

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Alenka MALOVRH

**KARAKTERIZACIJA ENCIMOV VKLJUČENIH V
RAZGRADNJO ARABINO GALAKTANOV PRI
BAKTERIJI *Bifidobacterium longum***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Alenka MALOVRH

**KARAKTERIZACIJA ENCIMOV VKLJUČENIH V RAZGRADNJO
ARABINOGALAKTANOV PRI BAKTERIJI *Bifidobacterium longum***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**CHARACTERIZATION OF ENZYMES INVOLVED IN
ARABINOGALACTAN DEGRADATION BY *Bifidobacterium longum***

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Mašo Vodovnik in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: doc. dr. Maša VODOVNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Alenka MALOVRH

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 602.3:579.864:577.15 (043.2)
KG	Glikozid hidrolaze/GH43/CAZy/heterologno izražanje/biokemijska karakterizacija encimov/arabinogalaktan/arabinan/ <i>Bifidobacterium longum</i> /črevesna mikrobiota
AV	MALOVHR, Alenka
SA	VODOVNIK, Maša (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Magistrski študijski program druge stopnje Biotehnologija
LI	2016
IN	KARAKTERIZACIJA ENCIMOV VKLJUČENIH V RAZGRADNJO ARABINO GALAKTANOV PRI BAKTERIJI <i>Bifidobacterium longum</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XIII, 90, [14] str., 28 pregl., 32 sl., 7 pril., 136 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Bakterije <i>Bifidobacterium longum</i> so ene prvih naseljevalk prebavnega trakta novorojenčkov in sodijo med pomembnejše probiotične bakterije. V debelem črevesu sodelujejo pri razgradnji polisaharidov in pri tem proizvajajo kratkoverižne maščobne kisline. Genomske raziskave so pokazale, da pri <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> kar 8 % genoma sestavljajo geni za razgradnjo in privzem ogljikovih hidratov, ki se pogosto nahajajo v genskih gručah. Med drugim so bifidobakterije sposobne razgradnje arabinoznih polisaharidov, ki so se v različnih raziskavah izkazali kot primeren kandidat za prebiotike. Večina genov, ki sodelujejo pri razgradnji arabinoznih polisaharidov je še neokarakteriziranih. V tem magistrskem delu smo izvedli bioinformatično analizo, heterologno ekspresijo, proizvodnjo in izolacijo ter karakterizacijo dveh proteinov, ki sodelujeta pri razgradnji arabinogalaktanov pri <i>B. longum</i>. Bioinformatična analiza je pokazala, da sta zapisa za proteina del genske gruče, ki kaže podobno sestavo, kot je bila ugotovljena pri sorodnih sevih in da vsebujeta poleg katalitične domene GH43 še dodatne funkcionalne domene. Proteina smo heterologno izrazili v bakteriji <i>E. coli</i>. Iz bioprocen brozge smo produkt izolirali z afinitetno kromatografijo in gelsko filtracijo. Ugotovili smo, da encim, poimenovan Ara1_{his}, razgrajuje razvejani arabinan, encim Ara2_{his} pa nerazvejani in linearni arabinan ter da oba iz substrata sproščata le monosaharide arabinoze. Optimalni pH in temperatura delovanja encima Ara1_{his} sta 6,8 in 50 °C, encima Ara2_{his} pa 5,75 in 37 °C. Ocenjeni vrednosti K_m in k_{cat} encima Ara1_{his} sta 2,13 +/- 0,03 mg/ml in 2760 s⁻¹ za substrat razvejani arabinan. Na substratu nerazvejani arabinan smo za encim Ara2_{his} ocenili K_m in k_{cat} na 3,5 +/- 0,1 mg/ml in 3800 s⁻¹. Rezultati magistrske naloge so doprinesli k znanju na področju glikozid hidrolaz iz družine GH43. Izbrana encima sta prva biokemijsko okarakterizirana encima s katalitično domeno GH43 pri bakteriji <i>B. longum</i>.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
 DC UDC 602.3:579.864:577.15 (043.2)
 CX Glycosyl hydrolase/GH43/CAZy/heterologous expression/biochemical characterization of proteins/arabinogalactan/arabinan/*Bifidobacterium longum*/gut microbiota
 AU MALOVRH, Alenka
 AA VODOVNIK, Maša (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in Biotechnology
 PY 2016
 TI CHARACTERIZATION OF ENZYMES INVOLVED IN ARABINO GALACTAN DEGRADATION BY *Bifidobacterium longum*
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
 NO XIII, 90, [14] p., 28 tab., 32 fig., 7 ann., 136 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB *Bifidobacterium longum* is one of the first bacterial species that colonizes the gastrointestinal tract of newborns and is recognized as an important probiotic bacterium. It is involved in polysaccharide metabolism in colon and releases short chain fatty acids. Genome studies have shown that 8 % of total genome of *B. longum* subsp. *longum* consists of genes for carbohydrate metabolism and uptake which are often found in gene clusters. Among other carbohydrates, bifidobacteria are capable of degradation of arabinopolysaccharides, and the latter were recently found as promising prebiotics. Only a few genes that are involved in degradation of arabinopolysaccharides were characterized so far. In this work we present results from bioinformatic analysis, heterologous expression, production, isolation and characterization of two proteins from *B. longum* that are involved in arabinogalactan degradation. Bioinformatic analysis showed that both proteins are a part of gene cluster that shows structure similar to those already published and they both contain additional protein domains besides the catalytic domain GH43. Both proteins were separately cloned and expressed in *E. coli*. Products were isolated using affinity and size exclusion chromatography. Enzyme activity studies showed that enzyme named Ara1_his degrades branched arabinan. Enzyme Ara2_his is active on debranched and linear arabinan. Both of them only released monosaccharide arabinose from the respective substrates. Determined pH and temperature optimum for enzyme Ara1_his were 6,8 and 50 °C, and for enzyme Ara2_his 5,75 and 37 °C, respectively. Estimated values of K_m and k_{cat} for enzyme Ara1_his were 2,13 +/- 0,03 mg/ml and 2760 s⁻¹, and for enzyme Ara2_his 3,5 +/- 0,1 mg/ml and 3800 s⁻¹. This work contributes to the knowledge in the field of GH43. Ara1_his and Ara2_his were first biochemically characterized enzymes with catalytic domain GH43 from *B. longum*.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VIII
	KAZALO SLIK	X
	KAZALO PRILOG.....	XII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XIII
1	UVOD	1
1.1	RAZISKOVALNI PROBLEM.....	1
1.2	NAMEN IN CILJI	2
1.3	DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	ČLOVEŠKA ČREVESNA MIKROBIOTA.....	3
2.2	BIFIDOBakterije	5
2.2.1	Razgradnja ogljikovih hidratov pri bifidobakterijah	5
2.3	OGLJIKOVI HIDRATI	6
2.3.1	Pektini	7
2.3.2	Arabinogalaktan	7
2.3.2.1	Prebiotične lastnosti arabinogalaktana.....	8
2.3.3	Arabinan	9
2.3.3.1	Prebiotične lastnosti arabinana	9
2.4	GLIKOZID HIDROLAZE.....	10
2.4.1	Encimi, ki razgrajujejo, sintetizirajo in modificirajo ogljikove hidrate (CAZy)	10
2.4.2	Glikozid hidrolaze	10
2.4.2.1	Mehanizem delovanja glikozid hidrolaz	11
2.4.2.2	Glikozid hidrolaze v črevesju človeka	11
2.4.3	Glikozid hidrolaze iz družine 43 (GH43)	12
3	MATERIAL IN METODE	14
3.1	SHEMA DELA	14
3.2	MATERIALI.....	15
3.2.1	Kemikalije	15

3.2.2	Aparature.....	16
3.2.3	Bioinformatika orodja in podatkovne baze	17
3.2.4	Bakterijska seva in plazmid	17
3.2.5	Priprava gojišč	18
3.3	METODE	19
3.3.1	Bioinformatika analiza.....	19
3.3.2	Transformacija ekspresijskih sevov in poskusno izražanje proteinov	19
3.3.2.1	Priprava plazmida pETM-11 za transformacijo ekspresijskega seva	19
3.3.2.2	Transformacija ekspresijskih sevov <i>E. coli</i>	20
3.3.2.3	Poskusno izražanje encima	20
3.3.2.4	Ekstrakcija proteinov iz sedimenta po poskusnem izražanju.....	21
3.3.3	Poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom.....	21
3.3.4	Ugotavljanje koncentracije reducirajočih sladkorjev z reagentom DNS ..	22
3.3.5	Ekspresija encimov v laboratorijskem merilu	24
3.3.5.1	Priprava inokuluma	24
3.3.5.2	Bioproces (proizvodnja Ara1_His in Ara2_His)	24
3.3.5.3	Zaključni procesi.....	25
3.3.5.3.1	Centrifugiranje	25
3.3.5.3.2	Mehansko razbijanje celic in centrifugiranje homogenata	25
3.3.5.3.3	Afinitetna kromatografija.....	26
3.3.5.3.4	Gelska filtracija	27
3.3.5.3.5	Ultrafiltracija (koncentriranje vzorcev)	28
3.3.5.3.6	Merjenje koncentracije proteinov	29
3.3.6	Biokemijska karakterizacija Ara1_his in Ara2_his.....	29
3.3.6.1	Določanje specifične encimske aktivnosti	29
3.3.6.2	pH-optimum	29
3.3.6.3	Temperaturni optimum	31
3.3.6.4	Vpliv soli, prisotnosti EDTA in Ca^{2+} ionov na encimsko aktivnost.....	32
3.3.6.5	Tankoplastna kromatografija	32
3.3.6.6	Encimska kinetika	33
3.3.6.7	Določanje kinetičnih konstant K_m in k_{cat}	34
3.3.6.8	Določanje molekulske mase encima	34
3.3.7	Statistična in matematična obdelava rezultatov	35

4	REZULTATI	36
4.1	BIOINFORMATSKA ANALIZA	36
4.1.1	Osnovne lastnosti tarčnih genov	36
4.1.2	Ohranjene proteinske domene	38
4.1.3	Umestitev genov v gensko gručo	43
4.2	TRANSFORMACIJA IN POSKUSNA PROIZVODNJA PROTEINOV Ara1_his IN Ara2_his	44
4.3	PROIZVODNJA PROTEINOV V LABORATORIJSKEM MERILU	46
4.4	IZOLACIJA TARČNIH PROTEINOV	47
4.4.1	Ločevanje proteinov z afinitetno kromatografijo	47
4.4.2	Ločevanje proteinov z gelsko filtracijo	49
4.4.3	Spremljanje encimske aktivnosti in koncentracij proteinov v različnih fazah izolacije tarčnih proteinov	51
4.5	BIOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA TARČNIH PROTEINOV	53
4.5.1	Kvantitativno vrednotenje encimske aktivnosti na različnih substratih ...	53
4.5.2	Ugotavljanje produktov razgradnje	54
4.5.3	pH-optimum	55
4.5.4	Temperaturni optimum	56
4.5.5	Vpliv soli, EDTA in Ca^{2+} ionov na encimsko aktivnost	58
4.5.5.1	Ugotavljanje vpliva ionske moči pufra na encimsko aktivnost	58
4.5.5.2	Ugotavljanje vpliva EDTA in Ca^{2+} ionov na encimsko aktivnost	59
4.5.6	Določanje kinetičnih konstant K_m in k_{cat}	61
4.6	DOLOČANJE MOLEKULSKE MASE Z GELSKO FILTRACIJO	62
5	RAZPRAVA	64
5.1	BIOINFORMATSKA ANALIZA	64
5.2	HETEROLOGNO IZRAŽANJE	66
5.3	BIOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA	68
6	SKLEPI	78
7	POVZETEK	79
8	VIRI	81
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam uporabljenih kemikalij in proizvajalci	15
Preglednica 2: Seznam uporabljenih aparatov	16
Preglednica 3: Podatkovne baze in bioinformatična orodja, spletne povezave ter nastavitve, uporabljene pri iskanju	17
Preglednica 4: Sestava gojišča SOC	19
Preglednica 5: Sestava barvila Coomassie Brilliant Blue	22
Preglednica 6: Sestava reagenta DNS	22
Preglednica 7: Standardna raztopina L-arabinoze	22
Preglednica 8: Založna raztopina substrata	23
Preglednica 9: Sestava pufra 1	26
Preglednica 10: Sestava pufra 2	26
Preglednica 11: Nastavitve metode afinitetne kromatografije 1	26
Preglednica 12: Nastavitve metode afinitetne kromatografije 2	27
Preglednica 13: Sestava pufra 3	28
Preglednica 14: Nastavitve metode gelske filtracije	28
Preglednica 15: Sestava univerzalnih pufrov Britton in Robinson s pH med 2 in 12. Vrednosti pH pripravljenih mešanic smo pred končnim umerjanjem volumna natančneje prilagodili z dodajanjem 0,2 M NaOH ob spremljanju s pH elektrodo (Mongay in Cerna, 1974)	29
Preglednica 16: Sestava Na-acetatnih pufrov z različnimi vrednostmi pH, končno koncentracijo 50 mM in volumnom 100 ml	30
Preglednica 17: Sestava pufrov MES za določanje pH-optimuma	30
Preglednica 18: Sestava pufrov HEPES za določanje pH-optimuma	30
Preglednica 19: Sestava pufra MES za določanje temperaturnega optimuma delovanja encimov	31
Preglednica 20: Vrednosti pH, na katere smo umerili pufre, ki smo jih uporabili pri določanju temperaturnega optimuma delovanja encimov	31
Preglednica 21: Nastavitve metode ločevanja proteinov z gelsko filtracijo za določanje molekulske mase tarčnih encimov	35
Preglednica 22: Osnovne lastnosti tarčnih genov (podatki v oklepaju veljajo za klonirano zaporedje)	36

