

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

***Bacteroides thetaiotaomicron*'i endo-levanaasi lektiinmärgisega valgu puhastamine,
biokeemiliste omaduste kindlakstegemine ja immobiliseerimine agarosmaatriksile**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Luiza Tolokonnikova

Juhendaja kaasprofessor Triinu Visnapuu, PhD

INFOLEHT

***Bacteroides thetaiotaomicron*'i endo-levanaasi lektiinmärgisega valgu puhastamine, biokeemiliste omaduste kindlakstegemine ja immobiliseerimine agarosmaatriksile**

Bacteroides thetaiotaomicron (*Bt*) on üks olulistest inimese jämesooles elavatest bakteritest, mis lagundab paljusid polüsahhariide oligosahhariidideks. *Bt* ensüüm endo-levanaas BT1760 võimaldab bakteril levaani (fruktoosi polümeeri) kasutada ning tekivad levaani-tüüpi fruktooligosahhariidid (LOS-id), mis on potentsiaalsed prebiootikumid. Ensüümide immobilisatsioon kandjale võimaldab selle korduvkasutust ja suurendab produkti hulka. Käesolevas bakalaureusetöös kasutati agaros-seonduva lektiinimärgisega (LSLt) BT1760 ühendvalku. Töö eesmärgiks oli kindlaks teha LSLt-BT1760 biokeemilised omadused ja hinnata magnetilisele agarosmaatriksile immobiliseeritud LSLt-BT1760 korduvkasutamise võimalust levaanist LOS-ide tootmiseks. Tulemused näitasid, et LSLt lisamine ei mõjuta oluliselt BT1760 ensümaatilist aktiivsust ega kineetilisi parameetreid, kuid tõstab mõnevõrra temperatuuristabiilsust. LSLt-BT1760 magnetilisele agarosmaatriksile seondumine on piisavalt stabiilne, et tsüklite vältel on võimalik kasutada seda katalüüsijat LOS-ide tootmiseks.

Märksõnad: glükosiidi hüdrolaas, endo-levanaas, fruktooligosahhariidid, ensüümi immobiliseerimine, magnetiline agarosmaatriks

CERCS kood: P310 Proteiinid, ensümolooogia, T490 Biotehnoloogia

Purification of lectin-tagged endo-levanase from *Bacteroides thetaiotaomicron*, characterization of its biochemical properties and immobilization on agarose matrix

Bacteroides thetaiotaomicron (*Bt*) is an important bacterium in the human gut that degrades diverse polysaccharides into oligosaccharides. The endo-levanase of *Bt*, BT1760, cleaves levan (a fructose polymer) into levan-type fructooligosaccharides (LOSs). These may have prebiotic properties. Immobilization of an enzyme to the carrier facilitates continuous use of the enzyme and enhances the product yield. This thesis explores the potential of lectin-derived affinity tag (LSLt) for immobilization of BT1760. The main aim of the thesis was to biochemically characterize LSLt-BT1760 fusion protein and evaluate the immobilization properties of LSLt-BT1760 to magnetic agarose matrix in order to reuse the catalyst for LOSs synthesis. Results showed that adding LSLt did not significantly affect enzymatic activity and kinetic properties, somewhat increased temperature stability of LSLt-BT1760 and the catalyst can be used repeatedly due to rather stable immobilization.

Keywords: glycoside hydrolase, endo-levanase, fructooligosaccharides, enzyme immobilization, magnetic agarose matrix

CERCS code: P310 Proteins, enzymology; T490 Biotechnology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Fruktaanide leidumine looduses, põhiomadused ja süntees	7
1.2. Fruktaanide funktsioonid ja kasutamine.....	8
1.3. Mikroorganismide endo-levanaasid	9
1.4. Jämesoolebakteri <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> omadused ja roll inimese sooles..	10
1.4.1. <i>B. thetaiotaomicron</i> 'i levaani lagundamise võime	11
1.4.2. <i>B. thetaiotaomicron</i> 'i endo-levanaasi BT1760 struktuur ja omadused	12
1.5. Ensüümide puhastamise ja immobiliseerimise võimalused erinevate meetodite ja märgiste abil	14
1.5.1. Lektiinimärgis LSLt ja selle kaudu valkude immobiliseerimine agarosmaatriksile	17
2. EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1. Töö eesmärgid	19
2.2. Materjal ja meetodika.....	19
2.2.1. Kasutatud bakteritüvi, plasmiidid ja transformatsioon.....	19
2.2.2. Endo-levanaasi variantide ekspresseerimine <i>E. coli</i> 's	20
2.2.3. Rakuekstraktide valmistamine, endo-levanaaside puhastamine ja valgu kontsentratsiooni määramine	20
2.2.4. Endo-levanaaside variantide aktiivsuse määramine	23
2.2.5. LSLt-BT1760 kineetiliste parameetrite määramine	23
2.2.6. Temperatuurioptimumi ja temperatuuristabiilsuse määramine, säilivuse hindamine	24
2.2.7. LSLt-BT1760 sidumine magnetilisele agarosmaatriksile ja LOS-ide tekke reaktsiooni korratavuse testimine	24
2.2.8. Arvutipõhised meetodid	25
2.3. Tulemused ja arutelu	26
2.3.1. His ₆ -märgisega ja lektiinmärgisega endo-levanaasi ekspresseerimine ja puhastamine	26
2.3.2. Lektiinmärgisega endo-levanaasi biokeemilised omadused.....	28

2.3.3. Lektinmärgisega endo-levanaasi sidumine magnetilistele kandjale ja kompleksi korduvkasutamise võimalikkuse testimine	31
2.3.4. LSLt-ga sarnaste järjestuste analüüs	36
KOKKUVÕTE	37
RESÜMEE	39
TÄNUSÕNAD	41
KIRJANDUSE LOETELU.....	42
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	52
LISAD	53
LISA 1	53
LISA 2	54
LIHTLITSENTS.....	55

KASUTATUD LÜHENDID

Amp – ampitsilliin

4B – 4% polümeeriseeritud agaros

4B-CL – 4% ristseotud polümeeriseeritud agaros (*cross-linked agarose*)

Bt – *Bacteroides thetaiotaomicron*

BT1760 – *Bacteroides thetaiotaomicron*'i endo-levanaas

BT1760Cter – C-terminaalse His₆-märgisega BT1760, BT1760-His₆

BTL2 – lipaas bakterist *Geobacillus thermocatenolatus*

Cap – sea tsirkoviiruse kapsiidi valk

CAZy – *Carbohydrate-active enzymes database*

CBM – süsivesikutega seonduv moodul (*carbohydrate-binding module*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid

DNSA – 3,5-dinitrosalitsüülhape

ε – ekstinktsioonikoefitsent [$1/(M \times cm)$]

FOS – fruktooligosahhariid

GH – glükosiidi hüdrolaas

HPLC – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (*high performance liquid chromatography*)

IE – immobiliseeritud ensüüm

k_{cat} – katalüütiline konstant (1/s)

k_{cat}/K_m – katalüütiline efektiivsus [$1/(mg/ml) \times s$]

K_m – kanamütsiin

K_m – kineetiline aktiveerimiskonstant (mg/ml)

LOS – levaani-tüüpi fruktooligosahhariid

LSLt – lektiinmärgis (LSL₁₅₀)

LSLt-BT1760 – lektiinmärgisega BT1760

MBP – maltoosiga seonduv valk (*maltose-binding protein*)

M_w – molekulmass (*molecular weight*, Da)

PA, DP – polümerisatsiooniaste (*degree of polymerization*)

PUL – polüsahhariidide kasutamise lookus (*polysaccharide utilization locus*)

Sus – tärklise kasutamise lookus (*starch utilisation system*)

TEV – tubaka söövitav viirus (*tobacco etch virus*)

TLC – õhukese kihi kromatograafia, planaarkromatograafia (*thin layer chromatography*)

V_{max} – maksimaalne reaktsioonikiirus (U/mg)

SISSEJUHATUS

Inimese jämesooles elavad probiootilised bakterid, mille metaboolisel aktiivsusel ja ainevahetusproduktidel on inimese tervisele positiivne mõju. Paljud neist bakteritest on võimelised lagundama jämesooles erinevaid toiduga saadud kiudaineid nagu näiteks polüsahhariide, mis annab neile võrreldes teiste mikroorganismidega, sh patogeensete bakteritega, kasvueelise. Polüsahhariidide lagundamisel endo-aktiivsusega glükosiidi hüdrolaasidega (GH-dega) tekivad lühema ahelapikkusega oligosahhariidid. Mitmed polü- ja ka oligosahhariidid on jämesoolebakterile prebiootilise toimega – nad soodustavad probiootiliste bakterite kasvu ja neil on tervisele kasulikke mõjusid.

Fruktaanide hulka kuuluvad taimne inuliin ja inuliini-tüüpi fruktooligosahhariidid (FOS-id) on tuntud prebiootikumid, mida kasutatakse laialdaselt toiduainetööstuses funktsionaalsete toidukomponentidena. Lisaks on fruktaanidel mitmeid potentsiaalseid kasutusalasid biotehnoloogias, kosmeetika- ja farmaatsiatööstuses. Levaani põhiahela moodustavad β -2,6-sidemetega seotud fruktoosijäägid. Polümeerset levaani sünteesivad mikroorganismid ja ka taimed arvatavasti rakkude kaitseks kuivamise jt stressitingimuste eest. Levaan ja levaani-tüüpi fruktooligosahhariidid (LOS-id) on potentsiaalsed prebiootikumid ja võiksid leida kasutust toidutehnoloogias. Nende omaduste täpsemaks väljaselgitamiseks ja kasutuselevõtuks on vajalik leida võimalusi levaanide ja LOS-ide kulutõhusaks tootmiseks näiteks immobiliseeritud ensüümide abil.

Bacteroides thetaiotaomicron (*Bt*) on üks imetajate jämesooles elavatest sümbiontsetest bakteritest, mis suudab lagundada paljusid erinevaid polüsahhariide. On teada, et *Bt* kodeerib 88 erinevat polüsahhariidide kasutamise lookust (*polysaccharide utilisation locus*, PUL), nende hulgas ka levaani lagundamise PUL-i. Fruktaanide kasutamise PUL sisaldab glükosiidi hüdrolaaside hulka kuuluvat endo-levanaasi BT1760, mis võimaldab bakteril efektiivselt nii bakteriaalset kui ka taimset levaani fruktooligosahhariidideks lagundada. Seega sobib see endo-levanaas levaanist LOS-ide tootmiseks. BT1760 kristallstruktuur on 2019. aastal kindlaks tehtud samas töögrupis, kus antud bakalaureusetöö koostati, ja selle reaktsioonimehhanismi on selgitatud.

Selle bakalaureusetöö põhieesmärk oli kindlaks teha seenest *Laetiporus sulphureus* pärineva lektiinimärgisega (LSLt) endo-levanaasi BT1760 levaani hüdrolüüsi aktiivsus, kineetika ja temperatuuristabiilsus. Kuna LSLt võimaldab ensüümi sidumist agarosmaatriksile, siis immobiliseeriti LSLt-BT1760 ühendvalk magnetilistele agaroskerakestele, et hinnata süsteemi korduvkasutamise võimalikkust levaanist LOS-ide tootmiseks.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Fruktaanide leidumine looduses, põhiomadused ja süntees

Polüsahhariidid on väga laialt levinud looduslikud ained. Maakeral tekkiv biomass koosneb suurel määral erinevatest polüsahhariididest – tselluloosist, hemitselluloosist, tärklisest, kitiinist, fruktaanidest jne. Looduses leidub mitmesuguseid fruktaane, mida sünteesivad paljud taimed, hallitusseened, bakterid ja ka arhed. (Vijn ja Smeekens, 1999; Versluys *et al.*, 2018; Kirtel *et al.*, 2019) Taimedes leidub eelkõige inuliini, mis on β -2,1-sidemetega lineaarne fruktaan, aga ka hargnenud struktuuriga fruktaane – graminaani ja agaviini. Mõnedes taimedes, eelkõige kõrrelistes, leidub ka β -2,6-sidemetega ühendatud levaani. Taimede fruktaanid on valdavalt madala polümeerisatsiooniastmega (PA) ja neid sünteesitakse sahharoosist vakuoolides vähemalt kahe transfruktosüüliva ensüümi abil. (Vijn ja Smeekens, 1999; Ritsema ja Smeekens, 2003; Versluys *et al.*, 2018)

Mikroobse päritoluga fruktaane sünteesitakse peamiselt sahharoosist ekstratsellulaarsete ensüümidega: levaansukraasi (EC 2.4.1.10) või inulosukraasiga (EC 2.4.1.9). Bakteritel ja arhedel piisab ühest ensüümist, et sünteesida suure molekulmassiga ja kõrge PA-ga fruktaani (Visnapuu *et al.*, 2015; Kirtel *et al.*, 2019; Ghauri *et al.*, 2021). Levaansukraasi geene on leitud paljudes nii grampositiivsetes kui ka gramnegatiivsetes bakterites: *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*), *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Zymomonas mobilis*, *Pseudomonas syringae* jpt (Li ja Ullrich, 2001; Martínez-Fleites *et al.*, 2005; Homann *et al.*, 2007; Visnapuu *et al.*, 2015; Öner *et al.*, 2016; Raga-Carbajal *et al.*, 2016). Levaansukraas esineb lisaks paljudele keskkonnas elavatele liikidele ka sellistel bakteritel nagu batsillid ja laktobatsillid, mis koloniseerivad inimese jämesoolt (Lombard *et al.*, 2014). Levaansukraase ja nende produkte on biokeemiliselt rohkem uuritud ja neil on tuvastatud mikroobide hulgas laiem levik kui inulosukraasidel, mida ei ole veel leitud gramnegatiivsetest bakteritest (Ni *et al.*, 2019). Viimased avastused näitavad, et ka mõned halofiilsed arhed sünteesivad inuliini ja levaani (Kirtel *et al.*, 2019; Ghauri *et al.*, 2020).

Levaani põhiahelaks on β -2,6-sidemetega ühendatud fruktoosi polümeer, millel võib esinda hargnemisi β -2,1-sidemete kaudu (Öner *et al.*, 2016). Levaani molekulmass, PA ja hargnemiste määr varieeruvad erinevates levaani produtseerivates organismides. Üldjuhul on bakterite levaanil suurem molekulmass kui taimede levaanil selle kõrgema hargnemiste määra ja PA tõttu. Taimede levaanide molekulmassid jäävad vahemikku 2-33 kDa ja bakterite fruktaanid on neist kuni mitu suurusjärku suurema molekulmassiga ulatudes mitmekümnete MDa-ni. (Banguela ja Hernández, 2006; Barone ja Medynets, 2007) Näiteks risosfääris elaval bakteri *Bacillus aryabhattai* GYC2-3 levaani keskmine molekulmass on ligi 53 MDa ($5,317 \times 10^7$ Da)

(Nasir *et al.*, 2020). Erakordselt suure molekulmassiga levaani ($M_w = 2466$ MDa) sünteesib äädikhappebakter *Kozakia baliensis* (Jakob *et al.*, 2013). Mitmetel bakterite levaansukraasidel on näidatud nii mitteprotsessiivset kui ka protsessiivset levaani sünteesimise moodust, kus vastavalt tekib vastavalt madalmolekulaarne ja kõrgmolekulaarne levaan. Näiteks on leitud, et *B. subtilis*'e ensüüm SacB sünteesib levaani fraktsioone keskmise M_w -ga 7,2 kDa ja 2,3 MDa, mille osakaal sõltub ensüümi sisaldusest reaktsioonisegus, temperatuurist, reaktsioonipuhvri ioonsest jõust ning orgaaniliste lahustite sisaldusest (Öner *et al.*, 2016; Raga-Carbajal *et al.*, 2016, 2018). Kaht levaani fraktsiooni sünteesib ka Lsc3 bakterist *Pseudomonas syringae* pv. tomato, mille puhul tekivad levaanid keskmiste molekulmassidega 10,7 kDa ja 4,7 MDa. Levaanilahuse dialüüsamise käigus on võimalik eemaldada nii FOS-id kui ka madalmolekulaarne levaan. (Mardo *et al.*, 2017)

Bakteriaalse levaani hargnemiste määr jääb 5-10% piiresse. Näiteks on *Bacillus aryabhatai* GYC2-3 levaanil tuvastatud 5,19% hargnemisi (Nasir *et al.*, 2020) ning *Erwinia herbicola* (*Pantoeae agglomerans*) levaanil ligi 5% (Blake *et al.*, 1982).

Levaan lahustub hästi vees ja õlis ning ei lahustu orgaanilises lahustites, va dimetüülsulfoksiidi (DMSO) lahuses. Võrreldes lineaarse inuliiniga on levaani lahustuvus tunduvalt parem (Manandhar *et al.*, 2009; Öner *et al.*, 2016). Vesilahustes on kindlaks tehtud, et võivad moodustada levaani nanoosakesed (Ağçeli ja Cihangir, 2020). Levaanilahuste viskoossus on väike ning toatemperatuuril jääb levaani lahus vedelikuks, erinedes selle poolest paljudest teiste polüsahhariidide sama kontsentratsioonide vesilahustest, mis geelistuvad või jäävad suspensiooniks (Manandhar *et al.*, 2009; Öner *et al.*, 2016).

Levaanil on suur vee sidumise ja hoidmise võime, sest levaan võib siduda samapalju vett kui aine ise kaalub. Keemiliselt on levaan väga stabiilne polümeer olles vastupidav kõrgele temperatuurile, sest laguneb alles temperatuuril 225°C, ning on vastupidav aluselistes aga ka nõrgalt happelistes tingimustes. Ka mikrobioloogiliselt on levaan suhteliselt stabiilne, sest spetsiifiliselt levaani lagundavaid mikroobe on vähe. (Marx *et al.*, 2000; Öner *et al.*, 2016; Mardo *et al.*, 2017; Domžal-Kędzia *et al.*, 2019)

1.2. Fruktaanide funktsioonid ja kasutamine

Bakterid ja arhed sünteesivad levaani rakkude kaitseks stressitingimuste vastu nagu madal temperatuur, kuivus ja kõrge soolsus ning taimepatogeenide puhul ka taimede koloniseerimiseks. Levaan aitab mikroobidel moodustada biofilmi (Dogsa *et al.*, 2013; Limoli *et al.*, 2015).

Arvatakse, et levaani ja LOS-id on potentsiaalsed prebiootikumid (Marx *et al.*, 2000; Adamberg *et al.*, 2015, 2018). Kõige rohkem uuritud ja kasutatud prebiootikumid on inuliin ja inuliini-

tüüpi FOS-id, mida eraldatakse taimedest. Inuliin on 2015. aastast alates Euroopa Liidus kinnitatud prebiootikum (COMMISSION REGULATION, EU 2015/2314; <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R2314;ajfrom=FR>).

Prebiootikumid on toidus esinevad ained, mis soodustavad probiootiliste bakterite kasvu ning millel on seega organismi talitlusele positiivseid mõjusid. Prebiootikume saab funktsionaalsete komponentidena toidutoodete koostisse lisada ja sellega stimuleerida soolekoosluse probiootiliste bakterite kasvu ning parandada erinevaid tervisenäitajaid (Gibson *et al.*, 1995, 2017; Verspreet *et al.*, 2016). Prebiootikume metaboliseerivad jämesooles elavad bakterid ja nendest toodetakse lühikese ahelaga rasvhappeid: laktaati, atsetaati, propionaati ja butüraati. Sellistel ainetel on inimese jaoks kasulikud omadused, näiteks butüraat on põhiline energeetiline aine sooleepiteeli rakkudele. Rasvhapped hoiavad sooles sobivat happesust ja osmootset rõhku. Lisaks alandavad lühikese ahelaga rasvhapped sooles pH-d, takistades patogeenide kasvu. Prebiootikumid parandavad seedimist, soodustavad mineraalide imendumist ja ka toimivad signaalmolekulidena. (Saulnier *et al.*, 2009; Cockburn ja Koropatkin, 2016; Verspreet *et al.*, 2016). On näidatud, et prebiootikumid alandavad kehakaalu. Näiteks leiti, et lastel vähenes keharasva osakaal oligofruktoosiga rikastatud inuliini tarbimise tulemusel (Nicolucci *et al.*, 2017).

