

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

## **Endo-levanaas BT1760: hüpoteetilise CBM-motiivi rolli uurimine**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Emma Johanna Sova

Juhendajad dots Tiina Alamäe, bioloogiakandidaat

Karin Ernits, MSc

TARTU 2018

# INFOLEHT

## **Endo-levanaas BT1760: hüpoteetilise CBM-motiivi rolli uurimine**

Levaan on polüfruktaan, mis toimib inimese soolestikus prebiootiliselt. Selles polüsahhariidis on fruktoosi monomeeride vahel  $\beta$ -2,6-side, mida *Bacteroides thetaiotaomicron*'i genoomis kodeeritud endo-levanaas BT1760 hüdrolüüsib, lõigates polümeeri ahela oligomeerideks. Valk BT1760 koosneb N-terminaalsest katalüütilisest domeenist ning C-terminaalsest  $\beta$ -sandwich domeenist. C-terminaalne  $\beta$ -sandwich domeen on glükosiidi hüdrolaasidel sageli vajalik süsivesikutega seondumiseks ning sel juhul nimetatakse neid motiive süsivesikuga seonduvateks domeenideks ehk CBM-deks (*Carbohydrate Binding Modules*). Käesolevas töös on uuritud endo-levanaas BT1760 C-terminaalse domeeni rolli kasutades metsiktüüpi valgust moodustatud mutantseid variante ning mõõtes nende substraadi hüdrolüüsamise aktiivsust ja levaanidega seondumise võimet.

Märksõnad: endo-levanaas, BT1760, CBM, *Bacteroides thetaiotaomicron*, levaan, inuliin, glükosiidi hüdrolaas

CERCS kood: P310 Proteiinid, ensümoloogia

## **Endo-levanase BT1760: investigating the role of hypothetical CBM motif**

Levan, a  $\beta$ -2,6 linked fructan is a polysaccharide that has prebiotic properties in the human gut. Endo-levanase BT1760 is a glycoside hydrolase, encoded by a gut commensial *Bacteroides thetaiotaomicron* in its fructan utilisation locus. BT1760 carries out random hydrolysis of levan polymer, producing fructooligosaccharides. The protein consists of N-terminal catalytic domain and C-terminal  $\beta$ -sandwich domain. It has been shown that the C-terminal  $\beta$ -sandwich module is often important for binding polymeric carbohydrates as substrates. Such domains are called Carbohydrate Binding Modules (CBM). In given thesis, the function of the C-terminal domain of endo-levanase BT1760 is studied by biochemical study of mutant variants of BT1760.

Keywords: endo-levanase, BT1760, CBM, *Bacteroides thetaiotaomicron*, levan, inulin, glycoside hydrolase

CERCS code: P310 Proteins, enzymology

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
1.1. <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> kui efektiivne polüsahhariidide lagundaja inimese sooles .....	6
1.1.1. Polüsahhariidide kasutamise lookused (PUL) <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 'i genoomis .....	7
1.1.2. Levaani lagundamine <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 'il ja vastav genoomne lookus .....	9
1.2. Mikroorganismide endo- ja eksolevanaasid.....	11
1.2.1. CBM-moodulid polüsahhariide lagundavates valkudes .....	15
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	17
2.1. Töö eesmärgid .....	17
2.2. Materjal ja meetoodika .....	17
2.2.1. Töös kasutatud endo-levanaasi variandid ning levaanid .....	17
2.2.2. Endo-levanaasi BT1760 variantide ekspressioon .....	21
2.2.3. Endo-levanaasi variantide katalüütilise aktiivsuse määramine .....	22
2.2.4. Endo-levanaasi seostumine fruktaanidega natiivses geelis elektroforeesil.....	22
2.2.5. Endolevanaasi variandi CBM66-BT1760 aktiivsuse mõõtmised .....	23
2.3. Tulemused ja arutelu.....	24
2.3.1. BT1760 valgu mutantsed variandid.....	25
2.3.2. Metsiktüüpi ja mutantsete endo-levanaaside iseloomustamine.....	26
2.3.3. BT1760 C-terminaalse domeeni roll .....	37
KOKKUVÕTE.....	39
RESUME .....	40
TÄNUSÕNAD .....	42
KASUTATUD KIRJANDUS.....	43
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	48
LIHTLITSENTS .....	49

## KASUTATUD LÜHENDID

ah – aminohape

CBM – süsivesikuga seonduv moodul (*Carbohydrate Binding Module*)

dH<sub>2</sub>O – destilleeritud vesi

DNSA – 3,5-dinitrosalitsüülhape

PA – polümeerisatsiooniaste

FOS – fruktooligosahhariid

GH – glükosiidi hüdrolaas

k<sub>cat</sub> – katalüütiline konstant

kDa – kilodalton

K<sub>m</sub> – Michaelis'e konstant

LB – Luria-Bertani (sööde)

OD – optiline tihedus (*optical density*)

PAA-geel – polüakrüülamiidgeel

PDB – *Protein Data Bank*, valgustruktuuride andmebaas

PUL – polüsahhariidi kasutamise lookus e klaster (*Polysaccharide Utilization Loci*)

SDS – naatrium-dodetsüülsulfaat (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

TAE – Tris-atsetaat-EDTA

TLC – õhukese kihi kromatograafia (*Thin Layer Chromatography*)

## SISSEJUHATUS

Jämesoolt koloniseerivad bakterid on inimese jaoks väga olulised, kuna lagundavad polüsahhariide, mille seedimiseks vajalikke ensüüme inimese genoomis ei kodeerita, tootes lühikese ahelaga rasvhappeid, millel on inimese tervisele soodne toime. Neid polüsahhariide, soolestiku tervisliku seisundi ja talitlemise jaoks hädavajalikke ühendeid nimetatakse ka kiudaineteks. Kiudained koosnevad peamiselt glükoosi ja/või fruktoosi monomeeridest ühendatuna mitmete eritüüpi glükosiidsidemetega.

Üks levinud inimese soolestiku kkommensaalne polüsahhariide lagundav bakter on *Bacteroides thetaiotaomicron*. Selle bakteri genoomis on lookused, milles kodeeritakse polüsahhariidide kasutamiseks vajalikke valke, nende seas ka käesolevas töös uuritud endo-levanaasi BT1760. Antud valgul on omadus lagundada levaani –  $\beta$ -2,6-sidemetega polüfruktaani, mida toodavad peamiselt bakterid biofilmi moodustamiseks, kuid mida leidub ka osades taimedes, eriti kõrrelistes. Arvatakse, et levaan võiks sarnaselt rohkem uuritud ning laialdaselt kasutust leidnud inuliinile mõjuda inimesele kasulikult, olles jämesoolebakteritele prebiootilise toimega.

Käesolevas töös uuritud valk BT1760 kuulub glükosiidi hüdrolaaside perekonda 32. Hüpoteetiliselt koosneb ensüüm N-terminaalsest katalüütilisest domeenist ja C-terminaalsest  $\beta$ -sandwich struktuuriga domeenist, mille funktsioon pole teada. Sarnase ehitusega on ka teised sellesse perekonda kuuluvad valgud, millest mitmete puhul on näidatud C-terminaalse mooduli vajalikkust substraadiga seondumiseks.

Antud bakalaureuse töö peamine eesmärk oli välja selgitada, kas endo-levanaasi BT1760 C-terminaalse tundmatu funktsiooniga domeeni roll võiks olla levaani sidumine ehk kas see domeen on valgu süsivesikuga seonduv moodul. Selleks konstrueeriti algsest BT1760 valgust erinevad variandid, uuriti nende katalüütilist aktiivsust ja seondumisvõimet levaanidega ning võrreldi metsiktüüpi valguga.

Töö tehti Eesti Teadusagentuuri projekti PUT1050 raames ja vahenditega.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. *Bacteroides thetaiotaomicron* kui efektiivne polüsahhariidide lagundaja inimese sooles

On teada, et bakterid koloniseerivad inimese seedesüsteemi juba sünnihetkest ning täiskasvanud inimese sooles sisalduv mikroorganismide biomass on ligikaudu 1,5 kg. Inimesel aitab see „lisaorgan“ läbi viia metaboolseid protsesse, mille jaoks inimesel endal ensüümid puuduvad, näiteks lagundada toidus sisalduvaid kiudaineid, toota vitamiine ja muid vajalikke ühendeid (nt butüraati). Lisaks mängib see ka rolli immuunsüsteemi kujunemisel (Xu & Gordon, 2003). Arvukaimad bakterite hõimkonnad inimese sooles on *Firmicutes* ja *Bacteroidetes* (Gill *et al.*, 2006). Viimase jämesooles esindatuim perekond on *Bacteroides*, kuhu kuulub ka *Bacteroides thetaiotaomicron* (*Bt*), kelle endo-levanaasi käesolevas töös uuriti. *Bt* on Gram-negatiivne anaeroob, kes on levinud kommensaal jämesooles (Moore & Holdeman, 1974). Bakteri teeb eriliseks tema võime kasutada väga paljusid polüsahhariide (kiudaineid) süsiniku- ja energiaallikana, mis võivad pärineda nii inimese toidust (taimsed polüsahhariidid), soolelimast kui ka teiste soolebakterite polüsahhariidsetest kapslitest (Salyers *et al.*, 1977). Polüsahhariidide kasutamiseks on *Bt*-l suur hulk gene, näiteks kodeeritakse tema genoomis 263 glükosiidi hüdrolaasi (GH), mida on rohkem kui paljudel teistel soolebakteritel (Tabel 1) (Flint *et al.*, 2012). Suur hulk neist ensüümidest on rakuvälised või seotud raku välismembraaniga. *Bt* suudab paindlikult reguleerida geeniekspressiooni, et reageerida muutustele, nt teatud toitainete olemasolule keskkonnas (Xu, Bjursell, *et al.*, 2003).

**Tabel 1. Genoomilt ennustatud glükosiidi hüdrolaaside (GH) arv erinevatel soolebakteritel.** Tabeli koostamisel kasutati andmeid artiklist Flint *et al.* (2012)

Hõimkond	Liik	Genoomilt ennustatud GHde arv
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI 5482	263
	<i>Bacteroides xylanisolvens</i> XB1A	224
	<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	177
	<i>Bacteroides fragilis</i> 638R	138
<i>Firmicutes</i>	<i>Roseburia intestinalis</i> XB6B4	115
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> 16/4	75
	<i>Ruminococcus champanellensis</i> 18P13	54
<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	54

Inimesel puuduvad taimsete polüsahhariidide (välja arvatud tärklise) lagundamiseks vajalikud ensüümid. Selle töö teevad ära soolebakterid, tänu kellele saame 10-15% toidust pärinevast energiast (Schwalm & Groisman, 2017; Xu, Bjursell, *et al.*, 2003). Siiski ei ole kõik soolestikus elavad bakterid võimelised hüdrolüüsima kõiki sinna jõudvaid kiudaineid. Nii suudavad *Bacteroidetes* hõimkonda kuuluvad liigid lagundada laia valikut polümeerseid suhkruid ning *Firmicutes* esindajad on rohkem spetsialiseerunud mõnele kindlale polüsahhariidile (Cockburn & Koropatkin, 2016). Ka varieeruvad bakterite võimekused erineva pikkusega polüsahhariide kasutamises. Näiteks eelistavad bifidobakterid lühemaid fruktooligosahhariide pika ahelaga inuliinile (Roberfroid *et al.*, 1998). Paljud jämesooles elavad bakterid suudavad küll kasutada lühikesi levaan-tüüpi FOS-e kuid mitte suure molekulmassiga pikki levaani polümeere (Marx *et al.*, 2000). Kuna sooles on väga suur bakterite mitmekesisus, siis moodustuvad mikroobide vahel toiduahelad. Mõnda kiudainet väljaspool rakku lagundav bakter saab varustada laguproduktidega (oligosahhariididega) teisi soolebaktereid, kes polümeeri ei hüdrolüüsi, kuid oligosahhariide kasutada suudavad (Flint *et al.*, 2012). Seetõttu on *Bt* oluline kogu soolekoosluse seisukohalt – ta on väga hea adapteerumisvõimega ja suudab lagundada paljusid erinevaid polüsahhariide, nt ramnogalakturonaani, amüloosi, amülopektiini, pullulaani, dekstraani, polügalaktouronaati, pektiini, hüaluronaati, hepariini, kondroitiinsulfaati ja levaani (Ndeh *et al.*, 2017; Salyers *et al.*, 1977).

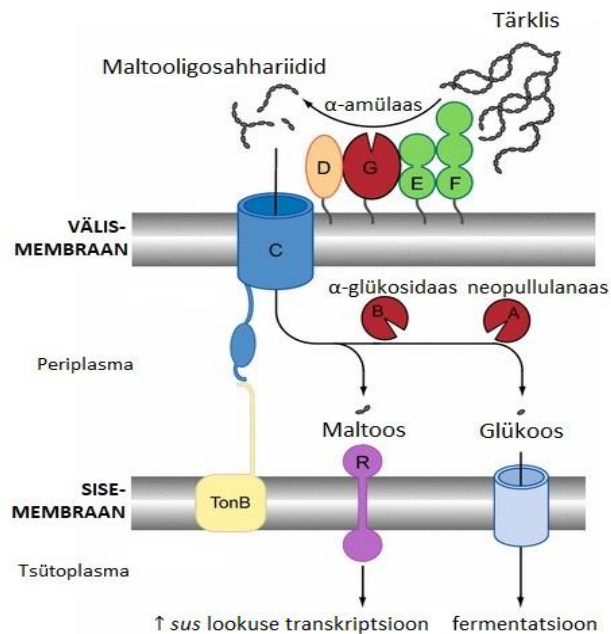
### **1.1.1. Polüsahhariidide kasutamise lookused (PUL) *Bacteroides* *thetaitaomicron*'i genoomis**

Polüsahhariidide tõhusaks kasutamiseks on *Bacteroidetes* hõimkonna liikidel evolutsiooni käigus moodustunud spetsiaalsed valgusüsteemid (Foley *et al.*, 2016), mida kodeerivad vastavad polüsahhariidide kasutamise lookused (PUL – *Polysaccharide Utilisation Loci*) (Martens *et al.*, 2008). PUL-id on polüsahhariidi-spetsiifilised, kuid kodeerivad kõik sarnase funktsiooniga komponente, mis on vajalikud polüsahhariidi sidumiseks raku pinnale, selle tükeldamiseks väiksemateks fragmentideks ja viimaste transpordiks periplasmasse (Schwalm *et al.*, 2017).

*Bacteroides thetaiotaomicron*'i genoomis on tuvastatud 88 PUL-i, mis kokku moodustavad 18% tema genoomist. Neist ligi pooled on ilmselt vajalikud peremehe soolelima suhkrute

kasutamiseks ning ülejäänud jämesoolde jõudvate kiudainete lagundamiseks (Martens *et al.*, 2008).

Kõikide *Bt* PUL-de prototüübiks peetakse *Sus* (*Starch utilisation system*) lookust (Anderson & Salyers, 1989a; 1989b). *Sus* lookuses on kaheksa geeni (*susRABCDEFG*), mis kodeerivad tärklise kasutamiseks vajalikke valke. Tärklise sidumiseks on välismembraanil kolm lipovalku: SusD, SusE ja SusF (Reeves *et al.*, 1997) (Joonis 1). Kui kahel viimasel (SusE ja SusF) on olemas polüsahhariidi siduvad CBM-moodulid (CBM – *Carbohydrate Binding Modules*) (Cameron *et al.*, 2012), siis SusD valgul need puuduvad (Koropatkin *et al.*, 2008). Tärklise lagundamise eest hoolitsevad SusG, SusA ja SusB. SusG on raku välismembraanil paiknev lipovalk  $\alpha$ -amülaas, mis varasematel andmetel (Shipman *et al.*, 1999) iseseisvalt tärklist ei seo. Valgu teeb omapäraseks selle struktuur: muidu tüüpilisele GH13 rühma valgule on lisandunud B-domeeni keskosas kodeeritav moodul CBM58, mis ulatub valgust välja (Koropatkin & Smith, 2009). Erinevalt SusG-st ei ole SusA ja SusB rakuvälised, vaid asuvad periplasmas. SusA on  $\alpha$ -glükosidaas ning SusB neopullulanaas. Mõlemad lagundavad periplasmas edasi tärklise laguprodukte – SusG poolt toodetud oligosahhariide. Oligosahhariidide aktiivseks transpordiks periplasmasse kodeeritakse *Sus* operonis TonB-seoseline poriin SusC (D'Elia & Salyers, 1996). Kogu *Sus* klatri reguleerimise eest vastutab *susR* geen, mille transkriptsiooni vallandab maltoos ning seejärel indutseerib SusR kõigi selles lookuses kodeeritavate geenide ekspressiooni. SusR valgu asemel võivad PUL-ides olla kodeeritud ka teistsugused regulaatorid, mis täidavad sama rolli (Schwalm *et al.*, 2017). *susC* ja *susD* geenide homoloogid on olemas kõikides *Bacteroidetes* bakterite PUL-ides, mis näitab nende vajalikkust polüsahhariidide kasutamiseks (Foley *et al.*, 2016).