Preglednica 23: Pregled podatkov o domenah, ki smo jih identificirali v aminokislinskem zaporedju Ara1 in najbolj podobnih zaporedjih v podatkovnih bazah NCBI in PDB...	41
Preglednica 24: Pregled podatkov o domenah, ki smo jih identificirali v aminokislinskem zaporedju Ara2 in najbolj podobnih zaporedjih v podatkovnih bazah NCBI in PDB...	42
Preglednica 25: Pregled genov v genski gruči iz katere sta gena <i>ara1</i> in <i>ara2</i> ter njihovih funkcij, predvidenih na osnovi sekvenčne podobnosti in ohranjenih domen.....	43
Preglednica 26: Izmerjena koncentracija izoliranih plazmidov	44
Preglednica 27: Rezultati testa encimske aktivnosti v proteinskih izolatih iz celičnih sedimentov na substratih arabinoksilan, linearni in razvejani arabinan	45
Preglednica 28: Parametri določanja molekulske mase encimoma Ara1 _{his} in Ara2 _{his} , izračunana in predvidena molekulska masa.	62

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijski strukturi α -1,5-L-arabinana in arabinogalaktana I (prirejeno po Shallom in Shoham, 2003).....	8
Slika 2: Prikaz strukture arabinoznih saharidov z različno povezanimi arabinoznimi ostanki (prirejeno po Park in sod., 2015).....	9
Slika 3: Prikaz kemijske spremembe substrata ob encimski hidrolizi po mehanizmu obrata ali ohranitve (prirejeno po Henrissat in Davies, 1997).....	11
Slika 4: Ekso- β -1,3-galaktanaza (E.C. 3.2.1.145) iz <i>B. bifidum</i> (PDB: 5FLW).....	13
Slika 5: Shema dela opravljenega v magistrski nalogi	14
Slika 6: Shema plazmida pETM-11, uporabljenega za heterologno izražanje tarčnih genov (EMBL, 2016).....	18
Slika 7: Shema dela pri poskusni proizvodnji encima.....	20
Slika 8: Tunair™ posode (IBI Scientific, 2016).....	25
Slika 9: Kolona HisTrap™ HP uporabljena pri afinitetni kromatografiji	27
Slika 10: Prikaz domen proteina Ara1, dolgega 1246 aminokislin (merilo od 1 do 1000 aminokislin; orodje: MyDomains Image Creator (Expasy))	38
Slika 11: Prikaz postavitve domen na proteinu Ara2, dolgem 1097 aminokislin (merilo od 1 do 1000 aminokislin; orodje: MyDomains Image Creator (Expasy))	39
Slika 12: Prikaz genov v genski gruči, iz katere sta gena <i>ara1</i> in <i>ara2</i>	43
Slika 13: Na SDS-PAGE gelu ločeni vzorci ekspresijskih kultur (poskusno izražanje encimov)	45
Slika 14: Grafični prikaz meritev optične gostote pri 600 nm v kulturah ekspresijskih sevov, s katerimi smo spremljali njihovo rast	46
Slika 15: SDS-PAGE gel, na katerem smo ločili frakcije v različnih fazah čiščenja proteina Ara1_his z afinitetno kromatografijo	47
Slika 16: SDS-PAGE gel, na katerem smo ločili frakcije v različnih fazah čiščenja proteina Ara2_his z afinitetno kromatografijo	48
Slika 17: SDS-PAGE gel na katerem smo ločili proteinske frakcije pred in v različnih fazah čiščenja Ara1_his z gelsko filtracijo	49
Slika 18: SDS-PAGE gel na katerem smo ločili proteinske frakcije pred in v različnih fazah čiščenja Ara2_his z gelsko filtracijo	50
Slika 19: Grafični prikaz sprememb specifične encimske aktivnosti (hidrolize razvejanega arabinana) in koncentracije proteinov v vzorcih po različnih fazah čiščenja encima Ara1_his	51

Slika 20: Grafični prikaz sprememb specifične encimske aktivnosti (hidrolize linearnega arabinana) in koncentracije proteinov v vzorcih po različnih fazah čiščenja encima Ara2_his	52
Slika 21: Grafični prikaz izmerjene specifične aktivnosti očiščenih encimov Ara1_his in Ara2_his na testiranih substratih: linearni, nerazvejani in razvejani arabinan ter arabski gumi	53
Slika 22: S tankoplastno kromatografijo ločeni produkti razgradnje arabinoznih polisaharidov z encimoma Ara_1 in Ara_2	54
Slika 23: Grafični prikaz encimske aktivnosti očiščenega encima Ara1_his v odvisnosti od pH reakcijske mešanice	55
Slika 24: Grafični prikaz rezultatov določanja pH-optimuma za encim Ara2_his.....	56
Slika 25: Relativna aktivnost encima Ara1_his v odvisnosti od temperature inkubacije reakcijske mešanice	57
Slika 26: Relativna aktivnost encima Ara2_his v odvisnosti od temperature inkubacije reakcijske mešanice	57
Slika 27: Vpliv različnih koncentracij soli na relativno encimsko aktivnost encima Ara1_his	58
Slika 28: Vpliv različnih koncentracij soli na relativno encimsko aktivnost Ara2_his	59
Slika 29: Grafični prikaz rezultatov ugotavljanja vpliva kelatorja EDTA in Ca^{2+} ionov na encimsko aktivnost Ara1_his	60
Slika 30: Grafični prikaz rezultatov ugotavljanja vpliva kelatorja EDTA na encimsko aktivnost Ara2_his.....	60
Slika 31: Grafični prikaz odvisnosti začetne hitrosti encimske reakcije, normalizirane na koncentracijo encima v reakciji, od koncentracije substrata za encim Ara1_his	61
Slika 32: Grafični prikaz odvisnosti hitrosti encimske reakcije, normalizirane na koncentracijo encima v reakciji, od koncentracije substrata za encim Ara2_his	62

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Blokovna shema proizvodnega procesa v laboratorijskem merilu

PRILOGA B: Kromatogrami iz afinitetne kromatografije

PRILOGA C: Kromatograma iz gelske filtracije

PRILOGA D: Preglednica lastnosti okarakteriziranih encimov iz naloge in drugih objavljenih arabinanaz in arabinofuranozidaz

PRILOGA E: Vpliv pozitivne in negativne kooperativnosti na krivulje encimske kinetike (Dixon in Webb, 1979)

PRILOGA F: Grafični prikazi vseh podatkov encimske kinetike Ara1_his na različne načine

PRILOGA G: Grafični prikazi vseh podatkov encimske kinetike Ara2_his na različne načine

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABC prenašalec	(Ang. ATP-binding cassette transporter) prenašalni protein z ATP-vezavno domeno, ki ob hidrolizi ATP prenaša različne spojine
ATP	Adenozil trifosfat
BLAST	(Ang. basic local alignment search tool) algoritem za iskanje podobnih zaporedij
CAZy	(Ang. carbohydrate-active enzymes database) spletna podatkovna baza o encimih, ki delujejo na ogljikove hidrate
Cfu/ml	(Ang. colony forming units per mililiter) število kolonijskih enot na mililiter
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
EDTA	Etilendiamintetraocetna kislina, kelator dvovalentnih kationov
E-vrednost	(Ang. expect value) parameter, ki poda oceno statistične značilnosti rezultatov poravnave z algoritmom BLAST; manjša kot je E-vrednost, bolj signifikanten je razultat
GH	Glikozid hidrolaza (sopomenki glikozil hidrolaza, glikozidaza)
IMAC	(Ang. immobilized metal ion affinity chromatography) afinitetna kromatografija z imobiliziranimi kovinskimi ioni
IPTG	Izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid
IU	Internacionalna enota za izražanje encimske aktivnosti, predstavlja število molov porabljenega substrata ali nastalega produkta na minuto
Katal	Enota za izražanje encimske aktivnosti, predstavlja število molov porabljenega substrata ali tvorjenega produkta na sekundo
k_{cat}	(Ang. turnover number) pretvorbena število, ki opisuje hitrost pretvorbe substrata v produkt
kDa	Kilo dalton, enota za izražanje velikosti proteinov
K_M	Michaelisova konstanta, ki predstavlja količino substrata, potrebno za doseg polovice maksimalne hitrosti encimske pretvorbe substrata v produkt
Kvantitativni PCR	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR)
LB gojišče	Luria-Bertani gojišče
Mw	(Ang. molecular weight) molekulska masa
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinukleotid
PUL	(Ang. polysaccharide utilizing loci) genska gruča za razgradnjo in privzem polisaharidov
RCF	(Ang. relative centrifugal force) relativna centrifugalna sila
Rpm	Vrtljaji na minuto
SW vrednost	Vrednost algoritma Smith Waterman za ugotavljanje podobnosti med dvema zaporedjema

1 UVOD

Bifidobakterije so med najbolj raziskanimi predstavniki debla *Actinobacteria* in so po Gramu pozitivne, negibne, paličaste in nesporogene bakterije, ki rastejo v anaerobnem okolju. Imajo pomembno vlogo pri fermentaciji ogljikovih hidratov v debelem črevesu. Za svoj obstoj v črevesni mikrobni združbi večinoma koristijo človeku neprebavljive prehranske ogljikove hidrate, nekatere ogljikove hidrate in glikokonjugate iz mukoznega sloja v črevesju in metabolite drugih članov mikrobne združbe (Korakli in sod., 2002, Ishibashi in sod., 1997). Bakterije *Bifidobacterium longum* so ene pomembnejših probiotičnih bakterij, za katere je znano, da človeška prebavila kolonizirajo že kmalu po rojstvu (Favier in sod., 2002). Pri metabolizmu polisaharidov proizvajajo kratkoverižne maščobne kisline in nekatere druge produkte, ki so koristni za gostitelja. Ravno zato je njihova vloga v mikrobni združbi zelo pomembna. Mnogi znanstveniki se ukvarjajo z raziskavami na področju stimulacije in uravnavanja prisotnosti bifidobakterij v črevesni mikrobioti s pomočjo probiotikov in prebiotikov (Pokusaeva in sod., 2011; Koropatkin in sod., 2012).

1.1 RAZISKOVALNI PROBLEM

Pomembna značilnost bifidobakterij je njihova prilagojenost na ekološko nišo, ki jo predstavlja prebavni trakt. Njihov genom vsebuje številne proteine, ki so v tem okolju nujno potrebni za prepoznavo, razgradnjo in transport polisaharidov. Ti proteini se pogosto nahajajo v genskih gručah in kažejo ohranjeno modularno strukturo med različnimi predstavniki rodu *Bifidobacterium* (Schell in sod., 2002). Bifidobakterije so sposobne razgrajevati polisaharide rastlinskih celičnih sten. Drugi najpogostejši polisaharid v slednjih je hemiceluloza, ki jo sestavlja mešanica polisaharidov, kot so galaktani, ksilani, manani, glukani in arabinani. L-arabinoza je drugi najpogostejši pentozni sladkor v naravi, ki ga lahko najdemo v homopolisaharidih, imenovanih arabinani, ter v heteropolisaharidih kot sta arabinoksilan in arabinogalaktan (Shallom in Shoham, 2003). Nekatere vrste, vključno z *B. longum*, so sposobne razgradnje arabinoznih substratov, kot je arabinogalaktan, ter za ta substrat tekmujejo z drugimi prebivalci debelega črevesa, npr. bakterijo *Bacteroides thetaiotaomicron* (Degnan in Macfarlane, 1995). Ravno arabinozni polisaharidi in oligosaharidi so v zadnjem času tema nekaterih raziskav s ciljem njihove uporabe kot prebiotikov, ki selektivno spodbujajo rast bifidobakterij v črevesni mikrobioti (Holck in sod., 2011; Moon in sod., 2015). Poleg odkrivanja novih kandidatov za prebiotike, so raziskave usmerjene tudi v pridobivanje globljega vpogleda v fino strukturo delovanja mikrobne združbe v prebavnem traktu, njihovih mehanizmov razgradnje in privzema ogljikovih hidratov ter aplikacije tega znanja na področju zdravstva, prehranske industrije in biotehnoloških aplikacij razgradnje rastlinske biomase. Večina proteinov, ki sodelujejo pri razgradnji arabinoznih substratov in transportu razgradnih produktov pri bifidobakterijah je še neokarakteriziranih. Od okarakteriziranih proteinov iz različnih

organizmov pa je nad 3 stopnjo anotiranih le 13 encimov, objavljenih v podatkovni bazi »Carbohydrate-Active Enzymes« (CAZy) v razdelku okarakterizirani encimi (Henrissat in sod., 2016).