Lisaks levaanile kui funktsionaalsele toidukomponendile on sellele välja pakutud mitmeid potentsiaalseid kasutusalasid tööstuses ja tehnoloogia valdkonnas. Näiteks peetakse levaani sobivaks naha niisutamisel ja kaitsmisel, emulgeerijana ja stabiliseerijana, kapslimaterjalina toiduainetööstuses või meditsiinis, metallilisi nanokerakesi stabiliseeriva kattematerjalina, haava paranemise soodustajana, viirus- ja kasvajakavastase ainenä (Bondarenko *et al.*, 2016; Öner *et al.*, 2016; Oner ja Combie, 2019). Inuliinist eristab levaani viimase parem lahustuvus, kõrgem keskmine M_w , veidi parem stabiilsus maohappes, efektiivne filmi moodustamise ja veesidumise võime (Öner *et al.*, 2016; Mardo *et al.*, 2017; Oner ja Combie, 2019).

1.3. Mikroorganismide endo-levanaasid

Levanaasid on ensüümid, mis lagundavad β -2,6-glükosiidsidemeid rohkem kui kolme fruktoosi jääki sisaldavates fruktoosist koosnevates sahhariidides. Levanaasid jagatakse endo- ja eksolevanaasideks. Endo-levanaasid (EC 3.2.1.65) viivad läbi sideme katkemise levaaniahela keskelt, mille tulemusena tekivad levaan-tüüpi oligosahhariidid, ning eksolevanaasid (EC 3.2.1.154) alustavad levaani hüdrolyüüsi levaaniahela otsast vabastades substraadist fruktoosi (Porrás-Domínguez *et al.*, 2014; Jensen *et al.*, 2016; Mardo *et al.*, 2017; Ernits *et al.*, 2019). Endo-levanaasid kuuluvad glükosiidi hüdrolaaside GH32 hulka, mis CAZy (*Carbohydrate-active enzymes database*; www.cazy.org) klassifikatsiooni järgi sarnanevad omavahel valkude

aminohappelise järjestuse ning konformatsiooni poolest. Kõigil GH32 ensüümidel on sarnane põhistruktuur: N-terminaalses osas on 5-labalise β -propelleri struktuuriga katalüütiline domeen ja C-terminaalne osas β -lehtedest koosneva lisadomeeniga (vt Joonis 1 ja 2). (Lombard *et al.*, 2014; Mardo *et al.*, 2017; Ernits *et al.*, 2019) On näidatud, et C-terminaalne β -sandwich domeen on vajalik endo-levanaasi korrektseks voltimiseks, stabiilsuseks ja lahustuvuse tagamiseks (Ernits *et al.*, 2019).

Praeguste teadmiste kohaselt esineb spetsiifilisi endo-levanaase väga vähestel organismidel. Endo-levanaase on leitud kiudaineid lagundavatel bakteriliikidest *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lehensis*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Azotobacter chroococcum* ja *Bacteroides thetaiotaomicron* (*Bt*) (Sonnenburg *et al.*, 2010; Porrás-Domínguez *et al.*, 2014; Jensen *et al.*, 2016; Kasperowicz *et al.*, 2016; Mardo *et al.*, 2017; Fattah *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2019; Hövels *et al.*, 2021). On leitud, et bakteriaalsed endo-levanaasid võivad hüdrolüüsida nii taimset kui bakteriaalset levaani, kuid β -2,1 sidet inuliinis ei lagundata. Reaktsiooniproduktidena tekivad LOS-id valdavalt PA-ga 2-8 (Jensen *et al.*, 2016; Mardo *et al.*, 2017; Hövels *et al.*, 2021). Madala aktiivsusega *B. licheniformis*'e endo-levanaas LevB1 eelistab substraadina lineaarseid ilma hargnemisteta levaane, mis on madalmolekulaarsed (Porrás-Domínguez *et al.*, 2014). *Bt* endolevanaasi BT1760 reaktsioonikiirus on ligi 300 korda suurem kui ensüümil LevB1 (Mardo *et al.*, 2017). Hiljuti kirjeldatud *A. chroococcum*'i endo-levanaasi LevB2286 katalüütiline aktiivsus osutus sellest veel ligi 20 korda kõrgemaks (6685 U/mg), mis teeb sellest kõige aktiivsema ensüümi seni kirjeldatud endo-levanaasidest (Hövels *et al.*, 2021).

Aktiivsetel endo-levanaasidel on seega potentsiaali leida rakendust biotehnoloogias LOS-ide tootmiseks. LOS-e ei ole praegu võimalik konkurentsivõimelise hinnaga osta, et teha kindlaks LOS-ide toimeid ja kasutusvõimalusi. Levaanbioosi (PA 2) ja levaantrioosi (PA 3) pakub firma Megazyme ning nende suhkrute hinnaks on vastavalt 146 EUR/20 mg ja 162 EUR/20 mg (www.megazyme.com).

1.4. Jämesoolebakteri *Bacteroides thetaiotaomicron* omadused ja roll inimese sooles

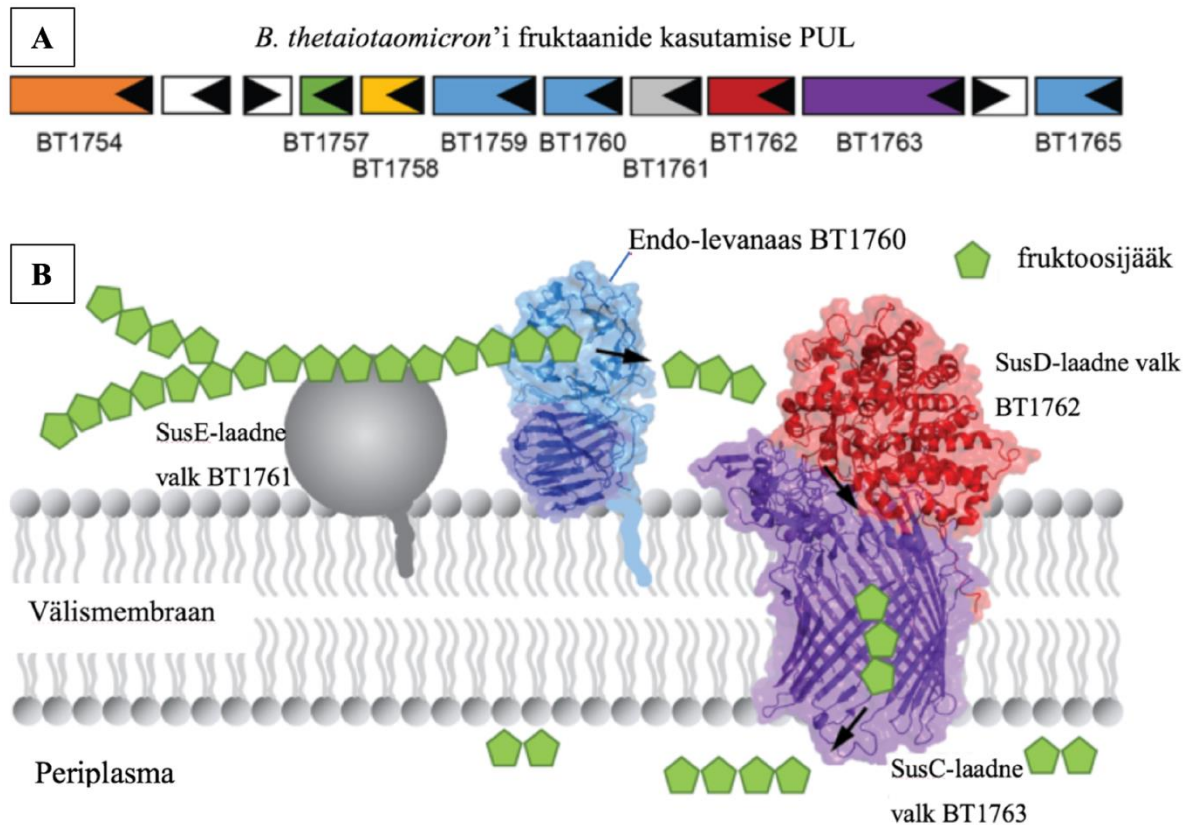
Jämesooles on kõige arvukamad bakterite hõimkondade *Firmicutes* ja *Bacteroidetes* esindajad (Eckburg *et al.*, 2005). *Bacteroidetes*'e hõimkonda kuulub seltsi *Bacteroidales*, milles on arvukate liikmetega perekonnad: *Bacteroides*, *Parabacteroides* ja *Prevotella*. *Bacteroides*'e perekonna bakteritest on leitud suurel arvul erinevaid ensüüme polüsahhariidide lagundamiseks. Seega selle perekonna bakterid sobivad inimese jämesoole koloniseerimiseks, sest seal esineb nii toidust kui ka soolelimast pärit polüsahhariide (Flint *et al.*, 2012; Cockburn

ja Koropatkin, 2016). *Bacteroides*'e perekonda kuulub *Bt*, mille genoomi suurus on 6,26 Map (megaaluspaari). Genoomis leiti palju geene, mis kodeerivad polüsahhariide lagundavaid ensüüme – 226 glükosiidi hüdrolaasi ja 15 polüsahhariidi lüaasi – ning kokku tuvastati 88 polüsahhariidide kasutamise lookust (PUL) (Sonnenburg *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2011). *Bt* on üks kõige suurema glükosiidi hüdrolaaside arvuga sekveneeritud prokariot ja on seega võimeline paljusid erinevaid glükosiidsidemeid hüdrolyüsima.31.05.2021 12:06:00 On näidatud, et *Bt* kasutab selliseid polüsahhariide nagu arabinaani, arabinogalaktaani, amülopektiini, kondroitiinsulfaati, dekstraani, hepariini, levaani, α -mannaani, pektiinset galaktaani, polügalakturoonhapet, rhamnogalakturonaani. (Sonnenburg *et al.*, 2010; Schwalm III *et al.*, 2017)

1.4.1. *B. thetaiotaomicron*'i levaani lagundamise võime

Bt lagundab levaani PUL-is kodeeritud spetsiifiliste valkude abil. Nad on vajalikud polüsahhariidi sidumiseks rakule, polüsahhariidi hüdrolyüsiks oligosahhariidideks ja nende transpordiks periplasmasse ning geenide ekspressiooni regulatsiooniks (Sonnenburg *et al.*, 2010; Ernits *et al.*, 2019).

Bt PUL-de prototüübiks peetakse tähtsuse kasutamise Sus (*starch utilisation system*) lookust. Selle lookuse geenid kodeerivad tähtsuse kasutamiseks vajalikke ensüüme (Anderson ja Salyers, 1989a, 1989b). *Bt* levaani lagundamise ensüümid jt vajalikud valgud kodeeritakse fruktaanide PUL-is (Joonis 1A), kus on 9 levaani kasutamisega seotud geeni, millest 7 on homoloogsed Sus lookuse geenidega. BT1754 on sisemembraaniga seotud sensor-regulaator, mis tunneb periplasmas ära fruktoosi ja aktiveerib operoni transkriptsiooni. BT1757 on fruktokinaas ja BT1758 on sisemembraanis olev monosahhariidi transporter. PUL-is kodeeritakse kolm glükosiidi hüdrolaasi: BT1759 ja BT1765 (raku tsütoplasma ekso-fruktanaasid) ning BT1760, mis on välismembraani kinnitunud endo-levanaas. Ekso-levanaasid ei ole levaanspetsiifilised, nad on võimelised ka inuliini lagundama. BT1761 ja BT1762 on välismembraanis asuvad polüsahhariidi siduvad lipoproteiinid, mis on levaanspetsiifilised, st nad seonduvad ainult levaaniga, aga nendel puudub levaani hüdrolyüsivõime. BT1763 on välismembraani transportporiin, millega transporditakse tekkinud LOS-id periplasmasse. Kõige olulisem komponent levaani lagundamisel on endo-levanaas BT1760. Kuna BT1760 ei ole võimeline mõne muu valgu abil levaani rakupinnale siduma, siis selleks kasutatakse eelpoolmainitud polüsahhariidi siduvad valke BT1761 ja BT1762 (Joonis 1B). Leiti, et mitmed teised *Bacteroides*'e perekonna teised bakterid ei ole võimelised levaani lagundama, seega on *Bt* teadaolevalt ainus bakter sellest perekonnast, mis kasutab levaani. (Sonnenburg *et al.*, 2010; Ernits *et al.*, 2019)



Joonis 1. Gramnegatiivse bakteri *B. thetaiotaomicron* fruktaanide kasutamise PUL. **(A)** Levaani kasutamise lookuse geenide organisatsioon. Erinevad lookusesse kuuluvad valku kodeerivad geenid on märgitud erinevate värvidega. **(B)** Raku pinnale levaani seostumise, selle hüdrolüüsi ja tekkinud hüdrolüüsiproduktide transpordi mehhanismide skemaatiline joonis. Joonis on modifitseeritud artiklist Ernits *et al.* (Ernits *et al.*, 2019).

1.4.2. *B. thetaiotaomicron*'i endo-levanaasi BT1760 struktuur ja omadused

BT1760 on oma peremehes raku välismembraaniga seotud endo-levanaas, mis suudab spetsiifiliselt hüdrolüüsida ainult levaanis ja pikema ahelaga LOS-ides esinevat glükosiidsidet. Substraadina kasutab BT1760 erinevaid levaane: bakteriaalse (toodetud *B. subtilis*'e, *Z. mobilis*'e, *P. syringae* pv. tomato, *E. herbicola*, *Halomonas smyrnensis* levaasukraaside või levaansukraasi-ekspresserivate rakkudega) ja taimse päritoluga levaani (eraldatud harilikust timutist, *Phleum pratense*). BT1760 hüdrolüüsib polüsahhariidset levaani oligosahhariidideks PA-ga 2-13. Võrreldes enamiku teiste seni iseloomustatud endo-levanaasidega on BT1760 kõrgema aktiivsusega. Tehti kindlaks, et kui substraadina kasutada levaansukraasiga Lsc3 sahharoosist sünteesitud levaani, siis C-terminaalse His₆-märgisega BT1760 (BT1760Cter) katalüütilise konstanti väärtus (k_{cat}) oli 466,8 1/s ja katalüütiline efektiivsus (k_{cat}/K_m) 34,3 1/(mg/ml)×s. Taimse levaani osutus veelgi efektiivsemaks substraadiks, mille puhul k_{cat} oli 901,1 1/s ja $k_{cat}/K_m = 79,7$ 1/(mg/ml)×s (Mardo *et al.*, 2017). Näidati, et BT1760-l on kõige suurem afiinsus väikese molekulmassiga (<60 kDa) levaanide suhtes ning kõige suurem levaani

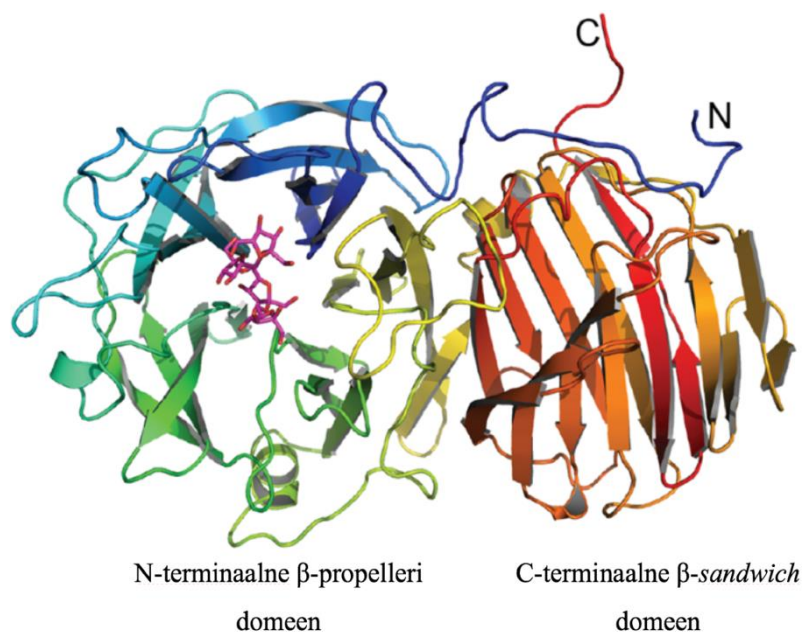
konverteerimise efektiivsus (k_{cat}/K_m) oligosahhariidideks oli väikese molekulmassiga bakteriaalsel levaanil, mis oli sünteesitud kasutades *P. syringae* levaansukraasi Lsc3 mutanti Asp300Asn, mis kõrgmolekulaarset levaani ei sünteesi. (Mardo *et al.*, 2017)

Kuna soolestikus on happeline keskkond, siis ka raku pinnaga seotud ensüümi pH optimum on vahemikus 4,5-6,5. Kõrgeim katalüütiline aktiivsus on ensüümil pH vahemikus 5.5-6.0. Endolevanaasi temperatuuri optimum on 50°C ja selle sulamistemperatuur T_m on 51,5°C. *B. licheniformis*'e endolevanaasi LevB1 jaoks optimaalne oli pH 6,0 ja suurim aktiivsus määrati temperatuuril 35°C (Porras-Domínguez *et al.*, 2014). *A. chroococcum*'i endolevanaasi LevB2286 katalüütiline aktiivsus osutus kõige suuremaks pH väärtusel 6,2 juures ja selle temperatuuri optimum oli temperatuuril 45°C (Hövels *et al.*, 2021). On teada, et BT1760 säilitab oma stabiilsuse ja aktiivsuse inimese kehatemperatuuril (37°C). Ensüümi biotehnoloogilist potentsiaali näitab see, et 1 mg BT1760 valku on võimeline optimaalsetes reaktsioonitingimustes produtseerima 1 g LOS-e. (Mardo *et al.*, 2017)

Saadi BT1760 endolevanaasi kristallid ja lahendati selle 523 aminohappes koosnev 3D struktuur. Ensüüm koosneb kahest domeenist: N-terminaalne katalüütiline 5-labalise β -propelleri struktuuriga domeen ja C-terminaalne β -sandwich domeeni (Joonis 2). BT1760 kaotab oma aktiivsuse ja stabiilsuse ning hakkab välja sadenema, kui eemaldada C-terminaalne domeen. Mõlemad domeenid on vajalikud ka levaani sidumiseks ensüümile, et reaktsiooni oleks võimalik läbi viia. Katalüütilises tsentris on 3 katalüütilist happelist aminohapet (nn katalüütiline kolmik), mis on tüüpilised GH32 valkude jaoks. BT1760 katalüütiline kolmik koosneb nukleofiilist (Asp41), stabiliseerijast (Asp169) ja hape/alus katalüüsijast (Glu221).

