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

# ***Thermobifida halotolerans'i*** **DyP-tüüpi peroksüdaasi puhastamine ja kineetiline iseloomustamine**

Bakalaureusetöö
12 EAP

Yayuan Min

Juhendaja PhD Jürgen Jalak

TARTU 2022

**Infoleht**

***Thermobifida halotolerans*'i DyP-tüüpi peroksüdaasi puhastamine ja kineetiline iseloomustamine**

*Thermobifida halotolerans*'st pärinev DyP-tüüpi peroksüdaas (*Th*DyP) on heemi sisaldav peroksüdaas. Tulenevalt oma katalüütilistest omadustest ja substraatide spetsiifilisuse poolest nähakse bakteriaalsetel DyP-tüüpi peroksüdaasidel suurt potentsiaali biotehnoloogilistes rakendustes, näiteks sünteetiliste värvainetega saastunud reovee töötlemisel ja ligniini lagundamisel. Käesolevas töös edukalt ekspresseeriti ja puhastati katalüütiliselt aktiivne *Th*DyP. *Th*DyP-i kineetikat iseloomustati kasutades substraatidena ABTS-i ja vesinikperoksiidi ning määrati näilised kineetilised parameetrid mõlema substraadi suhtes. ABTS-i oksüdeerimisel täheldati positiivset kooperatiivsust, mille iseloomustamiseks määrati Hilli koefitsient.

**Märksõnad**: Bakteriaalne DyP-tüüpi peroksüdaas, *Thermobifida halotolerans*, kooperatiivsus, substraat inhibitsioon

**CERCS**: P310 Proteiinid, ensümoloogia

**Purification and kinetic characterisation of *Thermobifida halotolerans* DyP-type peroxidase**

DyP-type peroxidase from *Thermobifida halotolerans* (*Th*DyP) is a heme-containing peroxidase. Catalytic properties and substrate specificity of bacterial DyP-type peroxidase hold a great potential in biotechnological applications, such as the treatment of dye-contaminated wastewater and lignin valorization. In this study the catalytically active *Th*DyP was successfully expressed and purified. Kinetic characterisation was carried out by using ABTS and hydrogen peroxide as substrates. The enzyme's specific activity and apparent kinetic parameters were determined. Oxidation of ABTS displayed positive cooperativity, for which Hill coefficient was determined.

**Keywords**: Bacterial DyP-type peroxidase, *Thermobifida halotolerans*, cooperativity, substrate inhibition

**CERCS**: P310 Proteins, enzymology

**SISUKORD**

KASUTATUD LÜHENDID…….. 5

SISSEJUHATUS……. 6

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE…….. 7

1.1. *Thermobifida halotolerans*……..7

1.2. Bakteriaalse *Th*DyP-tüüpi peroksüdaasi omadused……..7

1.2.1. Bakteriaalse *Th*Dyp-tüüpi peroksüdaasi füsioloogiline roll……..9

1.3. Bakteriaalse *Th*DyP-tüüpi peroksüdaasi katalüütiline mehhanism……..10

1.4. Bakteriaalse *Th*DyP-tüüpi peroksüdaasi biotehnoloogilised võimalused…… 12

2. EKSPERIMENTAALOSA…….. 13

2.1. Töö eesmärgid…….. 13

2.2. Materjal ja metoodika…….. 13

2.2.1. Kasutatud materjalid……... 13

2.2.2. SDS-polüakrüülamiid geelelektroforees……. 13

2.2.3. *Th*DyP-i aktiivsuse eelkatsed……..14

2.2.4. *Th*DyP-i ekspresseerimine……... 15

2.2.5. *Th*DyP-i puhastamine ja valgu kontsentratsiooni määramine…… 15

2.2.6. *Th*DyP-i eriaktiivsuse määramine……16

2.2.7. Kineetiliste parameetrite määramine ABTS-i ja H2O2 suhtes…… 17

2.3. Tulemused ja arutelu……19

2.3.1. *Th*DyP-i aktiivsuse eelkatsed……19

2.3.2. Valgu ekspresseerimine ja puhastamine……22

2.3.3. *Th*DyP-i preparatsiooni eriaktiivsus……25

2.3.4. Kineetika……..25

KOKKUVÕTTE……29

SUMMARY……30

KIRJANDUSE LOETELU…….. 31

LIHTLITSENTS.....34

**KASUTATUD LÜHENDID**

ABTS - 2,2′-asino-bis-[3-etüülbensotiasoliin-6-sulfoonhape]

BSA - veise seerumi albumiin

DyP - *Dye-decolorizing peroxidase*

$k^{obs}$- empiiriline kiiruskonstant, $v_0/E_0$

$k_{cat}^{app}$ - näiline katalüütiline konstant

$K_m^{app}$- näiline Michaelise konstant

OD - optiline tihedus

Rz - Reinheitszahl-i väärtus

SDS - naatriumdodetsüülsulfaat

$V_{max}$ - maksimaalne piirkiirus

**SISSEJUHATUS**

DyP-tüüpi peroksüdaasid on heemi sisaldavad bakteriaalsed peroksüdaasid, mis katalüüsivad vesinikperoksiidi toimel substraadi oksüdatsiooni. Bakteriaalsete DyP-tüüpi peroksüdaaside substraatide hulka kuuluvad ABTS, aso- ja antrakinoon värvid ja fenoolsed ühendid. Ainulaadse substraadi spetsiifilisus poolest omavad bakteriaalsed DyP-tüüpi peroksüdaasid suurt potentsiaali biotehnoloogilistes rakendustes, näiteks sünteetiliste värvainete töötlemises ja ligniini lagundamises. Vaatamata eelnimetatud mudelsubstraatide laialdasele kasutusele, pole seni teada, mis on bakteriaalse DyP-tüüpi peroksüdaasi bioloogiline substraat.

*Th*DyP-tüüpi peroksüdaas pärineb bakterist *Thermobifida halotolerans*, mida iseloomustab kõrge temperatuuri ja soola taluvus. *Thermobifida halotolerans*'i on seni vähe uuritud, mistõttu ka *Th*DyP-st on vähe teada. *Thermobifida halotolerans*'i bioloogilistele omadustele tuginedes võib eeldada, et *Th*DyP talub kõrget ioonset jõudu, mis muudab selle DyP-tüüpi peroksüdaasi huvipakkuvaks biotehnoloogiliste tööstusprotsesside jaoks.

Käesoleva töö eesmärgiks on ekspresseerida ja puhastada *Th*DyP-tüüpi peroksüdaas ning iseloomustada *Th*DyP-i kineetikat eriaktiivsuse ja näiliste kineetiliste parameetrite alusel.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. *Thermobifida halotolerans*

*Thermobifida halotolerans* (YIM 90462) on aeroobne, gram-positiivne aktinobakter, mis isoleeriti Edela-Hiina Yunnani provintsi soolakaevandusest. *Thermobifida* perekonda kuulub *Thermobifida halotolerans*, *Thermobifida alba, Thermobifida fusca* ja *Thermobifida cellulosilytica. Thermobifida halotolerans* erineb teistest *Thermobifida* bakteriliikidest kõrge NaCl taluvuse poolest. Laboritingimustel on *T. halotolerans* võimeline kasvama maksimaalselt kuni 10% (w/v) NaCl kontsentratsiooni juures. Kontrastina *T. alba* ja *T. cellulosilytica* puhul on maksimaalse NaCl kontsentratsiooni taluvuseks 3%. *T. halotolerans'i* optimaalsed kasvutingimused on 45°C ja pH 7-8 juures. (Yang et al., 2008)

*Thermobifida* liikide juures on täheldatud suurepärast tselluloosi lagundamise võimet (Yang et al., 2008)**.** Näiteks *Thermobifida fusca* DyP-tüüpi peroksüdaasil (*Tfu*DyP) on tuvastatud oksüdatiivne aktiivsus *Kraft*-ligniini suhtes (Rahmanpour et al., 2016). Lisaks on *Tfu*DyP-l näidatud ka termostabiilset aktiivsust antrakinoonvärvide ja fenoolsete ühendite suhtes (van Bloois et al., 2010).

Teadmised *Thermobifida halotolerans*'st on küll limiteeritud, kuid bakteri omaduste poolest, võib eeldada, et *Thermobifida halotolerans*'i DyP-tüüpi peroksüdaas talub kõrget ioonset jõudu ja seega omab potentsiaali biotehnoloogilistes rakendustes.

## 1.2. Bakteriaalse *Th*DyP-tüüpi peroksüdaasi omadused

*Thermobifida halotolerans Dye-decolorizing Peroxidase* (*Th*DyP) on heemi sisaldav peroksüdaas. Peroksüdaasid on oksüdoreduktaasid, mis katalüüsivad vesinikperoksiidi ($H_2O_2$) toimel substraadi oksüdatsiooni, kasutades $H_2O_2$ elektronaktseptorina (van Bloois et al., 2010) ja heemi kofaktorina (Banci, 1997). Heemi sisaldavate peroksüdaaside neeldumisspektritele on omane Soret piik neeldumismaksimumiga umbes 400 nm lainepikkusel, mis vastab heemist tulenevale neeldumisele. Olenevalt ensüümist võib Soret piigi neeldumismaksimumi lainepikkus pisut varieeruda, näiteks *Tfu*DyP-l täheldati Soret piiki 404 nm lainepikkusel ja *Tc*DyP-l täheldati 406 nm juures (Rahmanpour et al., 2016; Chen et al., 2015). Reinheitszahl väärtus (Rz) on heemi ja valgu aromaatsete aminohappejääkide neeldumise suhe, mis annab üldise hinnangu valgu küllastatusele heemiga.

Heemi sisaldavaid peroksüdaase liigitakse taimseteks ja loomseteks superperekondadeks, taimseid peroksüdaase jagatakse omette kolme kategooriasse (I, II, III) (Hofrichter et al., 2010). *Dye-decolorizing peroxidase* (DyP) ei kuulu aga heem peroksüdaasi superperekondade

alla, vaid eksisteerib eraldi heemi sisaldava peroksüdaasi perekonnana. Erinevus teistest heem peroksüdaasidest seisneb ensüümi primaarjärjestustes ja struktuuris. Bakteriaalsed DyP-d esinevad peamiselt dimeeridena ning nende tertsiaarse struktuuri moodustavad alfaheeliksid, mille vahel on antiparalleelsed beeta-võileiva voldid (Joonis 1). Sellist struktuuri ei leidu klassikalistes heemi sisaldavates peroksüdaasides, mis on enamasti alfaheeliksilise ehitusega (Veitch, 2004).

DyP ensüüme klassifitseeritakse järjestuse alusel nelja klassi: A, B, C, D. Klassid A, B ja C on valdavalt bakteriaalsed DyP-d ning D klassis on seente DyP-d (Brown et al., 2012). A klassi DyP-e iseloomustab Tat signaaljärjestuse olemasolu valgu N terminuses, mis on vajalik selle transpordiks periplasmasse (van Bloois et al., 2010). Lisaks on A klassi DyP-de aminohappeline järjestus lühem kui C ja D klasside DyP-tüüpi peroksüdaasidel, kuid pikem kui B klassi DyP-del. B ja C klassi DyP-d on tsütoplasmaatilised ensüümid ja osalevad rakusiseses metabolismis (Yoshida & Sugano, 2015).

A klassi DyP-tüüpi peroksüdaaside hulka kuulub *TfuDyP*, mis pärineb bakterist *Thermobifida fusca* (Colpa et al., 2014). *Thermobifida fusca* ja *Thermobifida halotolerans* kuuluvad ühte bakteriperekonda ning need liigid on omavahel sarnased (16S rRNA geenijärjestuste sarnasus on 97%), millele tuginedes võib pidada ka *Th*DyP-i potentsiaalseks A klassi DyP-tüüpi peroksüdaasiks (Yang et al., 2008).

