyan) and C09 (pink) with respect to the catalytic site (pink sticks). Panel (C) shows a comparison between the root mean square fluctuation (RMSF) of LCC, LCC-ICCG, and C09 at different temperatures (310 K, 350 K, and 400 K).

## 2.2. Characterization of novel PETase SM14

While enzymatic PET degradation has emerged as a promising sustainable alternative to conventional recycling methods, most known PET-degrading enzymes display limited catalytic efficiency and narrow operational windows, particularly under environmentally relevant conditions. This limitation is especially critical in the context of marine pollution, where large quantities of PET accumulate and persist due to high salinity, low temperatures, and the scarcity of effective natural degradation processes. In this context, the author characterised a novel PET-degrading enzyme isolated from the marine-sponge-associated bacterium *Streptomyces* sp. SM14 (PETase SM14). This project is conducted in collaboration with Prof. Giulia Di Rocco at the University of Modena and Reggio Emilia (Italy), where a part of the project was carried out.

### 2.2.1. Enzyme expression and purification

The gene encoding mature PETase SM14 from *Streptomyces* sp. SM14 was cloned into the pLATE52 vector using ligation-independent cloning and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Protein expression was induced with IPTG, followed by cell lysis and purification via Ni<sup>2+</sup>-affinity chromatography using a HisTrap HP column. PETase SM14 was eluted with an imidazole gradient, and peak fractions were collected, with protein concentration determined by UV absorbance at 280 nm based on its calculated molecular properties.

### 2.2.2. Biophysical characterization

Far-UV CD spectroscopy was employed to assess the secondary structure content of PETase SM14 and to compare its folding with that of the reference PETase from *Ideonella sakaiensis*<sup>36,52</sup>. The CD spectra displayed well-defined minima at approximately 208 nm and 222 nm, characteristic of an  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold dominated by  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -sheet elements (Fig. 18). The spectral profile of PETase SM14 closely resembled that of *I. sakaiensis* PETase, indicating that the enzyme retains a similar overall secondary structure architecture despite sequence divergence. The data confirm proper protein folding and align with the structure determined by X-ray crystallography of PETase SM14.

Thermal denaturation experiments, monitored by measuring ellipticity at 222 nm as a function of temperature, revealed a melting temperature ( $T_m$ ) of 56.3 °C for PETase SM14, indicating remarkable thermal stability. In comparison, the  $T_m$  of *Ideonella sakaiensis* PETase

was determined to be 45.0 °C, indicating that SM14 is more than 10 °C more thermostable (Fig. 21). This increase in  $T_m$  suggests enhanced structural rigidity or improved intramolecular interactions within PETase SM14, likely contributing to its robustness under environmental conditions. The unfolding transition represented a well-folded, monomeric protein.

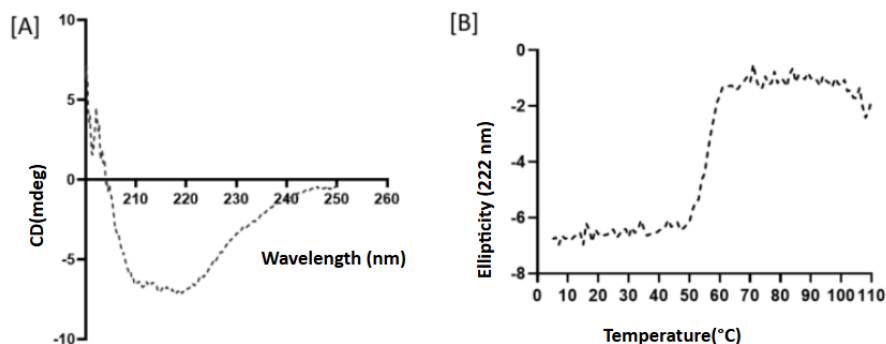


Fig. 21. Circular dichroism (CD) analysis to detect the secondary structure of the enzyme [A] and to measure the thermostability of the enzyme [B].

Protein thermal stability was also assessed using differential scanning fluorimetry (DSF) with SYPRO Orange dye (Thermo Fisher Scientific) on a 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Each reaction contained 5  $\mu\text{M}$  enzyme and 5 $\times$  dye in a final volume of 25  $\mu\text{L}$ , prepared by mixing equal volumes of enzyme solution (10  $\mu\text{M}$ ) and 10 $\times$  dye (diluted from a 5000 $\times$  stock) in the corresponding protein buffer. Fluorescence was monitored during temperature ramping from 15 °C to 95.3 °C, and melting temperatures ( $T_m$ ) were determined from the inflection points of the denaturation curves. To evaluate stability under different physicochemical conditions, assays were performed across a pH range of 6.0–9.0, and NaCl concentrations from 100 mM to 700 mM (Fig. 22). Variations in pH had minimal effect on  $T_m$ , which remained relatively constant, while increasing NaCl concentration up to 700 mM in Tris buffer (pH 8.0) did not induce protein unfolding. These results demonstrate that the enzyme maintains high structural stability across a broad range of salt concentrations and pH values.