C-terminaalsel domeenil on β -sandwich struktuur, mis moodustub kahest β -lehest, mis omakorda koosnevad 7 ja 8 antiparalleelsest β -ahelast (Joonis 2). Ernits *et al.* (2019) näitasid, et BT1760 C-terminaalsel domeenil on süsivesikutega seonduvate moodulitega (CBM-idega) sarnane struktuur. C- ja N-terminaalsed domeenid on omavahel seotud lühikese α -heeliksiga 339 PDAIDR 344 . (Ernits *et al.*, 2019)

CAZy andmebaasis on 13 GH32 valkude struktuuri. BT1760 valgujärjestuse identsus nendega on väga madal (14,1-20,6%). BT1760 kõige suurem valgujoonduse identsus on *B. subtilis*'e eksolevanaasiga SacC (UniProt: P05656). Valkude kõige konserveerunud regioonid asuvad katalüütilise kolmiku aminohapete ümbruses ning on seotud substraadi fikseerimise ja reaktsiooni läbiviimisega (Joonis 2). (Ernits *et al.*, 2019)



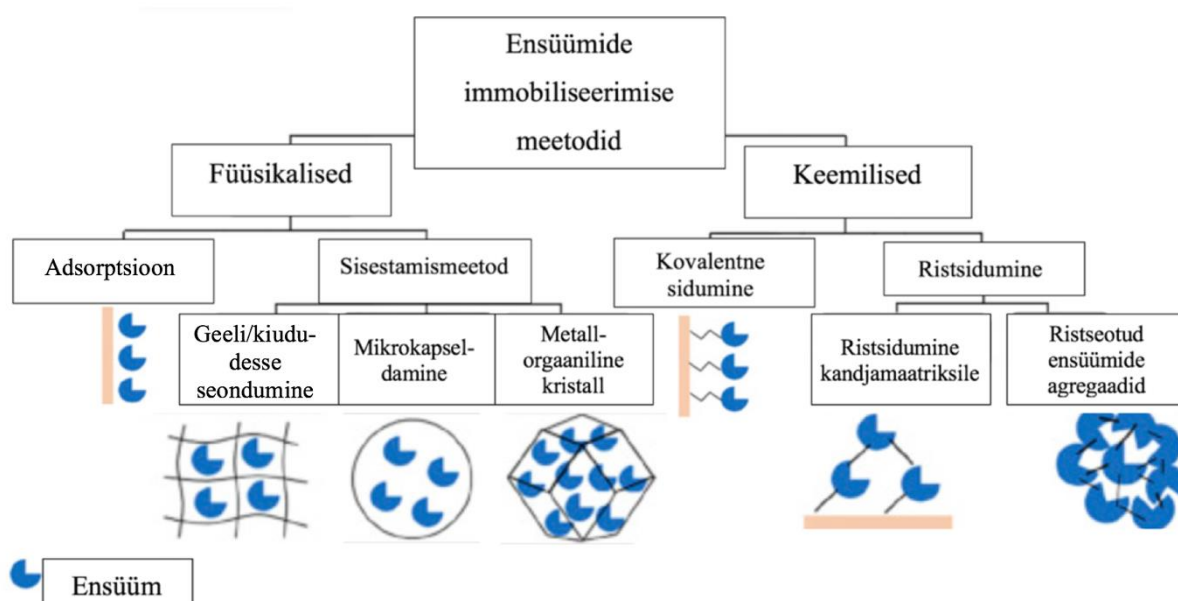
Joonis 2. Endo-levanaasi BT1760 skemaatiline struktuur. N-terminaalne domeen on kujutatud sinise ja rohelisega, C-terminaalne osa oranži ja punase värviga. Katalüütilises tsentris on näidatud levaantetraos (PA 4). Joonis on modifitseeritud kujul võetud artiklist Ernits *et al.* (Ernits *et al.*, 2019).

1.5. Ensüümide puhastamise ja immobiliseerimise võimalused erinevate meetodite ja määrgiste abil

Immobiliseeritud ensüüm (IE) on molekuli teatud osa kaudu kandjale fikseeritud ensüüm. Kandjale seondunud valku saab pärast reaktsiooni toimumist reaktsioonisegust kokku koguda ja ensüümi saab korduvalt kasutada. Immobiliseerimise puhul on oluline kandjaga seostunud ensüümimolekulide hulk ja nende aktiivsus, aga ka ensüümi stabiilsus, selle pH ja temperatuuri optimum. Üldiselt on IE-d stabiilsemad ja säilitavad oma katalüütilise aktiivsuse kauem võrreldes puhastatud ensüümidega. (Datta *et al.*, 2013)

Ensüümide immobiliseerimiseks kasutatakse mittekovalentset sidumist, kovalentset sidumist või sisestamismeetodit (Joonis 3). Mittekovalentse sidumise, mis on füüsikaline meetod, võimalusteks on adsorptsioon ja ioonsete sidemete kasutamine (Joonis 3). Adsorptsioon on immobiliseerimise vanim ja lihtsam meetod (Nelson ja Griffin, 1916; Messing, 1976; Jesionowski *et al.*, 2014). Ensüüm immobiliseeritakse pindaktiivse tahke kandjaga, milleks võib olla aktiivsüsi, silikaadid või orgaanilised polümeerid. Kuid selle puuduseks on ensüümi suhteliselt nõrk seotus kandjaga moodustunud nõrkade sidemete tõttu. Ioonisel sidumisel kasutatakse elektrostaatilisi jõude kandja laetud pinna ja ensüümi vahel (Betigeri ja Neau, 2002). Kandjateks võivad olla polüsahhariidid ja ka sünteetilised polümeerid, nt dietüülaminoetüülselluloos. Ioonse sidumise võib mõningal määral ensüümi aktiivsenti

konformatsiooni muuta ja sellega kaasneb valdavalt ensüümi aktiivsuse langus (Srere ja Uyeda, 1976).



Joonis 3. Ülevaade ensüümide immobiliseerimise põhimeetoditest. Joonis on modifitseeritud kujul võetud artiklist Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2018).

Kovalentne sidumine (keemiline meetod) on väga laialt levinud meetod IE-de saamiseks kuna annab stabiilse seondumise. Kandjamaterjalidele sidumisel tekivad kovalentsed sidemed ensüümi ja kandja vahel (Joonis 3). Selleks kasutatakse erinevaid funktsionaalseid rühmi: karboksüül-, amino-, hüdroksüül- või sulfhüdrüülrühmi. (D'souza, 1999) Ensüümi ja kandja vahele võib disainida vaheala (*spacer*), mis võimaldab ensüümil vesikeskkonnas rohkem liikuda ning oma konformatsiooni hoida ja seega tagab suurema aktiivsuse. Kandjatena kasutatakse aktiveeritud anorgaanilisi materjale (nt klaas), looduslikke polümeere (nt tselluloos, agaros) ja ka sünteetilisi polümeere (nt polüakrüülamiid, nailon). Keemilise sidumise teiseks tüübiks on ristsidumine (*cross-linking*) (Sheldon, 2007). Immobilisatsioonil tekivad intramolekulaarsed kovalentsed sidemed ensüümimolekulide ja bifunktsionaalsete reagentide (nt glutaaraldehüüd või diisotiotsüanaat) vahel, mille puhul reagentid moodustavad sidemeid nii kandjaga kui ka ensüümiga (Zucca ja Sanjust, 2014). Ristsidumise korral võib ensüümide aktiivsus väheneda (Sheldon, 2007).

Sisestamismeetodi puhul sisestatakse ensüümid polümeeride maatriksisse või membraankiududesse, kasutatakse ka mikrokapsleid (Joonis 3). Kapslite väikesed mõõtmed või õhuke membraanikiht võimaldavad substraadil ja produktil kergesti sisse ja välja liikuda, aga ensüümid jäävad kandja sisse. Selle meetodiga saab ensüümile sobivat mikrokeskkonda luua. Maatriksina kasutatakse erinevaid polümeere, nt alginaati, kollageeni, polüakrüülamiidi.

(Chiang *et al.*, 1997) Pöördumatuks ensüümide sidumiseks kandjale võidakse kasutada ka mitut meetodit korraga.

Laialdaselt kasutatakse erinevaid märgiseid, mis liidetakse valguekspressiooniga ensüümi C- või N-terminaalse osaga ja tulemuseks saadakse ühendvalk (*fusion protein*). Sellised märgised teevad ühendvalgu puhastamise lihtsamaks ja immobiliseerimise spetsiifilisemaks. Paljudel juhtudel suurendavad märgised ühendvalgu lahustuvust ja soodustavad seega produkti teket. Märgistena kasutatakse nii lühikesi peptiide (nt polü-His-, polü-Arg-, c-myc-, FLAG-, S-märgis) kui ka suuremaid valgumoduleid (nt glutatioon-S-transferaas, kalmoduliiniga seonduv peptiid, tselluloosiga seonduv domeen, maltoosiga seonduv valk – MBP, *maltose-binding protein*). Väikesed märgised on vähem immunogeensed kui suuremad. Suured märgised tõstavad ühendvalgu lahustuvust ja stabiilsust, kuid suure tõenäosusega tuleb need peale puhastamist ühendvalgust ensüümi biokeemiliseks iseloomustamiseks ja detailsemaks uurimiseks eemaldada. (Terpe, 2003; Hyeon *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015)

Rutiinselt kasutatakse rekombinantsete valkude puhastamiseks His-märgist, mis koosneb tavaliselt kuuest histidiini jäägist. Histidiin seondub nikli ionidega, mistõttu kasutatakse selliste ühendvalkude puhastamisel Ni²⁺-kandja (nt agaros) kolonne ja puhastatakse ensüüm afiinsuskromatograafia meetodil. Kolonniga seondunud ühendvalgud elueeritakse kolonnist vaba histidiini või imidasooliga. (Hochuli *et al.*, 1987; Mascher *et al.*, 2011; Carlsson *et al.*, 2012; Kimple *et al.*, 2013)

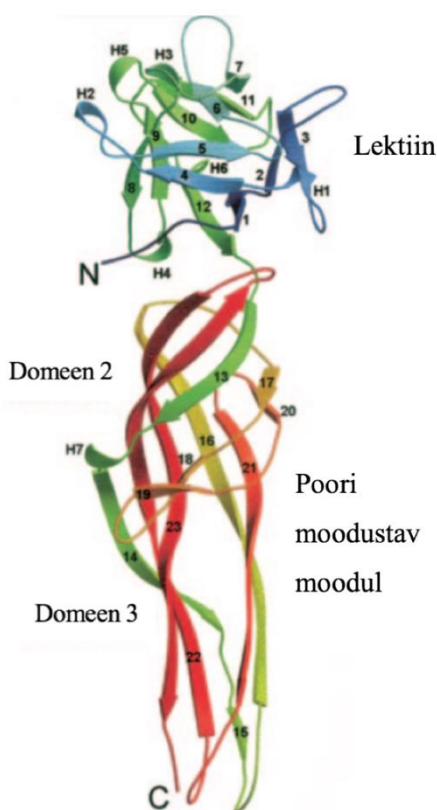
Periplasmaatilise asukohaga süsivesikutega seonduvad valgud (nt MBP), glükosiidi hüdrolaaside süsivesikutega seonduvad moodulid (*carbohydrate-binding module*, CBM) ja lektiini domeenid (nt LSLt) on potentsiaalsed või juba kasutuses olevad spetsiifilised sahhariididega seonduvad märgised, mida saab kasutada nii valkude puhastamiseks kui immobiliseerimiseks (López-Gallego *et al.*, 2012; Hyeon *et al.*, 2013; Kimple *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015). CBM on glükosiidi hüdrolaaside spetsiifiliselt süsivesikutega seonduv 40-200 aminohapest koosnev mittekatalüütiline domeen. On teada, et CBM-id stabiliseerivad süsivesikuid hüdrolüüsivaid ensüüme ja võimendavad nende katalüütilist aktiivsust (Cuskin *et al.*, 2012). Amülolüütilistel ensüümidel on leitud tärklis siduv domeen (*starch-binding domain*, SBD), mis võimaldab näiteks amülaasil tugevamini tärklisega seonduda ja seda hüdrolüüsida. Võrreldes polü-His märgisega vähendavad need märgised inklusioonkehade moodustumise tõenäosust heteroloogilisel ekspresioonil ja suurendavad ühendvalkude lahustuvust. Kuna CBM-id seonduvad süsivesikute maatriksiga väga spetsiifiliselt, neid on lihtne valkude puhastamiseks ja immobiliseerimiseks kasutada, kui valida sobiv CBM-i ja polüsahhariidse maatriksi paar. (Ito *et al.*, 2003; Boraston *et al.*, 2007; Guillén *et al.*, 2010) Vaatamata

potentsiaalile valkude puhastamisel ja ensüümide immobiliseerimisel on CBM-e ja ka lektiini domeene afiinsusmärgistena suhteliselt vähe uuritud.

1.5.1. Lektiinimärgis LSLt ja selle kaudu valkude immobiliseerimine agaroosmaatriksile

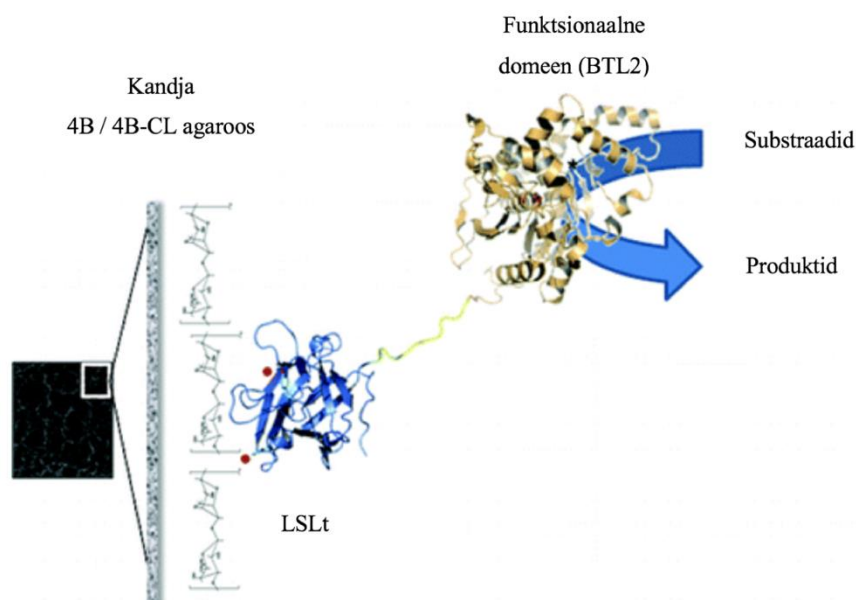
Lektiinid on glükoproteiinid, mis spetsiifiliselt seonduvad teatud oligosahhariidsete järjestustega ja põhjustavad rakkude aglutinatsiooni (Goldstein, 1980). Lektiinid avastas Tartu Ülikooli teadlane P. H. Stillmark 1888. aastal. Esimeseks leitud lektiiniks oli riitsinuse taimest pärinev ritsiin. See on heterodimeerne valk, mille üks domeen on lektiinse aktiivsusega, mis seondub galaktoosiga, ja teine domeen on N-glükosiidi hüdrolaasi aktiivsusega. On leitud, et enamik lektiine on toksilise toimega. (Tateno ja Goldstein, 2003; Varki *et al.*, 2017)

Lektiinimärgis LSLt (LSL₁₅₀) pärineb parasitsetest puid nakatavast seenest *Laetiporus sulphureus* (vääveltorik). Seene lektiin LSLa põhjustab hemolüüsi ja hemaglutinatsiooni (Tateno ja Goldstein, 2003). LSLa on tetrameerse struktuuriga, kus valgu monomeer (35 kDa) koosneb kahest domeenist: N-terminaalne lektiinne moodul (LSLt) ja C-terminaalne poori moodustav osa. Lektiin osa koosneb 150 aminohappest ja sellel on β -lehtedest koosnev ristküliku kujuga (β -*trefoil*) struktuur (Joonis 4). LSLt interakteerub galaktoosi sisaldavate suhkrutega ja kindlustab ühendvalgu parema lahustuvuse. C-terminaalne poori moodustav osa koosneb kahest regioonist/domeenist: β -*sandwich* domeen ja keerdunud 5 antiparalleelset β -lehte (Joonis 4). (Mancheño *et al.*, 2005; Angulo *et al.*, 2011)



Joonis 4. LSLa kolmedimensionaalne struktuur. LSLa koosneb N-terminaalsest lektiinidomeenist (sinine-roheline) ja C-terminaalsest poori moodustavast moodulist, mis koosneb kagast domeenist. Numbrid 1–23 tähistavad β -lehti ja H1–H7 tähistavad ühendavaid α -heelikseid. Joonis on modifitseeritud kujul võetud artiklist Mancheño *et al.* (Mancheño *et al.*, 2005)

LSLt saab kasutada ühendvalguga puhastamiseks ja immobiliseerimiseks ning selleks tuleb seda ekspresseerida koos huvipakkuva valguga. López-Gallego *et al.* (2012) kasutasid esmakordselt LSLt märgist koos ensüümiga – lipaasiga (BTL2) bakterist *Geobacillus thermocatenolatus* – ja *Aquorea victoria* võimendatud roheliselt fluorestseeruva valguga (EGFP, *enhanced green fluorescent protein*). LSLt-d on ekspresseeritud koos sea tsirkoviiruse kapsiidi valguga (Cap) ning tubaka söövitava viiruse (TEV, *tobacco etch virus*) proteaasiga ja kasutatud agaroomaatriksile seondumise hindamiseks (X. Li *et al.*, 2016). Valgu N-terminaalsesse ossa lisatakse ekspressioonil LSLt, mis seondub omakorda efektiivselt agarosist kandjaga. (Joonis 5) LSLt seondub agarosiga kahe sahhariidi seondava tsentri abil. On näidatud, et LSLt-ga seondumise partnerina saab edukalt maatriksina kasutada polümeriseeritud agarosi mikrokerakesi. Eristatakse kahte tüüpi LSLt-ga kasutatavat agarosimaatriksit: polümeriseeritud agaros 4B (4% agaros) ja ristseotud polümeriseeritud agaros 4B-CL (4% ristseotud agaros, *cross-linked agarose*). Seondunud ühendvalku saab maatriksilt laktoosiga elueerida. LSLt-l on kõrge afiinsus laktoosi suhtes, tänu sellele omadusele seondub laktoos LSLt-ga ja ühendvalk dissotseerub agarosmaatriksilt. Seejärel saab laktoosi ühendvalgust pesupuhvris eemaldada ja valku uuesti kasutada. (Angulo *et al.*, 2011; López-Gallego *et al.*, 2012; X. Li *et al.*, 2016) LSLt mugavaks eemaldamiseks ühendvalgust on ekspressioonivektorisse disainitud ka TEV proteaasi saiti kodeeriv järjestus (X. Li *et al.*, 2016) ning pExp-LSL ekspressioonivektor on saadaval ka Addgene portaali kaudu (<https://www.addgene.org/129239/>).



Joonis 5. Ühendvalguga immobiliseerimine agarosmaatriksile. Reaktsiooni katalüüsiva valguga (*G. thermocatenolatus*'e lipaas BTL2, pruun) on linkeri kaudu ühendatud LSLt (sinine), mis seondub kandjaga. Maatriksina saab kasutada nii 4B agarosi kui ka ristseotud 4B-CL agarosi. Joonis on modifitseeritud kujul võetud artiklist (López-Gallego *et al.*, 2012)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Töö koostamiseks püstitati järgmised ülesanded:

1. Ekspresseerida ja kaheetapiliselt puhastada LSLt-märgisega endo-levanaas BT1760 (LSLt-BT1760), et uurida selle ühendvalgu biokeemilisi omadusi;
2. Negatiivseks kontrolliks ekspresseerida ja puhastada afiinsuskromatograafiaga C-terminaalne histidiinimärgisega BT1760 (BT1760Cter või BT1760-His₆), sest see valk ei seonu agarosmaatriksile;
3. Teha kindlaks LSLt-BT1760 levaani lagundamise algiirus ja ensüümi kineetilised parameetrid;
4. Välja selgitada, kas LSLt lisamine mõjutab fusioonvalgu temperatuuristabiilsust;
5. Teha kindlaks LSLt-BT1760 temperatuurioptimum;
6. Võrrelda omavahel LSLt-BT1760 ja BT1760-His₆ biokeemilisi omadusi;
7. Teha kindlaks, kas LSLt-märgisega valk säilitab ensümaatilise ja struktuurse stabiilsuse 4°C säilitamisel;
8. Siduda LSLt-BT1760 magnetilistele agaroskerakestele ning hinnata immobiliseeritud LSLt-BT1760 korduvkasutamise võimalust levaanist LOS-ide tootmiseks.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kasutatud bakteritüvi, plasmiidid ja transformatsioon

Töös kasutati uuritava valkude – *Bt* endo-levanaasi BT1760 variantide – ekspressiooniks *Escherichia coli* tüve BL21(DE3) (Studier ja Moffatt, 1986), kuhu oli transformeeritud ekspressiooniplasmiidid pURI3-BT1760Cter (Lisa 1) või pKLSLt-BT1760 (Lisa 2). *E. coli* tüve BL21(DE3) kasvatati LB tardsöötmetel või vedelsöötmes temperatuuril 37°C. Vedelkultuure aereeriti loksutil (150 rpm). Transformante kasvatati temperatuuril 37°C LB vedelsöötmetes või tardsöötmetel, mis sisaldasid pKLSLt-BT1760 puhul 100 µg/ml kanamütsiini (Km) või pURI3-BT1760Cter puhul 150 µg/ml ampitsiliini (Amp).