2015. aastal on välja pakutud uus klassifikatsioon, mille alusel jagunevad DyP-d kolmeks põhitüübiks (Yoshida & Sugano, 2015). Vastavalt uuele jaotusele on A klassi DyP liigitatud I *(intermediate*) tüüpi, B klassi DyP on P (*primitive*) tüüpi ja V (*advanced*) tüübi alla kuuluvad C ja D klassi DyP-d. Klassifitsioon on järjestuste alusel, I-tüübil on on pikem järjestus kui V-tüübil ning P-tüübil on kõige lühem ja ka kompaktsem järjestus.

*Dye-decolorizing Peroxidase* nimi viitab sellele, et tegemist on ensüümiga, mis suudab lagundada värvainet. Bakteriaalsed DyP-d on võimelised oksüdeerima asovärve, ABTS-i ja sünteetilisi antrakinoon värve, mis on teiste peroksüdaaside jaoks kehvad substraadid (van Bloois et al., 2010). Lisaks kuuluvad bakteriaalsete DyP-de substraatide hulka ka ligniini monomeerid ja nende analoogid, mille otsene oksüdatsioon nõuab kõrget redokspotentsiaali, mida aga suudavad paljud bakteriaalsed DyP-d vahendada.

**Joonis 1.** *Thermobifida cellulosilytica* DyP-tüüpi peroksüdaasi kristallstruktuur (Bank, s.a.). Natiivne valk esineb peamiselt homodimeerina, monomeerid on tähistatud eri värvidega.

### 1.2.1. Bakteriaalse *Th*DyP-tüüpi peroksüdaasi füsioloogiline roll

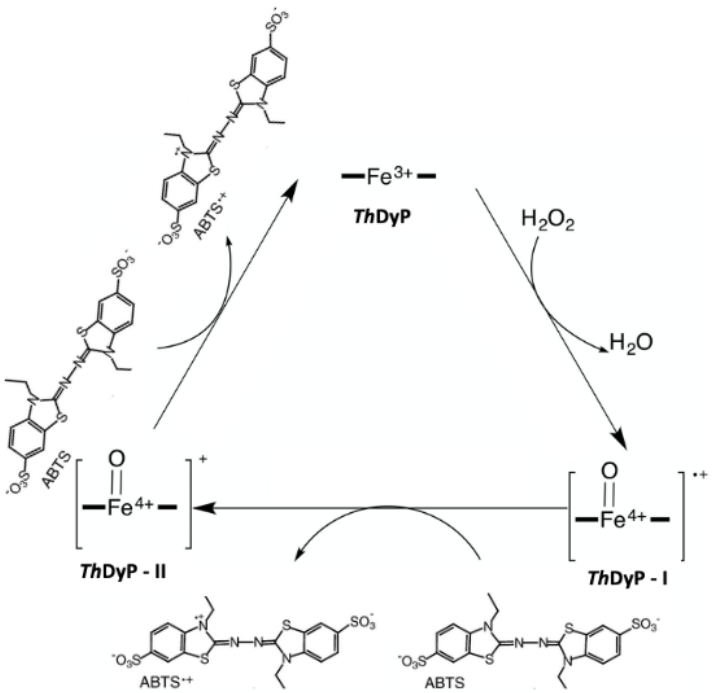
Seni teadaolevate bakteriaalsete DyP-tüüpi peroksüdaaside füsioloogiline roll pole täielikult teada ning nende aktiivsuse seos valgu füsioloogilise funktsiooniga vajab täiendavat uurimist. Seente DyP-tüüpi peroksüdaasi üheks füsioloogiliseks rolliks on välja pakutud osalemine ligniini oksüdatsioonis (Liers et al., 2010).

Teine välja pakutud funktsioon pärineb katsest *Halobacterium salinaruhmas* A klassi DyP-tüüpi peroksüdaasiga (*VNG0798H*), mille DyP-i eemaldamisel ja 25 mM $H_2O_2$ lisamisel, vähenes *knockout*-mutandi ellujäämise määr 99,9% võrra. Sellest katsest järeldati, et DyP-tüüpi peroksüdaasi (*VNG0798H*) olemasolu pakub kaitset $H_2O_2$ eest ning on seotud oksüdatiivse stressi reguleerimisega (Kaur et al., 2010).

B ja C klassi DyP-tüüpi peroksüdaaside võimalike füsioloogiliste rollide kohta on vähem teada. Näiteks arvatakse, et B klassi DyP-del on otsene seos raua omastamisel ja säilitamisel (Singh & Eltis, 2015). DyP-tüüpi peroksüdaaside substraatide uurimine on oluline, kuna sobivate substraadide alusel on võimalik määrata laiemalt ja täpsemalt DyP-i füsioloogilist rolli organismides.

### 1.3. Bakteriaalse *Th*DyP-tüüpi peroksüdaasi katalüütiline mehhanism

Bakteriaalse DyP-tüüpi peroksüdaasi katalüütiline mehhanism on sarnane teistele heemi sisaldavatele peroksüdaasidele. Sarnanedes heemi sisaldavatele peroksüdaasidele, kasutavad bakteriaalsed DyP-tüüpi peroksüdaasid ping-pong mehhanismi (joonis 2). DyP-i korral kujutab katalüütiline mehhanism endast tsüklit, kus esmalt seostub vesinikperoksiid ensüümiga ning moodustub ensüümi oksüdeeritud vorm (kompleks I, *Th*DyP-I) ja vabaneb $H_2O$. Seejärel toimub ühe elektroni ülekanne ja ensüümi oksüdeeritud vorm redutseeritakse substraadi (vesiniku doonori) poolt ning moodustub kompleks II (*Th*DyP-II) koos doonori radikaaliga. Kompleks II jätkab redutseerimist ning järgmise elektroni ülekandudes taastub ensüümi esialgne vorm ehk puhkefaas (Deyhimi & Nami, 2012). Ensüümi puhkefaasi taastumine ja kompleks I moodustumine on kinnitust leidnud kuid kompleks II esinemine on DyP-tüüpi peroksüdaaside puhul vaidluse all. Üksikutel DyP-tüüpi peroksüdaasidel on näidatud kompleks II moodustumist, näiteks A klassi *Tc*DyP-l täheldati kompleks II moodustumist $H_2O_2$ ja hüdrokinooni juuresolekul (Chen et al., 2015). Erinevalt teistest heemi sisaldavatest peroksüdaasidest peetakse DyP-tüüpi peroksüdaaside puhul tõenäolisemaks puhkefaasi taastumist otse kompleks I-st kahe elektroni üheaegse ülekande tulemusena. Tulenevalt sellest, et siiani tuvastatud kompleks II moodustunud DyP-de osakaal on väike, vaadatakse kompleks II tõepärasusele kriitiliselt.




**Joonis 2.** *Th*DyP-i katalüütiline tsükkel vastavalt ping-pong mudelile. Substraadiks on ABTS. Näidatud on ensüüm puhkeolekus (*Th*DyP) ning nii kompleks I (*Th*DyP-I) kui ka kompleks II (*Th*DyP-II) esinemine. Modifitseeritud (Chen et al., 2015).

Ping-pong kineetika korral esineb substraat inhibitsioon, näiteks on seda kirjeldatud mädarõika peroksüdaasi (HRP) kineetika uurimisel (Šekuljica et al., 2015). Substraat inhibitsiooni korral ei saa ensüümi aktiivsuse kirjeldamisel kasutada Michaelis-Menteni võrrandit vaid on vaja kasutada substraat inhibitsiooni võrrandit (võrrand 1).

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_{Si}}} \quad (1)$$

Mõningate bakteriaalsete DyP-tüüpi peroksüdaaside puhul on täheldatud kooperatiivsust, näiteks on kooperatiivsus iseloomulik *Thermomonospora curvata*'st pärinevale A klassi DyP-le (*Tc*DyP) (Chen et al., 2015). *Tc*DyP-tüüpi peroksüdaasi kineetikat uuriti ABTS-i ja antrakinoon värvide (*reactive blue* seeria) abil ja leiti, et oksüdeerimisel esines sigmoidset kõverat, mis viitas kooperatiivsusele.

Kooperatiivsus on nähtus, mille korral substraadi seostumisel muutub ensüümi subühiku konformatsioon, ning see muutus saab üle kanduda kõrval olevale subühikule. Positiivse kooperatiivsuse korral konformatsiooniline üleminek suurendab subühiku substraadi seostumise afiinsust ja/või katalüütilist aktiivsust. Negatiivse kooperatiivsuse korral konformatsiooniline üleminek vastupidi vähendab subühiku substraadi seostumise afiinsust või katalüütilist aktiivsust. Erinevalt Michaelis-Menteni kineetikale iseloomulikust hüperboolsest kõverast, iseloomustab kooperatiivsust sigmoidne kõver. Kooperatiivsuse hindamiseks rakendatakse Hilli võrrandit (2), milles $k_{cat}$ ja [S] on sarnase sisuga kui Michaelis-Menteni võrrandi puhul. Hilli võrrandi $K_{0,5}$ ei ole samaväärne Michaelise konstandiga ($K_m$), ehkki matemaatiliselt täidab sarnast ülesannet ja kujutab endast substraadi kontsentratsioon väärtust, mille korral reaktsiooni kiirus võrdub poolega maksimaalsest piirkiirusest. Hilli koefitsient h iseloomustab kooperatiivsust. Positiivse kooperatiivsuse puhul on Hilli koefitsient h > 1 ja negatiivse kooperatiivsuse puhul h < 1. Mittekooperatiivse ensüümi korral h = 1 (Hunter & Anderson, 2009).

$$\frac{v_0}{E_0} = \frac{k_{cat} \times [S]^h}{K_{0,5}^h + [S]^h} \quad (2)$$

### 1.4. Bakteriaalse *Th*DyP-tüüpi peroksüdaasi biotehnoloogilised võimalused

DyP-tüüpi peroksüdaasid omavad suurt potentsiaali biotehnoloogilistes rakendustes oma katalüütiliste omaduste ja substraadi spetsiifilisuse poolest. Kaks peamist potentsiaalset DyP-de tööstuslikku rakendust on sünteetiliste värvainete ja ligniini lagundamine. Erinevalt teistest DyP-tüüpi peroksüdaasidest on bakteriaalseid DyP-e lihtsam ekspresseerida ja geneetiliselt manipuleerida, mis seab bakteriaalseid DyP-e eelistavale positsioonile.

DyP-tüüpi peroksüdaase saab rakendada sünteetiliste värvainetega saastunud reovee bioremediatsioonis. Sünteetilisi värvaineid kasutatakse näiteks tekstiili-, kosmeetika-, toidu ja farmaatsiatoodete valmistamisel. 2013. aasta tekstiilitoodangu andmete põhjal saastati aastas hinnanguliselt 11 miljonit tonni vett sünteetiliste värvainetega, mis moodustus 20% kogu tööstuslikust reoveest (Routoula & Patwardhan, 2020). Levinumad sünteetilised värvaineid, mida leidub tööstuslikus reovees, on aso- ja antrakinoon värvid, mida on raske lagundada. Bakteriaalsetel DyP-del on täheldatud 40 korda kõrgemat aktiivsust värvi lagundamisel võrreldes teiste värvaineid lagundavate ensüümidega (Santos et al., 2014), mis seab DyP-e olulisele kohale sünteetiliste värvainete lagundamisel.

Teiseks võimalikuks DyP-de biotehnoloogiliseks rakenduseks on ligniini lagundamine. Ligniin on aromaatne biopolümeer, mida leidub enamikus maismaataimedes, moodustades umbkaudu 25% taime biomassist. Biomassi töötlemisel eraldatakse ligniini tselluloosist ja hemitselluloosist. Ligniini töötlemine on keeruline, mis tuleneb ligniini heterogeensest struktuurist ja tõrksast omadusest. Suur hulk ligniini tekib kõrvalsaadusena paberitööstusel, kus eraldatakse tselluloosist ligniin. 2022. aastal toodetakse hinnanguliselt USA bioetanooli tööstuses ligikaudu 60 miljonit tonni ligniini aasta kohta (Holladay et al., 2007). Ligniini peetakse ka üheks kandidaadiks fossiilsete kütuste asendajana. Ligniini depolümeriseerimisest saab fenüülpropaani, millest konverteeritakse fenoolseid kemikaale, mida saadakse praegu fosiilsetest kütustest, mis tähendab seda, et ligniinist saab toota biokütust. Ligniinist biokütuse tootmine hõlmab kolme etappi: ligniini eraldamine lignotselluloosist, ligniini depolümeriseerimine, depolümeriseeritud ligniini katalüütiline muundamine kütuseks sobilikeks süsivesinikeks (Ma et al., 2014). Bakteriaalsed DyP-d on aga võimelised lagundama ligniini ja modifitseerima ligniinist pärinevaid ühendeid (Lončar et al., 2016).