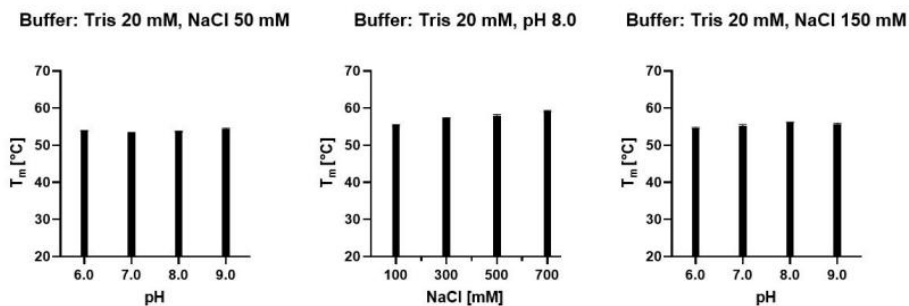


Fig. 22. Shift in melting temperature of PETase SM14 in different buffer conditions detected via temperature-dependent fluorescence shifts of SYPRO Orange.

MALDI mass spectrometry provides accurate molecular mass determination and sequence verification, enabling detection of degradation, post-translational modifications, and confirmation of expression products<sup>53</sup>. MALDI-TOF mass spectrometry was used to confirm the molecular mass and sequence integrity of the purified PETase SM14 enzyme.

Measurements were recorded with a FLEX-PC autoflex TOF/TOF (Bruker). The acquisition operation mode was Linear, polarity voltage POS. The number of shots was 500. Protein and formic acid (one sample with 1  $\mu$ L and one with 0.5  $\mu$ L) were mixed. One drop of this solution was mixed with matrix SA (sinapinic acid) and allowed to solidify. The concentration of the protein was 10 mg/mL.

The experimental molecular mass (approximately 28 kDa) closely matched the theoretical mass calculated from the amino acid sequence (Fig. 23), verifying successful expression and purification of the intact protein. No evidence of proteolytic cleavage, truncation, or post-translational modification was observed. The mass accuracy ( $\pm 0.1$  kDa) and absence of significant impurity peaks confirmed the high purity of the sample obtained after the two-step chromatographic purification.

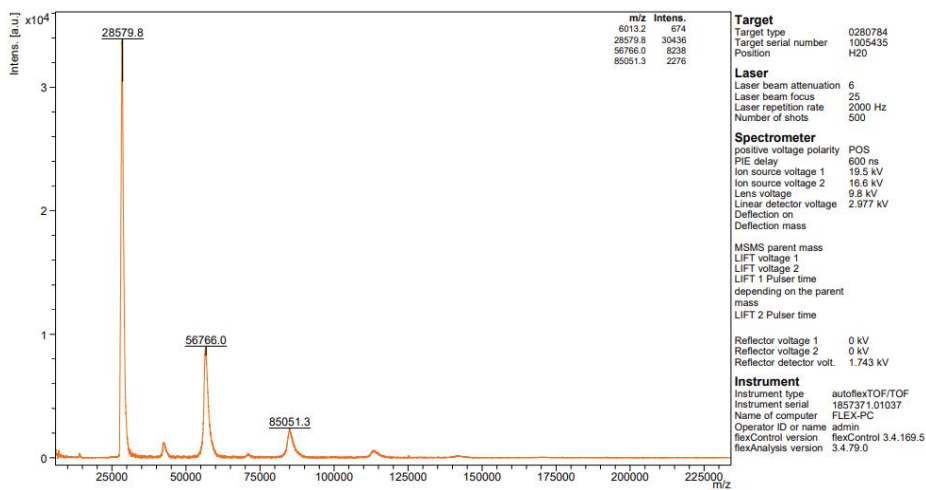


Fig. 23. MALDI-TOF analysis of PETase SM14. This value was obtained with a 5 mg/mL protein concentration, diluted with TFA 50 %, and sinapinic acid (SA) as the matrix.

Furthermore, peptide mass fingerprinting following tryptic digestion confirmed sequence coverage above 90 %, validating that the expressed product corresponded precisely to the intended PETase SM14 construct (Fig. 24). The consistency between the expected and observed mass further corroborated the structural data obtained from CD and DSF analyses, collectively confirming that PETase SM14 is a stable, properly folded, and structurally intact enzyme.