Ekspressiooniplasmiid pKLSLt-BT1760 (Lisa 2) (konstrueerinud T. Visnapuu) kodeerib *Bt* endo-levanaasi BT1760, mille ekspresseerimisel lisandub N-terminusesse LSLt-märgis. Konstrueerimisel oli vektorina kasutatud ekspressiooniplasmiidi pKLSLt (Angulo *et al.*, 2011) ja BT1760 sisaldavat *Bt* genoomset DNA-d (Mardo *et al.*, 2017). pKLSLt-BT1760 plasmiidil on selektsioonimarkeriks kanamütsiini resistentsuse geen. C-terminaalse His₆-jäägiga endo-levanaasi ekspressiooniks kasutati kõrge koopiaarvuga ekspressiooniplasmiidi pURI3-BT1760Cter (Mardo *et al.*, 2017). pURI3-BT1760Cter plasmiidil on Amp resistentsuse geen.

Mõlemal plasmiidil on IPTG-ga (isopropüül- β -D-1-tiogalaktopüranosiid) indutseeritav bakteriofaagi T7 RNA polümeraasi T7 promootor, millega tagati plasmiidsete geenide kõrge transkriptsiooni tase (de las Rivas *et al.*, 2007).

Transformatsiooniks lisati 1 μ l (50 ng) plasmiidset DNA-d keemiliselt kompetentseteks muudetud *E. coli* BL21(DE3) rakkudele ja hoiti 20 min jääl. Kompetendid olid valmistanud T. Visnapuu ja K. Ernits. Plasmiidse DNA sisenemise soodustamiseks *E. coli* rakkudesse tehti temperatuurišokk, kus tõsteti temperatuuri 1 minutiks 42°C. Seejärel hoiti rakke 5 min jääl ja adapteeriti transformante loksutil 45 min 37 °C ilma antibiootikumita 1,5 ml LB vedelsöötmes. Kultuurid tsentrifugeeriti 1 min (1 min, 20 000 \times g, 4°C) jooksul ja rakud külvati plaatimise teel LB tardsöötmele: pKLSLt-BT1760 plasmidi sisaldavad rakud plaaditi söötmetassile, mis sisaldas Km-i ja pURI3-BT1760Cter plasmidi sisaldavad rakud plaaditi tassile, mis sisaldas Amp-i. Üleöö 37°C kasvanud kolooniad külvati edasi vastavalt LB-Km või LB-Amp söötmeplaatidele ning kontrolliti endo-levanaasi geeni olemasolu PCR-iga. Praimeritena kasutati pKLSLt-BT1760 puhul T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') ja BT1760_int_Rev (5'-TTTGTTCCGTCGGAAGCGG-3') ja pURI3-BT1760Cter puhul BT1760Fw (5'-GACGAGACTGACCCCATCTTG-3') ja BT1760_int_Rev. PCR produktide pikkused olid vastavalt 1457 ap ja 872 ap. Produktide olemasolu ja suurust kontrolliti 1% agarosgeelil.

2.2.2. Endo-levanaasi variantide ekspresseerimine *E. coli*'s

Plasmide pLSLt-BT1760 või pURI3-BT1760Cter kandvad transformandid kasvatati vastavalt Km või Amp sisaldavas 5 ml LB vedelsöötmes üleöö. Saadud LSLt-BT1760 transformandi vedelkultuurist tehti 100 kordne lahjendus 200 ml LB-Km ja pURI3-BT1760Cter puhul LB-Amp söötmesse. Transformante kasvatati loksutil 37°C, 150 rpm, 160 min. pURI3-BT1760Cter plasmidi sisaldava kultuuri OD₆₀₀ väärtus kasvas ~0,05 kuni 0,416-ni ning pKLSLt-BT1760 plasmidi sisaldava kultuuri OD₆₀₀ kasvas ~0,05 kuni 0,257-ni. Heteroloogilise ekspressiooni algatamiseks lisati kultuuridele 1 mM IPTG-d ning kasvatati 22°C loksutil 20 h. pURI3-BT1760Cter ja pKLSLt-BT1760 kultuuride OD₆₀₀ väärtused olid peale inkubeerimist vastavalt 3,3 ning 5,6. *E. coli* rakkude söötimest eraldamiseks kultuurid kanti tsentrifugeerituubidesse ja tsentrifugeeriti (10 min, 2370 \times g, 4°C) ning rakud külmutati temperatuuril -20°C.

2.2.3. Rakuekstraktide valmistamine, endo-levanaaside puhastamine ja valgu kontsentratsiooni määramine

Rakuekstrakti valmistamiseks suspendeeriti BT1760Cter sisaldavad bakterirakud 10 ml sonikeerimispuhvris A1 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl ja 10 mM imidasool; pH 6,0),

suspensiooni külmutati vedelas lammastikus ja sulatati toatemperatuuriga vees, et soodustada rakkude lüüsi. Tsükli korrati 3 korda. Rakud purustati sonikeerimisega (Ultrasonic Homogenizer, Cole-Parmer, USA). Purustatud rakke tsentrifugeeriti ($2370 \times g$, 20 min, 4°C) ja filtreeriti supernatant, mis sisaldas valke ja teisi lahustunud molekule, läbi $0,45 \mu\text{m}$ poorisuurusega süstlafiltrit Minisart NML (Sartorius, Göttingen, Saksamaa). Rakulüsaati kasutati BT1760Cter valgu puhastamiseks.

BT1760Cter puhastati 10 ml rakuekstraktist kasutades vedelikkromatograafia süsteemi ÄKTAprime™ plus (GE Healthcare Bio-Sciences, Rootsi), Ni^{2+} -afiinsuskromatograafia kolonni HisTrap™ FF 1 ml (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi) ja tootjapoolset meetodikat (programm: *Affinity purification any His-Trap*) nagu on varasemalt kirjeldatud (Mardo *et al.*, 2017). Seondunud BT1760Cter valku elueeriti Ni^{2+} -afiinsuskromatograafia kolonnist puhvriga B1 (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 0,5 M imidasool; pH 6,0). BT1760Cter sisaldust kontrolliti 10% SDS-poliüakrüülamiidgeelil ja valku sisaldavad fraktsioonid ühendati. Fraktsioonide kontsentreerimiseks ja puhvri vahetuseks 0,1 M Na-fosfaatpuhvri (pH 6,0) vastu tsentrifugeeriti ($2370 \times g$, 4°C) valgulahust kasutades kuni 10 kDa läbilaskevõimega membraaniga Millipore'i filtertuubi (Amicon Ultra-15 *centrifugal filter*, *molecular-weight cut-off* – MWCO 10 kDa, Millipore, USA). Peale puhvri vahetust ja kontsentreerimist oli His₆-märgisega BT1760Cter valgu maht 1,5 ml.

LSLt-BT1760 sisaldavad bakterirakud suspendeeriti 10 ml sonikeerimispuhvris A2 (50 mM Na-fosfaatpuhver, 300 mM NaCl ja 0,02% Na-asiid; pH 6,0) ja lisati tootja soovitatud koguses (1 tk) Roche *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Merck, Saksamaa) proteaaside inhibiitorit. Rakud purustati sonikeerimisega ja rakkude suspensiooni tsentrifugeeriti ($2370 \times g$, 20 min, 4°C). Supernatant filtreeriti läbi $0,45 \mu\text{m}$ poorisuurusega süstlafiltrit Minisart NML (Sartorius). Järgnes kaheetapiline LSLt-BT1760 puhastamine, kus kasutati Sepharose 4B kolonni ja valgupreparaadi puhtuseastme tõstmiseks suurus-eraldus (*size-exclusion*) kromatograafiat Superdex 200 pg HiLoad 16/600 kolonnil (GE Healthcare Bio-Sciences). Kõik puhastamise etapid toimusid 4°C . Puhastamise esimeses etapis kanti LSLt-BT1760 sisaldav rakulüsaat A2 puhvriga pestud 50 ml mahuga Sepharose 4B kolonnile (käsitsi täidetud Sepharose 4B agarosmaatriksiga, osakeste läbimõõt 45-165 μm , GE Healthcare Bio-Sciences). Selleks kasutati peristaltilist pumpa (voolukiirus 2 ml/min). Kolonni voolutati 250 ml A2 puhvriga, et pesta välja kolonniga mitteseondunud valgud. Seejärel elueeriti agarosmaatriksiga seondunud valgud 100 ml puhvriga B2 (50 mM Na-fosfaatpuhver, 300 mM NaCl, 200 mM laktoos ja 0,02% Na-asiid; pH 6,0) ning koguti 1 ml fraktsioone. Fraktsioonid, kus mikrotiiterplaadil tuvastati valgusisaldus (5 μl fraktsiooni + 95 μl Bradfordi reagenti, Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, USA). LSLt-BT1760 sisaldavad fraktsioonid liideti ning

kontsentreeriti 4 ml-ni kasutades Millipore'i filtertuubi (Amicon Ultra-15 *centrifugal filter*, MWCO 10 kDa) ja analüüsiti preparaati SDS-poliakrüülamiidgeelil. Seejärel kanti valgulahus suurus-eraldus kromatograafiaks Superdex 200 pg kolonnile ja voolutati 50 mM Na-fosfaatpuhvriga (pH 6,0), mis sisaldas 150 mM NaCl, ÄKTAprime™ plus kromatograafiasüsteemi abil voolukiirusega 1 ml/min. Fraktsioonid koguti ning analüüsiti SDS-poliakrüülamiidgeelil. Täispikka LSLt-BT1760 sisaldavad fraktsioonid kontsentreeriti Millipore'i filtertuubi abil (MWCO 10 kDa). Pärast kontsentreerimist oli LSLt-BT1760 preparaadi maht 2 ml. Kõik valgupreparaatide puhastamiseks kasutatud puhvrid olid filtreeritud 0,45 µm poorisuurusega membraanfiltritega ja degaseeritud.

Valgu ekspressiooni ja olemasolu ning puhtuseastme kontrollimiseks analüüsiti proove denatureeriva polüakrüülamiid geelelektroforeesiga (SDS-PAGE) 10% geelil (Sambrook *et al.*, 1989). Geelid voolutati temperatuuril 22°C ja pingel 10 V/cm Mini-PROTEAN Tetra süsteemiga (BIORAD, USA). Geelid värviti Coomassie Brilliant Blue G250 (Merck, USA) värvilahusega. Valgu asukohta geelil hinnati valkude suurusmarkeri Protein Ladder Blue Prestained (Naxo, Eesti) valkude liikumise alusel.

Puhastatud valgu kontsentratsiooni määrati spektrofotomeetriliselt (OD_{280}) ekstinktsioonikoefitsendi (ϵ) järgi mikroplaadil (NanoQuantPlate; Tecan Group Ltd., Šveits), kasutades Tecan infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd.) mikroplaadilugejat. Andmed koguti Tecan'i i-control programmiga. Valgukontsentratsioonide arvutamiseks kasutati valemit $A = \epsilon \times C \times L$, kus A on optiline tihedus lainepikkusel 280 nm, ϵ on ekstinktsioonikoefitsient ($\epsilon_{\text{BT1760Cter}} = 113680 \text{ l}/(\text{M} \times \text{cm})$ ja $\epsilon_{\text{LSLt-BT1760}} = 142560 \text{ l}/(\text{M} \times \text{cm})$, mis vastab 1 mg/ml puhul vastavalt neeldumise väärtustele 1,965 ja 1,881), C on valgu kontsentratsioon (mg/ml) ja L on lahuse kihi paksus (cm). Sellest valemist tuleneb kontsentratsiooni valem $C = A/(\epsilon \times L)$. Ekstinktsioonikoefitsent ja valgu arvutuslik molekulmass saadi ExPASy ProtParam programmi (<https://web.expasy.org/protparam/>) abil. Saadud valgukontsentratsiooni kasutati, et arvutada valgu aktiivsust ja katalüütilisi parameetreid.

Teise meetodina valgu kontsentratsiooni määramisel rakuekstraktidest ja ka puhastatud valgu korral kasutati BCA valgu kontsentratsiooni määramise komplekti (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, USA) ja tootjapoolset meetodikat. Koostati kaliibergraafik, et teisendada mõõdetud neeldumise väärtused valgu kontsentratsiooniks. Selleks kasutati standardvalgu BSA (*bovine serum albumin*) lahuseid, mille kontsentratsioonid olid 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 ja 0,8 mg/ml.

2.2.4. Endo-levanaaside variantide aktiivsuse määramine

Endo-levanaaside variantide aktiivsuse määramiseks kasutati 3,5-dinitrosalitsüülhappe (DNSA) reaktiivi, mõõtes substraadist vabanenud redutseerivate suhkrute hulka (Miller, 1959) sarnaselt nagu on näidanud Mardo *et al.* (2017). Endo-levanaasi aktiivsused määrati rakuekstraktides, puhastatud valgupreparaatides ja biokeemiliste parameetrite kindlakstegemiseks (vt pt 2.2.5 ja 2.2.6). LSLt märgisega endo-levanaasi aktiivsus määrati ka pärast pikaaegset säilitamist (neli kuud) 4°C. Reaktsioonisegu sisaldas 375 µl 2% levaani (lõppkontsentratsioon 0,5%), 1075 µl McIlvaine'i puhvrit (Na-fosfaat/tsitraat puhver, pH 6,0) ja 50 µl valgu sobivat lahjendust McIlvaine'i puhvris. Substraadina kasutatud levaan oli sünteesitud 1,2 M sahharoosist *P. syringae* pv. tomato levaansukraasiga Lsc3 ja sadestatud ning puhastatud meie uurimisgrupis (Mardo *et al.*, 2017). Kontrollsegu oli valk asendatud 50 µl McIlvaine'i puhvriga. Reaktsiooni käivitati valgu lisamisega reaktsioonisegusse ja reaktsiooni läbiviimiseks kasutati lauatermostaati (Dry Block Thermostat; Biosan, Läti) ning temperatuuri 37°C, kui ei ole märgitud teisiti. 2, 4, 6 minuti järel võeti 200 µl proovi, millele lisati 400 µl DNSA reagenti. Reaktsiooni peatamiseks kuumutati reaktsioonisegu koos DNSA reagentiga 5 minutit temperatuuril 100°C, jahutati 5 minutit jääl ja lisati 800 µl dH₂O. Redutseeritud suhkrute hulk mõõdeti spektrofotomeetriliselt (Ultrospec 3100 Pro UV/Visible Spectrophotometer; GE Healthcare Pharmacia Biotech, UK) lainepikkusel 540 nm. Kõigist määramistest tehti vähemalt kolm tehnilist paralleeli ja kaks iseseisvat katset, kui ei ole märgitud teisiti. Kalibreerimiseks kasutati kontrollisegu, mis oli töödeldud samamoodi nagu reaktsioonisegu, kuid ei sisaldanud valku. Endo-levanaaside variantide aktiivsus väljendati 1 minuti jooksul vabanenud redutseerivate suhkrute hulgana mikromoolides 1 mg valgu kohta [$\mu\text{mol}/(\text{mg}\times\text{min})$] (Mardo *et al.*, 2017).

2.2.5. LSLt-BT1760 kineetiliste parameetrite määramine

LSLt-BT1760 variandil määrati K_m (kineetiline aktiveerimiskonstant) ja V_{\max} (maksimaalne reaktsioonikiirus) väärtused, mõõtes redutseeriva suhkru vabanemise algkiirust. Substraadiks kasutati erinevate kontsentratsioonidega levaani lahuseid (0,1–1,2% ehk 1–12 mg/ml) McIlvaine'i puhvris. Reaktsioon käivitati valgu lisamisega reaktsioonisegusse ja määramised tehti temperatuuril 37°C analoogiliselt peatükis 2.2.4 näidatud meetodikale. Valgusisaldus (lõppkontsentratsioon) reaktsioonisegus varieerus 3,8–7,6 µg/ml. Iga kontsentratsioonipunkti kohta tehti kaks kuni neli paralleeli. Kineetilised parameetrid arvutati nagu on näidatud peatükis 2.2.8.

2.2.6. Temperatuurioptimumi ja temperatuuristabiilsuse määramine, säilivuse hindamine

Temperatuuristabiilsuse ja temperatuurioptimumi määramiseks kasutati temperatuuril -20°C säilitatud LSLt-BT1760 varianti. Temperatuuristabiilsuse testimiseks hoiti valgulahust McIlvaine'i puhvris erinevatel temperatuuridel (30, 37, 40, 45, 47, 50, 51, 52, 53 ja 55°C) 30 minutit, siis jahutati 5 minutit jääl. Seejärel lisati substraat ja määrati aktiivsus, mõõtes levaanist vabanenud redutseerivate suhkrute hulka nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.4. Levaani lõppkontsentratsioon oli 0,5%. Valgusisaldus (lõppkontsentratsioon) reaktsioonisegus varieerus 7,6–15,2 $\mu\text{g/ml}$.

Erinevatel tingimustel säilitatud LSLt-BT1760 intaktsust hinnati SDS-geelelektroforeesi abil. LSLt-BT1760 preparaati oli säilitatud 4 kuud -20 ja 4°C juures. Analüüsiti ka -20°C säilitatud valku, mida hoiti 24 tundi temperatuuril 37°C . Võrdlusena kasutati BT1760Cter valku.

Temperatuurioptimumi kindlakstegemiseks määrati LSLt-BT1760 aktiivsus erinevatel temperatuuridel (45, 50, 55, 57 ja 60°C) sarnaselt nagu on näidatud peatükis 2.2.4. Segati kokku 50 μl (7,6– 11,6 μg) valgu sobivat lahjendust McIlvaine'i puhvris ja 1075 μl McIlvaine'i puhvrit. Segu hoiti 5 minutit adapteerimiseks vastaval temperatuuril ja reaktsiooni algatamiseks lisati 375 μl 2% levaani (lõppkontsentratsioon 0,5%). Määrati vastavatel temperatuuridel substraadist vabanenud redutseerivate suhkrute tekke algkiirust.