# 2. EKSPERIMENTAALOSA

## 2.1. Töö eesmärgid

1. *Th*DyP-i ekspresseerimine *E.coli*-s ja katalüütiliselt aktiivse ensüümi puhastamine läbi $Ni^{2+}$-afiinsuskromatograafia ja geelfiltratsiooni
2. *Th*DyP-i eriaktiivsuse ning näiliste kineetiliste parameetrite määramine

## 2.2. Materjal ja metoodika

### 2.2.1. Kasutatud materjalid

Eelkatsetes kasutatud *Th*DyP-i preparatsioon pärines TalTech-i Struktuuribioloogia ja ligniini biokeemia laborist.

*Th*DyP-i ekspresserimiseks kasutati TalTech-i Struktuuribioloogia ja ligniini biokeemia laborist pärinevat *Escherichia coli* tüve BL21 (DE3), kuhu oli transformeeritud koodon optimeeritud *Th*DyP-i geen, mis oli kloneeritud pET28a ekspressioonivektorisse (Twist Bioscience). pET28a kannab selektiivsusmärgisena kanamütsiini resistentsust andvat geeni. *Th*DyP-i geenijärjestuse ja His märgise vahele on disainitud trombiini äratundmisjärjestus.

Puhvrite komponendid Tris, NaOH, NaCl ja äädikhape pärinesid AppliChem'ist, tsitraat Sigma-Aldrich'ist ning HCl Lach-Ner'ist. Imidasool pärines Honeywell Fluka'st. Puhvrite valmistamisel kasutati mQ vett, mis oli täiendavalt puhastatud Chelex 100 katioonvahetuskromatograafiaga, et eemaldada raskmetallide ioonid. Valmistatud puhvritele lisati väike kogus Chelex 100 kandjat, et siduda puhvri tahketes komponentides lisandina leiduvaid raskmetalle.

*Th*DyP-i aktiivsuse katsetes kasutatud substraadid ABTS ja vesinikperoksiid pärinesid Sigma-Aldrich'ist.

### 2.2.2. SDS-polüakrüülamiid geelelektroforees

Valgueksprессiooni kontrollimiseks kasutati 10% SDS-PAGE ehk naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforeesi, mida valmistati järgnevatest osadest: lahutava geeli osa (10% akrüülamiidi/bis-akrüülamiidi lahus, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 10% SDS, 10% NAPS, TEMED), kontsentreeriv geeli osa (10% SDS, 1M Tris-HCl pH 6,8, 10% akrüülamiidi/bis-akrüülamiidi lahus, 10% NAPS).

Enne valguproovide geelile kandmist töödeldi neid 5x SDS proovipuhvriga (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 50% glütserool, 10% SDS, 0,5% broomfenoolsinine, 250 mM DTT) ja inkubeeriti 5 minutit temperatuuril 100℃. Geeli voolutati elektroforeesi puhvris (0,4M glütsiin, 50 mM

Tris, 0,4% SDS). Referentsina kasutati valkude molekulmassimarkerit *Unstained Protein Mw #SMO431*. Elektroforees viidi läbi 1,5 tunni vältel kasutades pinget vahemikus 100 - 147 V. Valkude visualiseerimiseks värviti geeli värvilahusega Coomassie blue (0,25% Coomassie R 250, 7% äädikhape, 25% etanool). Geeli hoiti värvilahuses üleöö loksutil, mille järel liigne värv eemaldati geelist lahusega, mis sisaldas 7% äädikhapet ja 25% etanooli. Alternatiivina kasutati foreesigeelide värvimiseks kiirmeetodit värviga InstantBlue® Coomassie Protein Stain (Abcam), mille korral liigse värvi eemaldamine ei olnud vajalik, ja tulemus oli loetav 15 minuti möödumisel.

### 2.2.3. *Th*DyP-i aktiivsuse eelkatsed

*Th*DyP-le sobiva puhvri leidmiseks valmistati naatriumatsetaadi puhver (pH 5,0) ja naatriumtsitraadi puhver (pH 3,5). Ensüümi aktiivsus määrati mõlema puhvri keskkonnas (puhvri lõppkontsentratsioon 50 mM), kasutades substraatidena ABTS-i ja $H_2O_2$. *Th*DyP-i kontsentratsioon reaktsioonisegus oli 5 nM, $H_2O_2$ oli 100 µM ja ABTS oli 100 µM. *Th*DyP-i aktiivsus oli 50 mM naatriumatsetaat (pH 5,0) puhvri korral suurem, mistõttu kõik edasised katsed tehti naatriumatsetaat puhvriga.

Ensüümi näiliste kineetiliste parameetrite määramiseks ABTS-i ja $H_2O_2$ suhtes tehti katsed nii, et ühe substraadi kontsentratsiooni varieeriti ja teise substraadi kontsentratsioon hoiti konstantne. Reaktsioonid viidi läbi toatemperatuuril 50 mM naatriumatsetaadi puhvris pH 5,0 ja mõlema substraadi puhul tehti kolm seeriat. ABTS-i seeriates varieerusid ABTS-i kontsentratsioonid vahemikus 50 - 5000 µM ja $H_2O_2$ kontsentratsioon reaktsioonisegus oli 0,1 mM. $H_2O_2$ seeriates varieerusid $H_2O_2$ kontsentratsioonid vahemikus 5 - 300 µM ja ABTS-i kontsentratsioon oli reaktsioonisegus 0,1 mM. *Th*DyP-i kontsentratsioon reaktsioonisegudes oli 10 nM. Reaktsiooni lõpp-ruumalaks oli 800 µL ja reaktsioon käivitati $H_2O_2$ lisamisega reaktsioonisegusse. Reaktsiooni tulemusel tekkiva $ABTS^{+*}$-i neeldumist mõõdeti lainepikkusel 420 nm spektrofotomeetriga (UV-1900i Shimadzu) 120 sekundi jooksul. Pime aeg oli 20 sekundit. Neeldumised teisendati kontsentratsioonideks kasutades $ABTS^{+*}$-i ekstinktsioonikoefitsienti lainepikkusel 420 nm ($\varepsilon_{ABTS}$ = 32000 $cm^{-1} \times M^{-1}$). Reaktsioonide algkiirused leiti lineaarse regressioon alusel teljestikus $ABTS^{*+}$-i kontsentratsioon vs. aeg. Kineetiliste parameetrite leidmiseks avaldati reaktsiooni algkiirused *Th*DyP-i kontsentratsiooni suhtes ($k^{obs}$, $v_0/E_0$) ja analüüsiti mittelineaarse regressiooniga, teljestikus $k^{obs}$ vs. substraadi kontsentratsioon. Regressioonimudelina kasutati Michaelis-Menteni

võrrandit ning näiliste kineetiliste parameetrite väärtused leiti vähimruutude meetodi alusel. Andmeanalüüs viidi läbi programmiga *Statistica*.

### 2.2.4. *Th*DyP-i ekspresseerimine

Transformante kasvatati LB tardsöötmel (0,5% pärmiekstrakt, 1% trüptoon, 1% NaCl, 1,7% agar) üleöö 37°C juures. Bakteri ümberkülvamiseks valmistati LB vedelsöödet (0,5% pärmiekstrakti, 1% trüptoon, 1% NaCl) milliQ-veega 1L koguses ning autoklaaviti. Autoklaavitud vedelsöötmele lisati kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 30 µg/mL. Tardsöötmel kasvatatud transformandid külvati LB vedelsöötmesse ning kasvatati loksutil (37°C, 180 rpm). Loksutil kasvatatud bakterikultuur viidi üle kahte 2L kolbi ning kasvatati loksutil (37°C, 180rpm) kuni bakterikultuur oli saavutanud $OD_{600}$ väärtuseks 0,5. *Th*DyP-i ekspressiooni indutseerimiseks lisati bakterikultuurile IPTG lahust lõppkontsentratsiooniga 0,5 mM ning kasvatati loksutil üleöö (30°C, 180 rpm). Üleöö kasvanud kultuuri $OD_{600}$ väärtuse mõõtmiseks tehti 10-kordne lahjendus mQ-veega, saades $OD_{600}$ väärtuseks 0,43. Rakkude söötmest eraldamiseks tsentrifuugiti rakukultuuri (10 min, 3000 x g, 4°C). Peale tsentrifuugimist eemaldati supernatant ning jääl lisati sademele 20 mL puhvrit (100 mM NaCl, 10 mM Tris, MilliQ). Suspendeeritud segu tsentrifuugiti, eemaldati supernatant ning rakud külmutati vedela-lämmastikuga ja säilitati -80°C juures.

### 2.2.5. *Th*DyP-i puhastamine ja valgu kontsentratsiooni määramine

Lüüsimiseks rakud sulatati toatemperatuuril ning suspendeeriti 1 mL A puhvris (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidasool, pH 7,5). Rakud lüüsiti sonikeerimisega (BANDELIN SONOPULS HD 2070). Sonikeerimistsüklit korrati 5 korda (10 s, 6 cycle x 10%, power 65%). Lüüsitud rakud tsentrifuugiti (Sorvall RC5B Plus, ss31 rootor) 16 000 rpm, 30 minutit ja sademe pealt eraldati supernatant. Supernatant filtreeriti läbi 0,20 µm poori suurusega süstlafiltri (CHROMAFIL® PVDF).

Filtreeritud supernatant laeti vedelikkromatograafia süsteemile (ÄKTAprime™ plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi) ning voolutati toatemperatuuril läbi $Ni^{2+}$-afiinsuskromatograafia kolonni (HisTrap™ Fast Flow Crude, 1 mL, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi). Histidiinimärgisega *Th*DyP-i elueeriti $Ni^{2+}$-afiinsuskromatograafia kolonnist B puhvriga (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 500 mM imidasool, pH 7,5) 1 mL/min voolukiirusel. Elueeritud valgufraktsioone hoiustati 4°C juures pimedas. Valgu puhastamisel

kasutatud A ja B puhvrid olid filtreeritud 0,22 µm poorisuurusega membraanfiltriga ja degaseeritud.

Puhastatud valgu kontsentratsiooni ja Reinheitszahl-i väärtuste (Rz) määramiseks mõõdeti valgu neeldumist spektrofotomeetril (UV-1900i Shimadzu) lainepikkustel 250 nm - 600 nm. Mõõtmised tehti kvartsküvetis (l = 1 cm) ning valgukontsentratsioonide leidmiseks kasutati valgu järjestuse põhjal arvutatud ekstinktsioonikoefitsient 280 nm juures ($\varepsilon_{ThDyP}$ = 45950 $cm^{-1}\times M^{-1}$). Kõrgema valgukontsentratsiooniga fraktsioone analüüsiti 10% SDS-polüakrüülamiidgeelil kontrollides valguproovi puhtust. Reinheitszahl-i väärtused avaldati 415 nm ja 280 nm lainepikkustel mõõdetud neeldumiste suhtena ($Rz = A_{415}/A_{280}$).

Histidiini märgise eemaldamiseks töödeldi ensüümipreparatsiooni trombiiniga (1mg:2U) 4°C juures üleöö. Trombiini töötluse õnnestumist kontrolliti 10% SDS-polüakrüülamiid geelelektroforeesil. Puhastatud valgu heemiga küllastamiseks lisati puhastatud valgule heemi moolsuhtes 1:2 ning inkubeeriti 2 päeva 4°C juures. Töödeldud valguproovi puhastati *HiPrep 26/10 Desalting* geelfiltratsioonikolonniga (GE Healthcare Bio-Sciences) vedelikkromatograafia süsteemis (ÄKTAprime™ plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi) voolukiirusega 0,5 mL/min. Vedelikkromatograafia süsteemi tasakaalustati eelnevalt puhvriga (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5), puhvrit filtreeriti 0,22 µm poorisuurusega membraanfiltriga ja degaseeriti. Puhastatud valgufraktsioone hoiustati 4°C juures pimedas.