1     **AQNPHERGPD PSNSYIEQAR GSYSVSQRSI SRLGSDGFRD GTMYPTSTA**  
51     **DGRFGVVAIS PGYTASESTI AWLGPRLASF GFVVVTINTD SRYDQPRQRA**  
101    **TQLHAALDHA IGDSVVGPRI DTSRQAVMGH SMGGGGALQA AEERDEIRAA**  
151    **VPLTPWNLKK GWSGVDAATL VIGAENDAIA PVRSHSIPFY ESLTNAERRA**  
201    **YLELRREGHF APNSSNTLIA KYSVSWLKRY VNDNLYDQF IDPGPRTGIT**  
251    **TGVSDYRLG**

Fig. 24. MS/MS spectra (100–1200 m/z) obtained from the band of PETase SM14 after purification, extracted and digested with trypsin and analyzed via ESI-MS/MS spectrometry. Sequence coverage of 95 %.

### 2.2.3. Functional assay

The enzymatic activity of PETase SM14 was evaluated using PET post-consumer plastic (PCP) under controlled reaction conditions, varying key parameters including pH, temperature, and NaCl concentration. PETase SM14 effectively degraded PCP, releasing terephthalic acid (TPA) as quantified by HPLC, with optimal activity observed at pH 9.0. TPA production increased approximately 10-fold under basic conditions and was largely independent of temperature between 40 °C and 50 °C. Enzymatic activity was strongly enhanced by salinity, showing over a 100-fold increase in TPA release in the presence of NaCl, with an optimal concentration around 900 mM,

### 2.2.4 X-ray crystallography

The author determined the high-resolution crystal structure of PETase SM14 from a *Streptomyces* species isolated from a marine sponge. Crystals of the tag-free enzyme were grown using the vapor diffusion method and diffracted to 1.43 Å resolution on the Diamond Light Source I03 beamline in Oxford, UK. The structure was solved by molecular replacement using an AlphaFold-predicted model as the search template, followed by iterative manual refinement in *Coot*<sup>54</sup> and automated cycles in *REFMAC5*<sup>55</sup>.

The PETase SM14 structure exhibited the classical  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold, with a conserved Ser–His–Asp catalytic triad positioned in a shallow substrate-binding cleft. Structural superposition with *Ideonella sakaiensis* PETase (IsPETase) and a polyester hydrolase (PE-H) (Fig. 25) revealed high structural conservation, with RMSDs of 0.69 Å (IsPETase) and 0.81 Å (PE-H). The catalytic residues aligned precisely, supporting a shared serine-hydrolase mechanism.

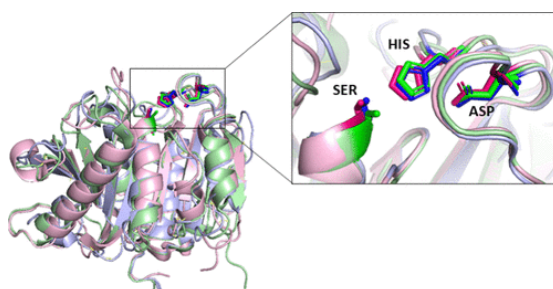


Fig. 25. Overall structure comparison of PETase SM14 (light blue), IsPETase (PDB code 6ILW, light green), and PE-H from *P. aestusnigri* (PDB code: 6SBN, light pink) performed using PyMOL.

Notably, SM14 displayed distinctive loop conformations adjacent to the active site that narrowed the catalytic pocket relative to IsPETase. This subtle closure may confer enhanced substrate binding and increased rigidity, consistent with the enzyme's high melting temperature ( $T_m$  56.3 °C) and pronounced salt tolerance up to 1.5 M NaCl. Electrostatic surface analyses indicated a less polarized and more evenly distributed charge potential compared with IsPETase (pI 6.67 vs. 9.41), potentially stabilizing the protein in marine or alkaline environments. Together, these features suggest that PETase SM14 evolved for catalytic persistence under high-salinity and mildly thermophilic conditions, an adaptation promising for environmental PET degradation.

### 2.2.5 Structure-function correlation analysis

The author studied the structure of PETase SM14 in detail in order to understand the effect of ionic strength on PETase enzymes. To further dissect the contribution of correlated flexibility to enzymatic adaptation, the author combined molecular dynamics (MD) simulations with *in vitro* enzymatic assays on IsPETase (from *Ideonella sakaiensis*) and PETase SM14. The objective was to determine how local motions and dynamic coupling contribute to catalytic efficiency across ionic environments. IsPETase, secreted by *Ideonella Sakaiensis* 201-f6, and PETase SM14, expressed by the marine-sponge *Streptomyces* sp. SM14, are characterized by the same catalytic scaffold; however, significant differences have evolved to adapt each enzyme to its native environment. Activity assays on PET powder degradation performed in this study and supporting evidence from the literature indicate that NaCl concentration exerts a positive effect on the activity of PETase SM14, consistent with its hypersaline marine origin, while having a negative effect on IsPETase. To date, this phenomenon has been observed using analytical techniques such as HPLC, SEM, and AFM, which do not elucidate the structural basis of these effects.