1.2 NAMEN IN CILJI

Pri bakteriji *B. longum* je bil najden genski lokus, ki kodira encime in druge proteine, ki so domnevno vpleteni v prepoznavanje, razgradnjo in privzem razgradnih produktov arabinogalaktana v celice, vendar do danes večina teh proteinov še ni bila eksperimentalno okarakterizirana. Namen tega magistrskega dela je bil heterologno izraziti dva gena za proteina s predvideno glikozid hidrolazno funkcijo iz bakterije *B. longum* v bakteriji *Escherichia coli* in proizvesti biološko aktivna proteina.

Cilj naloge je bil heterologna ekspresija, proizvodnja v laboratorijskem merilu, izolacija in čiščenje proizvedenih tarčnih proteinov. Očiščenima encimoma smo želeli določiti osnovne biokemijske značilnosti kot so temperaturni in pH-optimum, substratna specifičnost, encimsko kinetične konstante in vpliv izbranih dejavnikov na encimsko aktivnost. Predpostavljali smo, da bo raziskovalno delo privedlo do novih informacij v zvezi z načinom delovanja in preferenčnimi substrati proteinov, ki predvidoma sodelujejo pri razgradnji arabinogalaktana pri bakteriji *B. longum*.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Domnevni glikozid hidrolazi iz bakterije *B. longum* z dodano histidinsko oznako je možno heterologno izraziti v bakteriji *E. coli*.
- Heterologno izražena tarčna proteina lahko v aktivni nativni obliki izoliramo z metodo afinitetne kromatografije z imobiliziranimi nikljevimi ioni.
- Domnevni glikozid hidrolazi lahko razgrajujeta arabinogalaktane.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ČLOVEŠKA ČREVESNA MIKROBIOTA

Prebavna cev ali gastrointestinalni trakt (GIT) človeka so organi, ki sodelujejo pri prebavi hrane za pridobitev energije in hranil. Naseljuje ga med $10^6 - 10^{14}$ mikroorganizmov, ki jih skupaj imenujemo mikrobiota in so ključni za pravilno delovanje prebavil. V različnih delih prebavne cevi najdemo po sestavi ter številčnosti različno mikrobno združbo. Najmanj mikroorganizmov je v želodcu, največ pa v debelem črevesu, od 10^{12} do 10^{14} cfu/ml (Cultrone in sod., 2015; Simon in Gorbach, 1986). Uravnotežena, kompleksna mikrobiota je nujna za normalno prebavo in za vzdrževanje homeostaze v črevesnem ekosistemu (Simon in Gorbach, 1986). Črevo naselijo bakterije ob rojstvu novorojenčka, kamor pridejo preko vaginalnega kontakta med materjo in otrokom, iz materine fekalne mikrobiote in tudi preko materinega mleka (Mevissenverhage in sod., 1987; Fernandez in sod., 2013). Črevesna mikrobiota novorojenčkov je odvisna od več dejavnikov in sicer načina rojstva (naravni porod ali carski rez), načina hranjenja (dojenje ali hranjenje z mlečno formulo (Drasar, 1989)), izpostavljenosti antibiotikom, higiene, pogostosti in vrste bolezni (še posebej infekcije gastrointestinalnega trakta) (Fanaro in sod., 2003). Po prenehanju dojenja se stanje v prebavnem traktu začne počasi približevati mikrobioti odraslih ljudi. Mikrobiota odraslih ljudi je odvisna od starosti, prehrane, genetskega ozadja, fiziološkega stanja, mikrobnih interakcij in okoljskih dejavnikov (Dethlefsen in sod., 2006; Turnbaugh in sod., 2009). Raziskave so pokazale, da med človekom in črevesno mikrobioto obstaja obojestransko koristen odnos in da mikrobiota deluje kot virtualni organ, ki vpliva na razvoj imunskega sistema (Mazmanian in sod., 2005; O'Hara in Shanahan, 2006), brani pred patogeni in uravnava odzive na poškodbe epitelijskih celic (Gilmore in Ferretti, 2003; Hooper, 2004), vpliva na gostiteljevo ravnovesje energije preko fermentacije neprebavljivih prehranskih vlaknin in anaerobnim metabolizmom peptidov in proteinov (Backhed in sod., 2007). Možgani in črevesna mikrobiota so dobro povezani med sabo preko živčnega sistema ter tako sooblikujejo odzive telesa in vplivajo na gostiteljevo zdravje (Collins in Berick, 2009). V črevesni mikrobioti prevladujejo striktni anaerobi. Na podlagi metagenomskih študij je znano, da črevesno mikrobioto v glavnem zastopajo bakterije iz debel *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* in *Proteobacteria* (Finegold, 1983; Suau in sod., 1999; Marteau in sod., 2001, Tap in sod., 2009). Relativna zastopanost teh rodov v različnih študijah variira odvisno od variacij med izbranimi populacijami študije, geografskih dejavnikov, načina življenja, bolezenskih stanj ter na račun metagenomskih protokolov, uporabljenih pri določanju sestave mikrobiote (El Kaoutari in sod., 2013). Znano je tudi, da v proksimalnem delu debelega črevesa večinoma prevladuje saharolitični metabolizem, v distalnem delu pa prevladuje proteolitični in fibrolitični metabolizem (Macfarlane in sod., 1992).

V črevesju so substrat za rast bakterij ogljikovi hidrati iz prehrane, ki niso bili razgrajeni (oziroma so neprebavljivi) v zgornjem delu prebavnega trakta (Cummings in sod., 1989).

Poleg prehranskih najdemo tam še druge vrste ogljikovih hidratov in glikokonjugatov iz mukoznega sloja črevesne sluznice. Dnevno naj bi debelo črevo doseglo od 20 do 60 g prehranskih ogljikovih hidratov, od tega so glavne skupine odporni škrob, polisaharidi rastlinskih celičnih sten in neprebavljivi oligosaharidi (Cummings in Englyst, 1991). Ljudje privzamemo relativno majhen del prehranske energije (približno 10 %) preko aktivnosti črevesne mikrobiote (McNeil in sod., 1984). Človeški genom nosi zapis le za 17 encimov, povezanih z razgradnjo ogljikovih hidratov iz hrane, večinoma za razgradnjo laktoze, saharoze in škroba (Cantarel in sod., 2012). Črevesna mikrobiota se razvija med odraščanjem človeka in mu omogoča metabolne aktivnosti, ki niso kodirane v človeškem genomu (El Kaoutari, 2013). Prevladujoči končni produkti mikrobne fermentacije ogljikovih hidratov so kratkoverižne maščobne kisline butirat, propionat in acetat (Cummings, 1981; Wolin in Miller, 1983). Butirat je pomemben za kolonocite (epitelne celice debelega črevesa), propionat in acetat pa po krvi preideta do jeter in se vključita v metabolizem lipidov in glukoze (Rombeau in Kripke, 1990; Hamer in sod., 2008). Ustrezna in funkcionalna črevesna mikrobiota je zelo pomembna za človeka, zato je mnogo raziskav posvečeno ugotavljanju načinov njenega uravnavanja. Do sedaj so bili za ta namen razviti probiotiki, prebiotiki in simbiotiki. Koncept probiotikov je bil zasnovan že leta 1971, leta 1989 pa ga je Fuller ponovno definiral kot »živi mikrobni dodatek k hrani, ki ugodno vpliva na gostitelja z izboljšanjem njegovega črevesnega ravnovesja« (Fuller, 1989). Najbolj poznana probiotična rodova sta *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*. Nekaj let za tem pa sta Gibson in Roberfroid (1995) definirala koncept prebiotikov kot »neprebavljivo sestavino hrane, ki ugodno vpliva na gostitelja s selektivno vzpodbuditvijo rasti in/ali aktivnosti ene ali omejenega števila bakterij v debelem črevesju in s tem izboljšuje gostiteljevo zdravje«. Prebiotik se ne sme razgraditi ali absorbirati v zgornjem delu prebavil, zato so najprimernejši kandidati prav neprebavljivi ogljikovi hidrati (oligo in polisaharidi) ter tudi nekateri proteini in lipidi. V skupino neprebavljivih ogljikovih hidratov v hrani štejemo odporni škrob ter polisaharide rastlinskih celičnih sten (hemicelulozo, pektine in neprebavljive oligosaharide) (Gibson in Roberfroid, 1995). Trenutno dobro uveljavljeni prebiotiki so ksilooligosaharidi, galaktooligosaharidi in fruktani (Macfarlane in sod., 2008). Simbiotiki pa so kombinacija probiotikov in prebiotikov (de Vrese in Schrezenmeir, 2008).

Pri mnogih bolezenskih stanjih, kot so na primer kronična črevesna vnetja, rak debelega črevesa, neravnovesje povezano z uporabo antibiotikov in tudi debelost, so ugotovili odstopanja od normalnega stanja črevesne mikrobiote (Ley in sod., 2006; Khoruts in sod., 2010; Koropatkin in sod. 2012). Trenutne raziskave so usmerjene v ugotavljanje glavnih razlogov in dejavnikov, ki oblikujejo mikrobioto, da bi razumeli vzroke odstopanj in razvili strategije ponovne vzpostavitve zdrave mikrobne združbe. Cilj je pridobiti globlji vpogled v fino strukturo in delovanje mikrobne združbe, da bi z znanjem lahko razvili boljše strategije uporabe probiotikov, prebiotikov in farmakoloških pripravkov (Koropatkin in sod., 2012). V prihodnjih letih se bodo raziskave na tem področju

predvidoma osredotočile na vpliv prebiotikov na celotni mikrobn sistem in ne samo na izbrane bakterijske vrste, saj lahko samo tako izboljšamo razumevanje načina širšega delovanja prebiotikov in njihovo pravo vlogo, ki vpliva na zdravje človeka (Scott in sod., 2014).

2.2 BIFIDOBakterije

Bifidobakterije so negibne, Gram pozitivne, anaerobne, razvejane, paličaste bakterije, ki niso sporogene ali patogene. Uvrščene so v deblo *Actinobacteria* in spadajo med najbolj raziskane predstavnike tega debla. Prvi, ki je poročal o izolaciji bifidobakterij, je bil Tissier leta 1899 in sicer iz blata zdravega dojenega otroka (Ishibashi in sod., 1997). So heterofermentativne bakterije, ki proizvajajo mlečno kislino kot enega glavnih produktov fermentacije ogljikovih hidratov in jih zato pogosto vključujejo med mlečnokislinske bakterije (Biavati in Mattarelli, 2001). Bifidobakterije spadajo med prve naseljevalce prebavnega trakta novorojenčkov in prevladujejo pri dojenih otrocih do obdobja odvajanja od dojenja, ko jih prerastejo druge bakterijske vrste. V debelem črevesu dojenčkov najpogosteje najdemo seve *B. infantis*, *B. breve* in *B. longum* (Harmsen in sod., 2000; Favier in sod., 2002). Kljub temu, da bifidobakterije predstavljajo le 3-6 % črevesne mikrobiote odraslih ljudi, imajo pomemben vpliv pri izboljševanju nekaterih zdravstvenih stanj, kot je driska, nekatere metabolne nepravilnosti in vnetna stanja, delujejo imunomodulatorno, preprečujejo naselitev patogenov v črevesju itd. (Biavati in Mattarelli, 2001; Picard in sod., 2005, Wallace in sod., 2011).

2.2.1 Razgradnja ogljikovih hidratov pri bifidobakterijah

V zadnjih petnajstih letih raziskave kažejo, da je nabor genov za razgradnjo rastlinskih vlaknin v bifidobakterijah obsežnejši, kot so predvidevali pred tem. To nam pove, da so dobro prilagojene na posebno ekološko nišo, ki jo zasedajo v prebavilih (Schell in sod., 2002). Znano je, da je veliko genov ohranjenih med različnimi vrstami rodu *Bifidobacterium* in s tem ustvarja t.i. jedrni genom, v katerem 6,5 % ohranjenih genov sodeluje pri razgradnji in transportu ogljikovih hidratov (Bottacini in sod., 2010). Pri podvrsti *B. longum* subsp. *longum* je s tovrstnimi funkcijami povezano kar 8 % genoma (Schell in sod., 2002). Genomske sekvence kažejo, da so bifidobakterije dobro prilagojene na kolonizacijo človeških prebavil, saj vsebujejo številne encime za modifikacijo ogljikovih hidratov, glikozid hidrolaze, ABC-transporterje za sladkorje in fosfoenolpiruvat fosfotransferazni sistem (PEP-PTS), ki je pomemben za metabolizem rastlinskih ogljikovih hidratov (Schell in sod., 2002; Lee in sod., 2008; Barrangou in sod., 2009; Kim in sod., 2009). Ugotovili so tudi, da se mnogi geni za koriščenje ogljikovih hidratov v genomu nahajajo v genskih gručah z ohranjeno sestavo. Običajno so sestavljeni iz gena za represorski protein tipa *LacI*, gena za oligosaharidni transporter in od 1 do 6 različnih genov za glikozid hidrolaze (Schell in sod., 2002). Strukturna raznolikost in kompleksnost

rastlinskih ogljikovih hidratov nakazuje, da je za njihovo razgradnjo potrebno sodelovanje mnogih encimov, kar je v skladu s teorijo o genskih gručah za koriščenje polisaharidov, ki so jih poimenovali »PUL« (ang. »polysaccharide utilization loci«) (Schell in sod., 2002). Poleg bakterij iz debla *Actinobacteria*, so tudi pri nekaterih predstavnikih debla *Firmicutes* ugotovili podobno organizacijo zapisov za proteine, ki so udeleženi v razgradnjo polisaharidov, v genomu (Bjursell in sod., 2006).