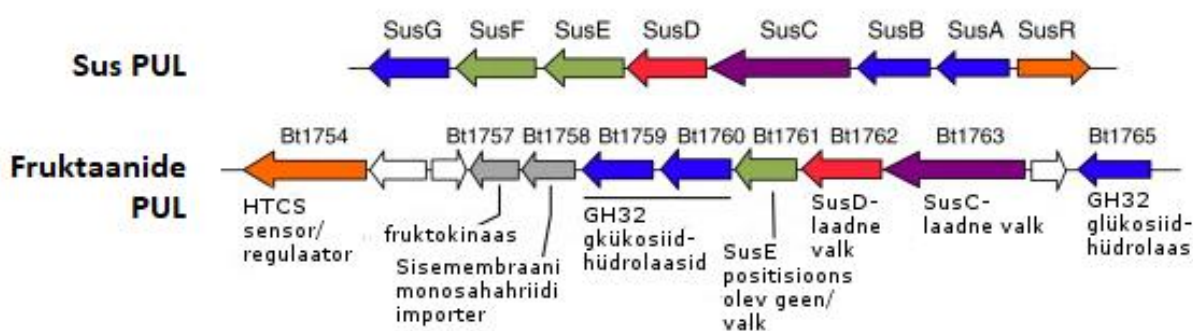


**Joonis 1. *Bacteroides thetaiotaomicron*'i Sus-süsteem.** Joonisel on kujutatud *Bt* Sus süsteemi valgud (tähed A-G ja R, vastavalt valgud SusABCDER), nende paiknemine rakus ning tärklise lagundamine nende valkude poolt. Joonis pärineb artiklist Foley *et al.* (2016), täiendatud eestikeelsete tähistustega.

### 1.1.2. Levaani lagundamine *Bacteroides thetaiotaomicron*'il ja vastav genoomne lookus

*B. thetaiotaomicron*'t eristab paljudest teistest soolebakteritest tema võime lagundada levaani ( $\beta$ -2,6-sidemetega fruktaan) ja levaan-tüüpi fruktooligosahhariide (FOS), mille metaboliseerimise tagajärrel eralduvad käärimisproduktidena atsetaat, propionaat ja suksinaat (Adamberg *et al.*, 2014). Levaani leidub mõningates taimedes, näiteks põldtimutis (*Phleum pratense*), kus ta on varupolüsahhariidiks ja kaitseks ebasoodsate keskkonnatingimuste (nt külma) eest (Tamura *et al.*, 2009). Bakteritel on levaan vajalik varuainena, biofilmi moodustamiseks ning ka virulentsusfaktoriks taimede koloniseerimisel (Velázquez-Hernández *et al.*, 2009).

Aastal 2010 kirjeldati PUL, milles kodeeritavad valgud võimaldavad *Bt*-l levaani lagundada (Sonnenburg *et al.*, 2010). See PUL sisaldab üheksat fruktaani metabolismiga seotud geeni: *BT1763* ja *BT1762*, mis on homoloogilised *Sus*-süsteemi *susC* ja *susD*-ga (vastavalt transportporiin ning polüsahhariidi siduv lipovalk); *SusE* positsioonis olev valk *BT1761*; kolm glükosiidi hüdrolaasi (*BT1759*, *BT1760*, *BT1765*); sensor-regulaator *BT1754*; fruktokinaas (*BT1757*) ja sisemembraanis olev monosahhariidi permeaas (*BT1758*). Kahel viimasel puuduvad vastavad homoloogid *sus* lookuses. Fruktaani PUL-i sensor-regulaator tunneb periplasmas ära fruktoosi ja aktiveerib operoni transkriptsiooni (Sonnenburg *et al.*, 2010). Fruktaanide lagundamise PUL-i kirjeldavad Joonis 2 ja Tabel 2.



**Joonis 2. Fruktaanide kasutamise PUL võrrelduna *Sus* PUL-ga.** Sarnase funktsiooniga geenid on tähistatud sama värviga ning joonist on täiendatud eestikeelsete tähistustega (Sonnenburg *et al.*, 2010)

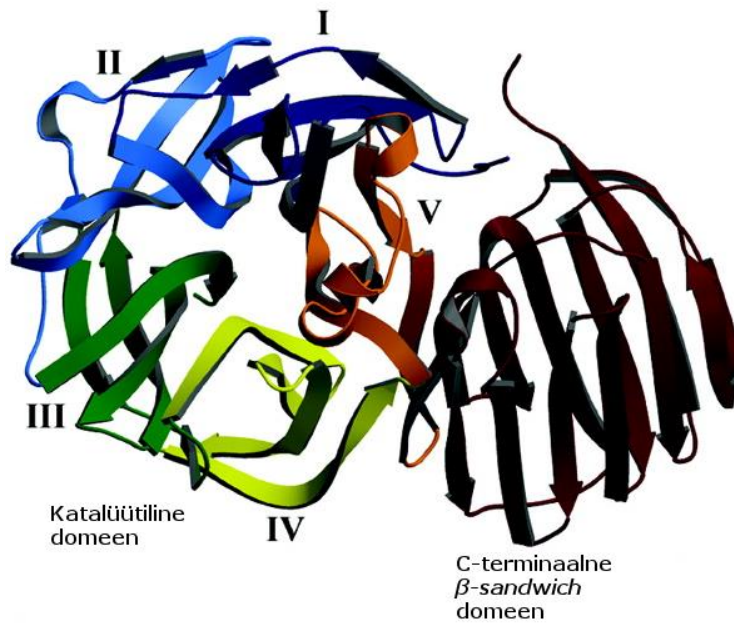
**Tabel 2. Fruktaani PUL-i geenid/valgud ja neile vastavad *Sus* lookuse homoloogid**

ORF	Valk	Funktsionaalne homoloog <i>Sus</i> lookuses	Paiknemine raku
BT1754	Sensor/regulaator	<i>SusR</i>	Tsütoplasma membraanis
BT1757	Fruktokinaas	–	Tsütoplasmas
BT1758	Monosahhariidi permeaas	–	Tsütoplasma membraanis
BT1759	Ekso-fruktanaas	<i>SusB</i> ( $\alpha$ -glükosidaas)	Periplasmas
BT1760	Endo-levanaas	<i>SusG</i> ( $\alpha$ -amülaas)	Välismembraani pinnal
BT1761	Levaani siduv lipovalk	<i>SusE</i> ja <i>SusF</i> (tärglist siduvad lipovalgud)	Välismembraani pinnal
BT1762	Levaani siduv lipovalk	<i>SusD</i> (tärglist siduv lipovalk)	Välismembraani pinnal
BT1763	Transportporiin	<i>SusC</i>	Välismembraanis
BT1765	Ekso-fruktanaas	–	Tsütoplasmas



Kirjanduses on kirjeldatud mitmesuguseid mikroobseid levanaase, millest *Bacillus subtilis*'e omad on ühed enimuuritud. See bakter omab ekstratsellulaarset endo-levanaasi LevB, mis lagundab bakteriaalseid ja ka taimseid levaane (Jensen *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2001) ning ekso-aktiivsusega  $\beta$ -fruktosidaasi SacC, mis suudab lisaks levaanile lagundada ka inuliini ja sahharoosi (Wanker *et al.*, 1995). *Bacillus licheniformis*'e endo-levanaas LevB1 moodustas levaanidest fruktooligosahhariide pikkusega PA2-8, kusjuures pikaajalisel reaktsioonil oli põhiproduktiks levaanbioos (PA2) (Porrás-Domínguez *et al.*, 2014). Mäletsejate vatsas elaval *Treponema zioleckii* tüvel kT on kaks endo-levanaasi, millest üks on rakuväline ensüüm. Lisaks on sel bakteril veel  $\beta$ -fruktofuranosidaas, mis suudab lagundada levaan-tüüpi FOS-e nende otstest ekso-aktiivsusega (Kasperowicz *et al.*, 2010). Leidub ka levanaase, mis käituvad ekso-ensüümina, kuid produktiks on fruktoosi asemel levaanbioos. Sellised on näiteks *Streptomyces exfoliatus*'e 2,6- $\beta$ -D-fruktaan 6-levaanbiohüdrolaas (Saito *et al.*, 2006) ja *Microbacterium levaniformans*'i levaanbiohüdrolaas LevM (Song *et al.*, 2002).

Levanaasid kuuluvad glükosiidi hüdrolaaside perekonda 32 (GH32) koos invertaaside (EC 3.2.1.26), endo-inulinaaside (EC 3.2.1.7), ekso-inulinaaside (EC 3.2.1.80) ja teiste fruktaanide lagundamisele spetsialiseerunud ensüümidega. Nad on kõik sarnase ehitusega: N-terminaalse osa moodustab 5-labaline  $\beta$ -propeller struktuur ja C-terminaalses otsas on  $\beta$ -sandwich motiiv ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)). Joonisel 3 on kujutatud *Thermotoga maritima* invertaasi struktuur. Invertaas hüdrolüüsib ekso-aktiivsusega  $\beta$ -fruktaanide otsmisi fruktoosijäake.



**Joonis 3. *Thermotoga maritima* invertaasi ehitus.** Numbritega I-V on tähistatud katalüütilise domeeni  $\beta$ -propeller labad (oranž, sinine, roheline). C-terminaalne domeen on kujutatud tumepunasega (Alberto *et al.*, 2004).

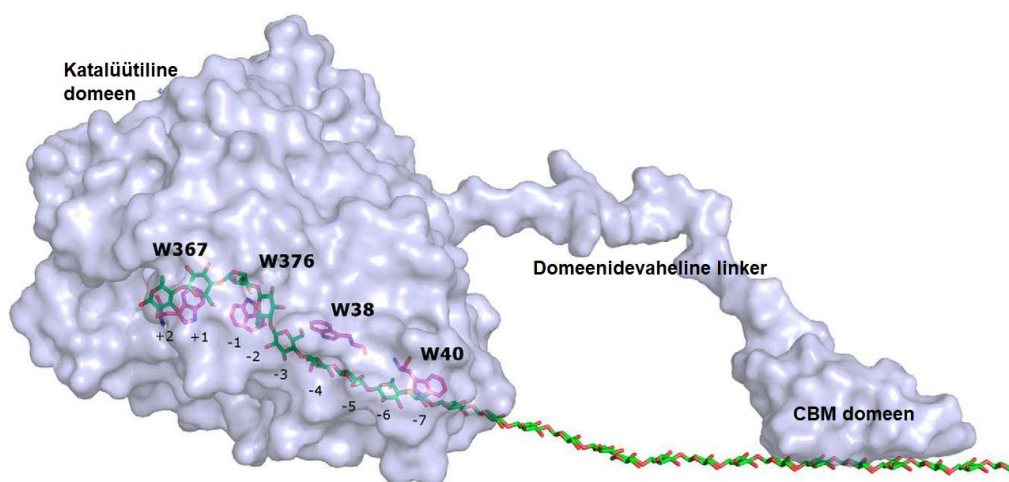
C-terminaasel  $\beta$ -*sandwich* domeenil võib olla erinevaid funktsioone. *T. maritima* invertaasi puhul on selleks välja pakutud valgu stabiliseerimise roll. Kuna on tegu termofiilse bakteriga, siis peaksid selle bakteri valgud taluma kõrget temperatuuri. Autorid väidavad, et kuigi sellel domeenil võis eellasvalgus eellases olla mingi muu funktsioon (nt valgumolekulide oligomeriseerumise vahendamine või substraadi sidumine), on domeen alles jäänud, sest stabiliseerib valku (Alberto *et al.*, 2004). On tõestatud ka C-terminaalse  $\beta$ -*sandwich* domeeni vajalikkust valgu oligomeeride moodustumiseks, seda näiteks pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* invertaasi puhul. Oligomeeride moodustamisega aitab C-terminaalne domeen määrata valgu substraadispetsiifilisust ning mõjutada hüdrofüütilist aktiivsust (Sainz-Polo *et al.*, 2013). *Arthrobacter ureafaciens*'i levaani fruktotransferaasil on nähtud substraadi seostumist mitte ainult katalüütilise domeeniga, vaid ka ka C-terminaalse  $\beta$ -*sandwich* domeeniga (Park *et al.*, 2012). Tabelis 3 on kirjeldatud fruktaanide lagundamisega seotud GH32 perekonna valke, mille struktuuri ja CBM-de funktsiooni on kas uuritud või ennustatud.

**Tabel 3. Glükosiidi hüdrolaaside perekonna 32 valgud, mille kristallstruktuur on lahendatud.** Kirjeldatud on lühidalt valgu ensümaatilist funktsiooni ning C-terminaalse mooduli (CBM) rolli.

Organism	Valgu nimetus	Valgu funktsioon	PDB kood	CBM-i tõestatud või hüpoteetiline funktsioon	Viide
<i>Bacillus subtilis</i>	Ekso-levanaas SacC (kristalliti ainult CBM)	Levaani ekso-hüdroolüüs	4B1L	Levaaniahela otsale seostumine CBM66 abil	Cuskin <i>et al.</i> (2012)
<i>Bifidobacterium longum</i>	$\beta$ -fruktofuranosidaas	Mitteredutseerivate otsmiste $\beta$ -fruktofuranosiidi jääkide hüdroolüüs	3PIG	Teadmata	Bujacz <i>et al.</i> (2011)
<i>Paenarthrobacter ureafaciens</i>	Levaani fruktotransferaas	Molekulisene fruktosüüljäägi ülekandmine, tsüklilise difruktoos-dianhüdriidi moodustamine	4FFF	Süsivesiku äratundmine ja seondumine	Park <i>et al.</i> (2012)
<i>Thermotoga maritima</i>	Invertaas ( $\beta$ -fruktanaas)	Sahharoosi, rafinoosi, inuliini ja levaani hüdroolüüs	1UYP	Valgu stabiilsuse tagamine	Alberto <i>et al.</i> (2004)
<i>Aspergillus awamori</i>	Ekso-inulaas	Inuliini, levaani, stafüloosi, rafinoosi ekso-hüdroolüüs	1Y4W	Teadmata	Kulminskaya <i>et al.</i> (2003)
<i>Aspergillus ficuum</i>	Endo-inulinaas	Inuliini endo-hüdroolüüs	3RWK	Teadmata	Pouyez <i>et al.</i> (2012)
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	Invertaas	$\beta$ -fruktofuranosiidide otsmine hüdroolüüs	3KF5	Aktiivsaiidi vormimine, substraad sidumine	Álvaro-Benito <i>et al.</i> (2010)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertaas	$\beta$ -fruktofuranosiidide otsmine hüdroolüüs	4EQV	Ensüümi dimeeride moodustamine, substraadispetsiifilisuse määramine	Sainz-Polo <i>et al.</i> (2013)

### 1.2.1. CBM-moodulid polüsahhariide lagundavates valkudes

Polüsahhariididel on elusorganismides palju erinevaid rolle. Neid kasutatakse energiaallikana, varuainetena, rakukesta tugimaterjalina jne. Kuna polüsahhariide on palju ja neil on väga varieeruv koostis ning struktuur, on elusorganismides ka palju nendega reageerivaid, neid modifitseerivaid või lagundavate ensüümide. Üheks võimaluseks, kuidas tagada kindla ensüümi reageerimine talle sobiva polüsahhariidiga on mittekatalüütiliste süsivesikutele seonduvate moodulite ehk CBM-ide kasutamine (Guillén *et al.*, 2010). CBM-id on defineeritud kui aminohappeline järjestus süsivesikut äratundvas ensüümis, mis voltub struktuuriliselt iseseisvaks üksuseks ning millel on polüsahhariidile seondumise võime, kuid mis iseseisvalt katalüütilist aktiivsust ei oma ([www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html](http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html)). Enim esineb süsivesikutele seonduvaid mooduleid glükosiidi hüdrolaaside ja transferaaside seas. CBM-id võivad paikneda katalüütilise domeeni suhtes erinevalt – olla nii N- kui C-terminaalses otsas, neid võib olla üks või mitu ning nad võivad paikneda grupiti või ühekaupa. CBM-id on ühendatud katalüütilise domeeniga linkeri abil (Guillén *et al.*, 2010). Esimesena kirjeldati sellised moodulid *Cellulomonas fimi* tsellulaasidel (Gilkes *et al.*, 1988) ja *Trichoderma reesei* tsellobiohüdrolaasidel (Peter *et al.*, 1988). Seetõttu kutsuti mooduleid alguses tselluloosi siduvateks domeenideks (*Cellulose Binding Domains – CBD*) (Boraston *et al.*, 2004). Joonisel 4 on näidatud *T. reesei* tsellobiohüdrolaasi TrCel7 seostumine tselluloosi ahelaga. CBM-i ja katalüütilise domeeni ühendab linker (Kari *et al.*, 2014).