2.2.7. LSLt-BT1760 sidumine magnetilisele agarosmaatriksile ja LOS-ide tekke reaktsiooni korratavuse testimine

Endo-levanaasi variantide immobiliseerimise testimiseks kasutati tavalisi (4B) ja ristseotud (4B-CL) magnetilisi agaroskerakesi (vastavalt Magnetic 4% Agarose Beads ja Crosslinked Magnetic 4% Agarose Beads, BioScience Bead Division of Colloidal Science Solutions Inc., USA). Kerakeste läbimõõt on 20–90 μm . Nii LSLt-BT1760 kui ka BT1760-His₆ variantide seondumise kindlakstegemiseks kasutati 0,25 g tavalist või ristseotud maatriksit. Enne valkude lisamist pesti kerakesi kaks korda 1 ml McIlvaine'i puhvriga, milleks lisati puhver, suspendeeriti vortexil ja tsentrifuugiti ($20\,000 \times g$, 1 min, 22°C). Magnetilisi kerakesi hoiti supernatandi eemaldamise ajal tuubi põhjas magnetiga kinni. Seejärel viidi segu maht puhvriga lõppmahuni 1 ml. Sidumine toimus sarnaselt nagu on varem näidatud (Lopez-Gallego *et al.*, 2012). Maatriksile lisati 50 μg valku, segati ja inkubeeriti 15 min toatemperatuuril. Peale seda võeti proovid valgu olemasolu kontrollimiseks supernatandis ja proovid analüüsiti SDS-PAGE-ga. Paralleelselt määrati proovides valkude kontsentratsiooni, kasutades BCA valgu kontsentratsiooni määramise komplekti (Pierce™ BCA Protein Assay Kit), tootjapoolset meetodikat ja koostatud kalibreerimisgraafikut. Seejärel kanti maatriksid 15 ml tuubidesse,

pesti kerakesi 10 ml McIlvaine'i puhvriga hoides vedeliku eemaldamiseks kerakesi magnetiga kinni. Peale supernatandi eemaldamist algatati LOS-ide tekke reaktsioon 5 ml 2% levaani lisamisega ja reaktsioon viidi läbi temperatuuril 37°C. Kindlatel ajapunktidel (0, 15, 30, 45, 60, 120, 180 min) võeti reaktsioonisegudest 20 µl proove õhukese kihi kromatograafia (*thin layer chromatography* – TLC) jaoks, neid kuumutati 5 minutit 96°C juures ensüümi inaktiveerimiseks ja säilitati enne analüüsi 4°C. Reaktsioonisegu eemaldati iga päev kuue päeva vältel, maatriksit pesti kaks korda McIlvaine'i puhvriga ja lisati 5 ml levaanilahust, et reaktsioon uuesti algatada. Reaktsioonisegu (supernatanti) kuumutati 10 minutit keevas vees võimaliku vaba ensüümi inaktiveerimiseks ja säilitati 4°C TLC ja kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC – *high performance liquid chromatography*) analüüside jaoks. Reaktsiooniproductide tuvastamiseks lahutati reaktsioonisegu kontsentratsiooniga TLC silikageelplaatidel (*silica gel* 60) 20 × 2,5 cm (Merck, Saksamaa). Plaadi stardijoonele kanti 0,5 µl proovi ja kuivatati. Suhkrumarker sisaldas 30 mM fruktoosi, 10 mM sahharoosi ja 8 mM 1-kestoosi. TLC plaati voolutati kaks korda ülemise servani, kasutades mahu järgi valmistatud segu kloroform:äädikhape:vesi (60:70:10) (Stingele *et al.*, 1999). Productide tuvastamiseks värviti plaate aniliini reaktiiviga: 1,2 g difenüülamiini (Merck, Saksamaa), 1,2 g aniliinhüdrokloriidi (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Saksamaa), 100 ml metanooli, 10 ml orto-fosforhapet) ja seejärel kuumutati plaate ~20 min 110°C kuni suhkrulaikude värvumiseni. Aniliini reaktiiv värvib fruktoosijääke sisaldavat produkti oranžiks, sahharoosi sisaldavat pruuniks ning glükoosi sisaldavat siniseks (Jork *et al.*, 1990). Vaba fruktoosi ja LOS-ide sisaldust proovides kvantiteeriti HPLC-ga. Meetod on põhjalikumalt kirjeldatud artiklis Mardo *et al.* (2017). Vedelikkromatograafia ja selle esialgne andmeanalüüs telliti meie töögrupi koostööpartnerilt H. Vijalt (KBFI, Tallinn).

2.2.8. Arvutipõhised meetodid

pKLSLt-BT1760 ja pURI3-BT1760Cter PCR fragmentide pikkuse kontrollimiseks ja plasmiidide visualiseerimiseks kasutati programmi pDRAW32 ver. 1.1.143 (<http://www.acaclone.com/>). Ekstinktsioonikoefitsent ja valgu arvutuslik molekulmass saadi ExPASy serveri ProtParam programmi (<https://web.expasy.org/protparam/>) abil. Kineetilised parameetrid arvutati arvutiprogrammi SigmaPlot 2001 (Systat Software Inc., USA) abil, kasutades ensüümikineetika moodulit (Enzyme Kinetics Module 1.1) ja Michaelis-Menten'i võrrandit.

2.3. Tulemused ja arutelu

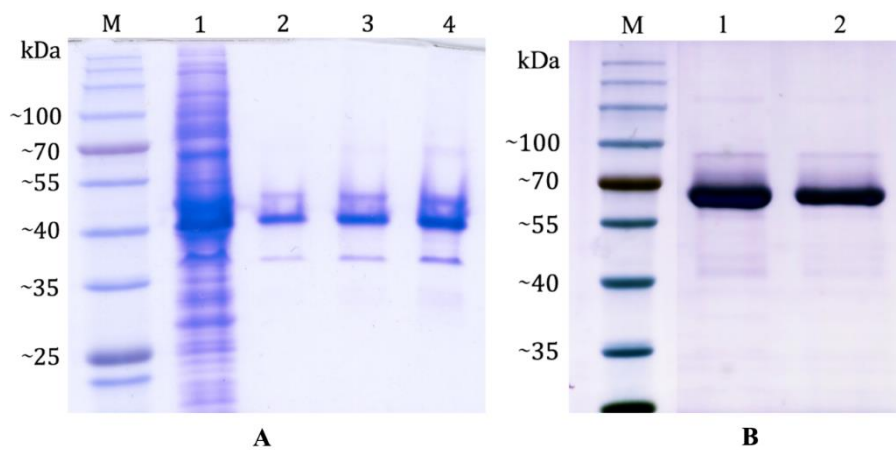
Valkude puhastamiseks ja immobiliseerimiseks saab kasutada spetsiifiliseid sahhariididega seonduvaid märgiseid, mis seonduvad pöörduvalt teatud kandjatele. Maatriksile seondunud ensüümi saab peale reaktsiooni toimumist reaktsioonisegust kokku koguda ja ensüümi saab seega korduvalt kasutada (vt pt 1.5). On näidatud, et immobiliseerimine tõstab valgu stabiilsust ja säilitab katalüütilise aktiivsuse pikemalt ning suurendab saadava produkti hulka (Lopez-Gallego *et al.*, 2012; Datta *et al.*, 2013). Selles töös kasutati afiinsusmärgisena seenest *L. sulphureus* pärinevat lektiinimärgist LSLt, mis interakteerub galaktoosi sisaldavate suhkrutega (vt p 1.5.1).

Imetajate jämesooles elav bakter *Bt* kodeerib aktiivset endo-levanaasi BT1760, mis võimaldab bakteril efektiivselt polüsahhariidset levaani ära kasutada seda rakuväliselt LOS-ideks lagundades (Sonnenburg *et al.*, 2010; Mardo *et al.*, 2017). LOS-id on suure potentsiaaliga prebiootilised ained, aga võiksid kasutust leida ka näiteks viirusvastaste komponentidena. Ensüümi substraadiks sobiv levaan on nii keemiliselt kui ka mikrobioloogiliselt suhteliselt stabiilne fruktaan, mida sünteesivad mitmed organismirühmad, aga eelkõige bakterid (vt pt 1.1). Meie töögrupis on põhjalikult uuritud *P. syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasi Lsc3 (Visnapuu *et al.*, 2015) ja sellest suuremas koguses levaani sünteesitud.

Selles bakalaureusetöös puhastati kaheetapiliselt LSLt-BT1760 ühendvalk ja iseloomustati selle produktide tootmise kontekstis olulisemaid biokeemilisi parameetreid (kineetika, temperatuurioptimum ja -stabiilsus). LSLt-BT1760 seoti magnetilistele agaroskerakestele hindamaks kompleksi abil LOS-ide tootmist.

2.3.1. His₆-märgisega ja lektiinmärgisega endo-levanaasi ekspresseerimine ja puhastamine

Bt endo-levanaasi BT1760 variante BT1760Cter (BT1760-His₆) ja pKLS_t-BT1760 ekspresseeriti plasmiididelt *E. coli* tüves BL21(DE3) nagu on näidatud peatükkides 2.2.1 ja 2.2.2. BT1760Cter on varasemalt Ni²⁺-afiinsuskromatograafiaga puhastatud ja selle biokeemilised omadused ning 3D struktuur on kindlaks tehtud (Mardo *et al.*, 2017; Ernits *et al.*, 2019). Käesolevas töös kasutati His₆-märgisega BT1760 kontroll-valguna, kus puudub suurema M_w-ga afiinsusmärgis ja see valk ei tohiks spetsiifiliselt seonduda agarosmaatriksiga. BT1760Cter preparaati puhastati Ni²⁺-afiinsuskromatograafiaga üheetapiliselt ja kontsentreeriti nagu on näidatud peatükis 2.2.3. Preparaadi valgusisaldus määrati ning selle puhtuseastet kontrolliti 10% SDS-poliüakrüülamiidgeelil (Joonis 6A).



Joonis 6. Puhastatud BT1760 erineva märgisega variantide analüüs SDS-poliakrüülamiidgeelil. A: 1 – BT1760Cter rakulüsaat, 2-4 – puhastatud BT1760Cter, vastavalt 1 µg, 2 µg või 4 µg; B: 1-2 – puhastatud LSLt-BT1760, vastavalt 4 µg või 2 µg. Mõlemal paneelil on rajal M suurusmarker (Protein Ladder Blue Prestained, Naxo, Eesti), mille komponentide suurused on joonisel näidatud.

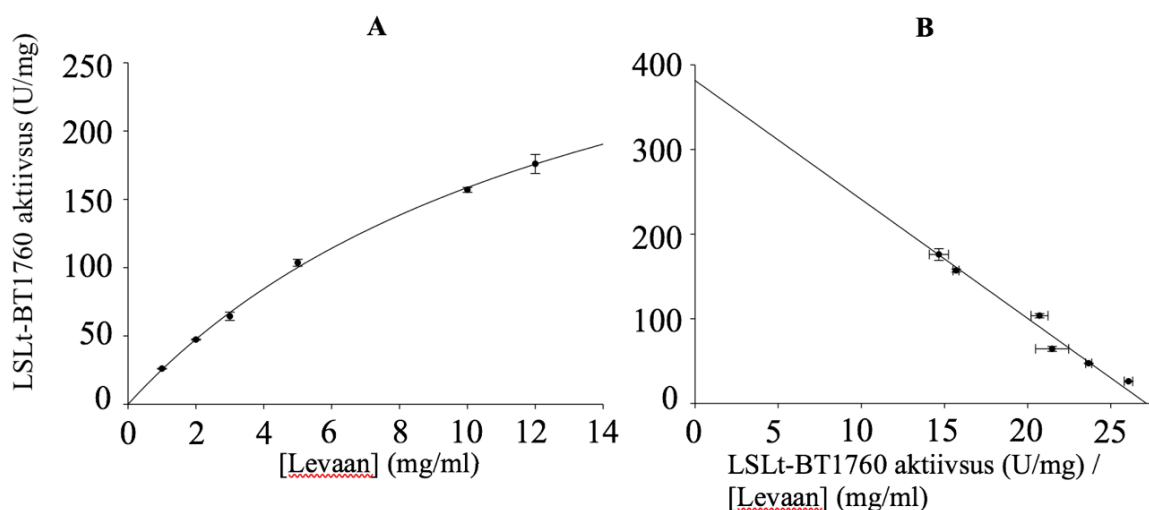
Vastavalt joonisel 6A toodud infole oli BT1760Cter preparaas suhteliselt kõrge puhtuseastmega, kuid sisaldas vähesel määral ka rakulüsaadist üheetapilise puhastamise käigus kaasa tulnud valke. Hindasime, et preparaas võiks siiski sobida edasistes immobiliseerimise katsetes kontrollvalguna kasutamiseks. Endo-levanaasi preparaadi aktiivsus määrati 0,5% (5 mg/ml) levaanist redutseerivate suhkrute tekke alusel (pt. 2.2.4) ning tulemuseks saadi $76,8 \pm 2,0$ U/mg. See on sarnane varem määratud väärtusele ($90,6 \pm 10,1$ U/mg) (Mardo *et al.*, 2017) ja viitab samuti preparaadi suhteliselt suurele puhtuseastmele. Indutseeritud *E. coli* transformantide kultuurist saadi 29,5 mg BT1760Cter valku.

LSLt-BT1760 puhastati kaheetapiliselt kasutades kõigepealt Sepharose 4B agaroskolonni, kuhu seondub LSLt märgisega ensüüm spetsiifiliselt, ja elueerimist laktoosi sisaldava puhvriga ning valgupreparaadi puhtuseastme tõstmiseks suurus-eraldus (*size-exclusion*) kromatograafiat Superdex 200 pg HiLoad 16/600 kolonnil (vt pt 2.2.3). Sarnast meetodit, kus kasutatakse LSLt omadust agarosmaatriksiga pöörduvalt seonduda ja elueerimist laktoosiga, on varem edukalt kasutatud näiteks bakteriaalse lipaasi (BTL2) ja sea tsirkoviiruse kapsiidi (Cap) valgu puhastamiseks (Lopez-Gallego *et al.*, 2012; X. Li *et al.*, 2016).

Puhastatud LSLt-BT1760 preparaati analüüsiti SDS-poliakrüülamiidgeelil (Joonis 6B) ning saadud ühendvalk oli väga kõrge puhtuseastmega. Puhastamise tulemusel saadi 3,2 mg LSLt-BT1760. LSLt-BT1760 rakuekstraktis oli aktiivsus $34,8 \pm 4,6$ U/mg ning puhastatud preparaadil $103,6 \pm 4,4$ U/mg. Seega puhastus valk ligikaudu 3 korda.

2.3.2. Lektiinmärgisega endo-levanaasi biokeemilised omadused

LSLt-BT1760 variandil tehti kindlaks kineetilised parameetrid: K_m (kineetiline aktiveerimiskonstant), V_{max} (maksimaalne reaktsioonikiirus), k_{cat} (katalüütiline konstant) ja k_{cat}/K_m (katalüütiline efektiivsus) mõõtes redutseeriva suhkru vabanemise algiirust Lsc3 levaansukraasiga sünteesitud levaanist (vt pt 2.2.5). Reaktsioonisegudes kasutati levaani kontsentratsioone 1-12 mg/ml. Katse tulemuste põhjal koostati Michaelis-Menten'i ja Eadie-Hofstee graafikud (Joonis 7).



Joonis 7. LSLt-BT1760 aktiivsuse (reaktsioonikiiruse) sõltuvus substraadi (Lsc3-ga sünteesitud levaani) kontsentratsioonist. A: Michaelis-Menten'i graafik näitab seost LSLt-BT1760 reaktsioonikiiruse ja Lsc3 levaani kontsentratsiooni vahel; B: Eadie-Hofstee graafik.

Kineetilised parameetrid arvutati kasutades arvutiprogrammi SigmaPlot 2001 (vt pt 2.2.8). LSLt-BT1760 kineetilised parameetrid võrdlusena BT1760Cter variandi vastavate tulemustega on toodud Tabelis 1.

Tabel 1. Endo-levanaasi erineva märgisega variantide kineetilised parameetrid.

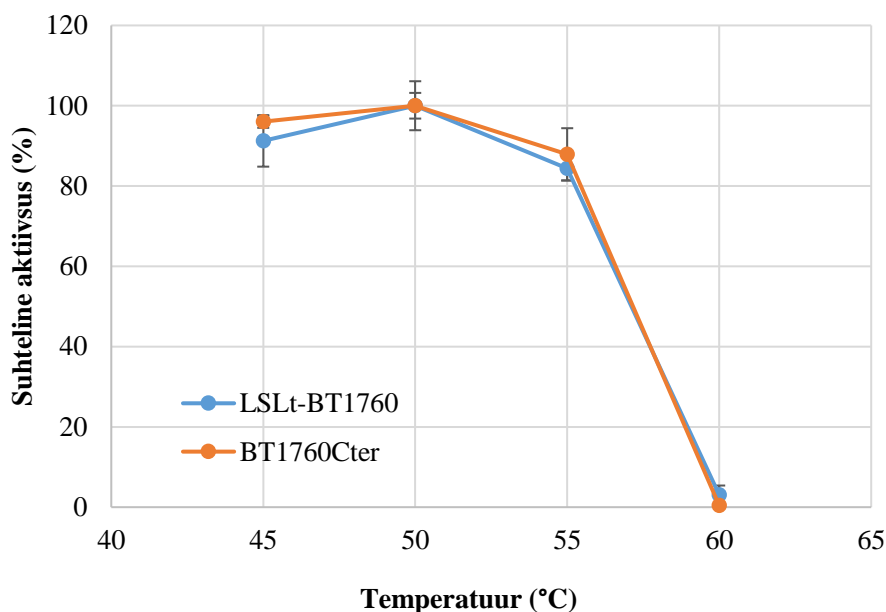
Endo-levanaasi variandid	V_{max} (U/mg)	K_m (mg/ml)	k_{cat} (1/s)	k_{cat}/K_m [$1/(\text{mg/ml}) \times \text{s}$]
LSLt-BT1760	$381,6 \pm 32,0$	$14,1 \pm 1,9$	$482,1 \pm 40,4$	34,2
BT1760Cter*	$484,1 \pm 28,7$	$13,6 \pm 1,5$	$466,8 \pm 27,7$	34,3

*BT1760Cter võrdlusandmed pärinevad artiklist (Mardo *et al.*, 2017).

Tabelist 1 on näha, et BT1760Cter valgul on veidi väiksem K_m väärtus, mis tähendab, et BT1760Cter seob substraati mõnevõrra efektiivsemalt. BT1760Cter variandil on ka veidi suurem V_{max} väärtus. Kuna LSLt-BT1760 molekulmass on suurem (arvutuslikult 75,794 kDa) kui His₆-märgisega valgu variandil, siis katalüütilise konstanti (k_{cat}) väärtus on LSLt märgisega

valgul omakorda veidi suurem. Tabelis 1 toodud andmetest selgub, et LSLt-BT1760 ja BT1760Cter valkudel on praktiliselt võrdne katalüütiline efektiivsus (k_{cat}/K_m). Tulemused näitavad seega, et LSLt lisamine ei mõjuta oluliselt BT1760 katalüüsivõimet. Sarnase tulemuseni jõuti ka lektiinimärgisega ja ilma selleta ekspresseeritud BTL2 analüüsil, kus lipaasi kineetilised parameetrid erinesid vähesel määral ja katalüütiline efektiivsus jäi variantidel praktiliselt samaks (López-Gallego *et al.*, 2012).

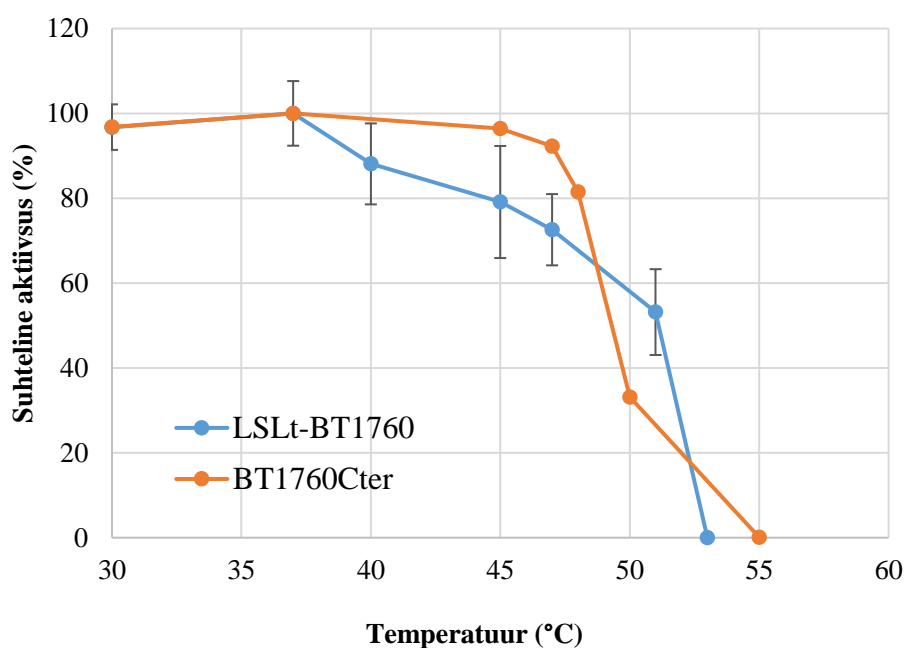
LSLt-BT1760 temperatuurioptimum tehti kindlaks määrates levaani hüdrolüüsi erinevatel temperatuuridel (vt pt 2.2.6). Võrdlusena kasutatud BT1760Cter temperatuurioptimumi andmed olid võetud artiklist (Mardo *et al.*, 2017). Tulemused on esitatud joonisel 8. Nii BT1760Cter kui ka LSLt-BT1760 temperatuurioptimum on temperatuuril 50°C. Kõrgematel temperatuuridel hakkab valgu aktiivsus kiiresti langema ja 60°C on aktiivsus langenud minimaalseks (Joonis 8). Seega LSLt lisamine ei mõjuta endo-levanaasi temperatuurioptimumi väärtust.