Bifidobakterije od nekaterih bakterij v mikrobnih združbi odstopajo še po eni metabolni posebnosti. Za razgradnjo heksoz uporabljajo fosfoketolazno metabolno pot, imenovano angleško tudi »bifid shunt«. V tej metabolni poti se heksozni sladkorji pretvorijo v intermediate fosfoketolazne poti in nato v kratkoverižne maščobne kisline in druge organske produkte (Devries in Stoutham, 1967; D'Argenio in Mazzacca, 1999). Ključni encim te poti je fruktoza-6-fosfat fosfoketolaza, ki služi tudi kot taksonomski označevalec družine *Bifidobacteriaceae* (Felix in Dellaglio, 2007). Fosfoketolazna pot bifidobakterijam omogoča, da med razgradnjo ogljikovih hidratov proizvedejo več energije v obliki ATP v primerjavi z drugimi fermentacijskimi potmi (Palframan in sod., 2003).

Rod *Bifidobacterium* nosi sposobnost koriščenja arabinofuranozil-vsebujočih oligosaharidov, ki se nahajajo v rastlinskih celičnih stenah (Van Laere in sod., 1999; Margolles in de los Reyes, 2003; Van den Broek in Voragen, 2008). Arabinan, arabinogalaktan in arabinoksilan se obravnavajo kot potencialni prebiotiki za podporo rasti določenim bifidobakterijskim sevom v črevesu (Van Laere in sod., 2000). Raziskave na podganah s presajeno človeško mikrobioto so pokazale, da dodatek dolgoverižnega arabinana k prehrani poveča število bifidobakterij, še posebej vrste *B. longum*, v debelem črevesu (Van den Abbeele in sod., 2011). Z *in-vitro* študijami fermentacije v človeški fekalni gošči so pokazali, da različni tipi arabino oligosaharidov iz kaše sladkorne pese vplivajo na povečanje deleža bifidobakterij – imajo t.i. bifidogeni efekt (Holck in sod., 2011; Vigsnaes in sod., 2011; Sulek in sod., 2014). Genski zapisi za arabinozidaze in oligosaharidne transporterje so poleg bifidobakterij pogosto zastopani tudi v sekvencah bakterij *Enterococcus faecium* in *Bacteroides fragilis*, ki sta tudi črevesni bakteriji. Na podlagi tega znanstveniki sklepajo, da je povečan delež omenjenih genov skupen naseljevalcem človeških prebavil (Schell in sod., 2002).

2.3 OGLJIKOVI HIDRATI

Ogljikovi hidrati so med najbolj razširjenimi molekulami na zemlji. Oksidacija ogljikovih hidratov predstavlja centralno pot pridobivanja energije v večini nefotosintetizirajočih celicah (organizmih). Ogljikove hidrate delimo v tri razrede: monosaharide, oligosaharide in polisaharide. Monosaharidi ali preprosti sladkorji so ogljikovi hidrati, sestavljeni iz dveh ali več hidroksilnih skupin in jih glede na lokacijo karbonilne skupine ločimo na aldoze in ketoze. Monosaharidi so brezbarvne snovi, ki se nahajajo v kristalinični obliki in so dobro

topne v vodi ter netopne v nepolarnih topilih. Najpogostejši monosaharid v naravi je D-glukoza. Monosaharide lahko oksidiramo že z blagimi oksidirajočimi snovmi, kot je na primer raztopina železovih (Fe^{3+}) ali bakrovih (Cu^{3+}) ionov. V procesu oksidacije se karbnilna skupina oksidira v karboksilno in zato sladkorje, ki so sposobni redukcije železovih ali bakrovih ionov, imenujemo reducirajoči sladkorji. Oligosaharidi so sestavljeni iz 2 do 20 monosaharidnih enot povezanih z *O*-glikozidnimi vezmi. *O*-glikozidna vez nastane v reakciji kondenzacije anomernega ogljika enega sladkorja in hidroksilne skupine drugega sladkorja. Razpad glikozidne vezi imenujemo hidroliza. Polisaharidi ali glikani so sestavljeni iz 20 ali več monosaharidnih enot. Med sabo se razlikujejo po sestavi, vrstah glikozidnih vezi med gradniki in po stopnji razvejanosti stranskih verig. Ločimo homopolisaharide, katere sestavlja le ena vrsta monosaharidov in heteropolisaharide, ki so sestavljeni iz različnih monosaharidov. Homopolisaharidi lahko služijo kot strukturni elementi (npr. celuloza v rastlinski celični steni) ali kot zaloga rezervnih monosaharidov (npr. škrob in glikogen). Heteropolisaharide pa najdemo predvsem v celičnih stenah organizmov, kjer služijo kot strukturni element (Nelson in Cox, 2005).

Ogljikovi hidrati v povezavi s proteini ali lipidi tvorijo glikokonjugate. Glikozilacija proteinov vpliva na njihove interakcije z drugimi proteini ali makromolekulami, njihovo stabilnost in lokalizacijo tekom razvoja celic, pomembne so pri medsebojnem prepoznavanju celic in pri imunskem odzivu. Veda o funkcijah in strukturah glikokonjugatov se imenuje glikobiologija (Nelson in Cox, 2005).

2.3.1 Pektini

Pektini so med najbolj raziskanimi polisaharidi in jih najdemo v celičnih stenah vseh višjih rastlin. Pektinsko skupino polisaharidov sestavlja več strukturno različnih in kompleksnih substratov: galakturonan, ramnogalakturonan-I in II, arabinan, galaktan, arabinogalaktan, ksilogalakturonan in apiogalakturonan (Darvill in sod., 1978; Sakamoto in Sakai, 1995; Ridley in sod., 2001; Makarova in sod., 2015). Raziskave na rastlinskih pektinskih in galaktanskih polisaharidih so pokazale, da imajo nekatere bioaktivne lastnosti. Odkrili so, da lahko delujejo imunomodulatorno, protivnetno, varujejo pred poškodbami jeter, protirakavo in proti-metastazno. Zaradi teh lastnosti jih lahko potencialno koristimo na področjih medicine, veterine ter prehranske in kozmetične industrije (Trofimova in sod., 2012; Makarova in sod., 2015).

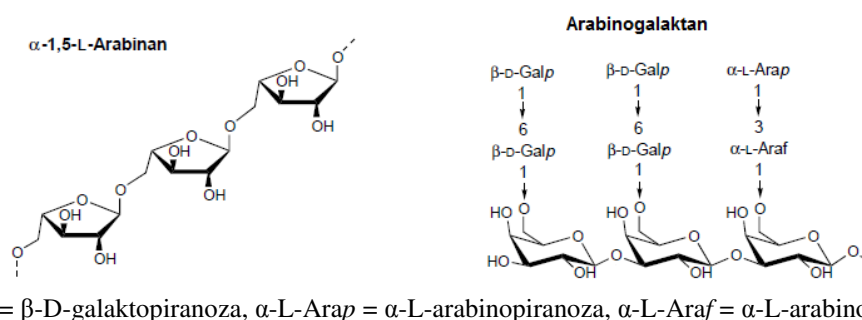
2.3.2 Arabinogalaktan

Arabinogalaktan je heteropolisaharid, ki ga prav tako najdemo v rastlinskih celičnih stenah in ga delimo na dva tipa. Arabinogalaktan-I sestavlja glavna veriga iz β -D-galaktopiranoznih ostankov, ki so med sabo povezani z 1,4-vezmi. Stranske verige α -L-

arabinofuranoznih ostankov so z glavno povezane z 1,2-, 1,3- in 1,5-vezmi (Huisman in sod., 1999; Huisman in sod., 2001; Hinz in sod., 2005). Arabinogalaktan tipa II pa sestavlja glavna veriga β -D-galaktopiranoznih ostankov med sabo povezanih z 1,3- ali 1,6-vezmi. Stranske verige pa so dveh vrst in sicer verige α -L-arabinofuranoznih ostankov, ki so na glavno verigo vezane z 1,3- in 1,5-vezmi, in verige β -D-galaktopiranoznih ostankov, ki pa so na glavno verigo vezane z 1,3- in 1,6-vezmi. Arabinogalaktan II je strukturno kompleksnejši, poleg galaktoznih in arabinoznih pogosto vsebuje tudi druge ostanke in lahko s proteini tvori glikokonjugate, ki se imenujejo arabinogalaktanski proteini (Clarke in sod., 1979; Fincher in sod., 1983; Ridley in sod., 2001; Caffall in Mohnen, 2009; Makarova in sod., 2015). Zaradi svoje strukturne kompleksnosti je arabinogalaktan težko razgradljiv polisaharid, zato je za razgradnjo potrebno sodelovanje več različnih encimov. Kombinacija encimov endogalakatanaz, eksogalakatanaz, endoarabinanaz in arabinofuranozidaz lahko uspešno razgradi arabinogalaktan tipa I, pri tipu II pa so glede na strukturo lahko potrebni še nekateri dodatni encimi (Huisman in sod., 1999).

2.3.2.1 Prebiotične lastnosti arabinogalaktana

Arabinogalaktan je eden od prehranskih ogljikovih hidratov, ki so nerazgradljivi s človeškimi encimi in se razgradijo šele ob mikrobem delovanju v debelem črevesu. Te lastnosti mu dajejo prebiotični potencial, ki ga znanstveniki odkrivajo in raziskujejo šele v zadnjih letih. Zaradi svoje kompleksnosti se ta polisaharid razgrajuje počasi, njegova razgradnja pa poteka tako v proksimalnem kot tudi v distalnem delu debelega črevesa človeka in zagotavlja mikrobioti v obeh delih substrat za fermentacijo (Terpend in sod., 2013).



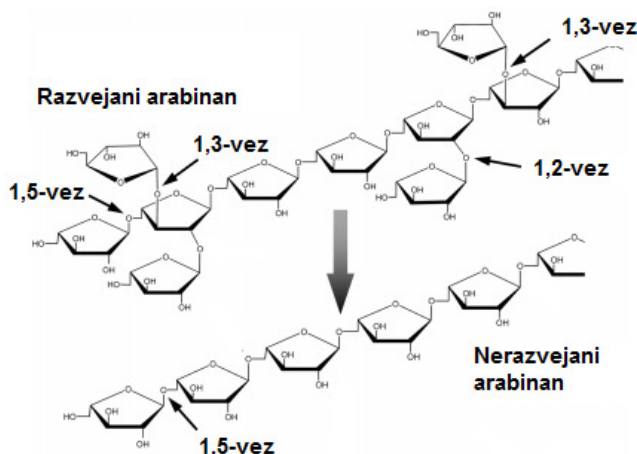
Slika 1: Kemijski strukturi α -1,5-L-arabinana in arabinogalaktana I (prirejeno po Shallom in Shoham, 2003)

Z uporabo simulatorja človeškega črevesnega mikrobnega ekosistema so ugotovili, da je arabinogalaktan I sposoben aktivirati mikrobno združbo v širšem območju debelega črevesa kot na primer uveljavljeni prebiotiki frukto-oligosaharidi, ki so večinoma hitro prebavljeni v proksimalnem delu debelega črevesa. Ugotovili so, da arabinogalaktani I ugodno vplivajo na koncentracijsko zastopanost bakterijskih vrst kot so *Roseburia* sp.,

Faecallibacterium prausnitzii in *Bifidobacterium* spp. (določeno z metodo kvantitativne PCR). Ravno bakterije *F. prausnitzii* na primer primanjkuje v črevesni mikrobioti pacientov s kroničnimi vnetji črevesa. Proizvodnja kratkoverižnih maščobnih kislin je pri razgradnji arabinogalaktanov prisotna tudi v distalnem delu debelega črevesa, kar je prav tako zaželen efekt (Terpend in sod., 2013; Daguet in sod., 2016).

2.3.3 Arabinan

Arabinan je pektinski polisaharid, sestavljen iz razvejane glavne verige arabinofuranoznih ostankov, povezanih med sabo z α -1,5-vezmi, stranske arabinofuranozne veje pa so na glavno verigo pripete z 1,2- ali 1,3- vezmi (Voragen in sod., 1987; Oosterveld in sod., 2002). Pogosto jih najdemo v kombinacijah z galaktani v pektinu v sadju, zelenjavi, semenih, lubju in lesu (Stephen in sod., 1982; Voragen in sod., 1987). Arabinane v rastlinskih celičnih stenah najdemo kot strukturne komponente in vplivajo na lastnosti procesiranega sadja in zelenjave ter so del prehranskih vlaknin (Voragen in sod., 1987). Arabinan razgrajujeta dva tipa encimov in sicer α -L-arabinofuranozidaze (E.C. 3.2.1.55) in endo-1,5- α -L-arabinanaze (E.C. 3.2.1.99). α -L-arabinofuranozidaze cepijo arabinozne monosaharide iz nereducirajočega konca arabinoznega polisaharida in so ekso- encimi, ki lahko cepijo 1,2-, 1,3- ali 1,5-vezi (Saha, 2000; Inacio in sod., 2008). Endo-1,5- α -L-arabinanaze pa hidrolizirajo 1,5-vezi znotraj glavne verige arabinana in sproščajo L-arabinozo in arabinooligosaharide različnih dolžin in razvejanosti (Saha, 2000).