To address this gap, the author employed molecular modeling and MD simulations to deliver a detailed structural comparison and molecular-level explanation of the experimentally observed differences between the two homologous plastic-degrading enzymes. The results obtained from 500-ns-long MD simulations reveal that the IsPETase binding site is significantly wider and more flexible than that found for PETase SM14, as supported by the larger average residue-residue distances and the more open electrostatic surface observed in Fig. 26. This inactivation is primarily caused by a conformational rearrangement involving the flipping of residue W159, which displaces the catalytic histidine (H237) from serine (S160),

disrupting the active site geometry. In contrast, PETase SM14 maintained a more rigid structure that underwent minor yet beneficial conformational changes under high-salt conditions. These subtle rearrangements promoted enhanced hydration of the active site, with additional water molecules facilitating substrate interaction and sustaining catalytic efficiency.

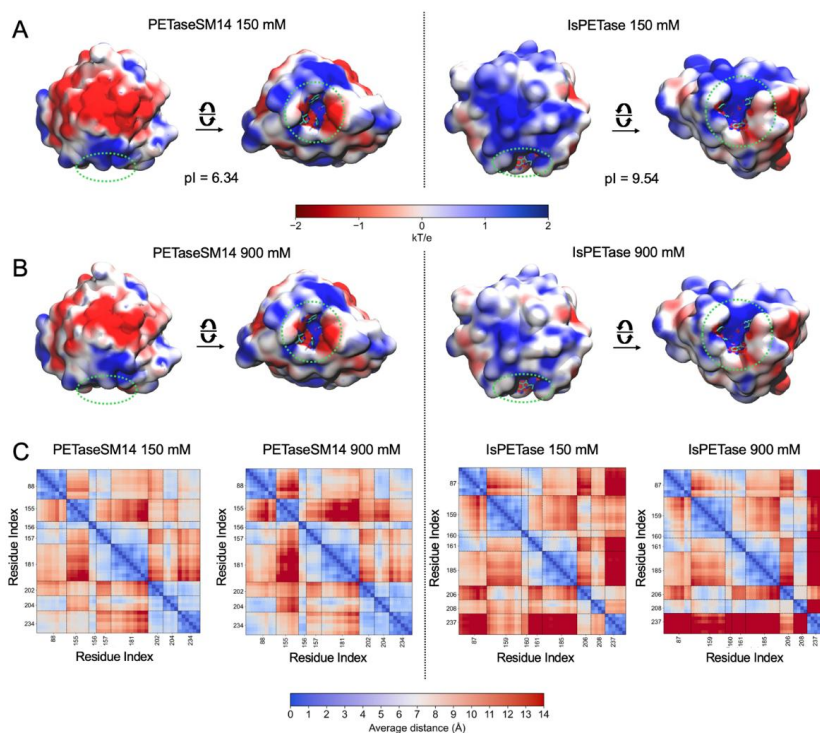


Fig. 26. Effect of ion concentrations on the PETase SM14 and IsPETase. Electrostatic potential surface of PETase SM14 and IsPETase at (A) 150 mM and (B) 900 mM of NaCl concentration. The binding site locations and key residues are indicated with the green dotted circles. C – Distance maps of residues forming the PETase SM14 and IsPETase binding sites at the two ion concentrations. The maps report the average values of each cross-distance calculated over the three 500-ns MD simulation replicas. The color scale ranges from 0 Å (blue spots) to  $\geq 14$  Å (red spots).

Modeling of PET binding using 9-monomer PET chains confirmed that PETase SM14 at high salinity and IsPETase at low salinity both achieve optimal substrate accommodation and catalytic alignment. At 900 mM NaCl, PETase SM14 displayed approximately twice as many reactive enzyme–substrate configurations compared to its performance at 150 mM, whereas

IsPETase exhibited a 50 % reduction in such states under the same conditions. These findings correlate well with the observed experimental activity trends and provide a molecular-level explanation for the distinct ionic adaptations of the two enzymes.

### **2.3 Current directions and future opportunities**

Building on the established computational-experimental framework, the author has initiated further exploration towards rational and simulation-guided engineering aimed at enhancing the stability and catalytic efficiency of PETase SM14. In parallel, the author is working towards the scale-up of enzymatic PET depolymerisation using the engineered LCC-ICCG-C09 variant in bioreactor systems, with the goal of improving process robustness, substrate accessibility, and overall catalytic productivity toward industrial implementation.

## CONCLUSIONS

This thesis developed an integrated computational-experimental framework for the rational engineering of enzymes with improved stability, activity, and environmental robustness. The approach combined molecular modeling, molecular dynamics simulations, protein engineering, biochemical characterization, and structural analysis to guide efficient enzyme optimization.