Trombiini ja heemi töötluse läbinud valguproovile määrati Reinheitszahl-i väärtus samadel tingimustel nagu eelnevalt kirjeldatud heemiga töötlemata valguproovile. Kuna Soret piigi neeldumismaksimum oli 415 nm juures, määrati Rz väärtus $Rz = A_{415}/A_{280}$. Valguproovide puhtust kontrolliti SDS-polüakrüülamiidgeelil.

### 2.2.6. *Th*DyP-i eriaktiivsuse määramine

*Th*DyP-tüüpi peroksüdaasi aktiivsuse määramiseks kasutati substraatidena ABTS-i ja vesinikperoksiidi ning mõõdeti $ABTS^{*+}$-i moodustumist ajas. $ABTS^{*+}$-i teket määrati spetsiifilise neeldumise alusel spektrofotomeetriga UV-1900i Shimadzu, kasutades lainepikkust 420 nm. Mõõtmised tehti 120 sekundi jooksul intervalliga 1 sekund.

*Th*DyP-i aktiivsuse määramiseks valmistati reaktsioonisegu, mis koosnes 50 mM naatriumatsetaati puhvrist pH 5, 0,1 mg/mL BSA-st, 1 mM ABTS-st ja 1 mM $H_2O_2$-st. Reaktsioonisegu lõpp-ruumalaks oli 800 µL. Reaktsioonisegu eelinkubeeriti 5 minutit 25 °C juures termostaadis. Reaktsioon käivitati 10 nM *Th*DyP-i lisamisega reaktsioonisegusse ning 30 sekundit pärast reaktsiooni käivitamist alustati neeldumiste mõõmist spektrofotomeetril.

Aktiivsuskatsed tehti kolmes korduses. *Th*DyP-i aktiivsused määrati Taltech-i Struktuuribioloogia ja ligniini biokeemia laborist pärineva *Th*DyP-i preparatsioonile ning käesoleva töö raames ekspresseeritud ensüümi puhastamise erinevates etappides.

Alternatiivina kasutati *Th*DyP-i aktiivsuse määramisel protokolli, mille korral ensüümi inkubeeriti enne reaktsiooni initsieerimist pikemalt. Reaktsioonisegu valmistamiseks tehti esmalt ABTS-i lahus (1,02 mM ABTS, 50 mM naatriumatsetaat puhver pH 5) ja $H_2O_2$ lahus (100 mM $H_2O_2$ , 50 mM naatriumatsetaat puhver pH 5), mida segati omavahel tausta lahuseks vahetult enne reaktsiooni initsieerimist, nii et ABTS-i ja vesinikperoksiidi lõppkontsentratsioonid olid mõlemad 1 mM. *Th*DyP-st valmistati ensüümi lahus (50 mM naatriumatsetaat puhver pH 5, 0,1 mg/mL BSA, 10 nM *Th*DyP). Selleks et ensüüm ei jääks katsuti seinte külge, lisati katsutisse esimesena naatriumatsetaadi puhver ja BSA. ABTS-i ja ensüümi lahust inkubeeriti 30 minutit 25℃ juures termostaadis. Reaktsioon käivitati ensüümi lahuse lisamisega tausta lahusesse, 20 sekundit peale reaktsiooni käivitamist mõõdeti *Th*DyP-i aktiivsust spektrofotomeetril. Reaktsioonisegu ruumalaks oli 1000 µL. Aktiivsuskatsele tehti kolm kordust.

Saadud tulemuste põhjal arvutati *Th*DyP-i reaktsioonikiirus ensüümi kontsentratsiooni kohta, kasutades $ABTS^{*+}$-i ekstinktsioonikoefitsient 420 nm juures $\varepsilon_{ABTS}$ = 32000 $cm^{-1}\times M^{-1}$ ja jagati 0,01 mM *Th*DyP-i kontsentratsiooniga.

### 2.2.7. Kineetiliste parameetrite määramine ABTS-i ja $H_2O_2$ suhtes

Käesoleva töö raames ekspresseeritud ja puhastatud *Th*DyP-tüüpi peroksüdaasi näiliste kineetiliste parameetrite määramiseks mõõdeti *Th*DyP-i aktiivsus erinevatel ABTS-i ja $H_2O_2$ kontsentratsioonidel. Katse metoodika on analoogne peatükis 2.2.6 kirjeldatud ensüümi aktiivsuse määramisega. ABTS-i seeriates varieerusid ABTS-i kontsentratsioonid vahemikus 50 - 5000 µM ja $H_2O_2$ kontsentratsioon oli reaktsioonisegus 1 mM. $H_2O_2$ seeriates varieerusid $H_2O_2$ kontsentratsioonid vahemikus 5 - 1000 µM ja ABTS-i kontsentratsioon oli reaktsioonisegus 1 mM. ABTS-i ja ensüümi lahust eelinkubeeriti 30 minutit 25 ℃ juures termostaadis. Tausta lahuse valmistamiseks ühendati ABTS-i lahus ja $H_2O_2$ lahus**.** Reaktsiooni initsieeriti ensüümi lahuse lisamisega tausta lahusesse, 20 sekundit peale reaktsiooni käivitamist alustati moodustunud $ABTS^{*+}$-i neeldumise mõõtmist spektrofotomeetril. Aktiivsuskatsed tehti kolmes korduses.

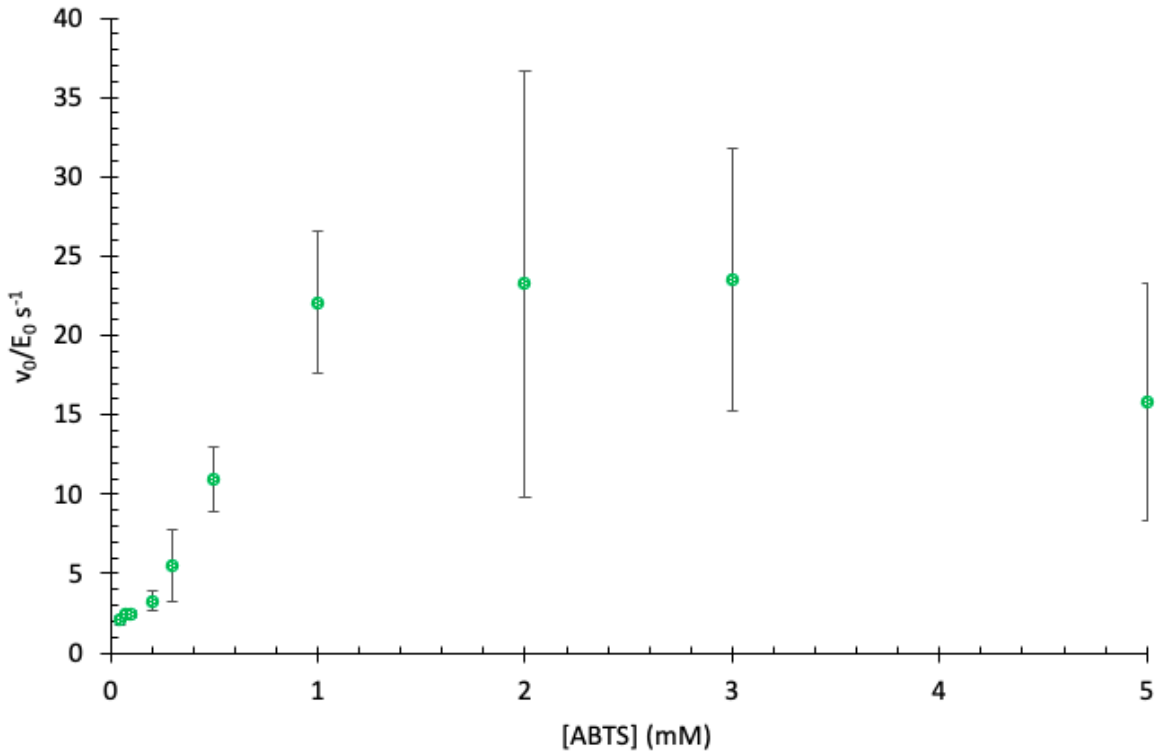
Tulemuste analüüsis kasutati peatükis 2.2.6 kirjeldatud arvutusmeetodit, mille alusel määrati *Statistica* programmiga näilised parameetrid Michaelis konstant ($K_m^{app}$) ja katalüütiline konstant ($k_{cat}^{app}$).

### 2.3. Tulemused ja arutelu

#### 2.3.1. *Th*DyP-i aktiivsuse eelkatsed

TalTech-i Struktuuribioloogia ja ligniini biokeemia laborist pärineva *Th*DyP-i valguproovil määrati kineetilised parameetrid, kasutades substraatidena ABTS-i ja $H_2O_2$ erinevatel kontsentratsioonidel (vt pt 2.2.3). Katse tulemuste põhjal koostati graafikud, kus on kujutatud *Th*DyP-i $k^{obs}(s^{-1})$ suhe substraadi kontsentratsiooniga (joonis 3 ja 4).

Reaktsiooni kiiruse sõltuvusel ABTS-i kontsentratsioonist täheldati madalamatel ABTS-i kontsentratsioonidel sigmoidset seost reaktsiooni kiiruse ja substraadi kontsentratsiooni vahel. Kõrgetel ABTS-i kontsentratsioonidel reaktsiooni kiirus langes substraadi kontsentratsiooni tõstmisega (joonis 3).

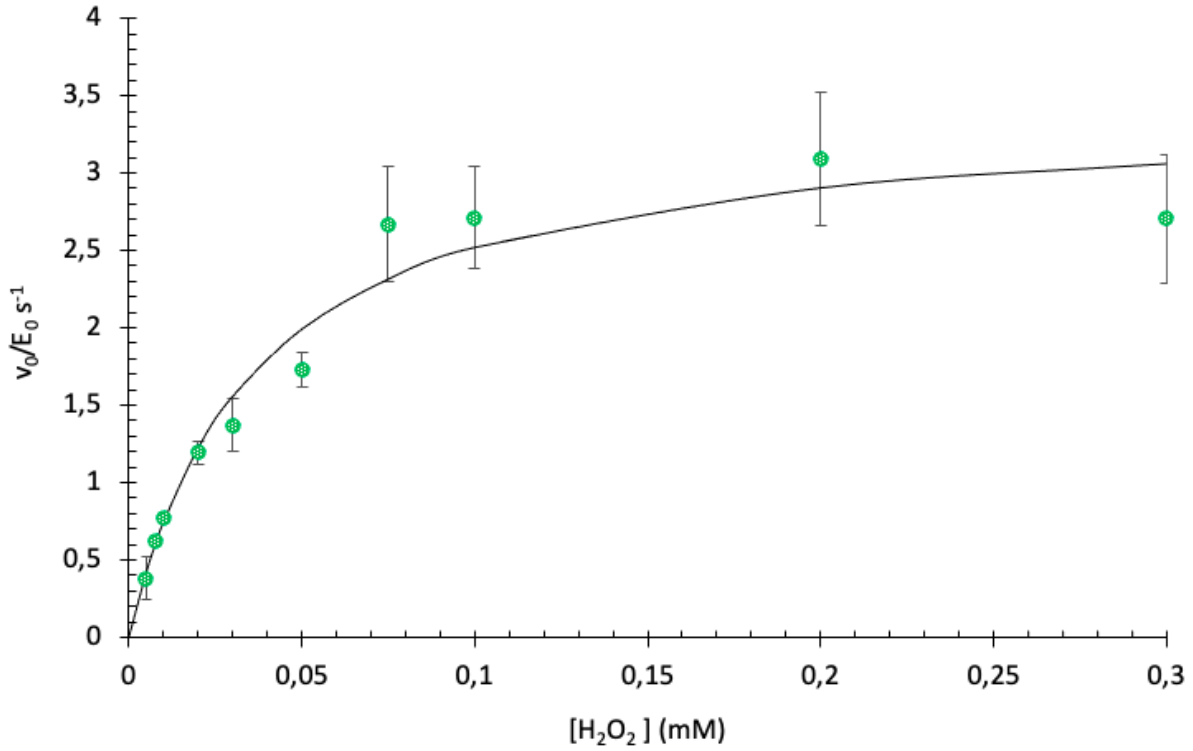



**Joonis 3.** *Th*DyP-i kiiruse sõltuvus substraadi kontsentratsioonist. Reaktsioonisegu koosnes 10 nM *Th*DyP, 0,1 mM $H_2O_2$ , 50 mM NaAC pH 5 ning tekkivat $ABTS^{+*}$-i mõõdeti 420 nm juures. Kiiruspunktid on kolme mõõtmise keskmised, veajooned on kolme mõõtmise standardhälbed.