Slika 2: Prikaz strukture arabinoznih saharidov z različno povezanimi arabinoznimi ostanki (prirejeno po Park in sod., 2015)

2.3.3.1 Prebiotične lastnosti arabinana

Več *in vitro* raziskav človeške fekalne gošče, ki so bile izvedene v zadnjih letih, je pokazalo, da različni tipi arabinooligosaharidov iz kaše sladkorne pese pozitivno vplivajo na zastopanost bakterij iz rodu *Bifidobacterium* (Holck in sod., 2011; Vigsnaes in sod.,

2011; Sulek in sod., 2014). Moon in sod. (2015) so pokazali, da linearni arabinooligosaharidi in linearni arabinan nista razgradljiva v slini, želodcu ali tankem črevesu, torej ostaneta neprebavljena vse do vstopa v debelo črevo. Ugotovili so tudi, da ta substrata selektivno razgrajujejo bakterijske vrste *Lactobacillus brevis*, *B. longum* in *Bacteroides fragilis*, medtem ko škodljive bakterije *Escherichia coli*, *Listeria monocitogenes*, *Salmonella typhimurium* in *Staphylococcus aureus* niso sposobne razgraditi v raziskavi uporabljenih arabinoznih substratov. Glavni produkti fermentativne razgradnje tega polisaharida so kratkoverižne maščobne kisline (Moon in sod., 2015).

2.4 GLIKOZID HIDROLAZE

2.4.1 Encimi, ki razgrajujejo, sintetizirajo in modificirajo ogljikove hidrate (CAZy)

Ogljikovi hidrati so široko zastopane molekule v naravi. Na njihovo sestavo in kompleksnost vpliva širok spekter encimov, ki razgrajujejo, sintetizirajo ali modificirajo oligo- in polisaharide (Henrissat in Davies, 1997; Lombard in sod., 2014). Sintezo glikokonjugatov in kompleksnih ogljikovih hidratov katalizirajo glikozid transferaze, razgradnjo pa specifične glikozid hidrolaze, polisaharid liaze in ogljikohidrat esterase. Skupno so ti encimi naslovljeni kot »encimi, ki delujejo na ogljikovih hidratih« (angl. Carbohydrate-Active Enzymes, kratko CAZy) in so v podatkovni bazi CAZy razdeljeni v družine na podlagi podobnosti v aminokislinskih sekvencah. CAZy je od leta 1999 vodilna podatkovna baza na tem področju, ki razvršča encime, aktivne na ogljikovih hidratih v družine in klane glede na podobnosti v zaporedju aminokislin oz strukturi (Henrissat in sod., 2016; Lombard in sod., 2014).

Encime, ki razgrajujejo, sintetizirajo ali modificirajo ogljikove hidrate ter glikokonjugate delimo v naslednje razrede (Henrissat in sod., 2016; Lombard in sod., 2014):

- glikozid hidrolaze (GHs, hidrolizirajo glikozidne vezi),
- glikoziltransferaze (GTs, tvorijo glikozidne vezi),
- polisaharid liaze (PLs, vršijo nehidrolitične cepitve glikozidnih vezi),
- ogljikohidrat esterase (CEs, hidrolizirajo estre ogljikovih hidratov),
- pomožni encimi (AAs, redoks encimi, ki sodelujejo z ostalimi encimi aktivnimi na ogljikovih hidratih).

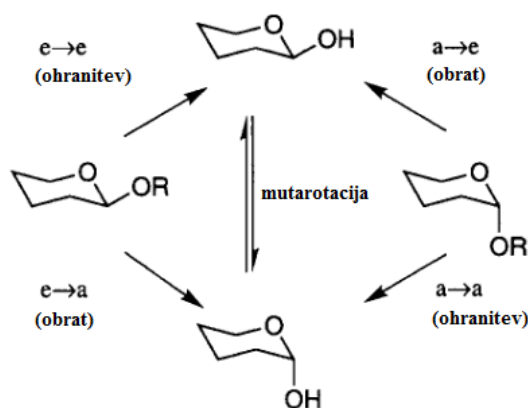
2.4.2 Glikozid hidrolaze

Glikozid hidrolaze (GH) so encimi, ki hidrolizirajo glikozidne vezi med dvema ali več ogljikovimi hidrati ali med ogljikovim hidratom in drugimi vezanimi skupinami. Produkt hidrolize so odcepljeni hemiacetali ali hemiketali sladkorjev in »preostala veriga«. Glikozid hidrolaze imenujemo tudi glikozidaze ali glikozil hidrolaze. GH so sposobne hidrolizirati *O*-, *N*- in *S*-vezane glikozide. GH lahko razvrščamo v skupine glede na

različne lastnosti. Delimo jih lahko na endo- in ekso-GH, kar opisuje lokacijo hidrolize (na koncu substrata, ki je pogostejše nereducirajoči ali v sredini verige substrata). Trenutno GH razvrščamo v 135 družin (podatek z dne 2.6.2016), te družine pa naprej v 14 klanov glede na tridimenzionalno strukturo proteinov. Nekatere kompleksne GH lahko najdemo v več družinah, saj vsebujejo več različnih katalitičnih domen (Henrissat in sod., 2016; Lombard in sod., 2014).

2.4.2.1 Mehanizem delovanja glikozid hidrolaz

Običajno v hidrolizi glikozidne vezi sodelujeta dva katalitična ostanka encima: protonski donor (kislina) in nukleofil (baza). Glede na pozicijo katalitičnih ostankov se hidroliza izvede kot ohranitev (ang. »retention«) ali obrat (ang. »inversion«) anomerne konfiguracije centra molekule sladkorja (Slika 3) (Davies in sod., 1995, cit. po Pokusaeva in sod., 2011). Ohranjajoči encimi uporabljajo mehanizem dvojne zamenjave, ki ohrani konfiguracijo anomernega centra in so sposobni transglikozilacije substrata (Withers, 2001). Obračajoči encimi delajo po mehanizmu enojne zamenjave in vedno uporabljajo vodo kot sprejemno molekulo ter niso sposobni izvedbe transglikozilacije (Van den Broek in Voragen, 2008). V podatkovni bazi CAZy lahko najdemo podatke o stereokemičnem izidu reakcije, ki jo katalizira GH in vrsti aminokislinskih ostankov, ki sodelujejo kot donor protona in nukleofil (Henrissat in sod., 2016).



Slika 3: Prikaz kemijske spremembe substrata ob encimski hidrolizi po mehanizmu obrata ali ohranitve (prirejeno po Henrissat in Davies, 1997)

2.4.2.2 Glikozid hidrolaze v črevesju človeka

Razgradnja kompleksnih polisaharidov v debelem črevesu je zahteven proces, pri katerem sodeluje veliko število mikroorganizmov s svojimi encimi. Zapisi za encime so pogosto kodirani v genskih gručah (Schell in sod., 2002; Bjursell in sod., 2006). Encimi imajo poleg katalitične domene mnogokrat še pomožne domene, katerih funkcija je zagotovitev dodatnih sposobnosti vezave ogljikovih hidratov, pritrditev encimov na celično membrano,

povezovanje z drugimi encimi v komplekse in integracija v celulosome (Cantarel in sod., 2009; Fontes in Gilbert, 2010; Yoshida in sod., 2010). Bakterijsko steno lahko preidejo le kratkoverižni oligosaharidi, zato razgradnja prehranskih ogljikovih hidratov zahteva izločanje encimov v lumen črevesja. Pri po Gramu negativnih bakterijah se lahko encimi s signalnim peptidom prenesejo v periplazmo ali izven celice, pri Gram pozitivnih pa bakterije nimajo periplazme, zato se vsi encimi s signalnim peptidom za izločanje prenesejo izven celic. Pri obeh vrstah bakterij proteini, ki imajo signalni peptid za izločanje, pogosto vsebujejo še peptid za pritrjevanje na zunanjo membrano celične stene ali t.i. transmembransko domeno. Prisotnost velikega števila genov za razgradnjo ogljikovih hidratov CAZy v črevesnih bakterijskih genomih je predvidoma posledica podvojevanja genov in/ali horizontalnega prenosa genov med različnimi vrstami (El Kaoutari in sod., 2013).

2.4.3 Glikozid hidrolaze iz družine 43 (GH43)

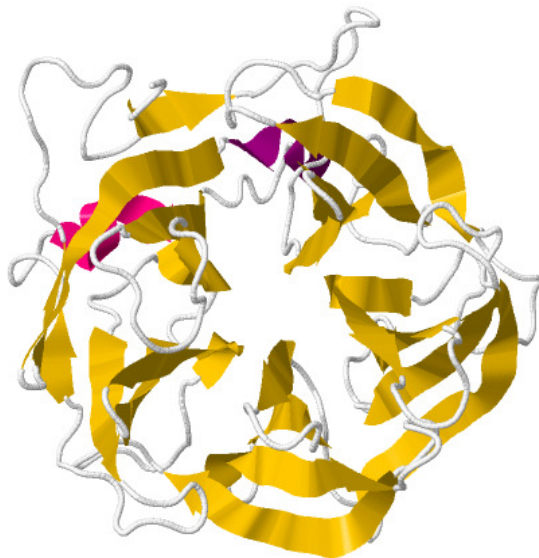
Glavni predstavniki glikozid hidrolaz, ki se uvrščajo v družino GH43 so glede na znane aktivnosti uvrščeni v naslednje skupine (Henrissat in sod., 2016; Lombard in sod., 2014):

- β -ksilozidaze (E.C. 3.2.1.37),
- α -L-arabinofuranozidaze (E.C. 3.2.1.55),
- arabinanaze (E.C. 3.2.1.99),
- ksilanaze (E.C. 3.2.1.37),
- galaktan 1,3- β -galaktozidaze (E.C. 3.2.1.145),
- α -1,2-L-arabinofuranozidaze (E.C. 3.2.1.-),
- ekso- α -1,5-L-arabinofuranozidaze (E.C. 3.2.1.-),
- ekso- α -1,5-L-arabinanaze (E.C. 3.2.1.-) in
- β -1,3-ksilozidaze (E.C. 3.2.1.-).

Značilna tridimenzionalna struktura predstavnikov družine GH43 je 5-kratni β -propeler in so zaradi tega uvrščeni v klan GH-F. Mehanizem delovanja GH43 je enojna zamenjava z obratom anomerne konfiguracije saharidnega centra. Katalitični center encima sestavljajo trije aminokislinski ostanki. Katalitični nukleofil je L-asparaginska kislina, darovalec protona pa L-glutaminska kislina (Nurizzo in sod., 2002; Pons in sod., 2004; Lombard in sod., 2014). Tretji aminokislinski ostanek je ponovno L-asparaginska kislina in predvidoma deluje kot pKa modulator in sodeluje pri vzdrževanju ustrezne poravnave kislinskega ostanka glede na substrat (Nurizzo in sod., 2002; Pons in sod., 2004; De Sanctis in sod., 2010). Ti trije aminokislinski ostanki v aktivnem mestu encima so ohranjeni tudi pri glikozid hidrolazah iz družin 32, 62 in 68 in skupaj z družino 43 sestavljajo furanozidazno naddružino (Naumoff, 2001; Pons in sod., 2004).

Nekateri predstavniki GH43 za delovanje potrebujejo kofaktorje. Eden izmed najpomembnejših kofaktorjev je Ca^{2+} ion. Prisotnost Ca^{2+} iona predvidoma prispeva k

stabilnosti terciarne strukture, saj encim izgubi aktivnost ob prisotnosti kovinskih kelatorjev. Ugotovili so tudi, da je kalcijev ion predvidoma obdan s šestimi vodnimi molekulami in v strukturi proteina interagira s histidinskim ostankom. Mutante encimov z zamenjanim histidinskim ostankom so imele drastično zmanjšano ali izgubljeno aktivnost v primerjavi z divjim tipom, kar potrjuje pomembnost Ca^{2+} iona v kombinaciji s histidinskim ostankom za strukturo in aktivnost encima (de Sanctis in sod., 2010; McVey in sod., 2014).