- Fructosyl peptide oxidase (FPOX) variants were successfully engineered with enhanced thermostability using RMSF-guided mutations, salt bridges, and disulfide bonds (Appendix 1).
- Although the optimized FPOX variants exhibit enhanced stability and activity, further development is focused on improving their performance toward glycosylated haemoglobin. Current data addressing this objective can be found in the manuscript provided in the Appendix 5.
- Engineering of PET-degrading enzymes demonstrated the broader applicability of the framework to industrial biocatalysis. The LCC-ICCG-C09 variant showed improved thermal stability and approximately two-fold higher PET depolymerization efficiency compared to the parent enzyme, providing a promising foundation for enzymatic plastic recycling despite remaining challenges related to substrate crystallinity, pH sensitivity, and scalability (Appendix 2).
- A novel marine sponge derived enzyme, PETase SM14, was discovered and characterized. It was found to maintain high activity in alkaline, high-salt, and high-temperature environments (Appendix 3).
- Structural and molecular dynamics analyses of PETase SM14 revealed adaptive features supporting catalysis in hypersaline environments, highlighting its potential for marine plastic bioremediation (Appendix 4).

## REFERENCES

- (1) Gautieri, A.; Rigoldi, F.; Torretta, A.; Redaelli, A.; Parisini, E. In Silico Engineering of Enzyme Access Tunnels. In *Enzyme Engineering: Methods and Protocols*; Magnani, F., Marabelli, C., Paradisi, F., Eds.; Springer US: New York, NY, 2022; pp 203–225. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1826-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1826-4_11).
- (2) Gribenko, A. V.; Patel, M. M.; Liu, J.; McCallum, S. A.; Wang, C.; Makhatadze, G. I. Rational Stabilization of Enzymes by Computational Redesign of Surface Charge-Charge Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (8), 2601–2606. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808220106>.
- (3) Dombkowski, A. A. Disulfide by Design: A Computational Method for the Rational Design of Disulfide Bonds in Proteins. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2003**, *19* (14), 1852–1853. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg231>.
- (4) Musil, M.; Jezik, A.; Horackova, J.; Borko, S.; Kabourek, P.; Damborsky, J.; Bednar, D. FireProt 2.0: Web-Based Platform for the Fully Automated Design of Thermostable Proteins. *Brief. Bioinform.* **2024**, *25* (1), bbad425. <https://doi.org/10.1093/bib/bbad425>.
- (5) Rigoldi, F.; Donini, S.; Redaelli, A.; Parisini, E.; Gautieri, A. Review: Engineering of Thermostable Enzymes for Industrial Applications. *APL Bioeng.* **2018**, *2* (1), 011501. <https://doi.org/10.1063/1.4997367>.
- (6) Chovancova, E.; Pavelka, A.; Benes, P.; Strnad, O.; Brezovsky, J.; Kozlikova, B.; Gora, A.; Sustr, V.; Klvana, M.; Medek, P.; Biedermannova, L.; Sochor, J.; Damborsky, J. CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures. *PLOS Comput. Biol.* **2012**, *8* (10), e1002708. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002708>.
- (7) Huang, P.-S.; Ban, Y.-E. A.; Richter, F.; Andre, I.; Vernon, R.; Schief, W. R.; Baker, D. RosettaRemodel: A Generalized Framework for Flexible Backbone Protein Design. *PLoS ONE* **2011**, *6* (8), e24109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024109>.
- (8) Kokkonen, P.; Bednar, D.; Pinto, G.; Prokop, Z.; Damborsky, J. Engineering Enzyme Access Tunnels. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37* (6), 107386. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.008>.
- (9) Zhou, J.; Huang, M. Navigating the Landscape of Enzyme Design: From Molecular Simulations to Machine Learning. *Chem. Soc. Rev.* **2024**, *53* (16), 8202–8239. <https://doi.org/10.1039/D4CS00196F>.
- (10) Lin, H.-Y.; Chen, X.; Dong, J.; Yang, J.-F.; Xiao, H.; Ye, Y.; Li, L.-H.; Zhan, C.-G.; Yang, W.-C.; Yang, G.-F. Rational Redesign of Enzyme via the Combination of Quantum Mechanics/Molecular Mechanics, Molecular Dynamics, and Structural Biology Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (38), 15674–15687. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c06227>.
- (11) Rigoldi, F.; Gautieri, A.; Dalle Vedove, A.; Lucarelli, A. P.; Vesentini, S.; Parisini, E. Crystal Structure of the Deglycating Enzyme Amadoriase I in Its Free Form and Substrate-Bound Complex. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2016**, *84* (6), 744–758. <https://doi.org/10.1002/prot.25015>.
- (12) Ogawa, N.; Kimura, T.; Umehara, F.; Katayama, Y.; Nagai, G.; Suzuki, K.; Aisaka, K.; Maruyama, Y.; Itoh, T.; Hashimoto, W.; Murata, K.; Ichimura, M. Creation of Haemoglobin A1c Direct Oxidase from Fructosyl Peptide Oxidase by Combined Structure-Based Site Specific Mutagenesis and Random Mutagenesis. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 942. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37806-x>.
- (13) Rahmatabadi, S. S.; Bashiri, H.; Soleymani, B. A Comprehensive Review on Fructosyl Peptide Oxidase as an Important Enzyme for Present Hemoglobin A1c Assays. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2025**, *72* (1), 268–281. <https://doi.org/10.1002/bab.2647>.
- (14) Rescalli, A.; Varoni, E. M.; Cellesi, F.; Cerveri, P.; Rescalli, A.; Varoni, E. M.; Cellesi, F.; Cerveri, P. Analytical Challenges in Diabetes Management: Towards Glycated Albumin Point-of-Care Detection. *Biosensors* **2022**, *12* (9). <https://doi.org/10.3390/bios12090687>.
- (15) Yonehara, S.; Inamura, N.; Fukuda, M.; Sugiyama, K. Use of Fructosyl Peptide Oxidase for HbA1c Assay. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2015**, *9* (2), 200–205. <https://doi.org/10.1177/1932296815569573>.
- (16) *Rational backbone redesign of a fructosyl peptide oxidase to widen its active site access tunnel – Rigoldi – 2020 – Biotechnology and Bioengineering – Wiley Online Library.*