Sigmoidne graafik viitab sellele, et tegemist on kooperatiivsusega (vt pt 1.3). Kooperatiivsuse esinemine ei olnud ootuspärane tulemus, kuid pole esmakordne nähtus A klassi DyP-tüüpi peroksüdaasi juures. Kooperatiivsust on varem täheldatud *Tc*DyP-i kineetika uurimisel, kus ensüümi substraadiks oli samuti ABTS (Chen et al., 2015)**.** Erinevalt *Tc*DyP-i kineetika tulemustest oli joonisel 3 näha 5 mM ABTS-i kontsentratsiooni juures substraat inhibitsiooni.

Põhjus, miks substraat inhibitsiooni esines on tingitud peatükis 1.3 kirjeldatud ping-pong kineetikast. Kõrge ABTS-i kontsentratsiooni juures on puhkeolekus *Th*DyP-i osakaal reaktsioonisegus suurem võrrelduna kompleks I ja kompleks II-ga (joonis 2). Sellest tingitult on suurenenud tõenäosus, et ABTS seostub puhkeolekus ensüümiga ning moodustub mitteproduktiivne ensüüm-substraat kompleks. Võrrandeid (1) ja (2) saab kasutada kooperatiivsuse ja substraat inhibitsiooni kirjeldamisel kui need esinevad eraldi. Kooperatiivsuse ja substraat inhibitsiooni kooseksisteerimisel ei ole mudelit, mille alusel kirjeldada seost reaktsiooni kiiruse ja substraadi kontsentratsiooni vahel ning ei ole võimalik määrata näiliste kineetiliste parameetrite väärtusi.

Erinevatel vesinikperoksiidi kontsentratsioonidel määratud reaktsiooni kiiruste põhjal koostati Michaelis-Menteni graafik (joonis 4).

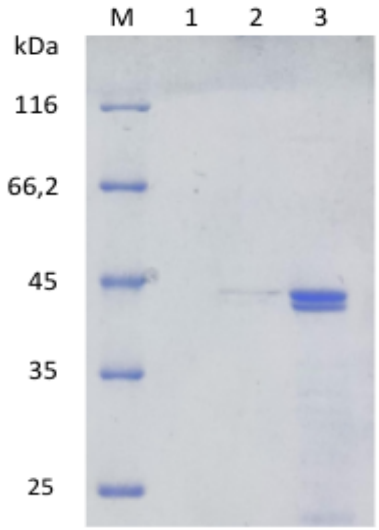



**Joonis 4.** *Th*DyP-i reaktsiooni kiiruse sõltuvus vesinikperoksiidi kontsentratsioonist. Reaktsioonisegu koosnes 10 nM *Th*DyP, 0,1 mM ABTS, 50 mM NaAC pH 5 ning tekkiva $ABTS^{+*}$-i mõõdeti 420 nm juures. Kiiruspunktid on kolme mõõtmise keskmised, veajooned on kolme mõõtmise standardhälbed. Regressioonkõver vastab Michaelis-Menteni võrrandile näiliste parameetritega $k_{cat}^{app}$ = 3,3 ± 0,2 $s^{-1}$ ja $K_m^{app}$ = 33 ± 5 µM.

Kuigi 0,3 mM vesinikperoksiidiga tehtud katsete korral saadi pisut madalam keskmine reaktsiooni kiirus kui 0,2 mM vesinikperoksiidiga, jääb erinevus veajoonte piiresse ning pole otseselt alust väita, et tegemist on substraat inhibtsiooniga. Kui määrata reaktsiooni kiiruseid

veelgi kõrgematel vesinikperoksiidi kontsentratsioonidel siis on ootuspärane substraat inhibitsiooni esinemine, sest see on tingitud *Th*DyP-tüüpi peroksüdaasi ping-pong kineetikast (vt pt 1.3). Peroksüdaaside aktiivsuse pärssimist kõrgemate $H_2O_2$ kontsentratsioonide juures on varem täheldatud näiteks ligniini peroksüdaasil (Wariishi & Gold, 1989). Vastavalt peatükis 1.3 kirjeldatud ping-pong kineetikale, kõrge vesinikperoksiidi kontsentratsiooni korral on kompleks I osakaal suurenenud. Samal ajal kõrge vesinikperoksiidi kontsentratsioon takistab ABTS-i seondumist kompleks I-le. Reaktsiooni kiiruse sõltuvusel vesinikperoksiidi kontsentratsioonist ei esinenud kooperatiivsust ning vaadeldavas substraadi kontsentratsioonide vahemikus ei olnud täheldada substraat inhibitsiooni, mistõttu näiliste kineetiliste parameetrite määramiseks oli võimalik kasutada Michaelis-Menteni mudelit. Näiliste kineetiliste parameetrite väärtusteks saadi $k_{cat}^{app}$ 3,3 ± 0,2 $s^{-1}$ ja $K_m^{app}$ 33 ± 5 µM.

*Th*DyP-i aktiivsuse katsete tulemuste põhjal otsustati kontrollida valguproovi puhtust SDS-polüakrüülamiidgeelil. Tulenevalt sellest, et kooperatiivsuse esinemine ei ole tavaline nähtus ning saranane seos reaktsiooni kiiruse ja substraadi kontsentratsiooni vahel võib olla tingitud valguproovi kontaminatsioonist või sellest, et proovis esineb madalama afiinsusega ensüümi kõrval vähesel määral kõrgema afiinsusega ensüümi.



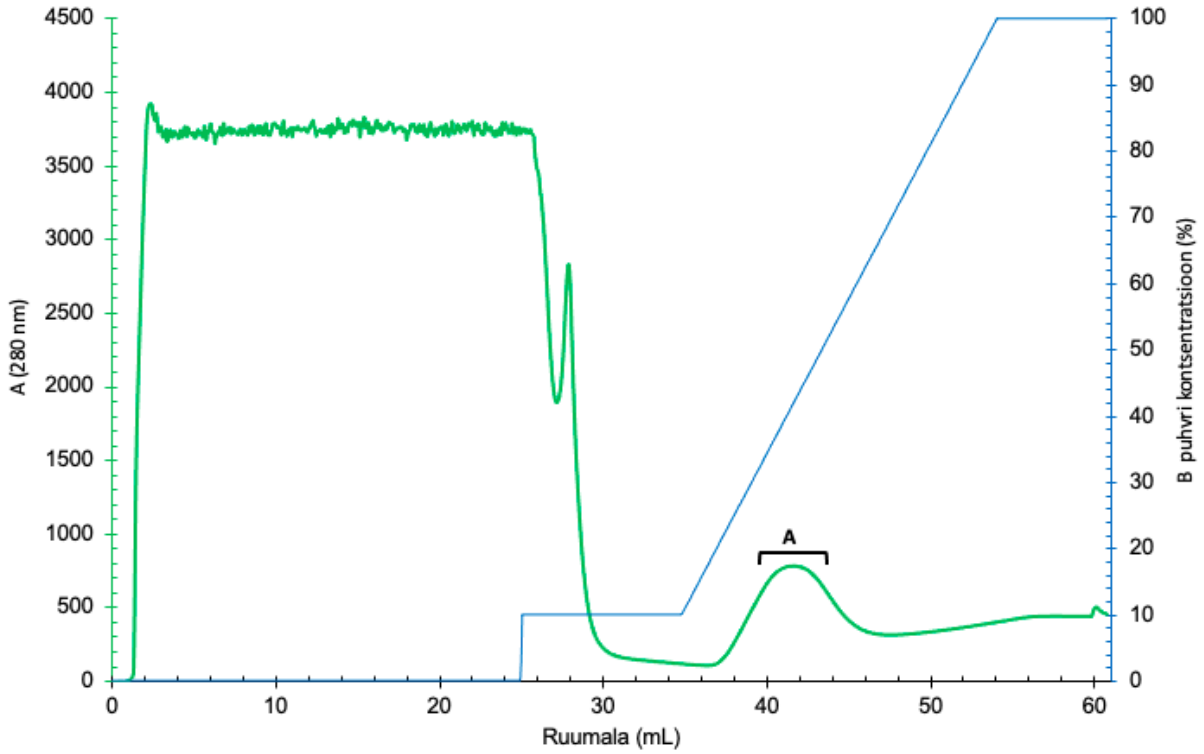

**Joonis 5.** Eelkatses kasutatava *Th*DyP-i valguproovi analüüs SDS-polüakrüülamiidgeelil. M - suurusmarker 5 µL, 1 - *Th*DyP 0,2 µL, 2 - *Th*DyP 1 µL, 3 - *Th*DyP 5 µL.

Valguproovi puhtust kontrolliti 10% SDS-polüakrüülamiidgeelil (Joonis 5). *Th*DyP-i teoreetiline molekulmass on 45,354 kDa, mis leiti arvutuslikult *Th*DyP-i aminohappelise järjestuse alusel. SDS-polüakrüülamiidgeelil täheldati *Th*DyP-l kaksik-riba esinemist, mille tekkepõhjus ei olnud

selge. Kaksikriba esinemine võis olla põhjuseks, miks eelnevas aktiivsuskatses täheldati kooperatiivsust ning sellest tulenevalt otsustati valmistada uus valgu preparatsioon.

### 2.3.2. Valgu ekspresseerimine ja puhastamine

*Th*DyP-tüüpi peroksüdaasi ekspresseeriti *E.coli* BL21(DE3) tüves ja valku puhastati $Ni^{2+}$-afiinsuskromatograafiaga (vt pt 2.2.4 ja 2.2.5). Joonisel 6 on kujutatud $Ni^{2+}$-afiinsuskromatograafia kromatogramm, kus piirkond A tähistab *Th*DyP-e sisaldavaid valgufraktsioone, millega on tehtud edasised katsed.



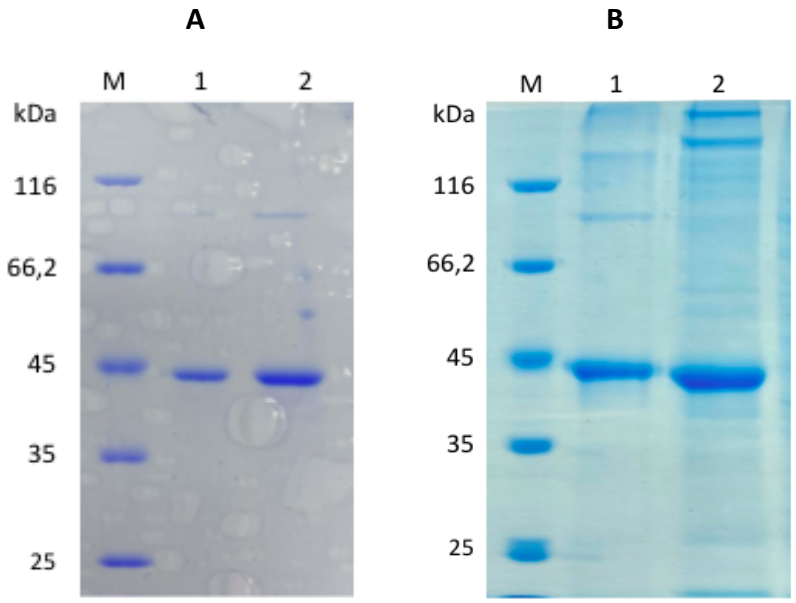

**Joonis 6.** $Ni^{2+}$-afiinsuskromatograafia kromatogramm. Rohelise joonega on tähistatud neeldumine lainepikkusel 280 nm ja sinise joonega puhvri B osakaal elueerimispuhvris protsendina. A kujutab piirkonda, kust võeti *Th*DyP-i fraktsioonid, millega on tehtud järgmised töötlused.