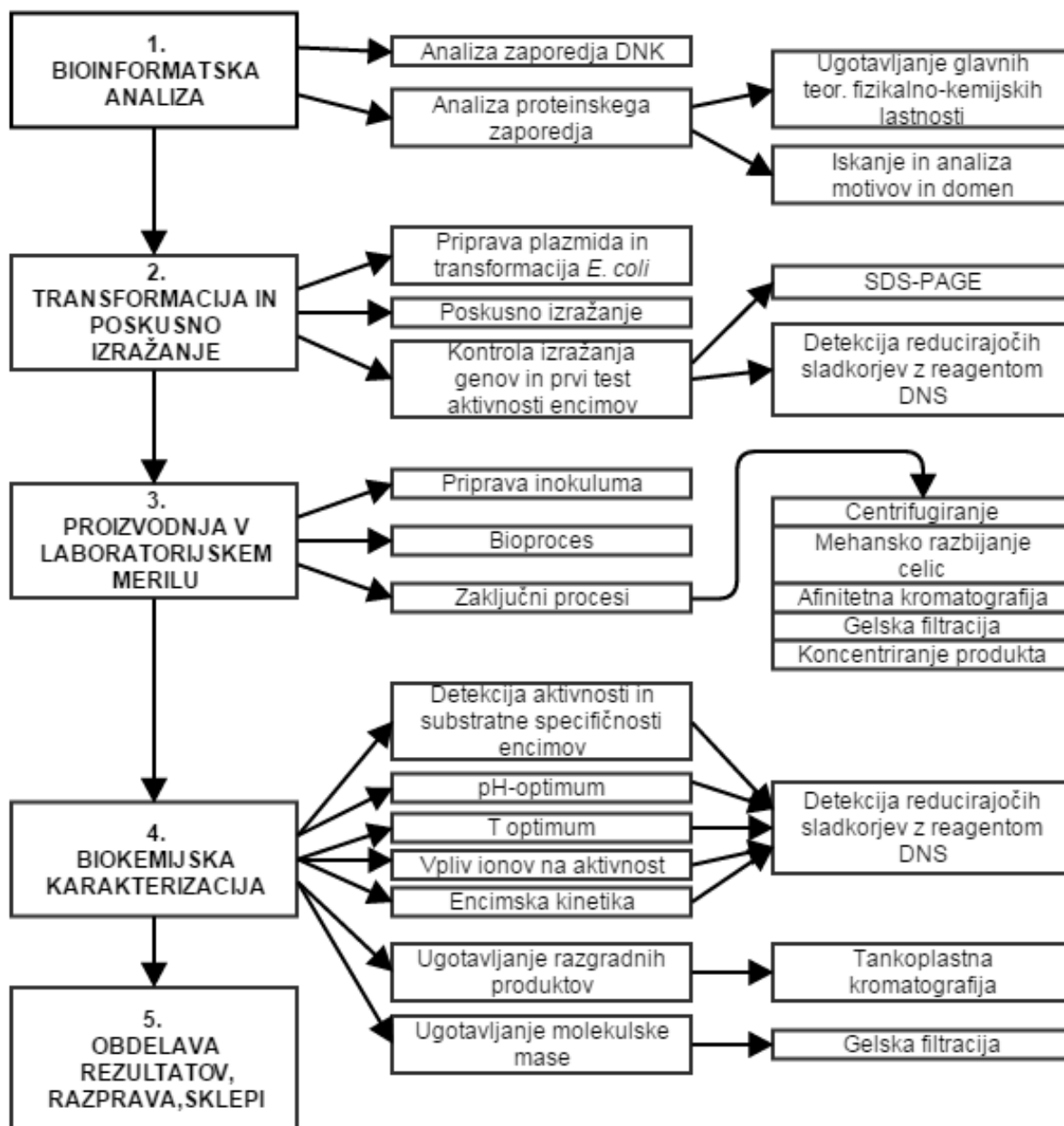
Slika 4: Ekso- β -1,3-galaktanaza (E.C. 3.2.1.145) iz *B. bifidum* (PDB: 5FLW)

Do sedaj je okarakteriziranih 139 encimov iz družine GH43 od skupno 5567 proteinov, ki so na podlagi sekvenčne podobnosti uvrščeni med GH43. Tridimenzionalna struktura je znana za 32 encimov. Do sedaj je bila tridimenzionalna struktura določena samo eni GH43 iz rodu *Bifidobacterium* in sicer ekso- β -1,3-galaktanazi iz *B. bifidum* (Godoy in sod., 2016) (podatki z dne 2. 6. 2016). Njena struktura je predstavljena na sliki 4. Vidna je tipična struktura 5-kratnega beta propelerja, rumeno so obarvani β -listi, vijolično v ozadju pa α -heliksi. Zaporedje vsebuje samo katalitično domeno iz družine GH43, dolgo 304 aminokislin (Godoy in sod., 2016).

GH43 so predvidoma eni pogostejše zastopanih encimov pri bakterijah, ki jih najdemo v mikrobnih združbi človeških prebavil. Znanstvenik El Kaoutari in sod. (2013) so pri analizi zastopanosti in raznolikosti encimov CAZy v človeški črevesni mikrobioti ugotovili, da med najpogostejše pojavljajoče GH sodijo družine 13, 2, 43 in 3.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SHEMA DELA



Slika 5: Shema dela opravljenega v magistrski nalogi

Slika 5 prikazuje shemo ključnih korakov dela, opravljenega v okviru magistrske naloge.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Kemikalije

Preglednica 1 prikazuje seznam kemikalij, ki smo jih uporabili v okviru magistrskega dela ter njihove proizvajalce.

Preglednica 1: Seznam uporabljenih kemikalij in proizvajalci

Proizvajalec oz. dobavitelj	Kemikalije
Amresco (Solon, ZDA)	NaCl
Appli. Chem GmbH (Darmstadt, Nemčija)	MES
BioRad (Kalifornija, ZDA)	Akrilamid (40%)
GE Healthcare (Velika Britanija)	Molekulske masne standarde (HMW in LMW) za gelsko filtracijo, amonijev persulfat.
Invitrogen (Kalifornija, ZDA)	NuPage® Bis-Tris geli, NuPage® LDS Sample Buffer, NuPage® TA Buffer, označevalec Mw Mark12 NuPage®, NuPage® Reducing Agent in NuPage® Antioxidant.
Avantor (Center Valley, ZDA)	Borova kislina, NaOH
Megazyme (Co. Wicklow, Irska)	Linearni arabinan, nerazvejani arabinan, razvejani arabinan, arabinotrioza.
Merck (Darmstadt, Nemčija)	NaOH, očetna kislina, fosforna kislina, Na-acetat, HEPES, CaCl ₂ x 2H ₂ O, Coomassie BB, glicerol, TLC Silica gel 60 F ₂₅₄ plošče, bromofenol modro, BugBuster Protein Extraction Kit (Novagen).
MoBio Laboratories (Carlsbad, ZDA)	Mešanica za LB tekoče gojišče, mešanica za LB trdno gojišče.
Sigma Aldrich (Steinheim, Nemčija)	L-arabinoza, fenol, Na ₂ SO ₃ , Na-K tartrat, Triton® X-100, gum arabik, TEMED, Trizma Base, imidazol, butan-1-ol, kloroform, DNS, tripton, kvasni ekstrakt, MgSO ₄ , KCl, glukoza, 5-metilresorcinol, etanol, Benzonase® Nuclease, Complete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail.
Thermo Scientific (Rockford, ZDA)	GeneJet Plasmid Miniprep Kit

3.2.2 Aparature

Preglednica 2 prikazuje seznam aparatur, ki smo jih uporabili v okviru magistrskega dela ter njihove proizvajalce.

Preglednica 2: Seznam uporabljenih aparatur

Aparatura	Opis
Analitski tehtnici	Mettler AG 245 (Ohio, ZDA), Sartorius BP 3100 P (Gottingen, Nemčija)
Avtoklav	Systec V100 (Linden, Nemčija)
Centrifuge	Eppendorf 5417 R in 5810 R (Hamburg, Nemčija), Sorval RC-5C plus (Newtown, ZDA)
Čitalec mikrotitrskih plošč	Powerwave XS BioTek (Nemčija)
Elektroforeza	NuPage, Invitrogen (Kalifornija, ZDA)
Grelni blok	Grant QBDA, Buch & Holm (Herlev, Danska)
Inkubator	Memmert (Struers) (Dublin, Irska)
Inkubator z mešanjem	Kühner ISF-1-W (Basel, Švica)
Laminarij	Thermo Safe 2020, Holm & Halby (Brøndby, Danska)
Ledomat	Scotsman AF20AS (Suffolk, Velika Britanija)
Mešalna plošča	Kühner Lab Shaker LS-W (Basel, Švica)
Namizni mešalnik	Vortex-Genie 2 (New York, ZDA)
pH meter	Calimatic 761, Knick (Berlin, Nemčija)
Pipete	Gilson, Pipetman® P1000, P200 in P20 (Middleton, ZDA)
Sistem za čiščenje proteinov	Äkta Avant, GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, Švedska)
Sistem za proizvodnjo miliQ vode	Merck, Milipore (Massachusetts, ZDA)
Spektrofotometer	Ultrospec 2100 Pro (Cambridge, Velika Britanija)
Tlačni celični homogenizator	Stansted Fluid Power Ltd (Harlow, Velika Britanija)
Ultrazvočna kopel	2510, Branson (Dansbury, ZDA)
Vakuumska črpalka	MZ 1C, Buch & Holm (Herlev, Danska)

Ostali uporabljeni material: laboratorijska steklovina, stojala za epruvete, mikrocentrifugirke, epruvete z ukrivljenim dnem, posode Tunair™, nastavki za pipete, kivete, mikrotitrne plošče, Petrijeve plošče, cepilne zanke, sterilni filtri 0,45 in 0,20 µm, nesterilni filtri 0,20 µm, avtoklavirni trak.

3.2.3 Bioinformatična orodja in podatkovne baze

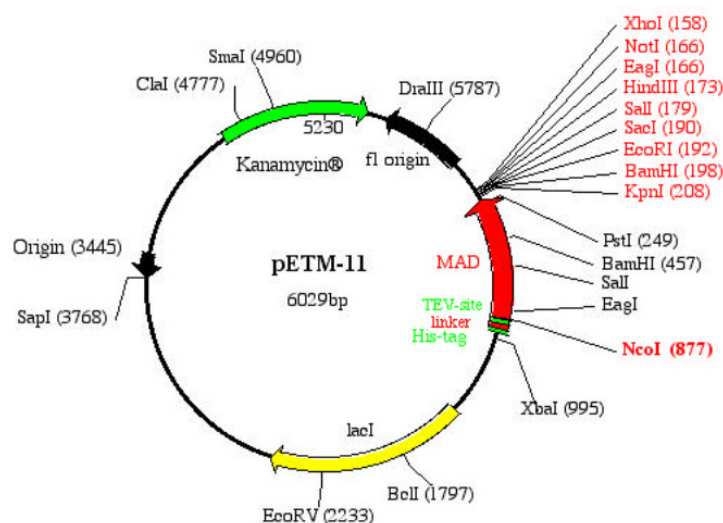
Preglednica 3 prikazuje seznam podatkovnih baz in bioinformatičnih orodij, ki smo jih uporabili v okviru magistrskega dela.

Preglednica 3: Podatkovne baze in bioinformatična orodja, spletne povezave ter nastavitve, uporabljene pri iskanju

Podatkovna baza ali orodje	Spletna povezava	Morebitne nastavitve iskanja
BLASTp (NCBI)	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Iskanje lokalnih podobnosti s proteini iz NCBI in PDB
CAZy	http://www.cazy.org/	
CDD (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi	»Conserved domains«
DNA/RNA GC calculator	http://www.endmemo.com/bio/gc.php	
GenomeNet (KEGG)	http://www.genome.jp/	
HMMER	http://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/	»Reference proteomes«
InterPro	http://www.ebi.ac.uk/interpro/	
InterProScan	http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search	
MyDomains Image Creator (Expasy)	http://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/mydomains/	
PDB	http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do	
Pfam	http://pfam.xfam.org/	
ProtParam (Expasy)	http://web.expasy.org/protparam/	
ProtScale (Expasy)	http://web.expasy.org/protscale/	Kyte & Doolittle, velikost okna 19
SMS Codon Usage	http://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html	Standardni genski kod
UniProt	http://www.uniprot.org/	

3.2.4 Bakterijska seva in plazmid

Za heterologno proizvodnjo obeh proteinov smo preizkusili dva različna bakterijska seva, prvi sev se imenuje *E. coli* BL21(DE3) in je primeren za izražanje genov, ki niso strupeni za gostitelja ter vsebuje T7 polimerazo, inducibilno z molekulo izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG). Drugi sev, ki smo ga preizkusili, se imenuje *E. coli* Rosetta in omogoča boljše izražanje proteinov katerih zapis vsebuje kodone, ki so redko prisotni pri *E. coli*. Sev Rosetta vsebuje tRNA za kodone AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA na plazmidu, odpornem na kloramfenikol (Novagen, 2016). Plazmid pETM-11 vsebuje gen za odpornost proti antibiotiku kanamicinu, promotor T7-lac in zapis za histidinsko oznako (Slika 6).