<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.27535> (accessed 2025-12-28).

- (17) Ferri, S.; Kim, S.; Tsugawa, W.; Sode, K. Review of Fructosyl Amino Acid Oxidase Engineering Research: A Glimpse into the Future of Hemoglobin A1c Biosensing. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2009**, *3* (3), 585–592. <https://doi.org/10.1177/193229680900300324>.
- (18) Rahmatabadi, S. S.; Bashiri, H.; Soleymani, B. A Comprehensive Review on Fructosyl Peptide Oxidase as an Important Enzyme for Present Hemoglobin A1c Assays. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2025**, *72* (1), 268–281. <https://doi.org/10.1002/bab.2647>.
- (19) Ferri, S.; Miyamoto, Y.; Sakaguchi-Mikami, A.; Tsugawa, W.; Sode, K. Engineering Fructosyl Peptide Oxidase to Improve Activity toward the Fructosyl Hexapeptide Standard for HbA1c Measurement. *Mol. Biotechnol.* **2013**, *54* (3), 939–943. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9644-2>.
- (20) Ogawa, N.; Kimura, T.; Umehara, F.; Katayama, Y.; Nagai, G.; Suzuki, K.; Aisaka, K.; Maruyama, Y.; Itoh, T.; Hashimoto, W.; Murata, K.; Ichimura, M. Creation of Haemoglobin A1c Direct Oxidase from Fructosyl Peptide Oxidase by Combined Structure-Based Site Specific Mutagenesis and Random Mutagenesis. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 942. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37806-x>.
- (21) Cid, R.; Bolívar, J.; Cid, R.; Bolívar, J. Platforms for Production of Protein-Based Vaccines: From Classical to Next-Generation Strategies. *Biomolecules* **2021**, *11* (8). <https://doi.org/10.3390/biom11081072>.
- (22) Pratama, F.; Linton, D.; Dixon, N. Genetic and Process Engineering Strategies for Enhanced Recombinant N-Glycoprotein Production in Bacteria. *Microb. Cell Factories* **2021**, *20* (1), 198. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01689-x>.
- (23) Nasiri, M.; Babaie, J.; Amiri, S.; Azimi, E.; Shamshiri, S.; Khalaj, V.; Golkar, M.; Fard-Esfahani, P. *SHuffle™ T7* Strain Is Capable of Producing High Amount of Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-1 (rhFGF-1) with Proper Physicochemical and Biological Properties. *J. Biotechnol.* **2017**, *259*, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.08.015>.
- (24) Young, C. L.; Britton, Z. T.; Robinson, A. S. Recombinant Protein Expression and Purification: A Comprehensive Review of Affinity Tags and Microbial Applications. *Biotechnol. J.* **2012**, *7* (5), 620–634. <https://doi.org/10.1002/biot.201100155>.
- (25) [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, 2000; Vol. 326, pp 245–254. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8).
- (26) Vedadi, M.; Arrowsmith, C. H.; Allali-Hassani, A.; Senisterra, G.; Wasney, G. A. Biophysical Characterization of Recombinant Proteins: A Key to Higher Structural Genomics Success. *J. Struct. Biol.* **2010**, *172* (1), 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.05.005>.
- (27) Circular Dichroism Spectroscopy for Protein Characterization: Biopharmaceutical Applications. In *Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals*; Elsevier, 2015; pp 109–137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59573-7.00006-3>.
- (28) Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. The Use of Differential Scanning Fluorimetry to Detect Ligand Interactions That Promote Protein Stability. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (9), 2212–2221. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.321>.
- (29) Rigoldi, F.; Donini, S.; Giacomina, F.; Sorana, F.; Redaelli, A.; Bandiera, T.; Parisini, E.; Gautieri, A. Thermal Stabilization of the Deglycating Enzyme Amadoriase I by Rational Design. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 3042. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19991-x>.
- (30) Rigoldi, F.; Donini, S.; Giacomina, F.; Sorana, F.; Redaelli, A.; Bandiera, T.; Parisini, E.; Gautieri, A. Thermal Stabilization of the Deglycating Enzyme Amadoriase I by Rational Design. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 3042. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19991-x>.
- (31) Rathore, I.; Mishra, V.; Bhaumik, P. Advancements in Macromolecular Crystallography: From Past to Present. *Emerg. Top. Life Sci.* **2021**, *5* (1), 127–149. <https://doi.org/10.1042/ETLS20200316>.
- (32) Helliwell, J. R. New Developments in Crystallography: Exploring Its Technology, Methods and Scope in the Molecular Biosciences. *Biosci. Rep.* **2017**, *37* (4), BSR20170204. <https://doi.org/10.1042/BSR20170204>.
- (33) *A Beginner's Guide to Protein Crystallography – Creative Biostructure*. <https://www.creative-biostructure.com/protein-crystallography-452.htm> (accessed 2025-12-28).