*Th*DyP-i sisaldavatel fraktsioonidel määrati Reinheitszahl väärtust (Rz), mõõtes nende neeldumist lainepikkuste vahemikus 250 - 600 nm (vt pt 2.2.5). Reinheitszahl väärtuse leidmiseks jagati *Th*DyP-i Soret piigi neeldumine lainepikkusel 415 nm trüptofaani neeldumisega lainepikkusel 280 nm ($Rz = A_{415}/A_{280}$). Tulemuseks saadi Rz väärtus 1,8. Samasugust Rz väärtust on varasemalt näidatud A klassi *Thermomonospora curvata* DyP-tüüpi peroksüdaasi metsiktüübil ja $Asp^{220}$ mutandil (Chen et al., 2015). Mida suurem on Rz väärtus, seda rohkem on heemi seotud ensüümiga. Jagades heemi

ekstinktsioonikoefitsiendi valgu ekstinktsioonikoefitsiendiga saab määrata valgu teoreetilise Rz väärtuse maksimumi, mis *Th*DyP-i korral on ligikaudu 2,2.

$Ni^{2+}$-afiinsuskromatograafiaga puhastatud *Th*DyP-i puhtust kontrolliti 10% SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforeesiga. Polüakrüülamiidgeelile kanti huvipakkuvaid valgufraktsioone $Ni^{2+}$-afiinsuskromatograafia kromatogrammi A piirkonnast (joonis 6).

Joonisel 7A on geelipilt kõrgeima kontsentratsiooniga *Th*DyP-de fraktsioonist, mida kanti polüakrüülamiidgeelile vastavalt 5 µL (rada 1) ja 10 µL (rada 2). Saadud tulemus ühtis teoreetilise *Th*DyP-i molekulmassiga, mis oli 45,354 kDa. Erinevalt 2.3.1 peatüki SDS-polüakrüülamiidgeeli tulemusest (Joonis 5) ei esinenud joonisel 7A topelt-riba. Tulemuse põhjal hinnati *Th*DyP-i ekspresseerimist ja puhastamist õnnestunuks ning saadud ensüümi preparatsiooni sobilikuks edasiseks trombiinitöötluseks ja heemiga küllastamiseks.



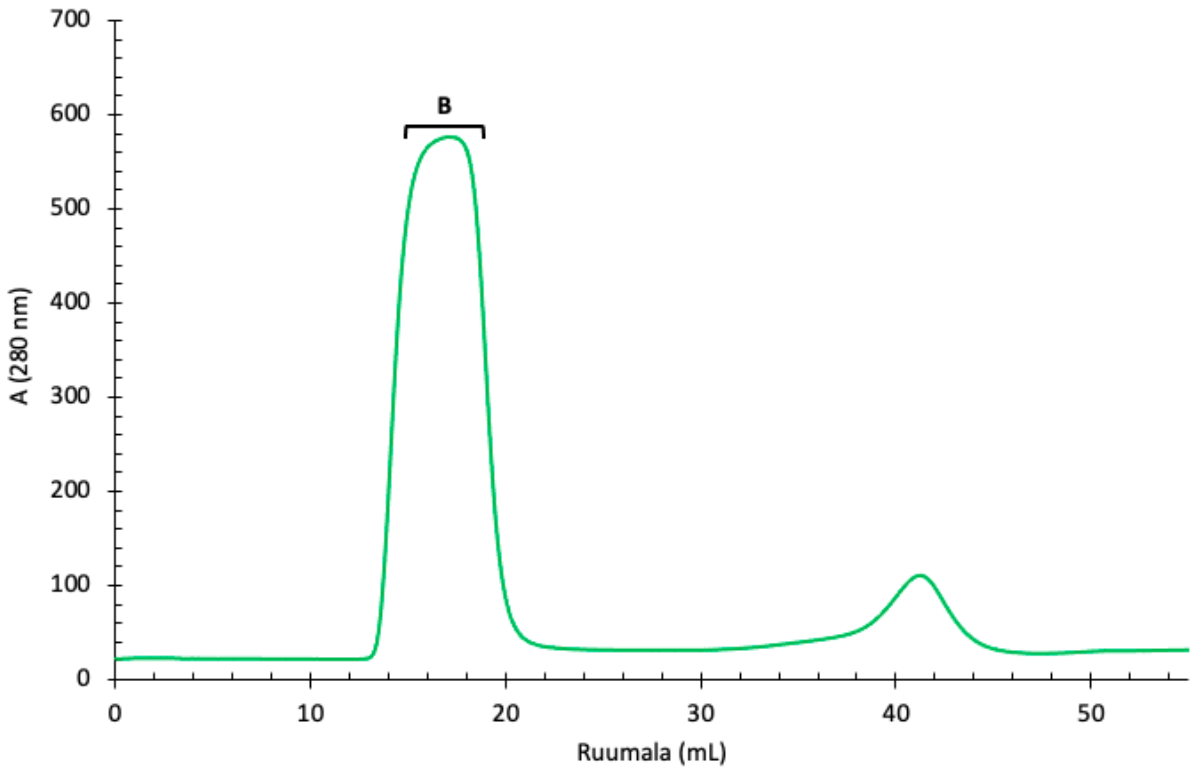

**Joonis 7**. $Ni^{2+}$-afiinsuskromatograafiaga puhastatud *Th*DyP-i ja peale trombiiniga töödeldud *Th*DyP-i analüüs 10% SDS-polüakrüülamiidgeelil. A: rada 1 - *Th*DyP 5 µL, rada 2 - *Th*DyP 10 µL. B: rada 1 - *Th*DyP enne trombiini töötlust 10 µL, rada 2 - *Th*DyP peale trombiini töötlust 12 µL. M - valkude molekulmassimarker

Selleks, et eemaldada *Th*DyP-i küljes olev histidiinimärgis, mis potentsiaalselt võib mõjutada valgu stabiilsust, tehti puhastatud *Th*DyP-i preparatsioonile trombiinitöötlus. Trombiini töötluse õnnestumist kontrolliti SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforeesiga (Joonis 7B). Joonisel 7B on kujutatud *Th*DyP-i enne ja pärast trombiinitöötlust, vastavalt esimesel ja teisel rajal. Trombiiniga töödeldud *Th*DyP-i molekulmass peaks vähenema tulenevalt histidiini märgise eemaldamisest. Joonisel 7B on näha trombiiniga töödeldud valguelektroforeetilise

liikuvuse suurenemist teisel rajal võrreldes esimese rajaga, kus oli trombiiniga töötlemata *Th*DyP. Saadud tulemustes põhjal hinnati trombiiniga töötlus õnnestunuks.

*Th*DyP-i kofaktoriks on heem ning ilma heemi sidumata on *Th*DyP inaktiivne. Puhastatud *Th*DyP-i preparatsiooni eriaktiivsuse tõstmiseks küllastati valku heemiga (vt pt 2.2.5). *Th*DyP-i preparatsioonile lisati 2:1 moolsuhtes heemi. Seondumata heemi eemaldamiseks puhastati *Th*DyP-i preparatsiooni geelfiltratsiooniga. Joonisel 8 on kujutatud geelfiltratsiooni kromatogramm, millel on esile toodud piirkond B, kus elueerus *Th*DyP. Huvipakkuvate fraktsioonide Rz väärtus määrati, jagades Soret piigi neeldumine 415 nm juures, trüptofaani neeldumisega 280 nm juures (Rz = $A_{415}/A_{280}$). Rz väärtuseks saadi 0,5. Teoreetiliselt peaks *Th*DyP-i Rz väärtus suurenema peale heemiga küllastumist, kuid saadud tulemus näitas vastupidist. See võib olla tingitud valgu denaturatsioonist *Th*DyP-i proovis, mistõttu geelfiltratsiooniga eraldus nii seondumata heem kui ka denatureeritud valgu küljest vabanenud heem.

Vastavalt joonisele 8 valiti kõrge kontsentratsiooniga *Th*DyP-i fraktsioon, millega tehti järgnevad eriaktiivsus katsed.




**Joonis 8.** Geelfiltratsiooni kromatogramm. B kujutab piirkonda, kus on huvipakkuvad *Th*DyP-i fraktsioonid, millele määrati Rz väärtust ning selle alusel valiti valgu fraktsioon, millega tehti järgnevad katsed.

### 2.3.3. *Th*DyP-i preparatsiooni eriaktiivsus

Eriaktiivsuste alusel saab hinnata ensüümi puhastamise efektiivsust. Mida vähem on preparatsioonis kontamineerivaid valke, seda kõrgem on ensüümi preparatsiooni eriaktiivsus. *Th*DyP-tüüpi peroksüdaasi eriaktiivsust määrati erinevatel valgu puhastamise etapidel ning eriaktiivsuste analüüsimisel täheldati preparatsioonieriaktiivsuse vähenemist aja jooksul. Käesolevas töös puhastatud valguproovi eriaktiivsuseks ($v_0/E_0$ $s^{-1}$) määrati $Ni^{2+}$-afiinsuskromatograafia järgselt 26,0 $s^{-1}$. Trombiiniga töödeldud ja heemiga küllastatud valguproovi eriaktiivsuseks määrati 24,0 $s^{-1}$. Heemiga töödeldud ja töötlemata *Th*DyP-i proovi eriaktiivsus ei erinenud märkimisväärselt omavahel, kuigi teoreetiliselt on katalüütiliselt aktiivne ainult heemiga seotud ensüüm ehk saadud tulemus polnud ootuspärane. Põhjus, miks heemiga seotud valguproovi eriaktiivsus oli oodatust madalam võis olla tingitud *Th*DyP-i ebastabiilsusest kasutatud säilitustingimustel. Eriaktiivsuste määramise vahele jäi üks kuu, mille jooksul *Th*DyP-i preparatsiooni aktiivsus võis väheneda.

Selleks, et kindlaks teha, kas valgu ebastabiilsus võis tingida eriaktiivsuse vähenemine puhastamise käigus, määrati TalTech-st pärineva *Th*DyP-i proovi eriaktiivsus uuesti ja võrreldi eelkatsete tulemustega, mis olid saadud aasta aega varem. Preparatsiooni eriaktiivsuse uuesti määramine andis tulemuseks 0,52 $s^{-1}$, mis on rohkem kui suurusjärgu võrra madalam, kui eelkatsetes määratud tulemus 20,3 $s^{-1}$. Sellele tuginedes sai kinnitust hüpotees, et *Th*DyP on valitud säilitustingimustel ebastabiilne ja eriaktiivsuste vähenemine valgu puhastamise käigus on tingitud ensüümi inaktiveerumisest.