**Joonis 4. *Trichoderma reesei* tsellobiohüdrolaasi TrCel7 ehitus.** Katalüütilise domeeni tunnelis on näidatud tselluloosi ahela seostumiseks olulised Trp-jäägid. Valk on kujutatud kompleksis tselluloosi ahelaga (Kari *et al.*, 2014).

CBM-domeenide peamine roll on spetsiifiliselt ära tunda ja seonduda kindla sahhariidiga ning seeläbi tõsta valguga katalüütilist efektiivsust. CBM võib (i) tuua katalüütilise domeeni substraadile lähemale, (ii) muuta polüsahhariidi struktuuri, tehes selle kergemini lagundatavaks, (iii) kinnitada valke raku pinnale. See kõik suurendab lahustumatute substraatide hüdrofüüsi. CBM-i eemaldamisega valgult langeb sageli ensüümi katalüütiline aktiivsus ning seostumisvõime lahustumatutele substraatidele, ent lahustuvate polüsahhariidide lagundamisele ei pruugi sellel mõju olla (Guillén *et al.*, 2010).

CBM-e jaotatakse rühmadesse kolmel erineval viisil: (i) aminohappelise järjestuse alusel, (ii) valguga seotumise põhjal ning (iii) substraadiga seondumise järgi. Aminohappelise järjestuse sarnasuse alusel eristatakse 83 perekonda CBM-e, mis on kantud ka CAZy andmebaasi ([www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html](http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html)). Sahhariidiga seondumise järgi jagunevad CBM-d kolmeks tüübiks. Tüüp A seondub planaarselt substraadi pinnale, tüüp B ehk endo-tüüp seondub polüsahhariidi ahela keskpaika ning tüüp C ehk ekso-tüüp seondub suhkru otsmise monomeeri külge. Eri tüüpidel on ka erineva struktuuriga seondumiskiirkond, vastavalt siis planaarne, soon või lõhe ja viimasel tasku (Gilbert *et al.*, 2013). Lisaks eristatakse CBM-de seas veel seitset erineva seotumisega valkude rühma, millest levinuim on  $\beta$ -sandwich struktuur. CBM-i substraadivalik ning afiinsus sõltub seondumiskiirkonna ning substraadi omavahelise topoloogia sobimisest ja aromaatsete aminohapete jääkide nagu trüptofaan ja türosiin asetusest CBM-is (Foley *et al.*, 2016; Guillén *et al.*, 2010).

Käesolevas töös uuritud endo-levanaasi mutantsetes variantides kasutati CBM66-e, mis on *Bacillus subtilis* ekso-levanaasi SacC C-terminaalne spetsiifiliselt levaani siduv moodul. CBM66 ei oma katalüütilist aktiivsust ning ekso-levanaas on ensümaatiliseltselt aktiivne ka selle moodulita, küll aga on aktiivsus siis suhteliselt madal. Samas, kui CBM66-moodul lisati mittespetsiifilisele  $\beta$ -fruktosidaasile, tõusis oluliselt selle afiinsus just levaanile. Mooduli kirstallstruktuur on teada – sarnaselt teiste GH32 perekonna C-terminaalsete domeenidega on see  $\beta$ -sandwich struktuuriga (Cuskin *et al.*, 2012).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Töö koostamiseks püstitati järgmised ülesanded:

1. Tutvuda kirjandusega, kus on kirjeldatud mikroobseid levanaase ning CBM-motiive polümeerseid suhkruid lagundavates valkudes.
2. Otsida kirjandusest ja andmebaasidest valke, millel on soolebakteri *Bacteroides thetaiotaomicron* endo-levanaasi BT1760 C-terminaalse domeeniga sarnane domeen.
3. Uurida BT1760 C-terminaalse domeeni rolli valgus, kasutades selleks Karin Ernitsa konstrueeritud BT1760 variante.
4. Mõõta valguga BT1760 variantide katalüütilist aktiivsust erinevat tüüpi levaanidel ja võrrelda tulemusi metsiktüüpi valguga saadud andmetega.
5. Hinnata erinevatel BT1760 variantidel levaanidest moodustuvate fruktooligosahharidide mustrit ja teket ajas.
6. Hinnata BT1760 seostumist levaanide ja inuliiniga valguga pidurdumise järgi polüsahhariidi sisaldavas natiivses geelis.

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. Töös kasutatud endo-levanaasi variandid ning levaanid

##### Endo-levanaasi variandid

Käesolevas töös kasutati uurimisobjektina Karin Ernitsa poolt geeni modifitseerimise abil konstrueeritud endo-levanaas BT1760 viite varianti (Tabel 4), mida võrreldi metsiktüüpi ensüümiga.

**Tabel 4. Käesolevas töös kasutatud endo-levanaas BT1760 variandid.**

Variant	Kirjeldus	Plasmiidi selgroog	Viide
BT1760	Metsiktüüpi BT1760 C-terminaalse His <sub>6</sub> järjestusega	pURI3-Cter	Mardo jt. 2017
BT1760ΔCBM	BT1760, millelt eemaldati CBM-motiiv	pET28a	Käesolev töö

BT1760ΔCBM-CBM66	BT1760, millelt eemaldati CBM-motiiv ja asendati <i>B. subtilis</i> CBM66-ga	pET28a	Käesolev töö
BT1760ΔCBM-LSL-CBM66	BT1760, millelt eemaldati CBM-motiiv ja asendati <i>B. subtilis</i> CBM66-ga, kahe domeeni vaheline originaallinker asendati LSL-linkeriga	pET28a	Käesolev töö
CBM66-BT1760	BT1760, mille N-terminaasesse otsa lisati <i>B. subtilis</i> CBM66	pET28a	Käesolev töö
CBM66-BT1760ΔCBM	BT1760, millelt eemaldati CBM-motiiv ning N-terminaalsesse otsa lisati <i>B. subtilis</i> CBM66	pET28a	Käesolev töö

Kõik BT1760 variandid kloneeriti pET28a vektorisse (Merck, Saksamaa). Valkude aminohappelised järjestused on esitatud Tabelis 5.

**Tabel 5. Endo-levanaasi BT1760 variantide aminohappelised järjestused.**

Rohelise värviga on tähistatud BT1760 katalüütiline domeen; punane värv on BT1760 originaallinker katalüütilise domeeni ja oletatava CBM-i vahel; sinine näitab BT1760 oletatavat CBM-i; lilla on *Bacillus subtilis*'e CBM66 ah järjestus; oranž tähistab LSL linkerit; kollane on C-terminaalne His<sub>6</sub>-järjestus; mustaga on tähistatud aminohapped, mis on lisandunud restriiktaasi lõikekohtade lisamisega geeni. Välja on toodud, mitmest aminohappest (ah) valk koosneb ning arvatud molekulmass (kDa). Molekulmassi arvutamiseks kasutati ExpASY kalkulaatorit ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)).

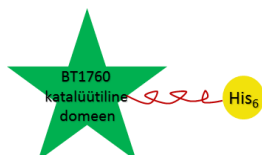
**1. BT1760 metsiktüüpi valk (508 ah; 57,7 kDa)**

DETDPILTQKNWDGTATYFQSSDEHGFSMYYPQVGVGDPMPFYDPVAKDFKVMYLQD  
YRPNPEATYHPIFGVATKDGATYESLGELISCGGRDEQDAAIGTGGTIYNPDKLYYTFYTG  
NKF KPSSDQNAQVVMVATSPDFKTWTKNRTFYLGKGDYGYDKNDFRDPFLFQTEDGVYH  
MLIATRKNKGKGHIAEFTSADLKEWESAGTFMTMMWDRFYECPDVFKMGDWWYLIYSEQ  
ASFMRKVQYFKGRTLEDLKATTANDAGIWPDNREGMLDSRAFYAGKTASDGTNRYIWG  
WCPTRAGNDNGNVGDVEPEWAGNLVAQRLIQHEDGTLTLGV**PDAIDRKY**TSAQEVKVM  
AKDGNMIESGKTYTLGEGASVIFNRLKVHNKISFTVKTASNTDRFGISFVRGTDSASWYSIH  
VNADEGKANFEKDGDDAKYLFDNKFNIPADNEYRVTIYSDQSVCVTYINDQLSFTNRIYQ  
MQKNPWSLCCYKGEITVSDVQVSTY**HHHHHH**



## 2. BT1760ΔCBM (354 ah; 40,5 kDa)

DETDPILTQKNWDGTATYFQSSDEHGFSMYYKPQVGFVGDPMFPYDPVAKDFKVMYLQD  
YRPNPEATYHPIFGVATKDGATYESLGELISCGGRDEQDAAIGTGGTIYNPADKLYYTFYTG  
NKFKPSSDQNAQVVMVATSPDFKTWTKNRTFYLGKGDYGYDKNDFRDPFLFQTEDGVYH  
MLIATRKNKGKGHIAEFTSADLKEWESAGTFMTMMWDRFYECPDVFKMGDWWYLIYSEQ  
ASFMRKVQYFKGRTLEDLKATTANDAGIWPDNREGMLDSRAFYAGKTASDGTNRYIWG  
WCPTRAGNDNGNVGDVEPEWAGNLVAQRLIQHEDGTLTLGV**PDAIDRKYTEHHHHHH**



## 3. BT1760ΔCBM-CBM66 (520 ah; 58,7 kDa)

DETDPILTQKNWDGTATYFQSSDEHGFSMYYKPQVGFVGDPMFPYDPVAKDFKVMYLQD  
YRPNPEATYHPIFGVATKDGATYESLGELISCGGRDEQDAAIGTGGTIYNPADKLYYTFYTG  
NKFKPSSDQNAQVVMVATSPDFKTWTKNRTFYLGKGDYGYDKNDFRDPFLFQTEDGVYH  
MLIATRKNKGKGHIAEFTSADLKEWESAGTFMTMMWDRFYECPDVFKMGDWWYLIYSEQ  
ASFMRKVQYFKGRTLEDLKATTANDAGIWPDNREGMLDSRAFYAGKTASDGTNRYIWG  
WCPTRAGNDNGNVGDVEPEWAGNLVAQRLIQHEDGTLTLGV**PDAIDRKYTEFGTTPFMS**  
NMTGWTTVNGTWADTIEGKQGRSDGDSFILSSASGSDFTYESDITIKDGNGRGAGALMFRS  
DKDAKNGYLANVDAKHDLVKFFKFENGAASVIAEYKTPIDVNKKYHLKTEAEGDRFKIYL  
DDRLVIDAHDVVFSEGFGLNVWDATAVFNQVTKES**LEHHHHHH**



## 4. BT1760ΔCBM-LSL-CBM66 (524 ah; 59,0 kDa)

DETDPILTQKNWDGTATYFQSSDEHGFSMYYKPQVGFVGDPMFPYDPVAKDFKVMYLQD  
YRPNPEATYHPIFGVATKDGATYESLGELISCGGRDEQDAAIGTGGTIYNPADKLYYTFYTG  
NKFKPSSDQNAQVVMVATSPDFKTWTKNRTFYLGKGDYGYDKNDFRDPFLFQTEDGVYH  
MLIATRKNKGKGHIAEFTSADLKEWESAGTFMTMMWDRFYECPDVFKMGDWWYLIYSEQ  
ASFMRKVQYFKGRTLEDLKATTANDAGIWPDNREGMLDSRAFYAGKTASDGTNRYIWG  
WCPTRAGNDNGNVGDVEPEWAGNLVAQRLIQHEDGTLTLGV**GSASSENLYFQGEFGTTP**  
FMSNMTGWTTVNGTWADTIEGKQGRSDGDSFILSSASGSDFTYESDITIKDGNGRGAGAL  
MFRSDKDAKNGYLANVDAKHDLVKFFKFENGAASVIAEYKTPIDVNKKYHLKTEAEGDR  
FKIYLDDRLVIDAHDVVFSEGFGLNVWDATAVFNQVTKES**LEHHHHHH**



5. **CBM66-BT1760** (669 ah; 75,5 kDa)

SNMTGWTTVNGTWADTIEGKQGRSDGDSFILSSASGSDFTYESDITIKDGNRGRGAGALMFR  
SDKDAKNGYLANVDAKHDLVKFFKFENGAASVIAEYKTPIDVNKKYHLKTEAEGDRFKIY  
LDDRLVIDAHDVSFSEGQFGLNVWDATAVFQNVTKESGSDETDPILTQKNWDGTATYFQS  
SDEHGFSMYYPQVGFVGDPMFPYDPVAKDFKVMYLQDYRPNPEATYHPIFGVATKDGA  
TYESLGELISCGGRDEQDAAIGTGGTIYNPADKLYYTFYTGKFKPSSDQNAQVVMVATSP  
DFKTWTKNRTFYLKGDYGYDKNDFRDPFLFQTEDGVYHMLIATRKNKGHIAEFTSADL  
KEWESAGTFMTMMWDRFYECPDVFKMGDWWYLIYSEQASFMRKVQYFKGRTLEDLKAT  
TANDAGIWPDNREGMLDSRAFYAGKTASDGTNRWIWGWCPTRAGNDNGNVGDVEPEWA  
GNLVAQRLIQHEDGTLTLGV**PDAIDRK**Y**TSAQ**EVK**VM**AKDGNMIESGKTYTLGEGASVIF  
NRLKVHNKISFTVKTASNTDRFGISFVRGTDASWYSIHVNADEGKANFEKDGDDAKYLF  
DNKFNIPADNEYRVTIYSDQSVCVTYINDQLSFTNRIMQKPNWSLCCYKGEITVSDVQV  
STYLE**HHHHHHH**



6. **CBM-BT1760ΔCBM** (514 ah; 58,0 kDa)

SNMTGWTTVNGTWADTIEGKQGRSDGDSFILSSASGSDFTYESDITIKDGNRGRGAGALMFR  
SDKDAKNGYLANVDAKHDLVKFFKFENGAASVIAEYKTPIDVNKKYHLKTEAEGDRFKIY  
LDDRLVIDAHDVSFSEGQFGLNVWDATAVFQNVTKESGSDETDPILTQKNWDGTATYFQS  
SDEHGFSMYYPQVGFVGDPMFPYDPVAKDFKVMYLQDYRPNPEATYHPIFGVATKDGA  
TYESLGELISCGGRDEQDAAIGTGGTIYNPADKLYYTFYTGKFKPSSDQNAQVVMVATSP  
DFKTWTKNRTFYLKGDYGYDKNDFRDPFLFQTEDGVYHMLIATRKNKGHIAEFTSADL  
KEWESAGTFMTMMWDRFYECPDVFKMGDWWYLIYSEQASFMRKVQYFKGRTLEDLKAT  
TANDAGIWPDNREGMLDSRAFYAGKTASDGTNRWIWGWCPTRAGNDNGNVGDVEPEWA  
GNLVAQRLIQHEDGTLTLGV**PDAIDRK**Y**TL**E**HHHHHHH**



## Levaanid

Katsetes kasutati endo-levanaasi substraatidena kuut erinevat levaani:

1. 1.2 M sahharoosist *Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasiga Lsc3 sünteesitud levaan (edaspidi Lsc3 Suc levaan)
2. 0.3 M rafinoosist *P. syringae* Lsc3 levaansukraasiga sünteesitud levaan (Lsc3 Raf levaan)
3. 1.2 M sahharoosist *P. syringae* mutantse levaansukraasiga Lsc3Asp300Asn (D300N) sünteesitud levaan (Lsc3D300N levaan)
4. *Zymomonas mobilis*'e 113S levaansukraasiga sahharoosist sünteesitud levaan (*Z. mobilis* levaan)
5. *Halomonas smyrnensis*'e levaansukraasiga sahharoosist sünteesitud levaan (*H. smyrnensis* levaan)
6. Põldtimutist (*Phleum pratense*) eraldatud levaan (timuti levaan) (Mardo *et al.*, 2017)

### **2.2.2. Endo-levanaasi BT1760 variantide ekspressioon**

Valkude ekspresserimiseks transformeeriti modifitseeritud BT1760 geeni sisaldav plasmiid kompetentsesse *Escherichia coli* BL21 (DE3) tüvesse (Studier & Moffatt, 1986). Selleks kasutati elektroporatsiooni meetodit (Gene Pulser Xcell Electroporation Systems, BIO-RAD, USA) ning saadud transformandid kasvatati üles kanamütsiini (Km; 50 µg/ml) sisaldavas LB (Luria-Bertani) söötmega agartassil (üleöö; 37°C). Üleöö kultuurid eelkasvatati LB vedelsöötmes (5 ml; 37°C; 150 rpm), mis sisaldas kanamütsiini 100 µl/ml. Saadud vedelkultuurist tehti 100 kordne lahjendus 200 ml LB-Km vedelsöötmesse (Km 100 µl/ml). Baktoreid kasvatati loksutil 37°C juures, 150 rpm kuniks OD<sub>580</sub> jäi vahemikku 0.4...0.6, lisati 0,5 mM IPTG (isopropüül-β-D-1-tiogalaktopüranosiid) indutseerimaks levanaasi ekspressiooni ning jäeti loksutile üleöö kasvama (22°C; 150 rpm). *E. coli* rakkude eraldamiseks söötimest kultuur tsentrifuugiti (10 min, 5000 rpm, 4°C) ning rakud külmutati temperatuuril -20°C.