Slika 6: Shema plazmida pETM-11, uporabljenega za heterologno izražanje tarčnih genov (EMBL, 2016)

3.2.5 Priprava gojišč

Vsa gojišča Luria-Bertani (LB) smo pripravili po navodilih proizvajalca mešanic za trdna in tekoča gojišča LB (MoBio Laboratories). Mešanici za trdna in tekoča gojišča LB sta v masi, določeni za pripravo 1 L medija vsebovali 10 g natrijevega klorida, 5 g kvasnega ekstrakta in 10 g triptona, mešanica za trdna gojišča pa je dodatno vsebovala še 15 g agarja (MoBio Laboratories, 2016a; MoBio Laboratories, 2016b). Mešanico za pripravo gojišča smo raztopili v ustrezni količini miliQ vode in avtoklavirali pri 121 °C, 20 minut. Avtoklavirane mešanice za pripravo trdnih gojišč smo pred razlivanjem v petrijeve plošče ohladili na približno 50 °C in dodali ustrezne antibiotike. Avtoklavirana tekoča gojišča LB smo do uporabe shranjevali v hladilniku, antibiotike smo dodajali tik pred njihovo uporabo. Med dodajanjem antibiotikov v gojišča smo vedno pazili na sterilnost. Za pripravo založne kulture *E. coli*, v kateri je bil shranjen plazmid smo uporabili trdna gojišča LB z dodatkom kanamicina (50 µg/ml). Za gojenje kulture *E. coli* BL21(DE3) smo uporabljali trdna in tekoča gojišča LB z dodatkom kanamicina (50 µg/ml). Za gojenje kulture *E. coli* Rosetta pa smo v gojišča poleg kanamicina dodali tudi kloramfenikol (25 µg/ml).

Za transformacijo proizvodnih sevov smo pripravili optimalni medij s katabolno represijo ali t.i. gojišče SOC (Preglednica 4). Sestava gojišča je podana v preglednici 4. pH gojišča smo umerili na 7,0 in ga sterilno prefiltrirali skozi filter s porami velikosti 0,20 µm.

Preglednica 4: Sestava gojišča SOC

Sestavina	Masa [g] za 1 L gojišča
Trypton	20
Kvasni ekstrakt	5
MgSO ₄	2,4
Glukoza	4
NaCl	0,5
KCl	0,186

3.3 METODE

V magistrski nalogi smo heterologno izrazili in biokemijsko okarakterizirali produkta genov *bllj_1852* (v nalogi poimenovan *ara1*) in *bllj_1853* (v nalogi poimenovan *ara2*). Kodirajoči regiji genov obeh proteinov, s katerima smo delali v magistrski nalogi, smo vstavili v dva ločena plazmida. Genoma smo odstranili signalni zaporedji in transmembranski domeni, ter dodali zapisa za histidinski oznaki (6xHis). Modificirana gena smo poimenovali *ara1_his* in *ara2_his*. Proteina smo poimenovali Ara1_his in Ara2_his. Spodaj opisane metode smo uporabili za izražanje in karakterizacijo obeh proteinov. V nadaljevanju bodo metode opisane na primeru enega gena oziroma proteina.

3.3.1 Bioinformatična analiza

Z uporabo različnih podatkovnih baz in orodij (Preglednica 3) smo iskali informacije, ki so nam služile pri bioinformatični analizi izbranih genov. Začeli smo z osnovno analizo nukleinskega zaporedja, sledila je analiza aminokislinskega zaporedja in njegovih lastnosti ter nato še iskanje lokalno najbolj podobnih zaporedij z orodjem BLAST. Celotno bioinformatično analizo smo izvedli z izvirnim nukleinskim ali aminokislinskim zaporedjem, ki se nahaja v organizmu *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217. Dodatno pa smo za modificirano zaporedje, ki je bilo uporabljeno za kloniranje, določili lastnosti, ki smo jih potrebovali pri praktičnem delu.

3.3.2 Transformacija ekspresijskih sevov in poskusno izražanje proteinov

3.3.2.1 Priprava plazmida pETM-11 za transformacijo ekspresijskega seva

Za pripravo ustrezne količine plazmida smo najprej namnožili pri -80 °C shranjeno založno kulturo *E. coli* DH5α, transformirano s predpripravljenim plazmidom za heterologno izražanje izbranega encima. V 14 ml epruvete z ukrivljenim dnom smo sterilno prelili 4 ml tekočega gojišča LB in s cepilno zanko sterilno postrgali nekaj celic založne kulture ter jih prenesli v gojišče. Epruveto smo inkubirali 16 ur pri 37 °C in mešanju 200 vrtljajev na minuto (rpm). Po 16 urah smo z laboratorijskim kitom »Plasmid Miniprep Kit« (Thermo

Scientific) iz kulture izolirali plazmid po navodilih proizvajalca. Uspešnost izolacije plazmida smo preverili z meritvijo koncentracije deoksiribonukleinske kisline (DNK) v vzorcu izoliranega plazmida. Meritev absorbance vzorca smo izvedli na napravi Ultrospec 2100 Pro z metodo, prilagojeno merjenju koncentracij nukleinskih kislin. Metoda izmeri absorbanco pri 260 nm (A_{260nm}) in 320 nm (A_{320nm}) ter z upoštevanjem faktorja redčitve (R) in korekcije, ki pravi, da $A_{260nm} = 1$ predstavlja 50 $\mu\text{g/ml}$ čiste dvoverižne DNK, izračuna koncentracijo DNK po enačbi »1« (Promega, 2016).

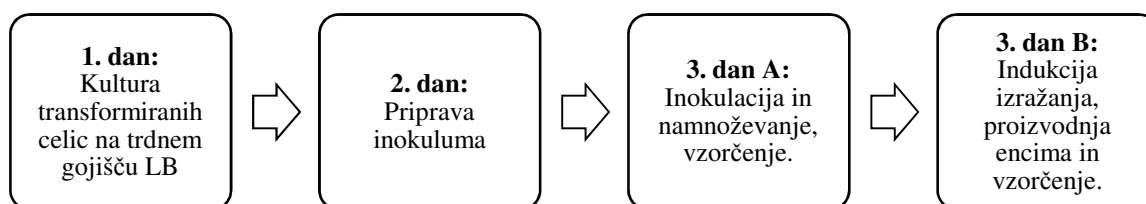
$$c_{DNK} = (A_{260\text{ nm}} - A_{320\text{ nm}}) \times R \times 50 [\mu\text{g/ml}] \quad \dots (1)$$

3.3.2.2 Transformacija ekspresijskih sevov *E. coli*

Za izražanje tarčnih proteinov smo uporabili kompetentna seva *E. coli* BL21(DE3) in Rosetta. Transformacijo obeh sevov smo izvedli po enakem postopku. Za transformacijo smo k celicam v 1,5 ml mikrocentrifugirko dodali 2 μl izoliranega plazmida, pazljivo ročno premešali in inkubirali 30 minut na ledu. Po 30 minutah smo izvedli 45-sekundni toplotni šok pri 42 °C in takoj za tem vrnili epruvete na led za eno minuto. V epruvete smo nato dodali 250 μl gojišča SOC in inkubirali eno uro pri 37 °C in mešanju 200 rpm. Transformirane celice smo prenesli na petrijeve plošče s trdnim gojiščem LB z dodanimi ustreznimi antibiotiki. Na eno ploščo smo odpipetirali 50 μl transformant, preostanek pa smo prelili na drugo ploščo ter naredili razmaz s steklenimi kroglicami in plošče dali v inkubator na 37 °C. Naslednji dan smo preverili rast transformant na gojiščih. Petrijeve plošče z zraslimi transformanti smo shranili v hladilnik in kolonije uporabili za pripravo inokulumov.

3.3.2.3 Poskusno izražanje encima

Poskusno izražanje encima smo izvedli le s transformanti *E. coli* BL21(DE3), saj smo predvideli, da bi morale transformante *E. coli* Rosetta uspešno izražati vstavljen plazmid, ker so prilagojene izražanju genov, ki vsebujejo za *E. coli* redke kodone (Novagen, 2016). Ker oba tarčna gena vsebujeta nekaj teh redkih kodonov, smo pred ekspresijo v laboratorijskem merilu želeli preveriti uspešnost izražanja genov v sevu *E. coli* BL21(DE3). Poskusno izražanje smo izvedli tako, kot je prikazano na shemi na sliki 7.



Slika 7: Shema dela pri poskusni proizvodnji encima

Kolonijo transformiranih celic *E. coli* BL21(DE3), ki je zrasla na agarškem gojišču LB s kanamicinom, smo s cepilno zanko prenesli v 14 ml epruvete z ukrivljenim dnom s 4 ml tekočega gojišča LB s kanamicinom (50 µg/ml). Epruvete smo inkubirali čez noč pri 37 °C, z mešanjem pri 200 rpm. Naslednji dan smo 100 ml tekočega gojišča LB s kanamicinom (50 µg/ml) inokulirali z 1 ml prekonočne kulture iz epruvet. Erlenmajerice smo inkubirali na 37 °C z mešanjem pri 200 rpm in spremljali rast z merjenjem absorbance pri 600 nm. Ko je optična gostota v gojišču dosegla vrednost 0,5, smo vzorčili kulturo iz erlenmajerice. Vzorec kulture, odvzet pred indukcijo izražanja, nam je služil kot referenčni vzorec za kasnejšo izvedbo poliakrilamidne gelske elektroforeze z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE) in test encimske aktivnosti z metodo določanja reducirajočih sladkorjev z reagentom iz dinitrosalicilne kisline (DNS). Vzorce smo centrifugirali 10 minut pri 15000 rpm (Eppendorf 5417R), ločili supernatant v svežo epruveto ter oboje zamrznili pri -20 °C. Z dodatkom 100 µM induktorja IPTG v gojišče, smo sprožili izražanje genov za tarčna encima. Erlenmajerice s kulturami smo od indukcije izražanja do zaključka poskusa inkubirali pri temperaturi 30 °C zato, da smo v kratkem času pridobili dovolj kulture za izvedbo testov. Po preteku štirih ur smo zaključili inkubacijo in ponovno vzorčili. Epruvete smo, tako kot ob prvem vzorčenju, centrifugirali ter ločeno shranili supernatant in sediment pri -20 °C do analize.

3.3.2.4 Ekstrakcija proteinov iz sedimenta po poskusnem izražanju

Za SDS-PAGE in test encimske aktivnosti smo iz sedimentov kultur izolirali proteine, med katerimi so bili tudi heterologno izraženi encimi. Uporabili smo kit za izolacijo proteinov »Bug Buster Protein Extraction Reagent« (Novagen) in sledili postopku, navedenem v navodilih proizvajalca. S tem postopkom smo izolirali vse proteine, ki se nahajajo znotraj bakterijskih celic.

3.3.3 Poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom

Uspešnost izražanja vstavljenega gena in uspešnost posameznih korakov zaključnih procesov smo preverili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE), ki smo jo izvedli po navodilih proizvajalca uporabljenih kemikalij in gelov (NuPage®). Elektroforezo smo pustili teči 35 minut pri 200 voltih. Po koncu smo odlili elektroforezni pufer, vzeli gel iz elektroforezne komore, ga sprali z destilirano vodo, odstranili iz okvirja in ga prestavili v posodico z barvilom Coomassie Brilliant Blue (Preglednica 5). Gel smo pustili barvati na mešalni plošči čez noč, naslednji dan barvilo odlili in nekajkrat sprali z destilirano vodo, da smo odstranili odvečno barvilo. Na koncu smo gel dokumentirali.

Preglednica 5: Sestava barvila Coomassie Brilliant Blue

Sestavina	Količina za 2 L
Fosforna kislina (85 %)	253 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 g
Coomassie Blue G-250	2,4 g
Absolutni etanol	400 ml
Destilirana voda	Do 2 L
Barvilo shranjujemo v steklenici zaviti v aluminijasto folijo.	

3.3.4 Ugotavljanje koncentracije reducirajočih sladkorjev z reagentom DNS

Encimsko aktivnost (v proteinskih vzorcih pridobljenih med poskusno proizvodnjo encimov, proizvodnjo v večjem merilu in pri določanju biokemijskih lastnosti encimov), smo spremljali z metodo detekcije reducirajočih sladkorjev z reagentom iz dinitrosalicilne kisline (DNS) (Preglednica 6) (metoda opisana v: Miller, 1959). Osnovni uporabljen protokol je opisan v tem poglavju, morebitne prilagoditve zaradi narave posameznega eksperimenta pa so navedene v sklopu njihovih opisov.

Preglednica 6: Sestava reagenta DNS

Sestavina	Delež končnega volumna reagenta (%)
Dinitrosalicilna kislina	1
Fenol	0,2
Na ₂ SO ₃	0,05
NaOH	1
NaK-tartrat	20
Destilirana voda	Do 100
Reagent shranjujemo v steklenici zaviti v aluminijasto folijo.	

Preglednica 7: Standardna raztopina L-arabinoze

Sestavina	Količina za 100 mM raztopino
L-arabinoza	375,3 mg
voda miliQ	25 ml
Standardno raztopino shranjujemo v manjših alikvotih pri -20 °C.	

Pred vsakim eksperimentom smo iz standardne raztopine L-arabinoze (Preglednica 7) z redčenjem z ustreznim pufrom pripravili standardne redčitve za umeritveno krivuljo s koncentracijami 20, 15, 10, 5 in 0 mM (slednja služi tudi kot meritev ozadja).