Joonis 8. Temperatuuri mõju LSLt-BT1760 ja BT1760Cter katalüütilisele aktiivsusele ja temperatuurioptimumide kindlakstegemine. Levaanist vabanenud redutseerivate suhkrute hulka määrati erinevatel temperatuuridel ja arvutati katsepunktidel suhtelised aktiivsused, kus maksimaalse aktiivsusega temperatuuripunkt (50°C) oli võetud 100%-ks. Joonisel on toodud kolme kuni viie tehnilise paralleeli keskmised väärtused ja standardhälbed. BT1760Cter võrdlusandmed pärinevad artiklist (Mardo *et al.*, 2017).

LSLt-BT1760 temperatuuristabiilsuse määramiseks inkubeeriti valku 30 minutit erinevatel temperatuuridel ja seejärel mõõdeti ensüümi aktiivsust temperatuuril 37°C (vt pt 2.2.6). BT1760Cter temperatuuristabiilsuse andmeid pärinesid artiklist (Mardo *et al.*, 2017). Joonis 9 näitab, et mõlema valgu variandi maksimaalne suhteline aktiivsus (100%) on 37°C. See peegeldab seda, et endo-levanaas BT1760 on inimese jämesoole bakteri ensüüm, mis katalüüsib

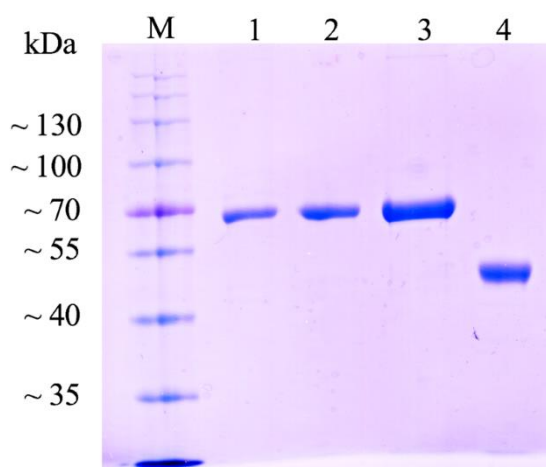
kõige stabiilsemalt inimese kehatemperatuuril. Inkubatsiooni temperatuuri tõstes hakkab ensüümi aktiivsus vähenema. Kui inkubeerida valku temperatuuroptimumil (50°C, vt Joonis 8) pikemalt, siis ensüüm inaktiveerub. See näitab temperatuuri kahetist mõju ensüümreaktsioonile: temperatuuri tõstmine kiirendab ensüümreaktsioonide kiirust, kuid kõrgematel temperatuuridel algab ensüümi denaturatsioon ja ensüümi lagunemise tulemusena aktiivsus langeb. Jooniselt 9 on näha, et LSLt märgisega endo-levanaasil on temperatuuridel 50-52°C inkubeerimisel ligikaudu 20% suurem jääkaktiivsus. See tulemus viitab LSLt stabiliseerivale mõjule, mis avaldub kõrgemal temperatuuril. Täpsemaks temperatuuri mõju väljaselgitamiseks oleks vajalik teha korduskatseid ja määrata ensüümivariandi T_m .



Joonis 9. LSLt-BT1760 ja BT1760-His₆ termostabiilsus. Peale valkude inkubeerimist vastavatel temperatuuridel 30 minuti jooksul mõõdeti valkude aktiivsust temperatuuril 37°C ja arutati BT1760 variantide suhtelised aktiivsused. BT1760-His₆ ja LSLt-BT1760 maksimaalsed aktiivsusused (100%) olid vastavalt 124,0 ja 116,5 U/mg temperatuuril 37°C. Joonisel on toodud kahe kuni kolme tehnilise paralleeliga kuni kolme iseseisva katse keskmised väärtused ja standardhälbed. BT1760Cter võrdlusandmed pärinevad artiklist (Mardo *et al.*, 2017).

Erinevatel tingimustel säilitatud BT1760 variantide intaktsust kontrolliti SDS-polüakrüülamiidgeelil. Kui LSLt oleks hakanud valgust eralduma, siis oleks seda ~20 kDa suurust moodulit geelil näha. Jooniselt 10 on näha, et -20°C ja 4°C säilitatud LSLt-BT1760 variantid ei ole hakanud lagunema ning -20°C säilitatud LSLt-BT1760, mida inkubeeriti 24 tundi 37°C oli samuti säilitanud oma intaktsuse. Suuruse võrdluseks kasutati puhastatud BT1760Cter valku. LSLt-BT1760 variantidel mõõdeti aktiivsust pärast pikaajast säilitamist temperatuuridel 4 ja -20°C. Neli kuud 4 °C säilitatud valgu aktiivsus oli 86,0 U/mg, mis oli 70%

algsest aktiivsust ja -20°C säilitatud valgu aktiivsus ei olnud algse aktiivsusega võrreldes langenud.



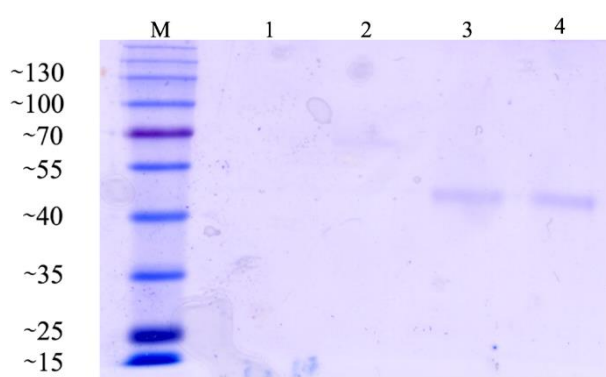
Joonis 10. LSLt-BT1760 erinevalt säilitatud proovid analüüsitud SDS-polüakrüülamiidgeelil. M – suurusmarker (Protein Ladder Blue Prestained, Naxo, Eesti), rada 1 – neli kuud 4 °C säilitatud LSLt-BT1760, 2 – neli kuud -20°C säilitatud LSLt-BT1760, 3 – neli kuud -20°C säilitatud LSLt-BT1760, mida hoiti 24 tundi 37°C, 4 – -80°C säilitatud BT1760Cter.

2.3.3. Lektiinmärgisega endo-levanaasi sidumine magnetilistele kandjale ja kompleksi korduvkasutamise võimalikkuse testimine

Varasemates töodes on näidatud, et LSLt seondub spetsiifiliselt 4% agarosmaatriksile ning seondumiseks sobivad nii 4B kui ka 4B-CL agaroskerakesed (López-Gallego *et al.*, 2012; X. Li *et al.*, 2016). Magnetilised kerakesed võimaldavad kiiret maatriksi sadestamist ja pesu ning kergendavad seega kerakestele immobiliseeritud ensüümi korduvat kasutamist huvipakkuvate produktide sünteesiks.

LSLt-BT1760 seondumist testiti tavalisel (4B) ja ristseotud (4B-CL) magnetilisel agarosmaatriksil nagu on näidatud peatükis 2.2.7. 4B on polümeriseeritud agaros ja 4B-CL on polümeriseeritud agaros, mis on ristseotud epikloridriiniga agarosi stabiliseerimiseks. Sidumine toimus sarnaselt nagu on varem näidanud Lopez-Gallego *et al.* (2012) ning kasutati suhteliselt lühikest inkubeerimise aega, 15 minutit, sest varasemad andmed on näidanud üle 90% seondumise efektiivsust juba mõne minuti jooksul (López-Gallego *et al.*, 2012). 0,25 g magnetilisele agarosmaatriksile lisati 50 µg endo-levanaasi (0.2 mg 1 g maatriksi kohta). Kuna maksimaalseks laadimise võimekuseks on varasemalt määratud 43 mg 1 g maatriksi kohta, siis kasutati selles töös maatriksit suures ülehulgas, et tagada võimalikult suure osa LSLt-BT1760 sidumine. Ei olnud teada ka magnetilise agarosmaatriksi lektiinimärgisega seondumise

võimekus. Negatiivse kontrollina kasutati BT1760Cter preparaati, mis ei seonu spetsiifiliselt agarosmaatriksiga. Peale endo-levanaasi ja maatriksi variantide inkubeerimist toatemperatuuril eemaldati proovidest supernatant, kust määrati valgusisaldus ja analüüsiti proove SDS-PAGE-ga (Joonis 11). SDS-polüakrüülamiidgeelil on näha, et BT1760Cter jääb supernatanti. Seevastu praktiliselt puudub geelil LSLt-BT1760, mis näitab, et suur osa sellest oli agarosmaatriksiga seondunud. Proovides valkude kontsentratsiooni kasutades BCA valgu kontsentratsiooni määramise komplekti ja leiti, et LSLt-BT1760 sisaldus 4B ja 4B-CL maatriksiga supernatantides oli alla määramispiiri. Tulemused SDS-PAGE analüüs ja supernatantide valgusisaldused näitavad, et LSLt-BT1760 seondu nii 4B kui ka 4B-CL agarosmaatriksiga (Joonis 11), aga BT1760Cter valdavalt maatriksile ei seondu.

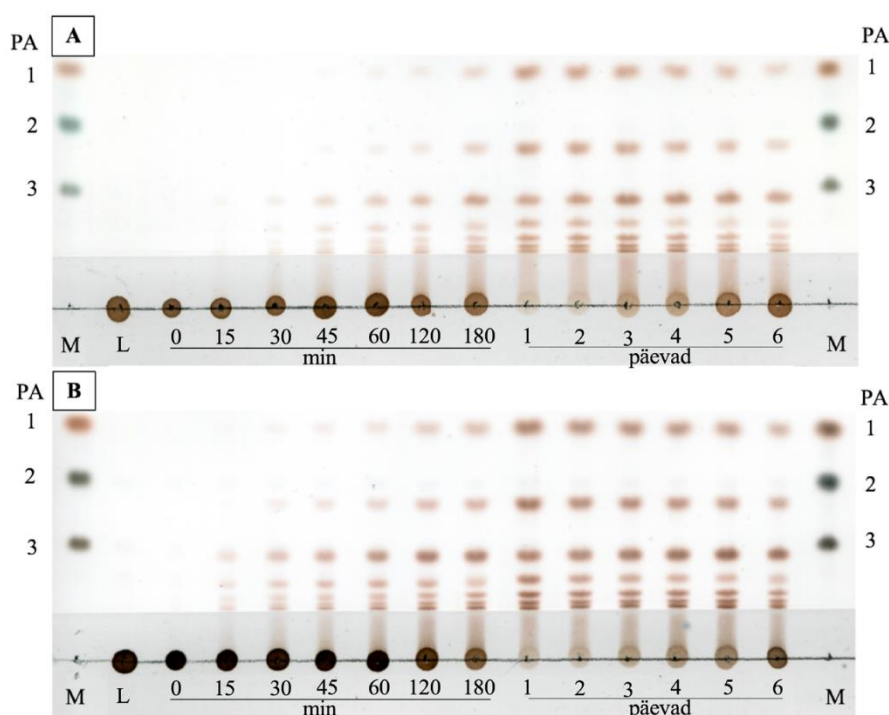


Joonis 11. Magnetiliste agarosmaatriksitega inkubeeritud BT1760 variantide supernatandid lahutatud SDS-polüakrüülamiidgeelil. M – suurusmarker (Protein Ladder Blue Prestained, Naxo, Eesti), 1 – LSLt-BT1760 magnetiliste agaroskerakestega 4B (Magnetic 4% Agarose Beads), 2 – LSLt-BT1760 ristseotud magnetiliste agaroskerakestega 4B-CL (Crosslinked Magnetic 4% Agarose Beads), 3 – His₆-märgisega BT1760 magnetiliste agaroskerakestega 4B, 4 – His₆-märgisega BT1760 ristseotud magnetiliste agaroskerakestega 4B-CL.

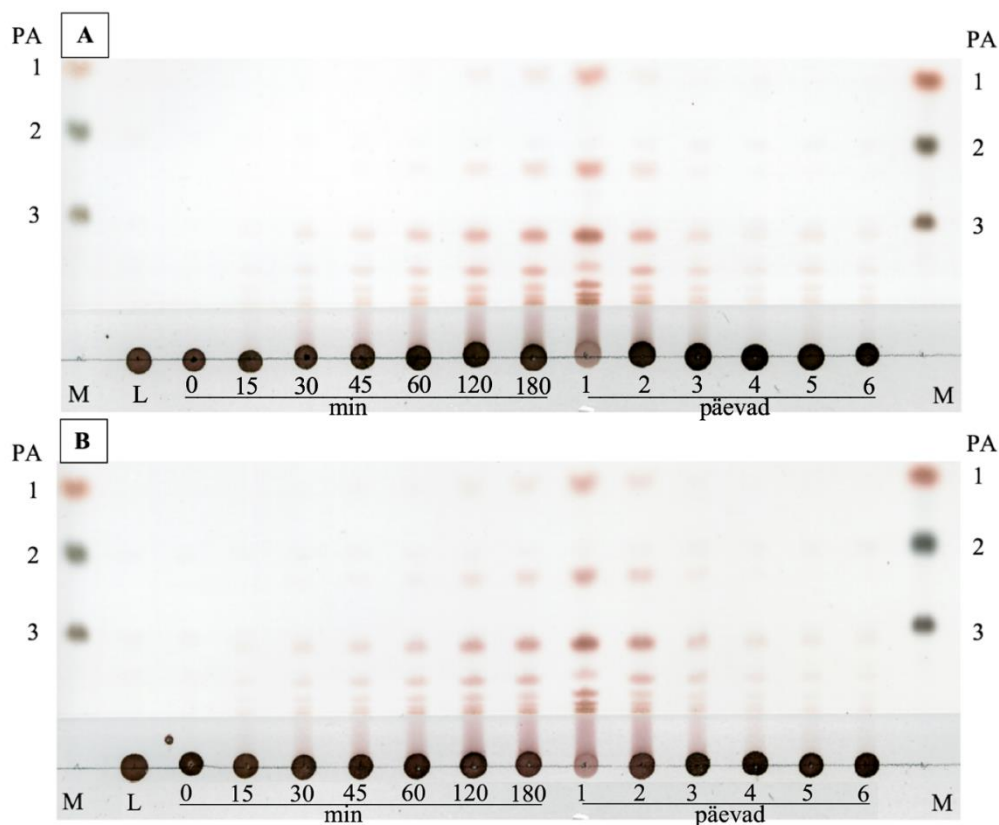
Peale LSLt-BT1760 ja BT1760Cter variantide immobilisatsiooni 4B ja 4B-CL agarosmaatriksitele algatati endo-levanaasi reaktsioon levaanilahuse lisamisega. Erinevatel ajapunktidel võeti reaktsioonisegudest proove õhukese kihi kromatograafia (TLC – *thin layer chromatography*) jaoks. Reaktsiooniproductide kineetika analüüsil TLC meetodiga selgus, et agarosmaatriksitele immobiliseeritud LSLt-BT1760 hüdrolüüsib levaani edukalt erinevate polümerisatsiooniastmetega LOS-ideks (Joonis 12). Kõige kiiremini tekib levaantrioos (PA 3), mille teket on võimalik detekteerida juba 15 minuti möödumisel. Reaktsiooni vältel hakkab vähenema levaan (stardijoonel), tekib erineva PA-ga LOS-e ja eraldub ka vaba fruktoosi. LOS-id tekivad kiiremini, kui kasutati 4B-CL maatriksit (Joonis 12), mis viitab võrreldes 4B-ga efektiivsemale ja stabiilsemale seandumisele. LOS-e tekkis ka kontrollkatsetes BT1760Cter valguga (Joonis 13), mis näitab, valgu vähest mittespetsiifilist seandumist kerakeste vahele või

ka pooridesse. Siiski on LOS-ide teke tunduvalt aeglasem, mis viitab vähesele ensüümi hulgatele. Mittespetsiifilise seondumise vähendamiseks on ilmselt vajalik peale immobiliseerimist maatriksit puhvriga põhjalikumalt pesta, et eemaldada kerakeste vahele ja pooridesse sattunud seondumata valgumolekulid.

Kuue päeva vältel eemaldati iga 24 h järel reaktsioonisegu, pesti BT1760 variante kandvaid agarosmaatrikseid ja algatati reaktsioon uuesti levaanilahuse lisamisega. Maatriksitelt eemaldatud reaktsioonisegud kuumutati ja analüüsiti proove TLC ja kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC – *high performance liquid chromatography*) abil (Joonised 12-16). TLC andmetest selgub, et magnetilise agarooosi + LSLt-BT1760 kompleksi on võimalik korduvalt endo-levanaasi reaktsiooni läbiviimiseks kasutada (Joonis 12). LOS-ide saagis ei vähenenud mitme päeva vältel läbi viidud reaktsioonides (Joonis 12 ja 14). Osa seondunud ensüümi siiski tsüklite vältel eemaldus ja substraati jäi rohkem alles. BT1760Cter puhul ei leidunud hilisemates tsüklites enam reaktiivset ensüümi, mis võib olla tingitud valgu reaktsioonisegusse vabastamisest ja selle kerakeste fraktsioonist eemaldamisest (Joonis 13).



Joonis 12. Seondunud LSLt-BT1760-ga katalüüsitud levaanist reaktsiooniproductide tuvastamine. Joonisel toodud kindlatel ajapunktidel võetud proovide TLC analüüs. A – LSLt-BT1760 + 4B agarosmaatriks; B – LSLt-BT1760 + 4B-CL. Rajal M on suurusmarker (1 PA – fruktoos, 2 PA – sahharoos, 3 PA – 1-kestoos) ja L on 2% levaan. Productide visualiseerimiseks värviti plaate aniliini reaktiiviga.

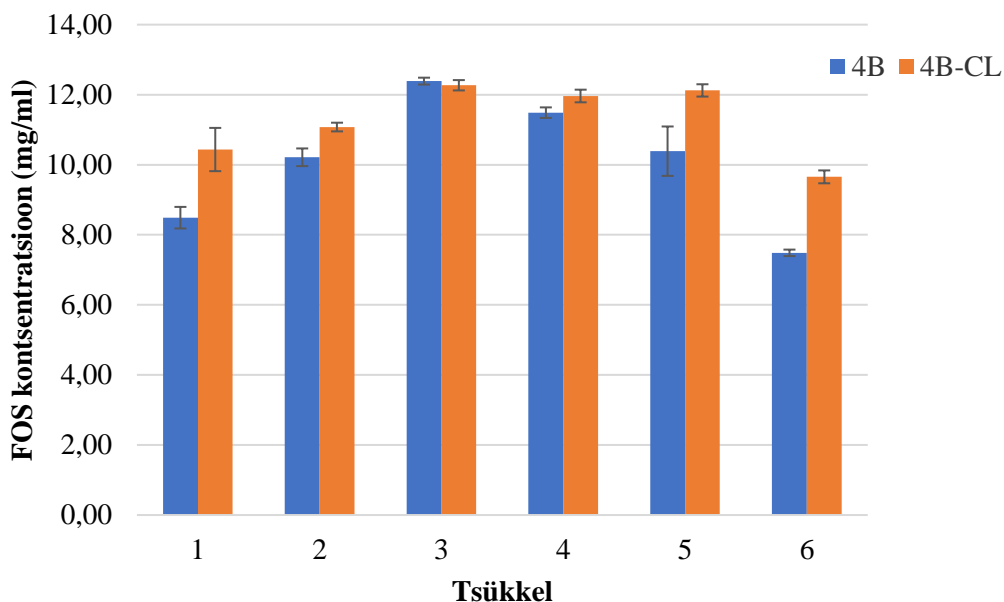


Joonis 13. Seondunud BT1760Cter-ga katalüüsitud levaanist reaktsiooniproductide tuvastamine. Joonisel toodud kindlatel ajapunktidel võetud proovide TLC analüüs. A – BT1760Cter + 4B agarosmaatriks; B – BT1760Cter + 4B-CL. Rajal M on suurusmarker (1 PA – fruktoos, 2 PA – sahharoos, 3 PA – 1-kestoos) ja L on 2% levaan. Productide visualiseerimiseks värviti plaate aniliini reaktiiviga.