Valgud puhastati rakulüsaadist IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) meetodil ÄKTaprime™ plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi) masinaga. Puhastamise teostas Karin Ernits. Edasistes katsetes on kasutatud erinevaid variante BT1760 valgust puhastatud kujul McIlvaine'i puhvril (pH 6.0) (Visnapuu *et al.*, 2011).

### 2.2.3. Endo-levanaasi variantide katalüütilise aktiivsuse määramine

Määramaks endo-levanaasi erinevate variantide ensümaatilist aktiivsust, mõõdeti reaktsioonis vabanenud redutseerivate suhkrute hulka 3,5-dinitrosalitsüülhappega (DNSA) (Miller, 1959). 1 ml või 800 µl inkubatsioonisegu sisaldas 0,5% levaani, McIlvaine'i puhvrit ning 50 µl puhastatud valgu sobivat lahjendust McIlvaine'i puhvris. Segu inkubeeriti lauatermostaadil (TDB-120, Dry Block Thermostat; Biosan, Läti) temperatuuril 37°C (maksimaalselt 144 tundi), võttes kindlatel ajapunktidel välja prooviks 200 µl, millele lisati 400 µl DNSA reagenti. Reaktsiooni seiskamiseks hoiti inkubatsioonisegu ja reagenti 5 minutit temperatuuril 100°C, jahutati jääl ja lisati 800 µl dH<sub>2</sub>O. Kontrollproovis asendati valk sama mahu McIlvaine'i puhvriga. Kõiki proove tehti vähemalt kahes korduses.

Redutseeritud suhkrute hulk mõõdeti spektrofotomeetriga (Ultrospec 3100 Pro UV/Visible Spectrophotometer; GE Healthcare Pharmacia Biotech, UK) lainepikkusel 540 nm. Masin kalibreeriti ainult reagenti ja puhvrit sisaldava segu vastu. Ensüümide eriaktiivsus väljendati reaktsioonis 1 minuti jooksul vabanenud redutseerivate suhkrute hulhana mikromoolides 1 mg valgu kohta (µmol/mg\*min ehk U/mg).

### 2.2.4. Endo-levanaasi seostumine fruktaanidega natiivses geelis elektroforeesil

Uuritavate endo-levanaasi variantide erinevatele levaandiele seondumisvõime hindamiseks voolutati valke natiivses polüakrüülamiidgeelis (PAA-geel). Selleks valmistati lahutavas osas (pH 8,3) 0,1% levaani või 0,1% daalia inuliini (Sigma-Aldrich, Saksamaa) sisaldavad 10% PAA-geelid. Konsentreerivale osale (4,8% PAA, pH 6,8) fruktaane ei lisatud. Võrdluseks valmistati ka fruktaane mittesisaldav geel. Geelidele kanti igat valku 5 µg, lahustatuna McIlvaine'i puhvris ja segatud 5 µl DNA värviga (DNA Loading Dye, Thermo Fischer, USA) (segu kogumaht 15 µl) ning voolutati 0,5x TBE (Tris-boraat-EDTA) puhvris (pH 8,3) 120V toatemperatuuril 2-2,5 tundi Mini-PROTEAN Tetra elektroforeessüsteemiga (BIO-RAD, USA). Geelid värviti Coomassie-blue G250 värviga ja seostumata värv eemaldati pesulahuses (äädikhape, metanool, dH<sub>2</sub>O vahekorras 7:5:88) hoidmisega. Valkude liikumise hindamiseks geelis kasutati võrdluseks valkude markerit Protein Ladder Blue Prestained (Naxo, Eesti). Katse koostamisel võeti aluseks meetodikad artiklites Xie *et al.* (2001) ja Cuskin *et al.* (2012).

## 2.2.5. Endolevanaasi variandi CBM66-BT1760 aktiivsuse mõõtmine

### Variandi CBM66-BT1760 reaktsioonikineetika määramine

Endo-levanaasi variandil CBM66-BT1760 määrati reaktsioonis erinevate levaanidega (Lsc3 Suc, Lsc3 Raf ja Lsc3D300N)  $K_m$  ja  $V_{max}$  (maksimaalne reaktsioonikiirus) väärtused, mõõtes redutseeriva suhkru vabanemise algkiirust. Selleks tehti reaktsioonisegud 0,5%-1,5% levaani sisaldusega ning reaktsioon käivitati 10  $\mu$ l ensüümilahuse (McIlvaine'i puhvris) lisamisega. Proovid võeti 1, 2 ja 3 minuti või 2, 4 ja 6 minuti järel, olenevalt valgust aktiivsusest antud substraadil ning redutseeriva suhkru sisaldus proovis määrati nagu kirjeldatud ülal. Kineetilised parameetrid leiti arvutiprogrammi SigmaPlot 2001 (Systat Software Inc., USA) abil, kasutades ensüümikineetika moodulit (Enzyme Kinetics Module 1.1) ja Michaelis-Menten'i ning Eadie-Hofstee' võrrandeid.

### Reaktsiooniproduktide spektri analüüs õhukese kihi kromatograafiaga

Metsiktüüpi endo-levanaasi BT1760 ja variandi CBM66-BT1760 toimel levaanist moodustunud oligosahhariidide tuvastamiseks kasutati õhukese kihi kromatograafia (TLC – *Thin Layer Chromatography*) meetodit.

Esmalt valmistati ette proovid, mida kanda TLC plaadile. Selleks tehti inkubatsioonisegud mahus 250  $\mu$ l, mis sisaldasid levaani kontsentratsiooniga 1,5% ning ensüümi 3 U/ml. Segusid inkubeeriti lauatermostaadil 6 tundi temperatuuril 37°C ja seejärel reaktsioon lõpetati kuumutamise temperatuuril 96°C 5 min.

Silikageelplaatide (TLC ALUGRAM® Xtra SILGUR/UV<sub>254</sub>; Macherey-Nagel, Saksamaa) kontsentreerivale stradijoonele kanti lahjendamata proove mahus 1  $\mu$ l. Markeriks oli suhkrute segu, mis sisaldas fruktoosi (PA1, 30 mM), sahharoosi (PA2, 30mM), 1-kestoosi (PA3, 8 mM), nüstoosi (PA4, 8 mM) ja levaani (0.7%) (Mardo *et al.*, 2014). TLC plaati voolutati selle ülemise servani, kuivatati ning voolutati uuesti. Voolutussegu koosnes kloroformist, äädikhappesest ja veest vahekorras 6:7:1 (Stingele *et al.*, 1999). Seejärel plaat kuivatati ja värviti aniliini-reaktiiviga (1,2 g difenüülamiini, 1,2 g aniliinhüdrokloriidi, 100 ml metanooli ja 10 ml ortofosforhapet). Suhkrute visualiseerimiseks kuumutati plaati temperatuuril 120°C 10-15 minutit, mille tulemusel värvusid fruktoosi sisaldavad produktid roosakaspunaseks, sahharoosi sisaldavad produktid pruuniks ning glükoos siniseks (Jork, 1990).

## 2.3. Tulemused ja arutelu

Sonnenburg *et al.* (2010) näitasid, et *Bacteroides thetaiotaomicron*'i GH32 perekonda kuuluv ensüüm BT1760 on endo-levanaas, mis lagundab spetsiifiliselt  $\beta$ -2,6-glükosiidsidemeid fruktoosijääkide vahel. Paljudel glükosiidi hürdolaasidel on efektiivsuse tõstmiseks lisaks katalüütilisele domeenile olemas veel spetsiaalselt süsivesikule seonduv CBM-motiiv. Ka meie töörühmas on ensüümi BT1760 varasemalt uuritud ja iseloomustatud ning näidatud selle võimet lagundada erinevaid levaane, sh taimset levaani (Mardo *et al.*, 2017).

Seni pole teada ühegi endo-levanaasi struktuur, kuid ennustatavalt koosneb valk BT1760 katalüütilisest domeenist ning teadmata funktsiooniga domeenist, millel võiks olla substraadiga seostumise roll (Joonis 5). Valguperekondade andmebaasi Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) alusel ei ole katalüütiline domeen ja CBM omavahel ühendatud pika linkeri abil, vaid võib arvata, et domeenid on omavahel üsna lähestikku kompakselt pakitud. Karin Ernitsa tehtud sekundaarstruktuuri analüüs vihjas ka lühikese  $\alpha$ -heeliksi olemasolule, mis võiks tõmmata motiivid üksteisele veelgi lähedamale (avaldamata andmed).



**Joonis 5. Ennustatud domeenide korraldus BT1760 valgus.** Kollasega on tähistatud valgu N-terminaalne signaaljärjestus, rohelisega GH32 perekonna valkudele omase struktuuriga N-terminaalne katalüütiline domeen ning punasega teadmata funktsiooniga (*Domain of Unknown Function*) C-terminaalne motiiv. Joonis on koostatud Pfam andmebaasi järgi valgu Q8A6W6\_BACTN alusel (<http://pfam.xfam.org/>).

Endo-levanaasi BT1760 potentsiaalset CBM-i on praeguseini kirjeldatud kui tundmatu funktsiooniga domeeni (DFU4975 – *Domain of Unknown Function* 4975). Seetõttu püstitati töörühmas hüpotees, kas valgu BT1760 DUF4975 võiks olla vajalik polüsahhariidi sidumiseks ehk toimida kui CBM, tõstes ensüümi katalüütilist efektiivsust. Käesolevas bakalaureusetöös on uuritud endo-levanaasi BT1760 C-terminaalse domeeni rolli valgu levaani hüdrolyüsivõime juures. Selleks konstrueeriti metsiktüüpi valgust mutantsed variandid ja mõõdeti nende ensümaatilist aktiivsust ning seondumisvõimet substraatidega, et tulemuste võrdluse põhjal teha järeldusi C-terminaalse domeeni funktsiooni kohta.

### 2.3.1. BT1760 valgu mutantsed variandid

Käesolevas töös uuritud metsiktüüpi valgust BT1760 tehtud erinevate variantide (vt Tabel 4) geene ekspresseeriti *Escherichia coli*'s ning valgud puhastati rakumassist afiinsuskromatograafia meetodil. Geneetilised manipulatsioonid ning valkude puhastamise teostas Karin Ernits. Edasises töös esitatud andmed on saadud puhastatud valke uurides.

Esimesel variandil eemaldati metsiktüüpi valgult oletatav CBM, jättes alles potentsiaalse linkerala – saades mutandi BT1760 $\Delta$ CBM (Tabel 4 ja 5). Teisel rekombinantsel valgul oli BT1760 natiivne C-terminaalne domeen asendatud *Bacillus subtilis*'e ekso-levanaasi SacC C-terminaalse CBM66-ga (BT1760 $\Delta$ CBM-CBM66) ning kolmandal variandil vahetati lisaks C-terminaalsele CBM-le ka valgu BT1760 natiivne linker LSL-linkeri vastu (BT1760 $\Delta$ CBM-LSL-CBM66), et uurida linkerala mõju ensüümi aktiivsusele ja stabiilsusele. Kui eelpool kirjeldatud mutantidele oli lisatud ekso-levanaasi CBM66-domeen C-terminaalsesse otsa, siis CBM66-BT1760 ja CBM66-BT1760 $\Delta$ CBM variantidel oli CBM66 lisatud endo-levanaasi BT1760 N-terminaalsesse otsa. Mutantsel variandil CBM66-BT1760 $\Delta$ CBM oli eemaldatud originaalne oletatav CBM-motiiv, kuid variandi CBM66-BT1760 puhul oli CBM66 liidetud metsiktüüpi valgule lisadomeeninena. Konstrueeritud variantide skeemid ja nende aminohappelised järjestused on esitatud Tabelis 5.