- (34) Qiu, J.; Chen, Y.; Zhang, L.; Wu, J.; Zeng, X.; Shi, X.; Liu, L.; Chen, J. A Comprehensive Review on Enzymatic Biodegradation of Polyethylene Terephthalate. *Environ. Res.* **2024**, *240*, 117427. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117427>.
- (35) Rosini, E.; Antonelli, N.; Molla, G. Rethinking Plastic Waste: Innovations in Enzymatic Breakdown of Oil-Based Polyesters and Bioplastics. *FEBS Open Bio* *n/a* (n/a). <https://doi.org/10.1002/2211-5463.70120>.
- (36) 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* (6278), 1196–1199. <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>.
- (37) Di Rocco, G.; Taunt, H. N.; Berto, M.; Jackson, H. O.; Piccinini, D.; Carletti, A.; Scurani, G.; Braidì, N.; Purton, S. A PETase Enzyme Synthesised in the Chloroplast of the Microalga *Chlamydomonas Reinhardtii* Is Active against Post-Consumer Plastics. *Sci. Rep.* **2023**, *13* (1), 10028. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37227-5>.
- (38) Tournier, V.; Duquesne, S.; Guillamot, F.; Cramail, H.; Taton, D.; Marty, A.; André, I. Enzymes' Power for Plastics Degradation. *Chem. Rev.* **2023**, *123* (9), 5612–5701. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00644>.
- (39) Han, X.; Liu, W.; Huang, J.-W.; Ma, J.; Zheng, Y.; Ko, T.-P.; Xu, L.; Cheng, Y.-S.; Chen, C.-C.; Guo, R.-T. Structural Insight into Catalytic Mechanism of PET Hydrolase. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 2106. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02255-z>.
- (40) Ahituv, N.; Freund, D.; Mireles, R.; Noda-García, L. The Diversity of PET Degrading Enzymes: A Systematic Review of Sequence, Structure, and Function. *Protein Sci.* **2025**, *34* (10), e70282. <https://doi.org/10.1002/pro.70282>.
- (41) Kawai, F.; Kawabata, T.; Oda, M. Current Knowledge on Enzymatic PET Degradation and Its Possible Application to Waste Stream Management and Other Fields. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103* (11), 4253–4268. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09717-y>.
- (42) Ermis, H. A Mini-Review on the Role of PETase in Polyethylene Terephthalate Degradation. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2025**, *24* (3), 545–555. <https://doi.org/10.1007/s11157-025-09737-3>.
- (43) Barclay, A.; Acharya, K. R.; Barclay, A.; Acharya, K. R. Engineering Plastic Eating Enzymes Using Structural Biology. *Biomolecules* **2023**, *13* (9). <https://doi.org/10.3390/biom13091407>.
- (44) Jerves, C.; Neves, R. P. P.; Ramos, M. J.; da Silva, S.; Fernandes, P. A. Reaction Mechanism of the PET Degrading Enzyme PETase Studied with DFT/MM Molecular Dynamics Simulations. *ACS Catal.* **2021**, *11* (18), 11626–11638. <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c03700>.
- (45) Arnal, G.; Anglade, J.; Gavalda, S.; Tournier, V.; Chabot, N.; Bornscheuer, U. T.; Weber, G.; Marty, A. Assessment of Four Engineered PET Degrading Enzymes Considering Large-Scale Industrial Applications. *ACS Catal.* **2023**, *13* (20), 13156–13166. <https://doi.org/10.1021/acscatal.3c02922>.
- (46) Tournier, V.; Topham, C. M.; Gilles, A.; David, B.; Folgoas, C.; Moya-Leclair, E.; Kamionka, E.; Desrousseaux, M.-L.; Texier, H.; Gavalda, S.; Cot, M.; Guémard, E.; Dalibey, M.; Nomme, J.; Cioci, G.; Barbe, S.; Chateau, M.; André, I.; Duquesne, S.; Marty, A. An Engineered PET Depolymerase to Break down and Recycle Plastic Bottles. *Nature* **2020**, *580* (7802), 216–219. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>.
- (47) Wang, H.; Cun, Y.; Wang, M.; Du, X.; Yang, Z.; Wang, H.; Zhang, J.; Wang, P.; Feng, Y.; Zhu, Y. Computational Loop Reconstruction Based Design of Efficient PET Hydrolases. *Commun. Biol.* **2025**, *8* (1), 934. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-08364-6>.
- (48) Der, B. S.; Kluwe, C.; Miklos, A. E.; Jacak, R.; Lyskov, S.; Gray, J. J.; Georgiou, G.; Ellington, A. D.; Kuhlman, B. Alternative Computational Protocols for Supercharging Protein Surfaces for Reversible Unfolding and Retention of Stability. *PloS One* **2013**, *8* (5), e64363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064363>.
- (49) Goldenzweig, A.; Goldsmith, M.; Hill, S. E.; Gertman, O.; Laurino, P.; Ashani, Y.; Dym, O.; Unger, T.; Albeck, S.; Prilusky, J.; Lieberman, R. L.; Aharoni, A.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Tawfik, D. S.; Fleishman, S. J. Automated Structure- and Sequence-Based Design of Proteins for High Bacterial Expression and Stability. *Mol. Cell* **2016**, *63* (2), 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.012>.