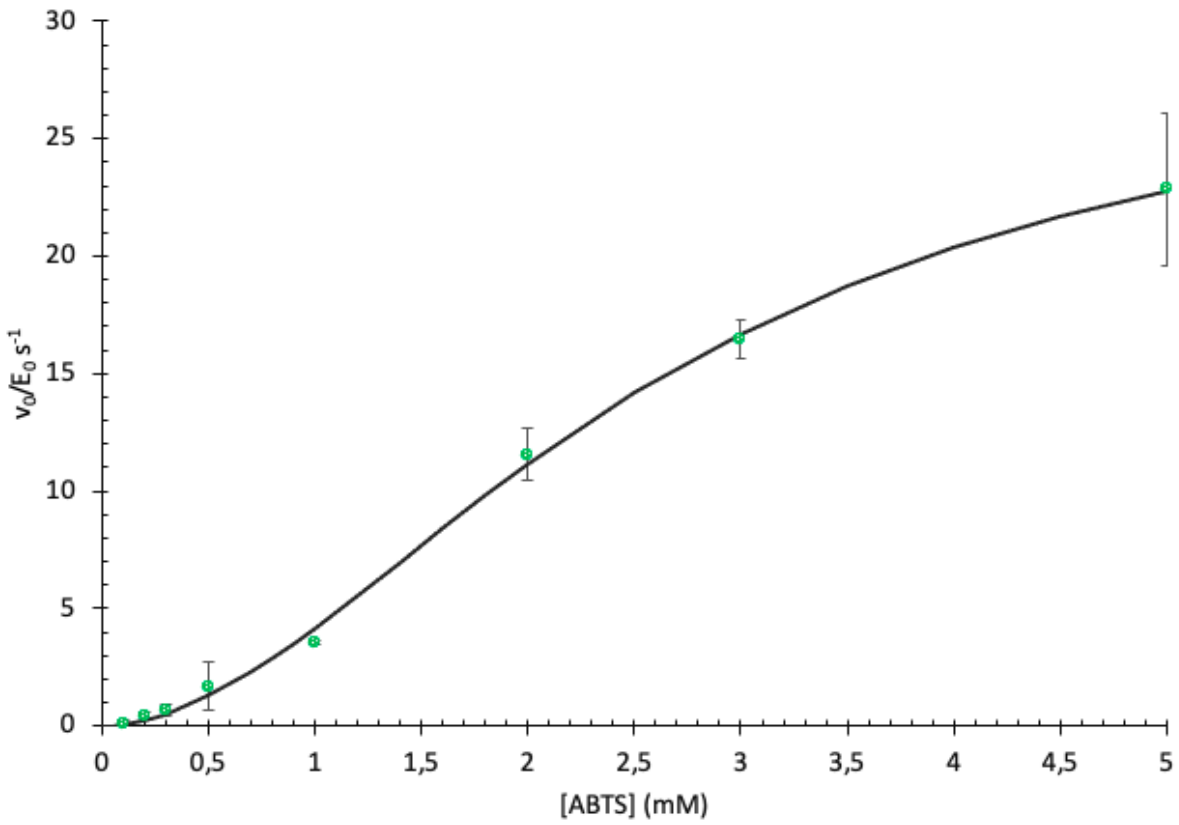
Põhjus, miks *Th*DyP-i eriaktiivsus vähenes aja jooksul, võib olla tingitud paljudest faktoritest, näiteks puhver, milles *Th*DyP-i säilitati ei pruukinud olla peroksüdaasile soodne keskkond.

### 2.3.4. Kineetika

*Th*DyP-i näiliste kineetiliste parameetrite määramisel mõõdeti reaktsiooni kiiruseid erinevatel ABTS-i ja $H_2O_2$ kontsentratsioonidel (vt pt 2.2.7).

Reaktsiooni kiiruse sõltuvust ABTS-i kontsentratsioonist iseloomustas sigmoidne kõver (joonis 9), mis viitab kooperatiivsusele. Erinevalt 2.3.1 peatüki joonisest 3, ei ole joonisel 8 substraat inhibitsioon 5 mM ABTS-i korral detekteeritav. Põhjuseks, miks substraat inhibitsiooni ei detekteeritud, tuleneb osaliselt erinevatest katsetingimustest. Erinevalt eelkatsest, oli antud katse reaktsioonisegus $H_2O_2$ kontsentratsioon 1 mM. Eelkatsetes oli $H_2O_2$ kontsentratsiooniks 0,1 mM. Substraat inhibitsioon on ping-pong mehhanismi korral seda tugevam, mida väiksem on katses konstantsena hoitud substraadi kontsentratsioon. Selles katses oli vesinikperoksiidi

kontsentratsioon kümme korda suurem kui eelkatses, millest tulenevalt ka substraat inhibitsioon avaldub kõrgematel ABTS-i kontsentratsioonidel.

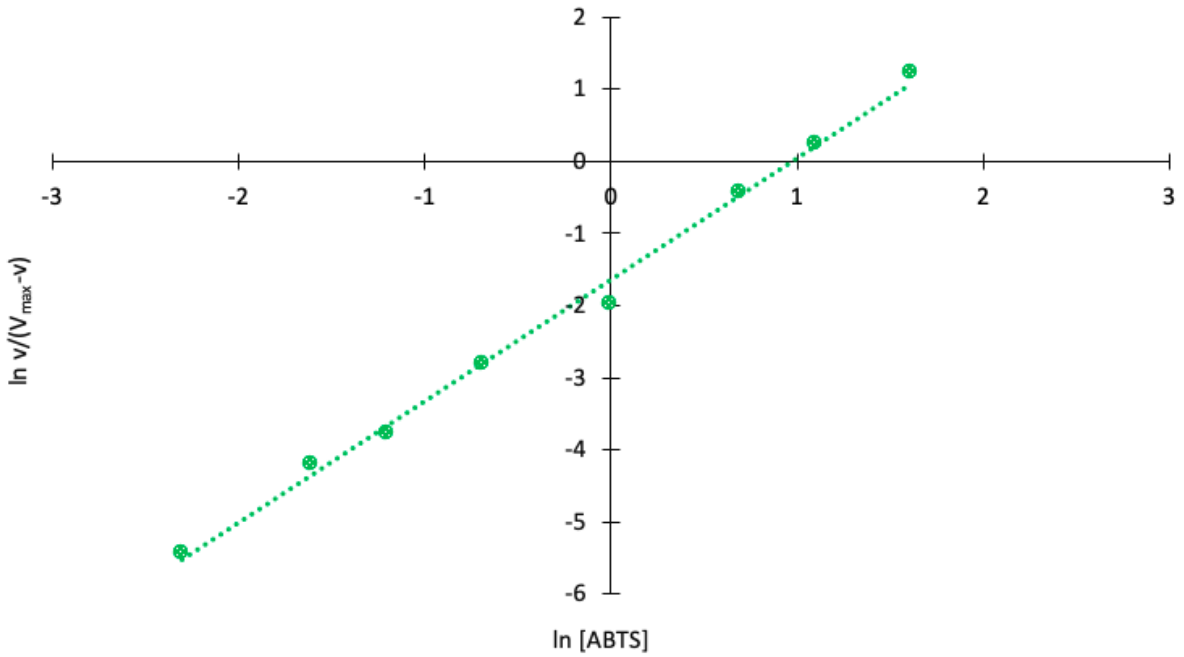



**Joonis 9**. *Th*DyP-i kiiruse sõltuvus ABTS-i kontsentratsioonist. Reaktsioonisegu koosnes 10 nM *Th*DyP, 1 mM $H_2O_2$ , 0,1 mg/mL BSA, 50 mM NaAC pH 5 ning tekkivat $ABTS^{+*}$-i mõõdeti 420 nm juures. Kiiruspunktid on kolme mõõtmise keskmised, veajooned on kolme mõõtmise standardhälbed. Regressioonikõver vastab Hilli võrrandile näiliste parameetritega $k_{cat}^{app}$= 30 ± 3 $s^{-1}$ ja $K_{0,5}$= 2,6 ± 0,3 mM

Kuna vaadeldavas ABTS-i kontsentratsioonide vahemikus ei ole detekteeritav substraat inhibitsioon, saab kineetiliste parameetrite hindamiseks kasutada Hilli võrrandit. Selle juures tuleb arvestada, et sellisel viisil määratud näilised parameetrid on rakendatavad ainult vaadeldavas substraadi kontsentratsioonide vahemikus ja ei ole üldistatavad. Kooperatiivsuse hindamiseks määrati *Th*DyP-i näilised kineetilised parameetrid ABTS-i oksüdeerimisel, kasutades mittelineaarse regressiooni mudelina Hilli võrrandit. Näiliste kineetiliste parameetrite väärtusteks saadi $K_{0,5}$= 2,6 ± 0,3 mM ja $k_{cat}^{app}$= 30 ± 3 $s^{-1}$ ABTS-i suhtes ning Hilli koefitsiendi väärtuseks 1,88. Kooperatiivsust tüüpiliselt analüüsitakse Hilli graafiku alusel (joonis 10), mis põhineb Hilli võrrandi teisendusel (võrrand 3).

$$ln[v/(k_{cat} - v)] = hln\,[S] - hlnK_{0,5} \quad (3)$$

kus y-teljel on $ln[v/(k_{cat} - v)]$ ja x-teljel on $ln\ [S]$. Hilli koefitsienti väljendab Hilli graafiku funktsioonvõrrandi lineaarliige. Leitud Hilli koefitsiendi väärtus h = 1,88 näitab positiivset kooperatiivsust, kuna positiive kooperatiivsuse puhul on Hilli koefitsienti väärtus suurem kui 1.

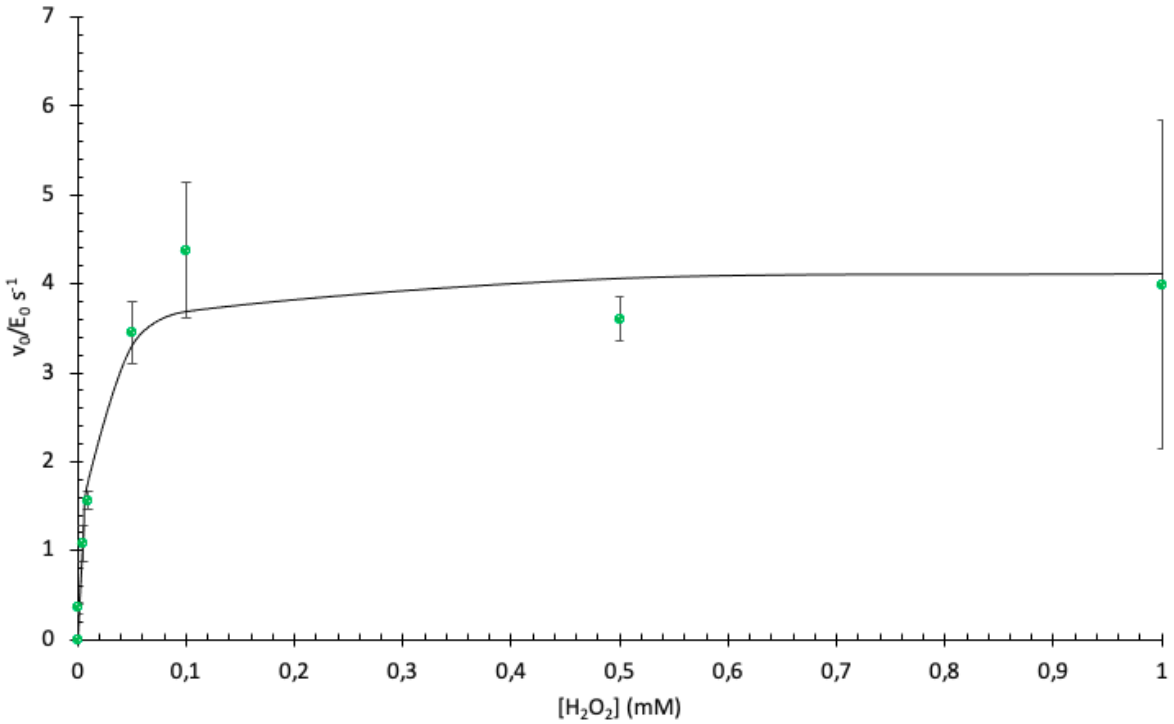



**Joonis 10.** *Th*DyP-i kiiruse sõltuvus ABTS-i kontsentratsioonist Hilli teljestikus. Sirge tõus näitab Hilli koefitsiendi väärtust.

Reaktsiooni kiiruse sõltuvus vesinikperoksiidi kontsentratsioonist vastab Michaelis-Menteni mudelile (Joonis 11).