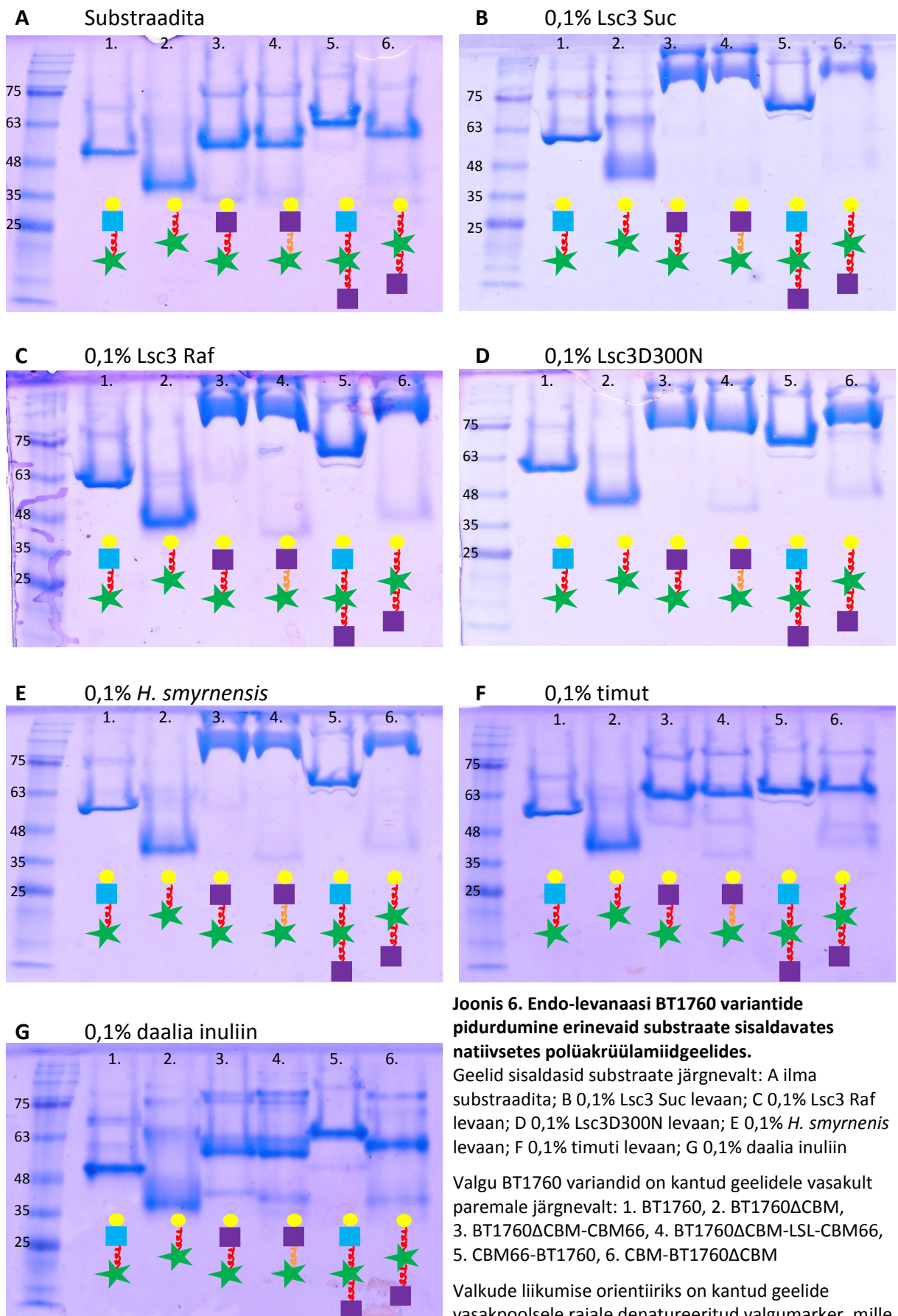
Cuskin *et al.* (2012) on näidanud, et *B. subtilis*'e ekso-levanaasi SacC süsivesikut siduva domeeni CBM66 lisamine mittespetsiifilisele fruktanaasile tõstab ensüümi afiinsust just levaanile. CBM66 struktuuri lahendamine näitas, et tegemist on  $\beta$ -sandwich struktuuriga, mis koosneb kahest  $\beta$ -lehest, mis on omakorda voltunud kokku kuuest ja seitsmest antiparalleelsest  $\beta$ -ahelast. CBM66 ehitusele on iseloomulik piki struktuuri kulgev „kraav“, mis jätab mulje nagu oleks  $\beta$ -sandwich'i ääred üles painutatud. „Kraavi“ keskele moodustub substraati siduv tasku. CBM66 suurendab ensüümi afiinsust polümeersetele substraatidele seondudes fruktaanide mitteredutseerivale otsale (Cuskin *et al.*, 2012). Substraatidena sobivad SacC-le paremini rohkem hargnenud (nt *B. subtilis*'e levaan) kui vähem hargnenud (nt *E. herbicola* levaan) või lineaarsed (nt siguri inuliin) polüfruktaanid (Cuskin *et al.*, 2012).

## 2.3.2. Metsiktüüpi ja mutantsete endo-levanaaside iseloomustamine

### 2.3.2.1. Endo-levanaas BT1760

Metsiktüüpi valgu BT1760 eriaktiivsus erinevatel levaanidel on kirjeldatud artiklis Mardo *et al.* (2017). Sellest lähtuvalt on ensüümi eriaktiivsus 120-130 U/mg, mõõtes redutseerivate suhkrute teket kasutades substraadina 0,5% *P. syringae* levaansukraasiga Lsc3 sahharoosist sünteesitud levaani ning *E. herbicola* ja *H. smyrnensis* levaane. Neist suure molekulmassiga levaanidest (1100-4800 kDa) on ainsana lineaarse struktuuriga *H. smyrnensis*'e levaan. Kui substraadiks oli *P. syringae* mutantse levaansukraasi Lsc3D300N sahharoosist sünteesitud madala molekulmassiga (17 kDa) ning hargnenud struktuuriga levaan, saadi kaks korda suurem eriaktiivsus – 260 U/mg. Kõrgeima eriaktiivsuse tuvastasid Mardo *et al.* timuti levaanil (~300 U/mg), mille fruktaanahel on üsna lühike ja lineaarne. *P. syringae* levaansukraasi poolt rafinoosist sünteesitud levaani suutis endo-levanaas kõige kehvemini hüdrolüüsida (eriaktiivsus 100 U/mg) (Mardo *et al.*, 2017). Varasemalt on näidatud veel, et BT1760 ei lagunda daalia ega siguri inuliini ning inuliin-tüüpi FOS-e. Samuti ei suuda see ensüüm hüdrolüüsida ksülooligosahhariide, rafinoosi, stahhüloosi, sahharoosi, 1-kestoosi, nüstoosi ega fruktosüülnüstoosi (Mardo *et al.*, 2017; Sonnenburg *et al.*, 2010).

Joonis 6 illustreerib natiivsete valkude pidurdumiskatses saadud tulemusi. Katses oli tegemist natiivsete PAA-geelidega, kus valgud liiguvad natiivses olekus aluselises keskkonnas negatiivse laengu suunas – liikumiskiirus on määratud valgu pinnalaengu ja molekulmassiga. Polüsahhariidiga seondumine põhjustab valgu mehhaanilist pidurdumist geelis ehk mida paremini ensüüm substraadiga seondub, seda aeglasemalt liigub ta geelis edasi. Katse planeeriti Xie *et al.* (2001) ja Cuskin *et al.* (2012) artiklite alusel. Viimases näidati, et *B. subtilis*'e ekso-levanaasi CBM66 seondub tugevalt *E. herbicola* levaaniga, pidurdades valgu liikumist levaani sisaldavas PAA-geelis (Cuskin *et al.*, 2012). Endo-levanaas BT1760 ei ole võimeline hüdrolüüsima inuliinis fruktoosijääkide vahel olevaid  $\beta$ -2,1-glükosiidsidemeid (Mardo *et al.*, 2017; Sonnenburg *et al.*, 2010). Seetõttu kasutati pidurdumiskatses inuliini kui negatiivset kontrolli.



**Joonis 6. Endo-levanaasi BT1760 variantide pidurdumine erinevaid substraate sisaldavates natiivsetes polüakrüülamiidgeelides.**

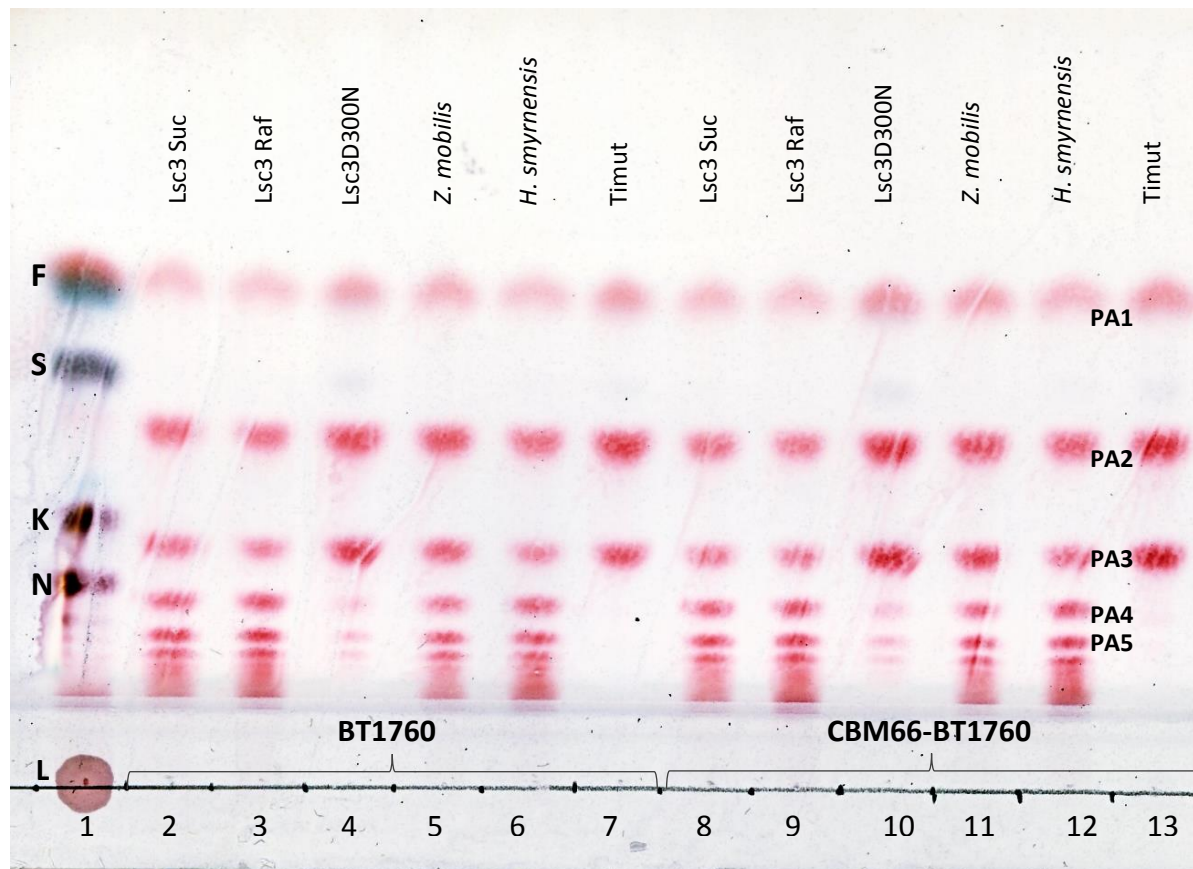
Geelid sisaldasid substraate järgnevalt: A ilma substraadita; B 0,1% Lsc3 Suc levaan; C 0,1% Lsc3 Raf levaan; D 0,1% Lsc3D300N levaan; E 0,1% *H. smyrnensis* levaan; F 0,1% timuti levaan; G 0,1% daalia inuliin

Valgu BT1760 variandid on kantud geelidele vasakult paremale järgnevalt: 1. BT1760, 2. BT1760 $\Delta$ CBM, 3. BT1760 $\Delta$ CBM-CBM66, 4. BT1760 $\Delta$ CBM-LSL-CBM66, 5. CBM66-BT1760, 6. CBM-BT1760 $\Delta$ CBM

Valkude liikumise orientiiriks on kantud geelide vasakpoolsel rajale denatureeritud valgumarker, mille komponentide suurused on tähistatud (kDa).

Hoolimata hüdrofüütilise aktiivsuse olemasolust, ei pidurdu metsiktüüpi valk spetsiifiliselt ja tugevasti elektroforeesil levaani sisaldavas geelis (Joonis 6). Fruktaane mittesisaldavas (Joonis 6, geel A, rada 1) ja inuliiniga (Joonis 6, geel G, rada 1) geelides jäi natiivses olekus metsiktüüpi BT1760 valk pidama veidi enne 48 kDa referentsmarkerit. Kõikides levaane sisaldavates geelides (Joonis 6, geelid B-F, rada 1) oli näha ainult vähene metsiktüüpi valgu pidurdumine võrrelduna geelidega, kus polnud fruktaane või oli inuliin. Järelikul ei seonu natiivne BT1760 valk märkimisväärselt levaaniga. Tugevat pidurdumist oleks võinud näha, kui C-terminaalne tundmatu funktsiooniga domeen toimiks CBM-moodulina.

Ensüümiproductide lahutamine õhukesekihi kromatograafiaga (TLC) näitas, et valk BT1760 hüdrofüüsib aktiivselt levaani väiksemateks oligosahhariidideks (vaata Joonis 7, rajad 2-7). Joonisel 7 on näha, et 6 tunnise katse käigus lagundas ensüüm kõiki levaane, produtseerides peamiselt levaanbioosi (PA2), levaantrioosi (PA3) ja ka suurema polümerisatsiooni astmega FOS-e (PA $\geq$ 4). Vaba fruktoosi on näha ainult väikeses hulgas, mis tõestab valgu endo-aktiivsust, kuna endo-levanaas lagundab levaani ahela keskelt, tootes lühemaid oligomeere. Ekso-aktiivsusega enüümi puhul oleks peamiseks produktiks vaba fruktoos. Lsc3D300N ja timuti levaanil on pea kogu algne substraat lagundatud levaanbioosiks, -trioosiks ja fruktoosiks (vt Joonis 7, rajad 4 ja 7). See on ka kooskõlas Mardo *et al.* (2017) tulemustega.



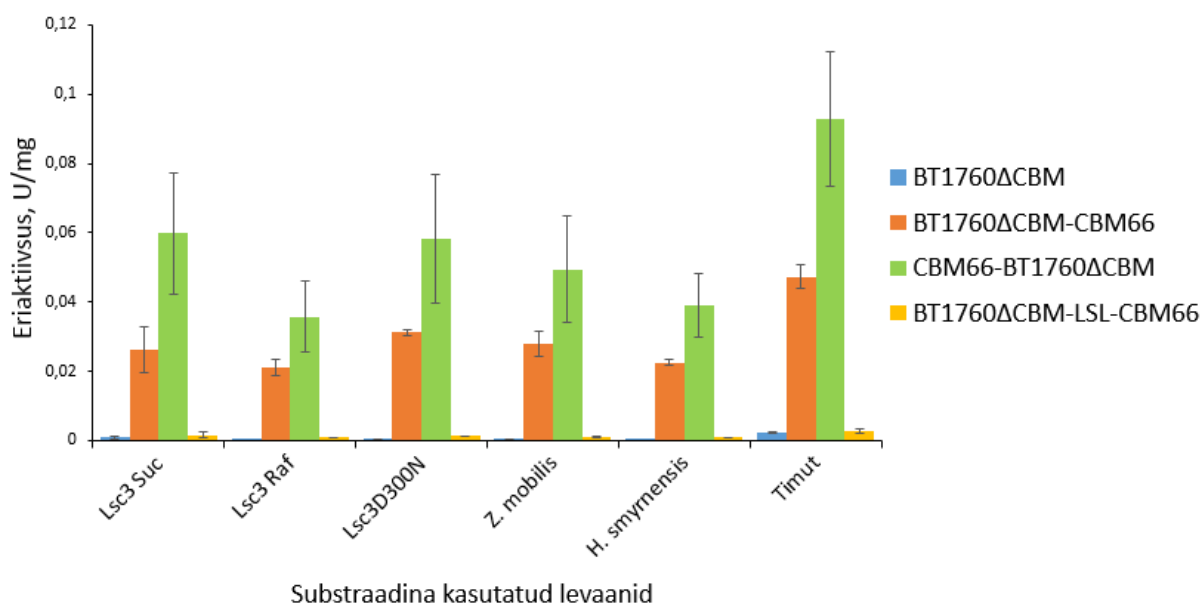
**Joonis 7. BT1760 ja CBM66-BT1760 ensüümide hüdrolüüsiproductide analüüs õhukesekihi kromatograafiaga (TLC).** Radadel 2-7 on metsiktüüpi BT1760 erinevate levaanide hüdrolüüsimisel tekkivad productid; radadel 8-13 on mutantse valgu CBM66-BT1760 productid. Esimesel rajal (1) on suhkrute võrdlusmarker: fruktoos (F), sahharoos (S), 1-kestoos (K) nüstoos (N) ja levaan (L). PA1-5 näitab hüdrolüüsiproductide (FOS-id) polümeerisatsiooniastet. Kasutatud 1,5% levaanid on märgitud radade kohale. Ensüüme inkubeeriti 1,5% substraati sisaldavas segus 6 tundi temperatuuril 37°C. Kõiki proove kanti TLC plaadi stardijoonele 1 µl.

### 2.3.2.2. BT1760 katalüütilise aktiivsuse kaotanud variandid

Endo-levanaasi BT1760 C-terminaalse domeeni rolli uurimiseks koostati metsiktüüpi BT1760 valgust erinevad variandid. Mutantsete valkudega mõõdeti levaanide lagundamise aktiivsust ning nende seondumist võrrelduna algse BT1760-ga.

#### Valguvariantide katalüütiline aktiivsus

Joonisel 8 on välja toodud endo-levanaasist BT1760 moodustatud variantide eriaktiivsus kuue erineva levaaniga, mida kõiki kasutati kontsentratsioonis 0,5%. Aktiivsused leiti mõõtes reaktsiooni tulemusel levaanist tekkivate redutseerivate suhkrute moodustumist. Katsed näitasid, et enamus valguvariante ei omanud katalüütilist aktiivsust või oli see äärmiselt madal võrrelduna metsiktüüpi BT1760 valguga (võrdle andmeid Joonistel 8 ja 9).