- (50) Huang, D.; Zhang, L.; Sun, Y. Rational Design of Disulfide Bridges in BbPETaseCD for Enhancing the Enzymatic Performance in PET Degradation. *Molecules* **2023**, *28* (8), 3528. <https://doi.org/10.3390/molecules28083528>.
- (51) *ESPrIPT 3*. ESPrIPT 3. <https://espript.ibcp.fr/ESPrIPT/ESPrIPT/> (accessed 2026-01-05).
- (52) Burgin, T.; Pollard, B. C.; Knott, B. C.; Mayes, H. B.; Crowley, M. F.; McGeehan, J. E.; Beckham, G. T.; Woodcock, H. L. The Reaction Mechanism of the Ideonella Sakaiensis PETase Enzyme. *Commun. Chem.* **2024**, *7* (1), 65. <https://doi.org/10.1038/s42004-024-01154-x>.
- (53) Liu, Z.; Schey, K. L. Optimization of a MALDI TOF-TOF Mass Spectrometer for Intact Protein Analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16* (4), 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.12.018>.
- (54) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G. W.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. Overview of the CCP4 Suite and Current Developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67* (Pt 4), 235–242. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>.
- (55) Murshudov, G. N.; Skubák, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A. REFMAC5 for the Refinement of Macromolecular Crystal Structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67* (Pt 4), 355–367. <https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>.



**Shapla Bhattacharya** dzimusi 1997. gadā Indijā. *Banasthali Vidyapith* (Indija) ieguvusi bakalaura (2019) un maģistra (2021) grādu biotehnoloģijā, absolvējot studijas ar zelta medaļu. Kopš 2021. gada novembra strādājusi Latvijas Organiskās sintēzes institūtā, kas pēc tā reorganizācijas 2026. gada 31. maijā iekļāvās Nacionālajā pētniecības un inovāciju institūtā (*NIRI*; Latvija). Viņas pētījumi ir snieguši ieguldījumu plastmasu noārdošu enzīmu inženierijā un uzlabotu *FPOX* variantu izstrādē diabēta diagnostikai. Ir sešu recenzētu publikāciju autore, devusi ieguldījumu divu patentu izstrādē un saņēmusi apbalvojumus par izciliem stenda ziņojumiem "*BioDrug*" konferencē, *EMBO* semināros un *FEBS* konferencē. Zinātniskās intereses ietver proteīnu inženieriju, strukturālo bioloģiju, proteīnu biofiziku, enzīmu tehnoloģijas, kā arī ilgtspējīgu un biomedicīnisku biotehnoloģisko risinājumu izstrādi.

**Shapla Bhattacharya** was born in 1997 in India. She obtained her Bachelor's degree in Biotechnology (2019) and her Master's degree in Biotechnology (2021), graduating as a Gold Medalist, from Banasthali Vidyapith, India. Since November 2021, she worked at the Latvian Institute of Organic Synthesis, which became part of the National Institute of Research and Innovation (*NIRI*), Latvia, following its establishment on May 31, 2026. Her research has contributed to the engineering of plastic-degrading enzymes and the development of improved *FPOX* variants for diabetes diagnostics. She has authored six peer-reviewed publications, contributed to two patents, and received Outstanding Poster Awards at the *BioDrug* Conference, *EMBO* workshops, and the *FEBS* conference. Her research interests include protein engineering, structural biology, protein biophysics, enzyme technology, and the development of sustainable and biomedical biotechnological solutions.