*Th*DyP-i näiliste kineetiliste parameetrite määramisel $H_2O_2$ suhtes, saadi $K_m^{app}$ väärtuseks 13 ± 4 µM ja $k_{cat}^{app}$ väärtuseks 4,2 ± 0,3 $s^{-1}$. Saadud näiliste kineetiliste parameetrite väärtused erinesid eelkatses saadud tulemustest, milleks oli $K_m^{app}$ väärtuseks 33 ± 5 µM ja $k_{cat}^{app}$ väärtuseks 3,3 ± 0,2 $s^{-1}$. Kuna näiliste kineetiliste parameetrite määramine vesinikperoksiidi suhtes on eelkatsetes ja käesoleva töö raames puhastatud *Th*DyP-ga tehtud erinevatel ABTS-i kontsentratsioonidel, ei ole leitud $K_m^{app}$ ja $k_{cat}^{app}$ väärtused omavahel otseselt võrreldavad. Samas ping-pong mehhanismi korral ensüümi katalüütiline efektiivsus ($k_{cat}/K_m$) ühe substraadi suhtes ei sõltu teise substraadi kontsentratsioonist ning $k_{cat}/K_m$ väärtuseid saab seega omavahel võrrelda. Kasutades leitud $K_m^{app}$ ja $k_{cat}^{app}$ väärtuseid saab leida ensüümi katalüütilise efektiivsuse ($k_{cat}^{app}/K_m^{app}$). Eelkatses kasutava *Th*DyP-i preparatsiooni katalüütiliseks efektiivsuseks saadi 0,1 $s^{-1}$/µM ning antud peatükis käsitletaval *Th*DyP-i preparatsioonil saadi 0,32 $s^{-1}$/µM. Näiliste kineetiliste parameetrite analüüsimisel saadud tulemused on kooskõlas

peatüki 2.3.3 eriaktiivsuste tulemustega, mis näitasid eriaktiivsuste erinevusi eelkatses kasutatud *Th*DyP-i ja antud töös puhastatud *Th*DyP-ga, mis olid vastavalt 20,3 $s^{-1}$ ja 24,0 $s^{-1}$.




**joonis 11**. *Th*DyP-i kiiruse sõltuvus vesinikperoksiidi kontsentratsioonist. Reaktsioonisegu koosnes 10 nM *Th*DyP, 1 mM $H_2O_2$, 0,1 mg/mL BSA, 50 mM NaAC pH 5 ning tekkivat $ABTS^{+*}$-i mõõdeti 420 nm juures. Kiiruspunktid on kolme mõõtmise keskmised, veajooned on kolme mõõtmise standardhälbed. Regressioonikõver vastab Michaelis-Menteni võrrandile näiliste parameetritega $k_{cat}^{app}$= 4,2 ± 0,3 $s^{-1}$ ja $K_m^{app}$ = 13 ± 4 µM

**KOKKUVÕTTE**

Käesolevas töös ekspresseeriti *Th*DyP-tüüpi peroksüdaas E.coli-s ning puhastati katalüütiliselt aktiivne *ThD*yP $Ni^{2+}$-afiinsuskromatograafiaga. Täiendavalt eemaldati ekspresseeritud *Th*DyP-lt histidiini märgis trombiinitöötlusega ja ensüüm küllastati heemiga. Valgu puhtust kontrolliti SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforeesiga ja iga valgu töötlemise etapil määrati *Th*DyP-i preparatsiooni eriaktiivsus kasutades substraatidena vesinikperoksiidi ja ABTS-i.

*Th*DyP-i preparatsioonide eriaktiivsuste analüüsimisel täheldati valgu ebastabiilsust. Pärast heemiga küllastamist *Th*DyP-i eriaktiivsus ja Rz väärtus olid väiksemad kui enne heemiga töötlust. Vastavalt $k^{obs}$= 24,0 $s^{-1}$ ja Rz= 0,5 pärast heemiga küllastamist ning $k^{obs}$= 26,0 $s^{-1}$ ja Rz= 1,8 enne töötlust heemiga. Tulemused erinesid oodatud teoreetilistest tulemustest, mille korral heemiga seotud *Th*DyP-i eriaktiivsus ja Rz väärtused peaksid olema vastupidi suuremad.

*Th*DyP-i näiliste kineetiliste parameetrite määramisel kasutati substraatidena vesinikperoksiidi ja ABTS-i ning määrati näilised kineetilised parameetrid mõlema substraadi suhtes. Reaktsiooni kiiruse sõltuvus ABTS-i kontsentratsioonist näitas kooperatiivsust. $K_{0,5}$= väärtuseks määrati 2,6 ± 0,3 mM ja $k_{cat}^{app}$ väärtuseks 30 ± 3 $s^{-1}$ ning täheldati kooperatiivsust. Positiivse kooperatiivsuse määramiseks leiti Hilli koefitsenti h=1,88. *Th*DyP-i näiliste kineetiliste parameetrite määramisel vesinikperoksiidi suhtes, määrati $K_m^{app}$ väärtuseks 13 ± 4 µM ja $k_{cat}^{app}$ väärtuseks 4,2 ± 0,3 $s^{-1}$.

**SUMMARY**

**Purification and kinetic characterization of *Thermobifida halotolerans* DyP-type peroxidase**

In this study the expression of *Thermobifida halotolerans* DyP-type peroxidase was carried out in E.coli, and successfully purified by $Ni^{2+}$- affinity chromatography. In order to remove Histidine tags the purified *Th*DyP was incubated with thrombin. Heme reconstitution was carried out by adding hemin to the *Th*DyP and the reconstituted *Th*DyP was subjected to buffer exchange by gel-filtration. At each protein processing step the purity of *Th*DyP was analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Hydrogen peroxide and ABTS were used as substrates in determining the specific activity of *Th*DyP in each purification step. During the analysis of *Th*DyP's specific activity, the protein appeared to be unstable. Due to the fact that the specific activity and Rz value of heme reconstituted *Th*DyP were lower than non-reconstituted *Th*DyP. The $k^{obs}$ value of heme reconstituted *Th*DyP was 24,0 $s^{-1}$ and the Rz value of 0,5. In contrary the $k^{obs}$ value of unreconstituted *Th*DyP was 26,0 $s^{-1}$ and the Rz value of 1,8. Theoretically the $k^{obs}$ and Rz values should be higher for the heme reconstituted *Th*DyP

*Th*DyP was characterised kinetically through the apparent kinetic parameters by determining the $k^{obs}$ ($s^{-1}$) of substrate oxidation at different times and substrate concentration. Hydrogen peroxidase and ABTS were used as substrates. By measuring the absorption of $ABTS^{+*}$ formation in ABTS oxidation, the $K_m^{app}$ and $k_{cat}^{app}$ values could be detected. The $K_{0,5}$ of *Th*DyP was 2,06 ± 0,3 mM and the $k_{cat}^{app}$ value was 30 ± 3 $s^{-1}$. In the oxidation of ABTS displayed sigmoidal rate curves which represent cooperativity. By having the Hill coefficient of 1,88 the cooperativity was determined as a positive cooperativity. Determination of the apparent kinetic parameters of *Th*DyP for hydrogen peroxidase gave a $K_m^{app}$ of 13 ± 4 s-1 and a $k_{cat}^{app}$ of 4.2 ± 0.3 $s^{-1}$.

**KIRJANDUSE LOETELU**


Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology*, *53*(2), 253–263.

Bank, R. P. D. (s.a.). *RCSB PDB - 4GS1: Crystal structure of DyP-type peroxidase from Thermobifida cellulosilytica*. https://www.rcsb.org/structure/4gs1

Brown, M. E., Barros, T., & Chang, M. C. Y. (2012). Identification and Characterization of a Multifunctional Dye Peroxidase from a Lignin-Reactive Bacterium. *ACS Chemical Biology*, *7*(12), 2074–2081.

Chen, C., Shrestha, R., Jia, K., Gao, P. F., Geisbrecht, B. V., Bossmann, S. H., Shi, J., & Li, P. (2015). Characterization of Dye-decolorizing Peroxidase (DyP) from Thermomonospora curvata Reveals Unique Catalytic Properties of A-type DyPs*. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(38), 23447–23463.

Colpa, D. I., Fraaije, M. W., & van Bloois, E. (2014). DyP-type peroxidases: A promising and versatile class of enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *41*(1), 1–7.

Deyhimi, F., & Nami, F. (2012). Peroxidase-catalyzed electrochemical assay of hydrogen peroxide: A ping–pong mechanism. *International Journal of Chemical Kinetics*, *44*(10), 699–704.

Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M. J., Liers, C., & Lundell, T. (2010). New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*(3), 871–897.

Holladay, J. E., White, J. F., Bozell, J. J., & Johnson, D. (2007). *Top Value-Added Chemicals from Biomass—Volume II—Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin* (PNNL-16983). Pacific Northwest National Lab. (PNNL), Richland, WA (United States).

Hunter, C. A., & Anderson, H. L. (2009). What is Cooperativity? *Angewandte Chemie International Edition*, *48*(41), 7488–7499.

Kaur, A. Van, T, P., Busch, R, C., Robinson, K, C., Pan, M., Pang, W, L., Reiss, J, DiRuggiero, J., & Baliga, S, N.(2010). Coordination of frontline defense mechanisms under severe oxidative stress. *Molecular Systems Biology*, *6*(1), 393.

Liers, C., Bobeth, C., Pecyna, M., Ullrich, R., & Hofrichter, M. (2010). DyP-like peroxidases of the jelly fungus Auricularia auricula-judae oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*,

*85*(6), 1869–1879.

Lončar, N., Colpa, D. I., & Fraaije, M. W. (2016). Exploring the biocatalytic potential of a DyP-type peroxidase by profiling the substrate acceptance of Thermobifida fusca DyP peroxidase. *Tetrahedron*, *72*(46), 7276–7281.

Ma, R., Hao, W., Ma, X., Tian, Y., & Li, Y. (2014). Catalytic Ethanolysis of Kraft Lignin into High-Value Small-Molecular Chemicals over a Nanostructured α-Molybdenum Carbide Catalyst. *Angewandte Chemie International Edition*, *53*(28), 7310–7315.

Rahmanpour, R., Rea, D., Jamshidi, S., Fülöp, V., & Bugg, T. D. H. (2016). Structure of Thermobifida fusca DyP-type peroxidase and activity towards Kraft lignin and lignin model compounds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *594*, 54–60.

Routoula, E., & Patwardhan, S. V. (2020). Degradation of Anthraquinone Dyes from Effluents: A Review Focusing on Enzymatic Dye Degradation with Industrial Potential. *Environmental Science & Technology*, *54*(2), 647–664.

Santos, A., Mendes, S., Brissos, V., & Martins, L. O. (2014). New dye-decolorizing peroxidases from Bacillus subtilis and Pseudomonas putida MET94: Towards biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(5), 2053–2065.

Singh, R., & Eltis, L. D. (2015). The multihued palette of dye-decolorizing peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *574*, 56–65.

Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., Stefanović, A. B., Žuža, M. G., Čičkarić, D. Z., Mijin, D. Ž., & Knežević-Jugović, Z. D. (2015). Decolorization of Anthraquinonic Dyes from Textile Effluent Using Horseradish Peroxidase: Optimization and Kinetic Study. *The Scientific World Journal*, *2015*, e371625.

van Bloois, E., Torres Pazmiño, D. E., Winter, R. T., & Fraaije, M. W. (2010). A robust and extracellular heme-containing peroxidase from Thermobifida fusca as prototype of a bacterial peroxidase superfamily. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(5), 1419–1430.

Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, *65*(3), 249–259. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022

Wariishi, H., & Gold, M. H. (1989). Lignin peroxidase compound III. *FEBS Letters*, *243*(2), 165–168.

Yang, L.-L., Tang, S.-K., Zhang, Y.-Q., Zhi, X.-Y., Wang, D., Xu, L.-H., & Li, W.-J. 2008. (2008). Thermobifida halotolerans sp. Nov., isolated from a salt mine sample, and emended description of the genus Thermobifida. *International Journal of Systematic and*

*Evolutionary Microbiology*, *58*(8), 1821–1825.

Yoshida, T., & Sugano, Y. (2015). A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *574*, 49–55.

**LIHTLITSENTS**

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

**Mina, Yayuan Min**

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose ***Thermobifida halotolerans'i*** **DyP-tüüpi peroksüdaasi puhastamine ja kineetiline iseloomustamine,** mille juhendaja on lektor Jürgen Jalak, 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 Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

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.

Yayuan Min

**26.05.2022**