**Joonis 8. Endo-levanaasist BT1760 moodustatud variantide aktiivsus erinevatel 0,5% levaanidel.** Joonisel näitavad tulpade kõrgused nelja ensüümivariandi keskmisi eriaktiivsuseid erinevate 0,5% levaanidega.

Katsed näitasid, et kõik mutantsed variandid peale CBM66-BT1760, olid kotanud katalüütilise aktiivsuse. Kõige lihtsam mutant – BT1760ΔCBM – koosnes ainult natiivsest katalüütilisest domeenist ja linkerist ning sellel ei tuvastatud ühegi levaani hüdrolüüsivõimet ka 144 tundi kestnud inkubeerimisel (Joonis 8). Välistamiseks juhuslikust mutatsioonist tulenevat aktiivsuse kadu kontrolliti variandi nukleotiidsel järjestusel ka skeveneerimisega, kuid ei

tuvastatud muutusi valku kodeerivas järjestuses. Seega oleks pidanud ensüümi katalüütiline domeen olema töökorras ning võimeline levaani lagundama.

Veel kolmel variandil oli natiivne oletatav CBM samuti puudu, kuid nende N- või C-terminaalsesse otsa oli lisatud *B. subtilis*'e ekso-levanaasi SacC CBM66 (ensüümivariandid CBM66-BT1760ΔCBM, BT1760ΔCBM-CBM66 ja BT1760ΔCBM-LSL-CBM66). Siiski ei taastanud selle motiivi lisamine oluliselt nende valkude võimet levaane lagundada. See andis alust oletata, et valgu BT1760 hüpoteetiline CBM on hädavajalik selle ensüümi funktsiooni tagamiseks. BT1760ΔCBM-CBM66-l ehk variandil, millel originaalne CBM oli deleteeritud ning asemele pandud CBM66, saadi kolm päeva kestnud reaktsioonis keskmiseks eriaktiivsuseks Lsc3 Suc levaanil 0,026 U/mg ning timuti levaanil 0,047 U/mg. See oli ka antud valguvariandi kõrgeim aktiivsus kõigil uuritud substraatidel. BT1760ΔCBM-CBM66 aktiivsuse näitajad on vastavalt ligi 4600 korda ja 6400 korda madalamad kui metsiktüüpi BT1760 valgu eriaktiivsus Lsc3 Suc ja timuti levaanidel, mis tõestab variandi ensümaatilist inaktiivsust.

Ensüümivariant BT1760ΔCBM-LSL-CBM66 erineb eelmisest mutandist BT1760ΔCBM-CBM66 domeenidevahelise linkeri poolest: natiivne linker on asendatud LSL-linkeriga. LSL-linker on ASSSENLVYFQG aminohappeline järjestus, mida on kasutatud sidumaks *Laetiporus sulphureus* lektiini domeeni mõne muu uuritava valguga. Linkeril sisaldab elastset ASSS järjestust, millele järgneb tubakaviiruse (*Tobacco etch virus*) endoproteaasi äratundmisjärjestus (ENLVYFQG) (López-Gallego *et al.*, 2012). Käesolevas töös tehtud katsed näitasid, et linkerivahetus ei muutnud valgu võimet substraati hüdrolüüsida: 3 päeva inkubeerimisel, saadi BT1760ΔCBM-LSL-CBM66 keskmiseks eriaktiivsuseks Lsc3 Suc levaanil 0,0016 U/mg ning timuti levaanil 0,0026 U/mg, mis oli isegi madalam BT1760ΔCBM-CBM66 variandi aktiivsustest (vt Joonis 8). Ülejäänud substraatide lagundamise võime jäi alla 0,002 U/mg (vt Joonis 8). Võib väita, et variandil BT1760ΔCBM-LSL-CBM66 puudub levaani hüdrolüüsamise aktiivsus, sest see oli metsiktüvest ligi 75 000 korda madalam.

Viimasel uuritavatest variantidest, CBM66-BT1760ΔCBM-l, oli puudu oletatav natiivne CBM, kuid omas N-terminaalses otsas CBM66-te. Redutseerivate suhkrute vabanemise mõõtmised näitasid, et neljast valgust, millel oli eemaldatud natiivne CBM, omas see ensüüm suurimat katalüütilist aktiivsust kõikide testitud 0,5% levaanide lagundamisel. Joonisel 8 (roheline tulp) on näha, et CBM66-BT1760ΔCBM lagundas Lsc3 Suc ja Lsc3D300N levaane aktiivsusega

0,06 U/mg. *Z. mobilis*'e levaanil oli variandi katalüütiline eriaktiivsus 0,05 U/mg ning Lsc3 Raf ja *H. smyrnensis*'e levaanidel keskmiselt 0,04 U/mg. Kõige paremini hüdrolüüsis antud ensüüm timuti levaani – aktiivsuselga 0,09 U/mg. Siiski jäi valgu aktiivsus madalaks võõrduna metsiktüüpi BT1760 valgu katalüütilise aktiivsusega (Joonised 8 ja 9). Näiteks timuti levaani lagundab muteerimata BT1760 valg 3300 korda CBM66-BT1760 $\Delta$ CBM mutandist edukamalt.

Üldiselt tõestas katse, et endo-levanaasi BT1760 variandid, millel puudub natiivne C-terminaalne domeen, ei oma katalüütilist aktiivsust. Seevastu variandid, millel natiivne oletatav CBM oli asendatud CBM66-ga, ei omanud samuti aktiivsust, mida oleks võinud oodata, kui C-terminaalne domeen oleks vajalik levaani sidumiseks ja substraadi katalüütilisele domeenile lähemale toomiseks.

Nendest andmetest võib järeldada, et natiivse BT1760 C-terminaalse domeeni eemaldamine lõhub valgu struktuuri nii, et see kaotab oma katalüütilise aktiivsuse. Selle mooduli asendamine CBM66-ga ei taasta valgu võimet levaane hüdrolüüsida. Ka linkerala vahetamine ei taasta valgu hüdrolüüsivõimet.

#### Valguvariantide seondumine levaanidega

Ensüümi edukaks toimimiseks on vajalik selle seondumine oma sihtmärksubstraadiga. Saamaks teada, kas endo-levanaasi BT760 C-terminaalse CBM-i eesmärk on aidata valgul seonduda levaanidega, uuriti metsiktüve ja sellest loodud variantide seondumisvõimet erinevate levaanide ning inuliiniga natiivsetes polüakrüülamiidgeelides, mis sisaldasid lahutavas geeliosas 0,1% vastavat substraati. Pidurdumiskatse andmed on esitatud Joonisel 6.

Katsest nähti, et variant BT1760 $\Delta$ CBM ei suutnud seonduda ühelegi levaanile ega inuliinile (vt Joonis 6, geelid B-G, rada 2). Järelikult ei piisa ainult ensüümi katalüütilisest domeenist substraadiga efektiivseks seondumiseks. Samas ei taganud ka oletatava CBM-i olemasolu valgu seondumist levaanile, mida näitas metsiktüüpi BT1760 mittepurdumine geelides (võrdle Joonis 6, rajad 1 ja 2 kõikidel geelidel).

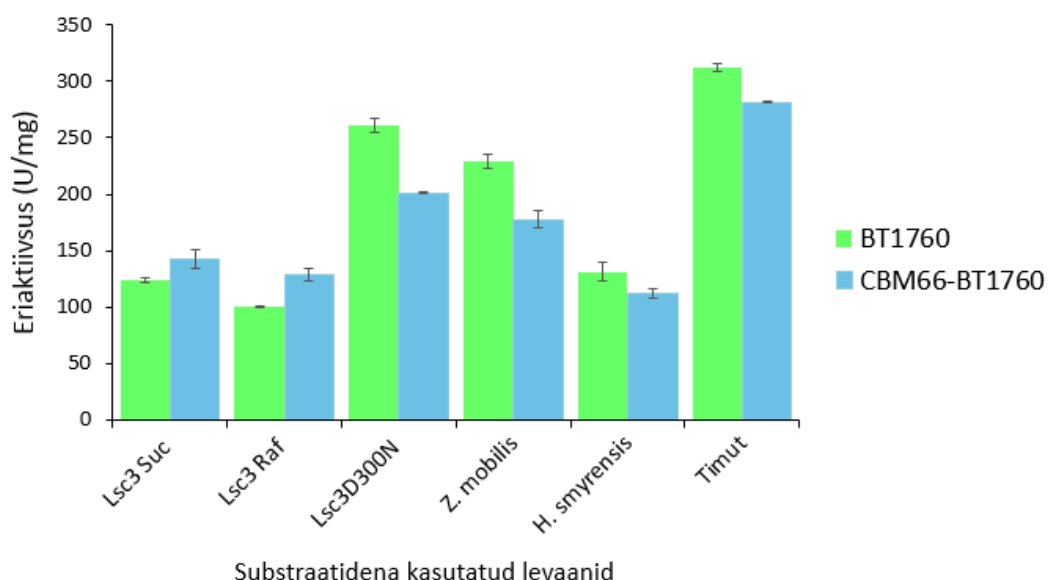
Kolme variandi, BT1760 $\Delta$ CBM-CBM66, BT1760 $\Delta$ CBM-LSL-CBM66 ja CBM66-BT1760 $\Delta$ CBM puhul oli näha nende selget pidurdumist kõikidel levaanidel (Joonis 6, geelid B-G, rajad 3,4 ja 6) ning eriti hästi Lsc3 Suc, Lsc3 Raf ja *H. smyrnensis* levaanidel (Joonis 6, geelid B, C, ja E, rajad 3, 4 ja 6). Inuliinile valgud ei seondunud (Joonis 6, geel G, rajad 3, 4, 6). Neil variantidel oli ühiseks jooneks natiivse CBM-domeeni puudumine ja valgule lisatud CBM66-domeen. CBM66

seondumist on varem näidatud 0,1% *E. herbicola* levaanile, kus ligandi olemasolul on valgu liikumine PAA-geelis oluliselt raskendatud (Cuskin *et al.*, 2012). Võib arvata, et nende kolme ensüümivariandi pidurdumine levaanidel on tingitud just CBM66 olemasolust.

Natiivses olekus valkude liikumine levaani või inuliini sisaldavas polüakrüülamiidi geelis näitas, et ei katalüütiline domeen ega ka oletatav C-terminaalne CBM ei taga valgu seondumist substraadiga (Joonis 6, geelid B-E 1. ja 2. rada). Samas on C-terminaalse mooduli olemasolu ülioluline valgu levaani lagundamise võime jaoks, sest variandid, millel domeen puudus ei omanud ka aktiivsust (Joonis 8), isegi kui suutsid levaani siduda (Joonis 6, rajad 3, 4, 6). Sellised olid valguvariandid BT1760 $\Delta$ CBM-CBM66, BT1760 $\Delta$ CBM-LSL-CBM66 ja CBM66-BT1760 $\Delta$ CBM. Natiivse C-terminaalse mooduli asendamine CBM66-mooduliga aitab rekombinantsel valgul levaanidele seonduda, kuid ei taasta seejuures valgu katalüütilist aktiivsust (Joonis 8 ja Joonis 6, rajad 3, 4, 6). Järelikult vajab ensüüm täielikuks korrektseks toimimiseks nii N-terminaalset katalüütilist domeeni kui ka C-terminaalset  $\beta$ -*sandwich* motiivi.

### **2.3.2.3. Katalüütilist aktiivsust omav CBM66-BT1760 variant**

Ainus mutantne valk, mis suutis peale metsiktüüpi ensüümi efektiivselt levaane lagundada, oli CBM66-BT1760. Erinevalt teistest variantidest oli sellele jäetud alles täispikkuses natiivne BT1760 valk, millele lisati N-terminaalsesse otsa CBM66. Joonisel 9 on võrreldud mutantse ensüümi CBM66-BT1760 katalüütilist eriaktiivsust 0,5% levaanidel metsiktüüpi endo-levanaasi BT1760 aktiivsustega.



**Joonis 9. Metsiktüüpi endo-levanaas BT1760 ja selle variandi CBM66-BT1760 katalüütiliste eriaktiivsuste võrdlus.** Rohelised tulbad kujutavad metsiktüüpi valgu BT1760 katalüütilist eriaktiivsust erinevatel 0,5% levaanidel ning sinised tulbad mutantse ensüümi CBM66-BT1760 eriaktiivsust. Standardhälve on arvatud kahe eraldi katse põhjal. Metsiktüüpi BT1760 aktiivsuse andmed pärinevad artiklist Mardo *et al.* (2017).

Katse tulemustest oli näha, et variant CBM66-BT1760 on väga hea levaanide hüdrolüüsija. Lsc3 Suc levaani lagundas see valk aktiivsusega 140 U/mg ja Lsc3 Raf levaani aktiivsusega 128 U/mg. Lsc3D300N ning *Z. mobilis* levaanidel oli CBM66-BT1760 eriaktiivsust vastavalt 180 U/mg ja 200 U/mg. Kõige kehvem substraat oli ensüümile *H. smyrnensis*'e levaan, mille hüdrolüüsiaktiivsus jäi 110 U/mg ligidale ja suurim aktiivsus oli timutist eraldatud levaanil (280 U/mg) (vaata Joonis 9). *P. syringae* levaansukraasiga (Lsc3) sahharoosist ja rafinoosist toodetud levaane lagundas CBM66-BT1760 edukamalt kui metsiktüüpi endo-levanaas BT1760, vastavalt 1,15 ja 1,28 korda paremini. Ülejäänutel uuritud substraatidel jäi variandi aktiivsus alla metsiktüüpi valgule, kuid vähesel määral (Joonis 9). Timuti levaani hüdrolüüsis rekombinantne valk 7% kehvemini ning *H. smyrnensis* ja Lsc3D300N levaanide puhul oli CBM66-BT1760 aktiivsus vastavalt 15% ja 11% madalam.

Kuna CBM66-BT1760 oli ainus mutantne valk, mis suutis substraati lagundada, mõõdeti ka selle katalüütilised parameetrid  $K_m$  ja  $k_{cat}$  (vaata Tabel 6). Parameetrid leiti kolmel *P. syringae* levaansukraasiga sünteesitud levaanil (Lsc3 Suc, Lsc3 Raf ja Lsc3D300N levaanid), mõõtes redutseerivate suhkrate tekkimise algkiiruseid substraatide erinevatel kontsentratsioonidel ning võrreldi Mardo *et al.* (2017) mõõdetud metsiktüüpi valgule näitajatega. Tabelis 6 on näha, et sarnaselt endo-levanaas BT1760-ga oli mutantsel valgul hea afiinsus Lsc3D300N levaanile

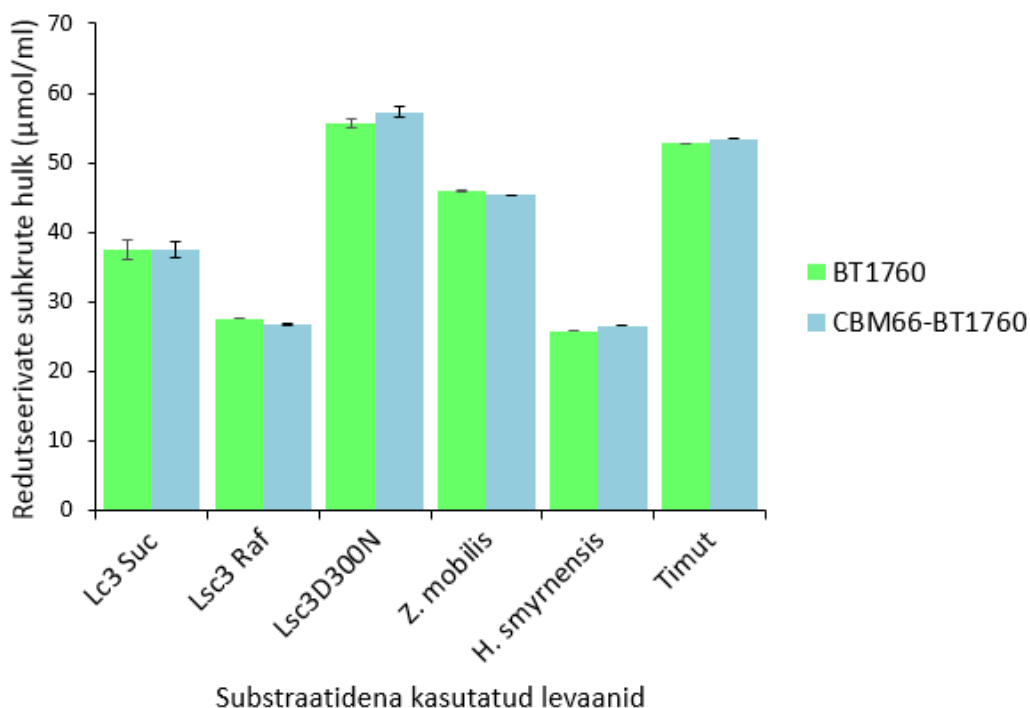
ning rafinoosist sünteesitud levaanile on mõlemal madalaim afiinsus. Variandil CBM66-BT1760 on afiinsus Lsc3 Suc levaanile kõrgem kui metsiktüüpi valgul. Ilmselt tuleneb erinevus CBM66 lisadomeenist mutantse valgu N-terminaalses otsas, mis seondub suurepäraselt just hargnenud kõrge molekulmassiga levaanidele nagu seda on Lsc3 Suc levaan (Cuskin *et al.*, 2012). Siiski ei suuda ensüüm seda levaani nii efektiivselt lagundada kui metsiktüüpi valk – CBM66-BT1760 hüdrolyüsib sekundis ligi kaks korda vähem substraati (Tabel 6). Rafinoosist sünteesitud levaani lagundab CBM66-BT1760 valk veidi kiiremini ning Lsc3D300N levaanil on mõlema valgu  $k_{cat}$  üpris sarnane: metsiktüvel  $472,7 \text{ s}^{-1}$  ning ensüümil CBM66-BT1760  $439,6 \text{ s}^{-1}$  (Tabel 6). Süsivesikule seonduv lisadomeen aitab valgul seonduda paremini teatud sorti levaanidega, kaotades seejuures substraadimolekulide lagundamise kiirust, kuid üldiselt on mutantse ensüümi CBM66-BT1760 kineetika sarnane metsiktüüpi BT1760 valgu omaga.