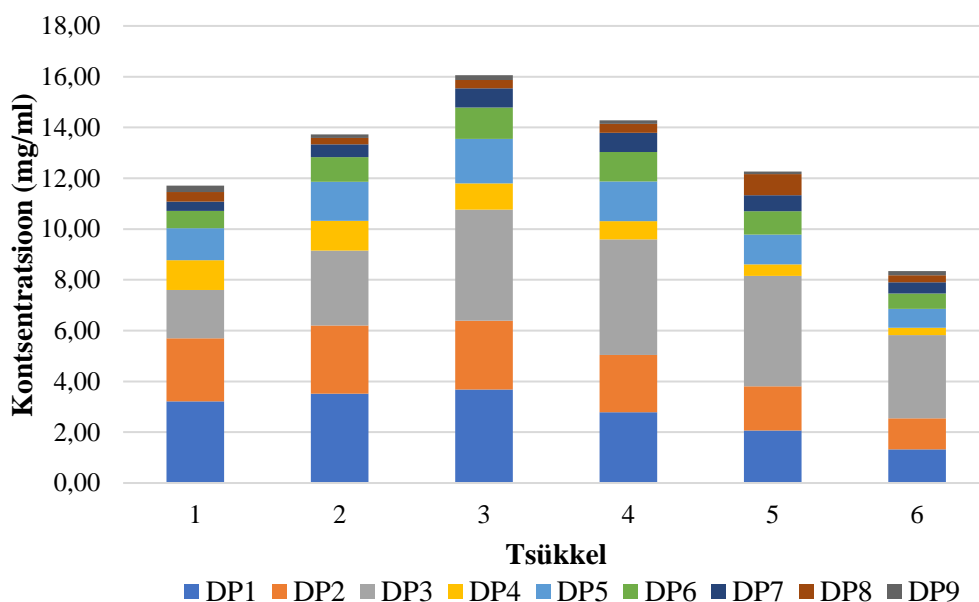
Vaba fruktoosi ja LOS-ide sisaldust seondunud LSLt-BT1760 proovides kvantiteeriti HPLC-ga (vt Joonised 14-16). Kromatograafia analüüsi viis läbi Heiki Vija (KBFI, Tallinn). Meetod on põhjalikumalt kirjeldatud artiklis Mardo *et al.* (2017). Vastavalt saadud tulemustele tekkis 4B agarosmaatriksi kasutamisel kõige rohkem LOS-e 3. päeva reaktsioonis ning edasi hakkas LOS-ide teke vähenema (Joonis 14). 4B-CL variandil on LOS-de teke läbi viidud tsüklite vältel ühtlasem. LOS-ide kontsentratsiooni analüüsist selgus, et krosslingitud variant seob LSLt märgisega endo-levanaasi stabiilsemalt, sest LOS-e tekib suurema tsüklite arvu juures rohkem kui 4B puhul (Joonis 14). Seda tõestab ka vaba fruktoosi (PA 1) sisalduse vähenemine suurema tsüklite arvu juures 4B puhul (Joonis 15). See võib olla osaliselt seletatav märgisega ensüümi difundeerumisest agaroskerakeste sisesse, mis toimub aeglasemalt 4B-CL puhul (López-Gallego *et al.*, 2012), mille tõttu osa ensüümi kaotab vahetu kontakti substraadiga. Tekkinud reaktsiooniproductide spektrid (Joonis 15 ja 16) olid väga sarnased vaba ensüümiga saadud reaktsiooniproductidega (Mardo *et al.*, 2017).

Saadud tulemused näitavad selgelt, et LSLt-BT1760 seondub spetsiifiliselt magnetilise agarosmaatriksiga, kompleks on reaktsioonivõimeline ja tekivad LOS-id. Seda süsteemi saab

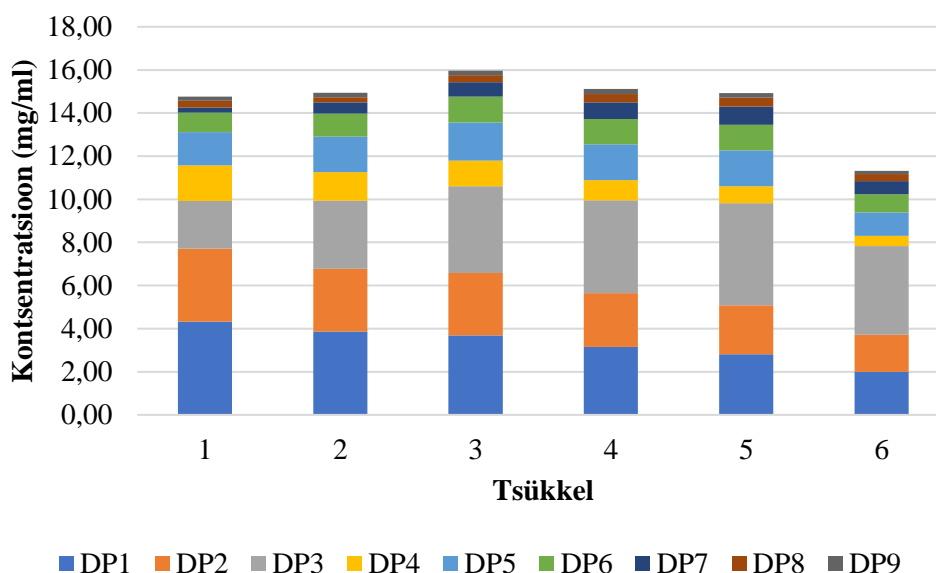
korduvalt LOS-ide sünteesiks kasutada ning see võimaldav vähendada vajaliku ensüümi hulka, et saada sama kogus LOS-e. LOS-ide toimete täpsemaks uurimiseks on vajalik välja töötada kulutõhusaid meetodeid ning lektiini märgise kaudu immobiliseeritud endo-levanaas on selleks üks potentsiaalseid võimalusi.



Joonis 14. Kuue tsükli vältel 4B + LSLt-BT1760-ga ja 4B-CL + LSLt-BT1760-ga sünteesitud LOS-de sisalduse võrdlus. Reaktsioonisegud analüüsiti HPLC-ga. Toodud on kahe tehnilise paralleeli keskmised väärtused ja standardhälbed.



Joonis 15. Kuue tsükli vältel 4B + LSLt-BT1760-ga katalüüsitud levaani degradatsioon erinevate polümerisatsioonistmetega (DP) LOS-ideks. Joonisel on toodud kahe tehnilise paralleeli keskmised.



Joonis 16. Kuue tsükli vältel 4B-CL + LSLt-BT1760-ga katalüüsitud levaani degradatsioon erinevate polümeerisatsiooniasetmetega (DP) LOS-ideks. Joonisel on toodud kahe tehnilise paralleeli keskmised.

2.3.4. LSLt-ga sarnaste järjestuste analüüs

LSLt aminohappelist järjestust joondati NCBI andmebaasis kajastatud valkude järjestuste vastu kasutades BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) vahendit (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Valkude andmebaasi (refseq_protein) otsingu tulemus on toodud Tabelis 2.

Tabel 2. Andmebaasiotsingu tulemused LSLt-ga sarnaste valgujärjestuste kirjeldamisel.

Organism	Valk	Identsus (%)	Geenipanga number
<i>Laetiporus sulphureus</i> 93-53 (vääveltorik)	Hemolüütiline lektiin LSLb	91,45	XP_040768305.1
<i>Mycena indigotica</i>	Hemolüütiline lektiin LSLb	52,94	XP_037219959.1
<i>Diplodia corticola</i>	Natteriini-laadne valk	50,00	XP_020135513.1
<i>Dothidotthia symphoricarpi</i>	Hemolüütiline lektiin LSLb	42,48	XP_033518962.1
<i>Lasioidiplodia theobromae</i>	Natteriini-laadne valk	41,72	XP_035367324.1
<i>Arthroderma uncinatum</i>	Hemolüütiline lektiin LSLb	41,18	XP_033407977.1

Kõik organismid, kellel on tuvastatud LSLt-ga sarnased valgujärjestused, kuuluvad seente hulka. Aminohappelise järjestuse identsuse järgi on kõige sarnasem valk hemolüütiline lektiin LSLb seenest *Mycena indigotica*. Tulemused viitavad sellele, et sarnase struktuuri ja funktsiooniga lektiinimärgiseid võiks isoleerida erinevatest seentest, kuid aminohappeline identsus teiste seente lektiinide ja vääveltoriku LSLt vahel on pigem väike.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärkideks oli puhastada LSLt-märgisega *B. thetaiotaomicron*'i (*Bt*) endo-levanaas BT1760 ning teha kindlaks ühendvalgu biokeemilisi omadusi ja võrrelda neid His₆-märgisega BT1760 parameetritega. Lisaks hinnati kahele magnetilisele agarosmaatriksile immobiliseeritud LSLt-BT1760 korduvkasutamise võimalust levaanist levaani-tüüpi fruktooligosahhariidide (LOS-ide) tootmiseks.

Bt on üks olulistest imetajate jämesooles elavatest ja seal polüsahhariide lagundavatest bakteritest. Bakterite ensüümid on inimesele hädavajalikud paljude nii toidust kui ka soolelimast pärinevate polüsahhariidide lagundamiseks, sest inimesel endal see võimekus puudub. Endo-levanaas BT1760 lagundab polüsahhariidse levaani efektiivselt LOS-ideks. Võrreldes enamiku teiste seni iseloomustatud endo-levanaasidega on BT1760-l kõrgem aktiivsus. Arvatakse, et levaan ja LOS-id on potentsiaalsed prebiootikumid ja neil võiks olla mitmeid potentsiaalseid kasutusalasid toiduainetööstuses, tehnoloogia või meditsiini valdkonnas, kuid täpsete toimete väljaselgitamist takistab LOS-ide vähene kättesaadavus ja kõrge hind. Seega on vajalik uudsete meetodite arendamine LOS-ide kulutõhusaks tootmiseks. Ensüümi stabiilsuse ja katalüütilise aktiivsuse säilitamiseks on võimalik kasutada erinevaid immobiliseerimise meetodeid. Selles töös BT1760 immobiliseeriti agarosmaatriksile lektiinimärgise LSLt abil, mis seondub spetsiifiliselt agarosiga. Kuna ei olnud teada, kas LSLt lisamine mõjutab BT1760 katalüütilist aktiivsust ja biokeemilisi omadusi, siis määrati käesolevas töös LSLt-BT1760 kineetilisi parameetreid, temperatuurioptimumi ja stabiilsust. Vastavalt töös püstitatud ülesannetele saadi järgmised tulemused:

1. Ekspresseeriti *E. coli*'s ja puhastati kaheetapiliselt agaroskolonni ja suurus-eraldus kromatograafiat kasutades LSLt-märgisega endo-levanaas BT1760 (LSLt-BT1760), et uurida selle ühendvalgu biokeemilisi omadusi. Kontrollvalguna ekspresseeriti ja puhastati afiinsuskromatograafiaga BT1760Cter.
2. Tehti kindlaks, et LSLt-BT1760 afiinsus (K_m) levaani suhtes on $14,1 \pm 1,9$ mg/ml, katalüütiline konstant on $482,1 \pm 40,4$ 1/s ja katalüütiline efektiivsus on $34,2$ 1/(mg/ml)×s. LSLt-märgise lisamine ei mõjutanud endo-levanaasi katalüütilist efektiivsust.
3. Määrati LSLt-BT1760 temperatuuristabiilsus kui ühendvalku hoiti 30 min erinevatel temperatuuridel ning selgus, et LSLt olemasolu tõstab vähesel määral BT1760 temperatuuristabiilsust kõrgemal temperatuuridel (50-52°C).
4. LSLt-BT1760 temperatuurioptimumiks määrati 50°C, mis kattub BT1760Cter vastava väärtusega.

5. Tehti kindlaks, kas LSLt-märgisega valk säilitab suure osa oma aktiivsusest, kui preparaati säilitati neli kuud 4°C või 24 h 37°C.
6. LSLt-BT1760 seoti 4B ja ka ristseotud 4B-CL magnetilistele agaroskerakestele. Leiti, et LSLt-BT1760 seondub stabiilselt ning seondunud ensüümiga on võimalik läbi viia endo-levanaasi reaktsiooni ja magnetiga ensüümi kandvad kerakesed lahusest hõlpsasti kokku koguda. Seandumine 4B-CL maatriksiga osutus mõnevõrra stabiilsemaks ning immobiliseeritud LSLt-BT1760-d on võimalik vähemalt 5 tsükli vältel levaanist LOS-ide tootmiseks korduvkasutada.

Tulemustest järeldati, et LSLt-märgise lisamine ei mõjuta märgatavalt BT1760 biokeemilisi parameetreid ega katalüüsivõimet. LSLt-märgisega endo-levanaas säilitab oma ensümaatilise ja struktuurse stabiilsuse nii puhastamise vältel kui ka madalatel temperatuuridel hoiustades. Käesoleva töö kõige olulisemaks järelduseks on see, et agaros-spetsiifiline lektiinmärgis sobib endo-levanaasi näitel glükosiidi hüdrolaaside immobiliseerimiseks magnetilisele agarosmaatriksile. Ühendvalku saab korduvalt reaktsiooni läbiviimiseks kasutada ning töös kasutatud süsteem sobib levaanist LOS-ide tootmiseks.

RESÜMEE

Purification of lectin-tagged endo-levanase from *Bacteroides thetaiotaomicron*, characterization of its biochemical properties and immobilization on agarose matrix

Luiza Tolokonnikova

Summary

Human microbiota makes a significant contribution to human metabolism and well-being. Various members of gut bacteria provide essential capacities for the degradation of complex non-digestible substrates like dietary fibres and polysaccharides. Dominant gut bacterial phyla are *Bacteroidetes* and *Firmicutes*. *Bacteroides thetaiotaomicron* (*Bt*) is important symbiotic bacterium found in the human large intestine. The genome of *Bt* contains numerous genes associated with degradation of polysaccharides, e.g. cellulose, starch, chitin, fructans. Endo-levanase BT1760, an important member of fructan-degrading polysaccharide utilization locus from *Bt*, hydrolyses β -2,6-linked polyfructan levan into levan-type fructooligosaccharides (LOSs). In particular, BT1760 degrades high molecular weight levan 300 times more efficiently than endo-levanase LevB1 of *Bacillus licheniformis*.

Levan is synthesized from sucrose by a wide range of organisms, mostly bacteria, but also by some plants, archaea and fungi. We used bacterial levan synthesized by the levansucrase Lsc3 of *Pseudomonas syringae* pv. tomato as a substrate. Levan and LOSs are considered as candidate prebiotics that induce the growth of beneficial microorganisms and facilitate the health of the host. LOSs are not commercially available with competitive price that hinders their application studies. Fermentation of prebiotics contributes to short-chain fatty acids (SCFAs) synthesis by gut microbiota that serve as the primary energy source for colonocytes, have anti-tumorigenic and anti-inflammatory properties.

There are several enzyme immobilization strategies to facilitate enzymatic reaction and enhance the product yield. Application of affinity tags provides an excellent opportunity for one-step purification of recombinant proteins. Tagged proteins can be then reversibly immobilized to a solid matrix. Inert polymers and inorganic materials could be applied as carriers for the enzymes. The most widely used affinity tags include small peptides, e.g. poly-His-tag, or larger modules, e.g. maltose binding protein. In our study, we used the lectin domain of β -trefoil fold originated from the pore-forming toxin LSLa of a mushroom *Laetiporus sulphureus* (LSLt). LSLt has two binding sites for galactose-containing compounds and it has been shown to bind effectively to 4B agarose beads.

We expressed BT1760 as a fusion protein with LSLt in *E. coli* BL21(DE3) and purified it with Sepharose 4B resin and used polishing step on Superdex 200 pg column of size-exclusion chromatography. We determined the biochemical and kinetic parameters of LSLt-BT1760 that

are important for the catalyst applied in biotechnology. The optimal temperature for the reaction and thermal stability of the endo-levanase were evaluated by detecting initial velocity of the degradation of Lsc3 levan to reducing sugars. Moreover, we tested feasibility of the catalyst for LOSs synthesis in repeated cycles. The spectrum and yield of LOSs were determined using thin layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). For negative control we used endo-levanase BT1760 with His₆-tag that cannot specifically bind to agarose resin.

We found that LSLt-tagged BT1760 degrades levan into LOSs with a high catalytic activity and LSLt does not interfere with the reaction. Biochemical and kinetic parameters of LSLt-BT1760 were not significantly different from those of BT1760 with His₆-tag. Catalytic activity of LSLt-BT1760 was retained almost unaffected for at least 4 months when kept at -20 or 4°C. Magnetic agarose 4B and cross-linked 4B-CL beads were tested for enzyme immobilization via LSLt- tag and they proved to be suitable for the task. The main conclusion of the work is that LSLt-BT1760 if immobilized to agarose matrix can be used repeatedly, up to 5 consecutive cycles for LOSs synthesis from levan.

TÄNUSÕNAD

Kõige soojemate sõnadega soovin tänada selle bakalaureusetöö valmimise eest oma juhendajat kaasprof. Triinu Visnapuud, kes oli nõus mind enda töörühma õppima võtma. Suur tänu panustatud aja ja kannatlikkuse, suurepärase juhendamiskuse ning toetava suhtumise eest.

Suur aitäh meie töögrupi koostööpartnerile Heiki Vijale (KBFI, Tallinn), kes viis läbi vedelikkromatograafia ja selle tulemuste esialgse andmeanalüüsi. Samuti olen tänulik kogu TUMRI Geneetika õppetooli kollektiivile abivalmiduse ja nõustamise eest.

Ei saa mainimata jätta ka finantsallikat. Töö on seotud Tartu Ülikooli Arengufondi grantiprojektiga *Scale-up production of a novel polyfructan levan by bacterial levansucrase, extremely stable and active biocatalyst* (LTMRARENG13, Triinu Visnapuu) ja Eesti Teadusagentuuri projektiga COVSG7 (Rando Tuvikene, Tallinna Ülikool).

KIRJANDUSE LOETELU

- Ağçeli, G. K., ja Cihangir, N. (2020). Nano-sized biopolymer levan: Its antimicrobial, anti-biofilm and anti-cancer effects. *Carbohydrate Research*, 494, 108068.
- Anderson, K. L., ja 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.
- Anderson, K. L., ja 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.
- Angulo, I., Acebrón, I., de Las Rivas, B., Muñoz, R., Rodríguez-Crespo, I., Menéndez, M., García, P., Tateno, H., Goldstein, I. J., Pérez-Agote, B., *et al.* (2011). High-resolution structural insights on the sugar-recognition and fusion tag properties of a versatile β -trefoil lectin domain from the mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Glycobiology*, 21(10), 1349–1361.
- Banguela, A., ja Hernández, L. (2006). Fructans: From natural sources to transgenic plants. *Biotechnología Aplicada*, 23(3), 202–210.
- Barger-Lux, M. J., Heaney, R. P., ja Recker, R. R. (1989). Time course of calcium absorption in humans: Evidence for a colonic component. *Calcified tissue international*, 44(5), 308–311.
- Barone, J. R., ja Medynets, M. (2007). Thermally processed levan polymers. *Carbohydrate polymers*, 69(3), 554–561.
- Betigeri, S. S., ja Neau, S. H. (2002). Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterials*, 23(17), 3627–3636.
- Blake, J., Clarke, M., Jansson, P., ja McNeil, K. (1982). Fructan from *Erwinia herbicola*. *Journal of Bacteriology*, 151(3), 1595–1597.
- Bondarenko, O. M., Ivask, A., Kahru, A., Vija, H., Titma, T., Visnapuu, M., Joost, U., Pudova, K., Adamberg, S., Visnapuu, T., ja teised. (2016). Bacterial polysaccharide levan as stabilizing, non-toxic and functional coating material for microelement-nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 136, 710–720.