**Tabel 6. BT1760 ja CBM66-BT1760 valkude  $K_m$  ja  $k_{cat}$  võrdlus.** Metsiktüübi valgu  $K_m$  ja  $k_{cat}$  väärtused on artiklist Mardo *et al.* (2017). Katsed CBM66-BT1760-ga tehti vähemalt kahes korduses. Esitatud on keskmised väärtused ja standardhälbed.

Levaan	BT1760 $K_m$ (g/L)	BT1760 $k_{cat}$ (1/s)	CBM66-BT1760 $K_m$ (g/L)	CBM66-BT1760 $k_{cat}$ (1/s)
Lsc3 Suc	$13,6 \pm 1,5$	$466,8 \pm 27,7$	$4,1 \pm 0,6$	$267,3 \pm 25,4$
Lsc3 Raf	$12,2 \pm 1,5$	$366,7 \pm 23,3$	$11,4 \pm 2,3$	$414,2 \pm 86,6$
Lsc3D300N	$4,1 \pm 0,4$	$472,7 \pm 16,8$	$6,1 \pm 1,2$	$439,6 \pm 60,9$

Mutantse valgu CBM66-BT1760 levaani hüdrolyüsil tekkivaidprodukte analüüsiti TLC meetodiga (vaata Joonis 7, rajad 8-13). Ensüümi toimetel vabanenud FOS-ide muster oli sarnane metsiktüüpi valgu omaga (Joonis 7, rajad 2-7) – peale 6 tunnist reaktsiooni 1,5% substraadil temperatuuril  $37^\circ\text{C}$  oli kõige rohkem tekkinud kahest ja kolmest fruktoosijärgist koosnevaid fruktooligosahhariide. Lisaks oli saaduste seas ka fruktoosi ning suurema polümerisatsiooni astmega FOS-e (PA>3). Joonisel 7 kujutatud TLC pildilt oli näha, et timuti levaani laguproduktideks on ainult fruktoos, levaanbioos ja -trioos (rada 13) – see on ensüümi poolt kõige väiksemateks oligomeerideks lagundatud substraat. Sarnane produktide spekter saadi ka timuti levaani lagunemisel metsiktüüpi valguga (rada 7). Mõlema valgu reaktsiooni käigus

toodetud redutseerivate suhkrute koguhulk oli samuti võrdne (Joonis 10), mis toetab saadud TLC-analüüsi tulemusi.



**Joonis 10. BT1760 ja CBM66-BT1760 1,5% levaanidega TLC segudes produtseeritud redutseerivate suhkrute koguhulk.** X-teljel on välja toodud katsetes kasutatud 1,5% levaanid, Y-teljel TLC segudes mõõdetud redutseerivate suhkrute hulk (µmol/ml). Valgu ja substraadi segusid inkubeeriti 6 tundi temperatuuril 37°C.

Pidurdumiskatses geelelektrofooresil oli näha rekombinantse valgu CBM66-BT1760 paremat seondumist levaanidega kui metsiktüüpi valgul või C-terminaalse domeenita valgul (vaata Joonis 6, geelid B-F, rada 5 vs rajad 1 ja 2). Siiski seondus CBM66-BT1760 kõikide levaanidega geelides natuke kehvemini kui CBM66-domeeni omavat ent originaalset CBM-moodulit mitteomavad variandid (BT1760ΔCBM-CBM66, BT1760ΔCBM-LSL-CBM66 ja CBM66-BT1760ΔCBM) (vaata Joonis 6, rada 5 vs rajad 3, 4, 6). Kehvema seondumise võis põhjustada BT1760 endo-aktiivsuse ja ekso-aktiivsusega valgu CBM-i (CBM66) konflikt – endo-aktiivsusega BT1760 seondub levaaniahela keskele, kuid *B. subtilis*'e ekso-levanaasi CBM66 selle otsmise fruktoosijäägi külge.

Katalüütilise aktiivsuse mõõtmisest ning pidurdumiskatses geelis võib järeldada, et hea levaani siduva võime andis CBM66-BT1760 valgule lisatud CBM66-domeen ning et ensümaatilise töövõime jaoks on tähtis natiivse C-terminaalse mooduli olemasolu.

### 2.3.3. BT1760 C-terminaalse domeeni roll

Glükosiidi hüdrolaaside perekonna 32 valkudel on enamasti C-terminaalne  $\beta$ -*sandwich* motiiv, kuid sageli pole selle funktsioon teada.

Käesolevas töös oletati, et endo-levanaas BT1760 C-terminaalne domeen on vajalik levaanipolümeeri sidumiseks, et tõsta valgu sahhariidi lagundamise efektiivsust ja toimida CBM-ina. Mõningatel puhkudel on tõestatud GH32 valkude C-terminaalse  $\beta$ -*sandwich* mooduli polüsahhariidi siduv võime, teistel valkudel on C-terminaalne domeen hoopis vajalik valgu ensümaatilisel aktiivse struktuuri tagamiseks. Siiski pole paljudel glükosiidi hüdrolaasidel selle domeeni funktsioon veel teada (vaata Tabel 3).

Käesoleva töö tulemustest on näha, et oletatav CBM-domeen on BT1760 valgule oluline katalüütiliseks funktsioneerimiseks. Ükski C-terminaalse mooduli deletant (BT1760 $\Delta$ CBM, BT1760 $\Delta$ CBM-CBM66, BT1760 $\Delta$ CBM-LSL-CBM66 ja CBM66-BT1760 $\Delta$ CBM) ei suutnud hüdrolüüsida substraatidena kasutatud levaane. Ensümaatilist aktiivsust omasid ainult metsiktüüpi ensüüm BT1760 ning variant CBM66-BT1760 – valgud, millel oli alles natiivne hüpoteetiline CBM (vaata Joonis 8 ja 9).

Siiski ei saa ainult ensüümi aktiivsuse või selle puudumise põhjal väita, kas uuritav domeen on või ei ole CBM. Selleks uuriti, kuidas valgud pidurdavad erinevaid levaane sisaldavates PAA-geelides ehk mil määral seonduvad levaanidega (Joonis 6). Üllatav oli tulemus, et metsiktüüpi valk ei seondugi eriti levaanidega, kuigi lagundab neid edukalt (vaata Joonis 6, rajad 1 ja Joonis 9). Samamoodi ei pidurdunud katses ilma CBM-ta variant (BT1760 $\Delta$ CBM) (Joonis 6 rajad 2). Kõik CBM66-ga valgud pidurdusid geelides oluliselt paremini võrreldes metsiktüüpi valguga (Joonis 6, rajad 3-6 vs rada 1). See annab alust arvata, et substraadiga seondumine ei sõltu mitte natiivse oletatava CBM-i olemasolust valgus, vaid lisatud CBM66-st, mille levaani siduv toime on tõestatud (Cuskin *et al.*, 2012). C-terminaalse domeeni puudumine mõjutab hoopis oluliselt valgu katalüütilist aktiivsust. Katsetest selgus, et kõik valgud, millelt moodul oli eemaldatud, ei suutnud lagundada ühtegi testitud levaani (vaata Joonis 8).

Ülaltoodu põhjal saab järeldada, et endo-levanaasi BT1760 C-terminaalne domeen ei ole valgule vajalik polüsahhariidi paremaks sidumiseks ehk ei ole CBM. Domeen mängib ilmselt rolli hoopis valgu aktiivse struktuuri hoidmisel ning ilma selleta ei suuda ensüüm levaani hüdrolüüsida. Sarnane roll on C-terminaalsel  $\beta$ -*sandwich* moodulil näiteks

*Thermotoga maritima* invertaasis (Alberto *et al.*, 2004). Võimalik on, et BT170 ei vajagi eraldi levaani siduvat domeeni, kuna rakupinnal on tema lähiümbruses valgud BT1761 (SusE homoloog) ja BT1762 (SusD homoloog), mis seonduvad spetsiifiliselt levaaniga ent ei suuda seda lagundada (vaata Jooniseid 1 ja 2). Endo-levanaas võib teha nende valkudega koostööd, moodustades efektiivse polüsahhariidi kasutamise kompleksi.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös uuriti *Bacteroides thetaiotaomicron*'i endo-levanaasi BT1760 C-terminaalse hüpoteetilise süsivesikut siduva mooduli (CBM) rolli valgu katalüütilisele aktiivusele ning erinevatele levaanidele seondumisvõimele.

*B. thetaiotaomicron* on üks levinuimaid inimese jämesoole kommensaale. Tema, nagu paljud teisedki soole mikrobiota bakterid on inimesele hädavajalikud kiudainete lagundamiseks, sest inimesel endal sobivad ensüümid puuduvad.

*Bacteroidetes* hõimkonda kuuluvatel bakteritel on spetsiaalsed polüsahhariidide lagundamiseks ja kasutamiseks vajalikke valke kodeerivad lookused ehk PUL-id. *Bacteroides thetaiotamicron*'i genoomis on PUL, milles kodeeritakse spetsiifiliselt fruktaane lagundavaid valke, nende seas ka endo-levanaasi BT1760. Valk BT1760 koosneb N-terminaalsest katalüütilisest domeenist ning C-terminaalsest  $\beta$ -sandwich struktuurist nagu ka teised glükosiidi hürolaaside perekonna 32 valgud. C-terminaalse domeeni funktsioon oli siiani teadmata. Mitmel kirjanduses uuritud GH32 ensüümil on  $\beta$ -sandwich domeen vajalik efektiivsemaks süsivesikuga seondumiseks või valgu aktiivse struktuuri hoidmiseks. Seetõttu oli käesoleva töö eesmärk uurida ja teada saada selle C-terminaalse mooduli roll ning tõestada või ümber lükata hüpotees, et domeen on vajalik valgu seondumiseks substraadile. Selleks konstrueeriti metsiktüüpi valgust erinevad mutandid, eemaldades valgu enda domeene ning kasutades lisadomeenina *Bacillus subtilis*'e ekso-levanaasi SacC CBM66-moodulit. Katsetega mõõdeti saadud variantide aktiivsust ja afiinsust erinevatele levaanidele ning võrreldi tulemusi omavahel ja metsiktüüpi valguga.

Tulemustest järeldati, et *Bacteroides thetaiotamicron*'i endo-levanaas BT1760 C-terminaalne domeen ei ole süsivesikut siduv domeen (CBM), vaid on ilmselt vajalik hoopis valgu ensümaatilisel aktiivse struktuuri hoidmiseks.

# RESUME

## Endo-levanase BT1760: investigating the role of hypothetical CBM motif

Emma Johanna Sova

*Bacteroides thetaiotamicron* (*Bt*) is an abundant commensal of human large intestine that has the ability to degrade a large variety of polysaccharides, including plant fibers. For humans, bacteria with such abilities are important because no fiber-degrading enzymes are encoded in the human genome but these substances are necessary for a healthy gut and person's health in general.

Most plant polysaccharides are of fructan type – they are made up of fructose monomers. Fructans themselves can be of inulin-type with  $\beta$ -2,1 glycosidic bonds or levan-type where fructose units are linked with  $\beta$ -2,6 glycosidic bonds. Inulin and inuline-type fructooligosaccharides (FOS) are well-studied and widely used as a prebiotics, whereas levans and their beneficial effects for humans and animals are not yet widely investigated.

Like other *Bacteroides* species, *B. thetaiotaomicron* has special loci for utilising different polysaccharides – Polysaccharide Utilisation Loci (PUL). In one of such locus, enzymes for degradation and uptake of fructans are encoded (Sonnenburg *et al.*, 2010).

In *Bt*, a key enzyme in levan degradation is endo-levanase BT1760, encoded in fructan PUL. BT1760 is a glycoside hydrolase that hydrolyses  $\beta$ -2,6 bonds in random sites of levan chain containing more than 3 fructose monomers. BT1760 consists of a N-terminal 5-fold  $\beta$ -propeller catalytic domain and a C-terminal  $\beta$ -sandwich domain. The function of the  $\beta$ -sandwich domain is unknown but it could be important for supporting the protein's functional structure or contributing to the binding of the substrate. The domains with latter function are known as Carbohydrate Binding Modules (CBM) and are common in carbohydrate-active enzymes ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)).

In given thesis, the role of C-terminal motif of endo-levanase BT1760 is studied using five mutants designed for this study (BT1760 $\Delta$ CBM, BT1760 $\Delta$ CBM-CBM66, BT1760 $\Delta$ CBM-LSL-CBM66, CBM66-BT1760, CBM66-BT1760 $\Delta$ CBM) that are compared to the wild-type protein. The mutants lack a native C-terminal domain and/or are complemented with CBM66 from *Bacillus subtilis* exo-levanase SacC. The activity of levan hydrolysis by the enzymes was studied

by measuring the amount of reducing sugars released in reaction and the protein's ability to bind levans was investigated with native affinity-gel electrophoresis. In both experiments, levans of different origin were used. Additionally, dahlia inulin was used as a reference fructan.

Analyzing the mutant variants of the enzyme and the wild-type protein, it was found that the protein variants lacking native hypothetical CBM (BT1760 $\Delta$ CBM, BT1760 $\Delta$ CBM-CBM66, BT1760 $\Delta$ CBM-LSL-CBM66, CBM66-BT1760 $\Delta$ CBM) were catalytically inactive and could not hydrolyze any of the tested levans. Only CBM66-BT1760 preserved activity that was rather similar to the wild-type BT1760.

However, proteins' ability to bind levans did not correlate with proteins' substrate hydrolyzing activity. Affinity-gel electrophoresis showed that mutants containing a CBM66 had the best ability to bind to levans. Native C-terminal hypothetical CBM did not seem to promote substrate binding: the wild-type endo-levanase BT1760 showed minimal binding affinity and variant CBM66-BT1760 showed less binding affinity than other mutants.

Taking into consideration the obtained data, it can be concluded that the C-terminal motif of the endo-levanase BT1760 is not a Carbohydrate Binding Module for it does not aid the protein in better levan binding. The domain's role seems to be to support and preserve the catalytically effective structure of endo-levanase BT1760.

## **TÄNUSÕNAD**

Selle bakalaureusetöö valmimise eest sooviksin tänada oma juhendajaid Tiina Alamäed ja Karin Ernitsat, kes olid minuga alati kannatlikud, mõistvad ja toetavad ning kes mind alati usinalt töötama innustasid. Samuti tahan tänada kõiki teisi abivalmeid laborikaaslasid.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Adamberg, S., Tomson, K., Vija, H., Puurand, M., Kabanova, N., Visnapuu, T., Jõgi, E., Alamäe, T., & Adamberg, K. (2014). Degradation of Fructans and Production of Propionic Acid by *Bacteroides thetaiotaomicron* are Enhanced by the Shortage of Amino Acids. *Frontiers in Nutrition*, 1(21). doi: 10.3389/fnut.2014.00021
- Alberto, F., Bignon, C., Sulzenbacher, G., Henrissat, B., & Czjzek, M. (2004). The Three-dimensional Structure of Invertase ( $\beta$ -Fructosidase) from *Thermotoga maritima* Reveals a Bimodular Arrangement and an Evolutionary Relationship between Retaining and Inverting Glycosidases. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18903-18910. doi: 10.1074/jbc.M313911200
- Álvaro-Benito, M., Polo, A., González, B., Fernández-Lobato, M., & Sanz-Aparicio, J. (2010). Structural and Kinetic Analysis of *Schwanniomyces occidentalis* Invertase Reveals a New Oligomerization Pattern and the Role of Its Supplementary Domain in Substrate Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 285(18), 13930-13941. doi: 10.1074/jbc.M109.095430
- Anderson, K. L., & Salyers, A. A. (1989a). Biochemical Evidence that Starch Breakdown by *Bacteroides thetaiotaomicron* Involves Outer Membrane Starch-binding Sites and Periplasmic Starch-degrading Enzymes. *Journal of Bacteriology*, 171(6), 3192-3198. doi: 10.1128/jb.171.6.3192-3198.1989
- Anderson, K. L., & Salyers, A. A. (1989b). Genetic Evidence that Outer Membrane Binding of Starch is Required for Starch Utilization by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Journal of Bacteriology*, 171(6), 3199-3204. doi: 10.1128/jb.171.6.3199-3204.1989
- Avigad, G., & Bauer, S. (1966). Fructan Hydrolases. *Methods in Enzymology* (Vol. 8, pp. 621-628): Academic Press.
- Boraston, A.B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., & Davies, G. J. (2004). Carbohydrate-Binding Modules: Fine-Tuning Polysaccharide Recognition. *Biochemical Journal*, 382(3), 769-781. doi: 10.1042/bj20040892
- Bujacz, A., Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Bielecki, S., Redzyna, I., & Bujacz, G. (2011). Crystal Structures of the Apo Form of  $\beta$ -Fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its Complex with Fructose. *The FEBS Journal*, 278(10), 1728-1744. doi: doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08098.x
- Cameron, E. A., Maynard, M. A., Smith, C. J., Smith, T. J., Koropatkin, N. M., & Martens, E. C. (2012). Multidomain Carbohydrate-Binding Proteins Involved in *Bacteroides thetaiotaomicron* Starch Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 287(41), 34614-34625. doi: 10.1074/jbc.M112.397380
- Cockburn, D. W., & Koropatkin, N. M. (2016). Polysaccharide Degradation by the Intestinal Microbiota and Its Influence on Human Health and Disease. *Journal of Molecular Biology*, 428(16), 3230-3252. doi: https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.021
- Cuskin, F., Flint, J. E., Gloster, T. M., ... Gilbert, H. J. (2012). How Nature Can Exploit Nonspecific Catalytic and Carbohydrate Binding Modules to Create Enzymatic Specificity.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(51), 20889-20894. doi: 10.1073/pnas.1212034109
- D'Elia, J. N., & Salyers, A. A. (1996). Contribution of a Neopullulanase, a Pullulanase, and an Alpha-Glucosidase to Growth of *Bacteroides thetaiotaomicron* on Starch. *Journal of Bacteriology*, 178(24), 7173-7179. doi: 10.1128/jb.178.24.7173-7179.1996
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., & Forano, E. (2012). Microbial Degradation of Complex Carbohydrates in the Gut. *Gut Microbes*, 3(4), 289-306. doi: 10.4161/gmic.19897
- Foley, M. H., Cockburn, D. W., & Koropatkin, N. M. (2016). The Sus Operon: a Model System for Starch Uptake by the Human Gut *Bacteroidetes*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(14), 2603-2617. doi: 10.1007/s00018-016-2242-x
- Gilbert, H. J., Knox, J. P., & Boraston, A. B. (2013). Advances in Understanding the Molecular Basis of Plant Cell Wall Polysaccharide Recognition by Carbohydrate-Binding Modules. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(5), 669-677. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.05.005>
- Gilkes, N. R., Warren, R. A., Miller, R. C., & Kilburn, D. G. (1988). Precise Excision of the Cellulose Binding Domains from Two *Cellulomonas fimi* Cellulases by a Homologous Protease and the Effect on Catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 263(21), 10401-10407.
- Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., et al. (2006). Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science*, 312(5778), 1355.
- Guillén, D., Sánchez, S., & Rodríguez-Sanoja, R. (2010). Carbohydrate-Binding Domains: Multiplicity of Biological Roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1241-1249. doi: 10.1007/s00253-009-2331-y
- Jensen, S. L., Diemer, M. B., Lundmark, M., Larsen, F. H., Blennow, A., Mogensen, H. K., & Nielsen, T. H. (2016). Levanase from *Bacillus subtilis* Hydrolyses  $\beta$ -2,6 Fructosyl Bonds in Bacterial Levans and in Grass Fructans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 514-521. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.008>
- Jork, H., Funk, W, Fischer, W, Wimmer, H. (1990). Physical and Chemical Detection Methods: Fundamentals, Reagents I. Volume 1a *Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Methods* (pp. 179-184). Saksamaa.
- Kari, J., Olsen, J., Borch, K., Cruys-Bagger, N., Jensen, K., & Westh, P. (2014). Kinetics of Cellobiohydrolase (Cel7A) Variants with Lowered Substrate Affinity. *Journal of Biological Chemistry*, 289(47), 32459-32468. doi: 10.1074/jbc.M114.604264
- Kasperowicz, A., Pristaš, P., Piknová, M., Javorský, P., Guczyńska, W., Michałowski, T., & Kwiatkowska, E. (2010). Fructanolytic and saccharolytic enzymes of *Treponema zioleckii* strain kT. *Anaerobe*, 16(4), 387-392. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.03.003>
- Koropatkin, N. M., Martens, E. C., Gordon, J. I., & Smith, T. J. (2008). Starch Catabolism by a Prominent Human Gut Symbiont Is Directed by the Recognition of Amylose Helices. *Structure*, 16(7), 1105-1115. doi: 10.1016/j.str.2008.03.017

- Koropatkin, N. M., & Smith, T. J. (2009). SusG: A Unique Cell-Membrane-Associated  $\alpha$ -Amylase from a Prominent Human Gut Symbiont Targets Complex Starch Molecules. *Structure*, 18(2), 200-215. doi: 10.1016/j.str.2009.12.010
- Kulminskaya, A. A., Arand, M., Eneyskaya, E. V., Ivanen, D. R., Shabalin, K. A., Shishlyannikov, S. M., Saveliev, A. N., Korneeva, O. S., & Neustroev, K. N. (2003). Biochemical Characterization of *Aspergillus awamori* Exoinulinase: Substrate Binding Characteristics and Regioselectivity of Hydrolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1650(1), 22-29. doi: [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(03\)00187-0](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00187-0)
- López-Gallego, F., Acebrón, I., Mancheño, J. M., Raja, S., Lillo, M. P., & Guisán Seijas, J. M. (2012). Directed, Strong, and Reversible Immobilization of Proteins Tagged with a  $\beta$ -Trefoil Lectin Domain: A Simple Method to Immobilize Biomolecules on Plain Agarose Matrixes. *Bioconjugate Chemistry*, 23(3), 565-573. doi: 10.1021/bc2006237
- Mardo, K., Visnapuu, T., Vija, H., Aasamets, A., Viigand, K., & Alamäe, T. (2017). A Highly Active Endo-Levanase BT1760 of a Dominant Mammalian Gut Commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* Cleaves Not Only Various Bacterial Levans, but Also Levan of Timothy Grass. *PLOS ONE*, 12(1), e0169989. doi: 10.1371/journal.pone.0169989
- Mardo, K., Visnapuu, T., Vija, H., Elmi, T., & Alamäe, T. (2014). Mutational Analysis of Conserved Regions Harboring Catalytic Triad Residues of the Levansucrase Protein Encoded by the *Isc-3* gene (*Isc3*) of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61(1), 11-22. doi: 10.1002/bab.1129
- Martens, E. C., Chiang, H. C., & Gordon, J. I. (2008). Mucosal Glycan Foraging Enhances Fitness and Transmission of a Saccharolytic Human Gut Bacterial Symbiont. *Cell Host & Microbe*, 4(5), 447-457. doi: 10.1016/j.chom.2008.09.007
- Marx, S. P., Winkler, S., & Hartmeier, W. (2000). Metabolization of  $\beta$ -(2,6)-linked Fructose-Oligosaccharides by Different Bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 182(1), 163-169. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08891.x
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. doi: 10.1021/ac60147a030
- Moore, W. E. C., & Holdeman, L. V. (1974). Human Fecal Flora: The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology*, 27(5), 961-979.
- Ndeh, D., Rogowski, A., Cartmell, A., ... Gilbert, H.J. (2017). Complex Pectin Metabolism by Gut Bacteria Reveals Novel Catalytic Functions. *Nature*, 544, 65. doi: 10.1038/nature21725
- Park, J., Kim, M.-I., Park, Y.-D., Shin, I., Cha, J., Kim, C. H., & Rhee, S. (2012). Structural and Functional Basis for Substrate Specificity and Catalysis of Levan Fructotransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(37), 31233-31241. doi: 10.1074/jbc.M112.389270
- Pereira, Y., Petit-Glatron, M.-F., & Chambert, R. (2001). *yveB*, Encoding Endolevanase LevB, is Part of the *sacB-yveB-yveA* Levansucrase Tricistronic Operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 147(12), 3413-3419. doi: 10.1099/00221287-147-12-3413
- Peter, T., Herman, T., Göran, P., Jozef, D., Joel, V., Jonathan, K., Tuula, T., & Marc, C. (1988). Studies of the Cellulolytic System of *Trichoderma reesei* QM 9414. *European Journal of Biochemistry*, 170(3), 575-581. doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb13736.x

- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Escalante, A., González-Cervantes, R., Olvera, C., & López Munguía, A. (2014). Levan-Type FOS Production Using a *Bacillus licheniformis* Endolevanase. *Process Biochemistry*, *49*(5), 783-790. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.02.005>
- Pouyez, J., Mayard, A., Vandamme, A.-M., Roussel, G., Perpète, E. A., Wouters, J., Housen, I., & Michaux, C. (2012). First Crystal Structure of an Endo-Inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: Discovery of an Extra-Pocket in the Catalytic Domain Responsible for its Endo-Activity. *Biochimie*, *94*(11), 2423-2430. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.020>
- Reeves, A. R., Wang, G. R., & Salyers, A. A. (1997). Characterization of Four Outer Membrane Proteins that Play a Role in Utilization of Starch by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Journal of Bacteriology*, *179*(3), 643-649.
- Roberfroid, M. B., Van Loo, J. A. E., & Gibson, G. R. (1998). The Bifidogenic Nature of Chicory Inulin and Its Hydrolysis Products. *The Journal of Nutrition*, *128*(1), 11-19. doi: [10.1093/jn/128.1.11](https://doi.org/10.1093/jn/128.1.11)
- Sainz-Polo, M. A., Ramírez-Escudero, M., Lafraya, A., González, B., Marín-Navarro, J., Polaina, J., & Sanz-Aparicio, J. (2013). Three-dimensional Structure of *Saccharomyces* Invertase: Role of a Non-Catalytic Domain in Oligomerization and Substrate Specificity. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(14), 9755-9766. doi: [10.1074/jbc.M112.446435](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.446435)
- Saito, K., Oda, Y., Tomita, F., & Yokota, A. (2006). Molecular Cloning of the Gene for 2,6-β-d-Fructan 6-Levanbiohydrolase from *Streptomyces exfoliatus* F3-2. *FEMS Microbiology Letters*, *218*(2), 265-270. doi: [10.1111/j.1574-6968.2003.tb11527.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2003.tb11527.x)
- Salyers, A. A., Vercellotti, J. R., West, S. E., & Wilkins, T. D. (1977). Fermentation of Mucin and Plant Polysaccharides by Strains of *Bacteroides* from the Human Colon. *Applied and Environmental Microbiology*, *33*(2), 319-322.
- Schwalm, N. D., & Groisman, E. A. (2017). Navigating the Gut Buffet: Control of Polysaccharide Utilization in *Bacteroides* spp. *Trends in Microbiology*, *25*(12), 1005-1015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.06.009>
- Shipman, J. A., Cho, K. H., Siegel, H. A., & Salyers, A. A. (1999). Physiological Characterization of SusG, an Outer Membrane Protein Essential for Starch Utilization by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Journal of Bacteriology*, *181*(23), 7206-7211.
- Song, E.-K., Kim, H., Sung, H.-K., & Cha, J. (2002). Cloning and Characterization of a Levanbiohydrolase From *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953. *Gene*, *291*(1), 45-55. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00630-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00630-3)
- Sonnenburg, E. D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S. K., Firbank, S. J., Bolam, D. N., & Sonnenburg, J. L. (2010). Specificity of Polysaccharide Use in Intestinal *Bacteroides* Species Determines Diet-Induced Microbiota Alterations. *Cell*, *141*(7), 1241-1252. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.005>
- Stinglele, F., Newell, J. W., & Neeser, J.-R. (1999). Unraveling the Function of Glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*, *181*(20), 6354-6360.

- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. *Journal of Molecular Biology*, *189*(1), 113-130. doi: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Tamura, K.-i., Kawakami, A., Sanada, Y., Tase, K., Komatsu, T., & Yoshida, M. (2009). Cloning and Functional Analysis of a Fructosyltransferase cDNA for Synthesis of Highly Polymerized Levans in Timothy (*Phleum pratense* L.). *Journal of Experimental Botany*, *60*(3), 893-905. doi: [10.1093/jxb/ern337](https://doi.org/10.1093/jxb/ern337)
- Velázquez-Hernández, M. L., Baizabal-Aguirre, V. M., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M. P., & Valdez-Alarcón, J. J. (2009). Microbial Fructosyltransferases and the Role of Fructans. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(6), 1763-1778. doi: [10.1111/j.1365-2672.2008.04120.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04120.x)
- Visnapuu, T., Mardo, K., Mosoarca, C., Zamfir, A. D., Vigants, A., & Alamäe, T. (2011). Levansucrases from *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: Substrate Specificity, Polymerizing Properties and Usage of Different Acceptors for Fructosylation. *Journal of Biotechnology*, *155*(3), 338-349. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.07.026>
- Wanker, E., Huber, A., & Schwab, H. (1995). Purification and Characterization of the *Bacillus subtilis* Levanase Produced in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(5), 1953-1958.
- Xie, H., Bolam, D. N., Nagy, T., Szabó, L., Cooper, A., Simpson, P. J., Lakey, J. H., Williamson, M. P., & Gilbert, H. J. (2001). Role of Hydrogen Bonding in the Interaction between a Xylan Binding Module and Xylan. *Biochemistry*, *40*(19), 5700-5707. doi: [10.1021/bi010034z](https://doi.org/10.1021/bi010034z)
- Xu, J., Bjursell, M. K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L. K., Chiang, H. C., Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2003). A Genomic View of the Human-*Bacteroides thetaiotaomicron* Symbiosis. *Science*, *299*(5615), 2074.
- Xu, J., & Gordon, J. I. (2003). Honor thy Symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(18), 10452-10459. doi: [10.1073/pnas.1734063100](https://doi.org/10.1073/pnas.1734063100)

## KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

[www.cazy.org](http://www.cazy.org)

[www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html](http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html)

[https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)

<http://pfam.xfam.org/>

# LIHTLITSENTS

Mina, Emma Johanna Sova (sünnikuupäev 04.10.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**Endo-levanaas BT1760: hüpoteetilise CBM-motiivi rolli uurimine,**

mille juhendajad on Tiina Alamäe ja Karin Ernits,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018