- Boraston, A. B., Ficko-Blean, E., ja Healey, M. (2007). Carbohydrate recognition by a large sialidase toxin from *Clostridium perfringens*. *Biochemistry*, 46(40), 11352–11360.
- Carlsson, M., Lundqvist, J., Granér, T., ja Andersson, L. (2012). *Column purification of histidine-tagged proteins from unclarified samples*. Wiley Online Library.
- Chiang, C.-J., Hsiau, L.-T., ja Lee, W.-C. (1997). Immobilization of cell-associated enzymes by entrapment in polymethacrylamide beads. *Biotechnology techniques*, 11(2), 121–125.
- Cockburn, D. W., ja 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.
- Cuskin, F., Flint, J. E., Gloster, T. M., Morland, C., Baslé, A., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Strazzulli, A., Solovyova, A. S., Davies, G. J., ja teised. (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.
- Datta, S., Christena, L. R., ja Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9.
- de las Rivas, B., Curiel, J. A., Mancheno, J. M., ja Munoz, R. (2007). Expression vectors for enzyme restriction-and ligation-independent cloning for producing recombinant His-fusion proteins. *Biotechnology progress*, 23(3), 680–686.
- Dogsa, I., Brložnik, M., Stopar, D., ja Mandić-Mulec, I. (2013). Exopolymer diversity and the role of levan in *Bacillus subtilis* biofilms. *PloS one*, 8(4), e62044.
- Domżał-Kędzia, M., Lewińska, A., Jaromin, A., Weselski, M., Pluskota, R., ja Łukaszewicz, M. (2019). Fermentation parameters and conditions affecting levan production and its potential applications in cosmetics. *Bioorganic chemistry*, 93, 102787.
- D'souza, S. (1999). Immobilized enzymes in bioprocess. *Current Science*, 69–79.

- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., ja Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*, 308(5728), 1635–1638.
- Ernits, K., Eek, P., Lukk, T., Visnapuu, T., ja Alamäe, T. (2019). First crystal structure of an endo-levanase—the BT1760 from a human gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Scientific reports*, 9(1), 1–13.
- Fattah, S. S. A., Abu Bakar, F. D., Mahadi, N. M., Jonet, M. A., Illias, R. M., ja Murad, A. M. A. (2018). Short-chain fructo-oligosaccharides produced by enzymatic hydrolysis enhance the growth of probiotics isolated from cultured milk drinks. *Malaysian Journal of Microbiology*, 14(6), 497–502.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., ja Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature reviews Gastroenterology ja hepatology*, 9(10), 577.
- Ghauri, K., Ali, H., Munawar, N., Ghauri, M. A., ja Anwar, M. A. (2020). Glycoside hydrolase family 68 gene of halophilic archaeon *Halalkalicoccus jeotgali* B3T codes for an inulosucrase enzyme. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1–8.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X., ja Cummings, J. H. (1995). Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, 108(4), 975–982.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., ja teised. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology ja hepatology*, 14(8), 491.
- Goldstein, I. J. (1980). What should be called a lectin? *Nature*, 285, 66.
- Guillén, D., Sánchez, S., ja Rodríguez-Sanoja, R. (2010). Carbohydrate-binding domains: Multiplicity of biological roles. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(5), 1241–1249.

- Hochuli, E., Döbeli, H., ja Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography A*, 411, 177–184.
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D., ja Seibel, J. (2007). Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: Mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochemical Journal*, 407(2), 189–198.
- Hövels, M., Kosciow, K., ja Deppenmeier, U. (2021). Characterization of a novel endo-levanase from *Azotobacter chroococcum* DSM 2286 and its application for the production of prebiotic fructooligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 255, 117384.
- Hyeon, J. E., Jeon, S. D., ja Han, S. O. (2013). Cellulosome-based, *Clostridium*-derived multi-functional enzyme complexes for advanced biotechnology tool development: Advances and applications. *Biotechnology advances*, 31(6), 936–944.
- Ito, Y., Tomita, T., Roy, N., Nakano, A., Sugawara-Tomita, N., Watanabe, S., Okai, N., Abe, N., ja Kamio, Y. (2003). Cloning, expression, and cell surface localization of *Paenibacillus* sp. Strain W-61 xylanase 5, a multidomain xylanase. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 6969–6978.
- Jakob, F., Pfaff, A., Novoa-Carballal, R., Rübsam, H., Becker, T., ja Vogel, R. F. (2013). Structural analysis of fructans produced by acetic acid bacteria reveals a relation to hydrocolloid function. *Carbohydrate polymers*, 92(2), 1234–1242.
- Jensen, S. L., Diemer, M. B., Lundmark, M., Larsen, F. H., Blennow, A., Mogensen, H. K., ja Nielsen, T. H. (2016). Levansucrase from *Bacillus subtilis* hydrolyses β -2, 6 fructosyl bonds in bacterial levans and in grass fructans. *International journal of biological macromolecules*, 85, 514–521.
- Jesionowski, T., Zdarta, J., ja Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*, 20(5–6), 801–821.

- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., ja Wimmer, H. (1990). Thin-layer chromatography. *Reagents and detection methods, 1*, 294–298.
- Kasperowicz, A., Stan-Glasek, K., Taciak, M., ja Michalowski, T. (2016). The fructanolytic abilities of the rumen bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* strain 3071. *Journal of applied microbiology, 120*(1), 29–40.
- Kimple, M. E., Brill, A. L., ja Pasker, R. L. (2013). Overview of affinity tags for protein purification. *Current protocols in protein science, 73*(1), 9–9.
- Kirtel, O., Lescrinier, E., Van den Ende, W., ja Öner, E. T. (2019). Discovery of fructans in Archaea. *Carbohydrate polymers, 220*, 149–156.
- Li, H., ja Ullrich, M. S. (2001). Characterization and Mutational Analysis of Three Allelic *lsc* Genes Encoding Levansucrase in *Pseudomonas syringae*. *Journal of bacteriology, 183*(11), 3282–3292.
- Li, X., Liu, J., Gao, D., Wan, W., Yang, X., Li, Y., Chang, H., Chen, L., Wang, C., ja Zhao, J. (2016). Single-step affinity and cost-effective purification of recombinant proteins using the Sepharose-binding lectin-tag from the mushroom *Laetiporus sulphureus* as fusion partner. *Protein expression and purification, 119*, 51–56.
- Limoli, D. H., Jones, C. J., ja Wozniak, D. J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbial Biofilms, 223–247*.
- Liu, D.-M., Chen, J., ja Shi, Y.-P. (2018). Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, 102*, 332–342.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., ja Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research, 42*(D1), D490–D495.
- López-Gallego, F., Acebrón, I., Mancheño, J. M., Raja, S., Lillo, M. P., ja Guisan Seijas, J. M. (2012). Directed, strong, and reversible immobilization of proteins tagged with a β -trefoil

- lectin domain: A simple method to immobilize biomolecules on plain agarose matrixes. *Bioconjugate chemistry*, 23(3), 565–573.
- Manandhar, S., Vidhate, S., ja D'Souza, N. (2009). Water soluble levan polysaccharide biopolymer electrospun fibers. *Carbohydrate polymers*, 78(4), 794–798.
- Mancheño, J. M., Tateno, H., Goldstein, I. J., Martínez-Ripoll, M., ja Hermoso, J. A. (2005). Structural analysis of the *Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin in complex with sugars. *Journal of Biological chemistry*, 280(17), 17251–17259.
- Mardo, K., Visnapuu, T., Vija, H., Aasamets, A., Viigand, K., ja 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.
- Martens, E. C., Lowe, E. C., Chiang, H., Pudlo, N. A., Wu, M., McNulty, N. P., Abbott, D. W., Henrissat, B., Gilbert, H. J., Bolam, D. N., ja teised. (2011). Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. *PLoS Biol*, 9(12), e1001221.
- Martínez-Fleites, C., Ortíz-Lombardía, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E. J., Arrieta, J. G., Hernández, L., ja Davies, G. J. (2005). Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochemical Journal*, 390(1), 19–27.
- Marx, S. P., Winkler, S., ja Hartmeier, W. (2000). Metabolization of β -(2, 6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS microbiology letters*, 182(1), 163–169.
- Mascher, E., Risberg, G., ja Hedlund, H. (2011). Screening for optimal purification conditions for histidine-tagged water-soluble and membrane proteins using magnetic beads methods. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 22(Suppl), S70.
- Messing, R. A. (1976). Adsorption and inorganic bridge formations. *Methods in enzymology* (Kd 44, lk 148–169). Elsevier.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426–428.

- Nasir, A., Sattar, F., Ashfaq, I., Lindemann, S. R., Chen, M.-H., Van den Ende, W., Öner, E. T., Kirtel, O., Khaliq, S., Ghauri, M. A., ja teised. (2020). Production and characterization of a high molecular weight levan and fructooligosaccharides from a rhizospheric isolate of *Bacillus aryabhattai*. *LWT*, *123*, 109093.
- Nelson, J., ja Griffin, E. G. (1916). Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society*, *38*(5), 1109–1115.
- Ni, D., Xu, W., Zhu, Y., Zhang, W., Zhang, T., Guang, C., ja Mu, W. (2019). Inulin and its enzymatic production by inulosucrase: Characteristics, structural features, molecular modifications and applications. *Biotechnology advances*, *37*(2), 306–318.
- Nicolucci, A. C., Hume, M. P., Martínez, I., Mayengbam, S., Walter, J., ja Reimer, R. A. (2017). Prebiotics reduce body fat and alter intestinal microbiota in children who are overweight or with obesity. *Gastroenterology*, *153*(3), 711–722.
- Oliveira, C., Carvalho, V., Domingues, L., ja Gama, F. M. (2015). Recombinant CBM-fusion technology—Applications overview. *Biotechnology advances*, *33*(3–4), 358–369.
- Oner, E., ja Combie, J. (2019). *From healing wounds to resorbable electronics, levan can fill bioadhesive roles in scores of markets*.
- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Escalante, A., González-Cervantes, R., Olvera, C., ja Munguía, A. L. (2014). Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochemistry*, *49*(5), 783–790.
- Raga-Carbajal, E., Carrillo-Nava, E., Costas, M., Porras-Dominguez, J., López-Munguía, A., ja Olvera, C. (2016). Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Glycobiology*, *26*(4), 377–385.
- Raga-Carbajal, E., López-Munguía, A., Alvarez, L., ja Olvera, C. (2018). Understanding the transfer reaction network behind the non-processive synthesis of low molecular weight levan catalyzed by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Scientific reports*, *8*(1), 1–10.

- Ritsema, T., ja Smeekens, S. C. (2003). Engineering fructan metabolism in plants. *Journal of Plant Physiology*, 160(7), 811–820.
- Sambrook, J., Fritsch, E., ja Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York. USA.
- Saulnier, D. M., Spinler, J. K., Gibson, G. R., ja Versalovic, J. (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: Considerations for enhanced functional foods. *Current opinion in biotechnology*, 20(2), 135–141.
- Schwalm III, N. D., Townsend, G. E., ja Groisman, E. A. (2017). Prioritization of polysaccharide utilization and control of regulator activation in *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Molecular Microbiology*, 104(1), 32–45.
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis ja Catalysis*, 349(8–9), 1289–1307.
- Shi, Q., Hou, Y., Xu, Y., Krogh, K. B. M., ja Tenkanen, M. (2019). Enzymatic analysis of levan produced by lactic acid bacteria in fermented doughs. *Carbohydrate polymers*, 208, 285–293.
- Sonnenburg, E. D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S. K., Firbank, S. J., Bolam, D. N., ja Sonnenburg, J. L. (2010). Specificity of polysaccharide use in intestinal bacteroides species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell*, 141(7), 1241–1252.
- Sonnenburg, J. L., Xu, J., Leip, D. D., Chen, C.-H., Westover, B. P., Weatherford, J., Buhler, J. D., ja Gordon, J. I. (2005). Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*, 307(5717), 1955–1959.
- Srere, P. A., ja Uyeda, K. (1976). Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices. *Methods in enzymology* (Kd 44, lk 11–19). Elsevier.
- Stingele, F., Vincent, S. J., Faber, E. J., Newell, J. W., Kamerling, J. P., ja Neeser, J.-R. (1999). Introduction of the exopolysaccharide gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6 into *Lactococcus lactis* MG1363: Production and characterization of an altered polysaccharide. *Molecular microbiology*, 32(6), 1287–1295.

- Studier, F. W., ja 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.
- Zucca, P., ja Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. *Molecules*, 19(9), 14139–14194.
- Tateno, H., ja Goldstein, I. J. (2003). Molecular cloning, expression, and characterization of novel hemolytic lectins from the mushroom *Laetiporus sulphureus*, which show homology to bacterial toxins. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 40455–40463.
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(5), 523–533.
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., et al., editors. 2017. Essentials of Glycobiology, 31 Chapter, R-Type Lectins, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA
- Versluys, M., Kirtel, O., Toksoy Öner, E., ja Van den Ende, W. (2018). The fructan syndrome: Evolutionary aspects and common themes among plants and microbes. *Plant, cell ja environment*, 41(1), 16–38.
- Verspreet, J., Damen, B., Broekaert, W. F., Verbeke, K., Delcour, J. A., ja Courtin, C. M. (2016). A critical look at prebiotics within the dietary fiber concept. *Annual review of food science and technology*, 7, 167–190.
- Vijn, I., ja Smeekens, S. (1999). Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant physiology*, 120(2), 351–360.
- Visnapuu, T., Mardo, K., ja Alamäe, T. (2015). Levansucrases of a *Pseudomonas syringae* pathovar as catalysts for the synthesis of potentially prebiotic oligo- and polysaccharides. *New biotechnology*, 32(6), 597–605.
- Visnapuu, T., Mardo, K., Mosoarca, C., Zamfir, A. D., Vigants, A., ja 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.

Öner, E. T., Hernández, L., ja Combie, J. (2016). Review of levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology advances*, 34(5), 827–844.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<https://www.addgene.org/129239/> kasutatud 25.05.2021

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> kasutatud 20.04.2021

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R2314&jafrom=FR>

kasutatud 6.04.2021

<https://web.expasy.org/protparam/> kasutatud 15.09.2020

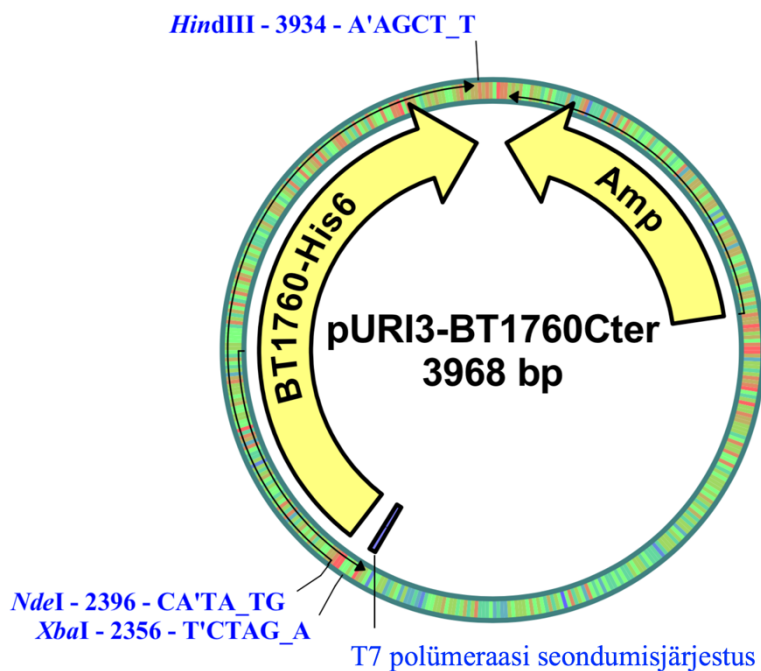
www.cazy.org kasutatud 6.04.2021

www.megazyme.com kasutatud 20.04.2021

LISAD

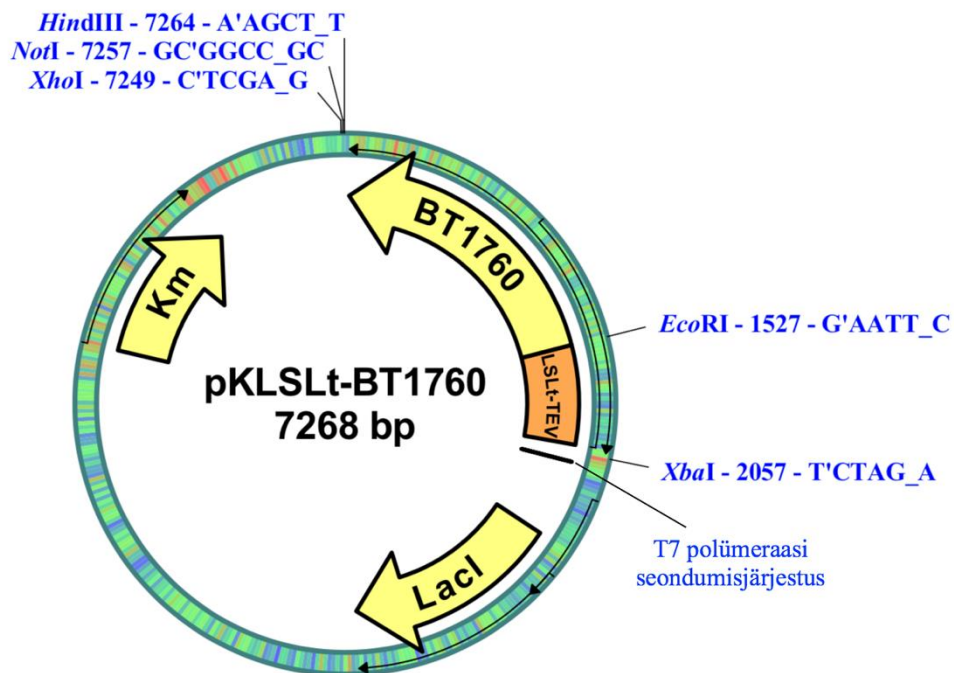
LISA 1

Kõrge koopiaarvuga ekspresiooniplasmiid pURI3-BT1760Cter (Mardo *et al.*, 2017). Plasmiidis on C-terminaalse His₆-jäägiga endo-levanaasi BT1760 geen, ampitsiliini resistentsuse geen, IPTG-ga indutseeritav bakteriofaagi T7 RNA polümeraasi seondumisjärjestus ja restriктаaside äratundmisjärjestused. Visualiseerimiseks kasutati programmi pDRAW32 ver. 1.1.146 (<http://www.acaclone.com/>).



LISA 2

Ekspressiooniplasmiid pKLSLt-BT1760 (konstrueerinud T. Visnapuu). Plasmiidis on endolevanaasi BT1760 geen koos LSLt märgist kodeeriva järjestusega, kanamütsiini resistentsuse geen, IPTG-ga indutseeritav bakteriofaagi T7 RNA polümeraasi seondumisjärjestus, Lac-operoni repressorvalk LacI ja restriктаaside äratundmisjärjestused. Visualiseerimiseks kasutati programmi pDRAW32 ver. 1.1.146 (<http://www.acaclone.com/>).



LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Luiza Tolokonnikova,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose ***Bacteroides thetaiotaomicron*'i endo-levanaasi lektiinmärgisega valgu puhastamine, biokeemiliste omaduste kindlakstegemine ja immobiliseerimine agarosmaatriksile,** mille juhendaja on kaasprofessor Triinu Visnapuu, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **01.06.2022** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Luiza Tolokonnikova

31.05.2021