Založne raztopine substratov (Preglednica 8) smo pripravljali tako, da smo najprej v čaši do 60 °C segreti 80 % vode želenega končnega volumna raztopine in vanjo stresli zatehtani substrat. Čašo smo postavili na mešalnik z grelcem in vsebino mešali pri 60 °C dokler se substrat ni popolnoma raztopil. Nato smo ugasnili grelec in ob konstantnem počasnem

mešanju pustili, da se raztopina ohladi. Ohlajeno raztopino substrata smo prelili v merilni valj in dodali vodo MilliQ do končnega volumna. Založne raztopine substratov smo pripravili za en teden vnaprej in jih, kadar niso bile v uporabi, shranili pri -20 °C. Končne koncentracije substrata, ki smo jih uporabili v metodi, smo pripravili z redčenjem v ustreznem pufru, glede na planiran poskus.

Preglednica 8: Založna raztopina substrata

Sestavina	Koncentracija
Substrat (linearni, nerazvejani ali razvejani arabinan)	100 mg/ml
Raztopimo v ustreznem volumnu vode miliQ. Shranjujemo na -20 °C.	

Pred začetkom smo vključili grelne bloke in počakali, da se segrejejo na nastavljeno temperaturo. Pripravili smo želeno redčitev encima v ustreznem pufru. Redčitve encima smo med delom vedno shranjevali na ledu. Spodaj navedeni postopek smo izvajali v natančno merjenih časovnih intervalih med posameznimi reakcijskimi mešanicami.

Postopek:

1. Po 180 µl substrata smo odpipetirali v 1,5 ml mikrocentrifugirke in inkubirali pri 37 °C v grelnem bloku.
2. K substratu smo dodali 20 µl pripravljene redčitve encima/standardne raztopine in premešali na namiznem mešalniku.
3. Mešanice smo inkubirali 10 min pri 37 °C.
4. K mešanicam smo nato dodali 300 µl reagenta DNS in premešali na namiznem mešalniku.
5. Inkubirali smo 15 minut pri 95 °C.
6. Nato smo prestavili mikrocentrifugirke na led za 15 minut.
7. Centrifugirali smo 12 minut pri najvišji hitrosti v namizni centrifugi.
8. 300 µl supernatanta smo prenesli v mikrotitrsko ploščo in izmerili absorbanco pri 540 nm.

Od izmerjenih vrednosti absorbanco smo najprej odšteli meritev ozadja (vrednost meritve v reakcijskih mešanicah substrata, v katere smo namesto encima dodali pufer). Koncentracijo nastalega produkta v reakcijskih mešanicah z encimom smo izračunali iz enačbe umeritvene krivulje. Encimsko aktivnost, izraženo v µmol/min ali mednarodnih enotah (IU – ang. international units), smo izračunali iz koncentracije produkta ([P]) izražene v µM, volumna reakcijske mešanice v mililitrih in časa inkubacije v minutah po enačbi »2« (Wilson in Walker, 2010). Specifično encimsko aktivnost, izraženo v IU/mg, smo izračunali iz encimske aktivnosti in količine proteinov v reakcijski mešanici v miligramih po enačbi »3« (Wilson in Walker, 2010).

$$\text{Encimska aktivnost} = \frac{[P] \times 0,2 \text{ ml}}{\text{čas inkubacije (min)}} [\mu\text{mol/min ali IU}] \quad \dots (2)$$

$$\text{Specifična encimska akt.} = \frac{\text{encimska aktivnost}}{\text{masa proteinov v reakc.mešanici (mg)}} [\text{IU/mg proteina}] \quad \dots (3)$$

3.3.5 Ekspresija encimov v laboratorijskem merilu

3.3.5.1 Priprava inokuluma

Inokulum za ekspresijo sevov v večjih količinah smo pripravili v dveh korakih. V prvem koraku smo iz petrijeve plošče nacepili eno kolonijo transformant v 14 ml polipropilenske gojitvene epruvete z ukrivljenim dnem, v katerih smo pripravili 3 ml tekočega gojišča LB s kanamicinom (50 µg/ml) v primeru transformant *E. coli* BL21(DE3) oziroma kanamicinom (50 µg/ml) in kloramfenikolom (25 µg/ml) v primeru transformant *E. coli* Rosetta. Namnoževanje je potekalo v inkubatorju 6 ur pri 37 °C in mešanju pri 200 rpm. Nato smo 1 ml zrasle kulture prenesli v 250 ml erlenmajerico z utori, v kateri smo predhodno pripravili 100 ml tekočega gojišča LB z ustreznimi antibiotiki. Drugi korak namnoževanja je potekal preko noči pri enaki temperaturi in mešanju kot prvi korak.

3.3.5.2 Bioproces (proizvodnja Ara1_His in Ara2_His)

Ekspresijske seve smo gojili v posodah Tunair™ (Slika 8) z volumnom 2,5 L v katerih smo predhodno pripravili in avtoklavirali po 1 L tekočega gojišča LB. Pred dodatkom inokuluma smo v gojišča za namnoževanje transformant *E. coli* BL21(DE3) dodali antibiotik kanamicin (50 µg/ml). V gojišča za transformante *E. coli* Rosetta pa smo dodali antibiotik kanamicin (50 µg/ml) in kloramfenikol (25 µg/ml). Gojišča smo inokulirali z 10 ml ustreznega prekonočnega inokuluma in inkubirali pri 37 °C in mešanju 180 rpm ter rast spremljali z merjenjem absorbance pri 600 nm. Kulture, v katerih je absorbanca dosegla vrednost približno 0,5, smo prestavili na led in počakali, da so isto vrednost dosegle tudi vse ostale. Inkubator smo nato ohladili na 18 °C zato, da smo pri izražanju nastajajočim proteinom, omogočili dovolj časa za ustrezno zvitje in da smo lahko podaljšali čas izražanja (Rosano in Ceccarelli, 2014). V vse posode smo ob istem času dodali induktor izražanja IPTG v končni koncentraciji 0,1 mM ter nadaljevali inkubacijo pri 18 °C in 180 rpm. Še naprej smo spremljali rast ter nato po 48 urah zaključili bioproces.



Slika 8: Tunair™ posode (IBI Scientific, 2016)

3.3.5.3 Zaključni procesi

3.3.5.3.1 Centrifugiranje

Po zaključku bioprocasa smo brozgo iz posod prelili v avtoklavirane centrifugirke in centrifugirali 20 minut pri 4 °C in 8000 rpm (Sorval RC 5C plus). Supernatant smo nato prelili v steklenico, sediment pa postrgali iz centrifugirk in prestavili v vrečko za shranjevanje ter stehtali. Sediment smo do nadaljevanja zaključnih procesov shranili pri -20 °C, vzorce supernatanta smo shranili v hladilniku pri 4 °C do potrditve, da se želeni produkt nahaja v sedimentu.

3.3.5.3.2 Mehansko razbijanje celic in centrifugiranje homogenata

Sediment, shranjen pri -20 °C, smo prenesli v stekleno čašo in dolili pufer 1 (Preglednica 9) v petkratnem volumnu mase sedimenta. Sediment smo počasi odmrznili z mešanjem na mešalni plošči in na ledu. Ko se je odtalil in zmešal z dodanim pufrom, smo izvedli mehansko razbijanje celic s tlačnim homogenizatorjem (Stansted). Razbijanje celic smo izvedli pri temperaturi 4 °C in tlaku 1,1 bar. Celično suspenzijo smo spustili čez homogenizator dvakrat. V tako dobljeni homogenat smo dodali 3 µl nukleaze in eno tableto proteaznega inhibitorja ter ga na mešalni plošči in na ledu mešali 20 minut. Nato smo homogenat prelili v ohlajene centrifugirke in 20 min centrifugirali pri 4 °C in 13000 rpm (Sorval RC 5C plus). Supernatant smo prelili v ohlajeno čašo in ga prefiltrirali čez sterilni filter z velikostjo por 0,45 µm ter takoj za tem vrnili na led. 200 µl vzorca prefiltriranega supernatanta smo shranili pri -20 °C za uporabo pri kasnejših analizah encimske aktivnosti in SDS-PAGE.

Preglednica 9: Sestava pufru 1

Sestavina	Koncentracija
HEPES	20 mM
NaCl	0,5 M
Glicerol	10 %
Imidazol	10 mM
pH pufru smo umerili na 7,5, prefiltrirali in razplinili.	

3.3.5.3.3 Afinitetna kromatografija

Za izvedbo afinitetne kromatografije z imobiliziranimi kovinskimi ioni (IMAC) smo uporabili sistem Äkta Avant in komercialno kolono HisTrap™ HP volumna 1 ml (Slika 9). Uporabljena kolona je namenjena čiščenju proteinov označenih s histidinsko oznako in ima na stacionarni fazi imobilizirane Ni^{2+} ione (GE Healthcare, 2007). Kromatografijo smo izvedli v hladni sobi pri 7 °C. Uporabljali smo pufer 1 (Preglednica 9) in pufer 2 (Preglednica 10). Izvedli smo dve zaporedni afinitetni kromatografiji z nastavitvami opisanimi v preglednicah 11 in 12.

Preglednica 10: Sestava pufru 2

Sestavina	Koncentracija
HEPES	20 mM
NaCl	0,5 M
Glicerol	10 %
Imidazol	400 mM
pH pufru smo umerili na 7,5, prefiltrirali in razplinili.	

Preglednica 11: Nastavitve metode afinitetne kromatografije 1

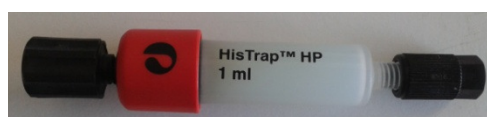
Faza	Število volumnov kolone	Pretok (ml/min)	Pufer	Gradient	Volumen frakcije (ml)
1. Uravnoteženje kolone	5	1	Pufer 1	/	/
2. Nalaganje supernatanta homogenata	/	0,5	/	/	12
3. Spiranje kolone 1	5	1	Pufer 1	/	12
4. Spiranje kolone 2	20	1	Pufer 1	/	12
5. Elucija	15	1	Pufer 1: 100 – 0 % Pufer 2: 0 – 100 %	Linearni	0,5
6. Uravnoteženje kolone	5	1	Pufer 1	/	/

Preglednica 12: Nastavitve metode afinitetne kromatografije 2

Faza	Število volumnov kolone	Pretok (ml/min)	Pufer	Gradient	Volumen frakcije (ml)
1. Uravnoteženje kolone	5	1	Pufer 1	/	/
2. Nalaganje izbranih frakcij	/	1	/	/	12
3. Spiranje kolone 1	5	2	Pufer 1: 94 % Pufer 2: 6 %	/	12
4. Spiranje kolone 2	50	2	Pufer 1: 94 % Pufer 2: 6 %	/	12
5. Elucija	15	1	Pufer 1: 94 – 0 % Pufer 2: 6 – 100 %	Linearni	1
6. Uravnoteženje kolone	5	2	Pufer 1	/	/

Frakcije smo detektirali s spremljanjem absorbance pri valovni dolžini 280 nm. Nastavitve iz preglednice 11 smo uporabili v prvem koraku izolacije produkta z afinitetno kromatografijo iz supernatanta homogenata celic. Nastavitve iz preglednice 12 pa smo uporabili v drugem koraku izolacije produkta z afinitetno kromatografijo iz frakcij, ki smo jih na podlagi kromatograma zbrali pri prvem koraku v fazah 2 in 5. Drugi korak smo dodali zato, ker smo pri analizi SDS-PAGE ugotovili, da smo nekaj želenega proteina izgubili v koraku nalaganja celičnega homogenata na kolono.

Izbrane frakcije, s katerimi smo želeli nadaljevati zaključne procese smo po potrebi z ultrafiltracijo skoncentrirali do volumna manjšega od 5 ml. Postopek je natančneje opisan v poglavju 3.3.5.3.5. Skoncentrirane frakcije (retentat) smo z injekcijsko iglo pazljivo posrkali v brizgo in ga nato prefiltrirali skozi sterilni filter z velikostjo por 0,45 µm.



Slika 9: Kolona HisTrap™ HP uporabljena pri afinitetni kromatografiji

3.3.5.3.4 Gelska filtracija

Za izvedbo gelske filtracije smo uporabili sistem Äkta Avant, komercialno kolono GF HiLoad 26/60 superdex 200 pg, 5 ml kapilarno zanko za nalaganje vzorca in pufer 3 (Preglednica 13).

Preglednica 13: Sestava pufra 3

Sestavina	Koncentracija
MES	20 mM
NaCl	0,15 M
pH pufra smo umerili na 6,5, prefiltrirali in razplinili.	

Preglednica 14: Nastavitve metode gelske filtracije

Faza	Število volumnov kolone	Pretok (ml/min)	Pufer	Volumen pufra pri spiranju zanke (ml)	Volumen frakcije (ml)
1. Uravnoteženje kolone	0,1	2,5	Pufer MES	/	/
2. Nalaganje elucijskih frakcij iz afinitetne kromatografije	/	/	/	12,5	/
3. Izokratska elucija	1,2	2,5	Pufer MES	/	2

Postopek smo izvedli v hladni sobi pri 7 °C. Kolono smo pred uporabo pripravili tako, da smo s prefiltrirano in razplinjeno deionizirano vodo sprali 20 % etanol, s katerim je bila kolona napolnjena med shranjevanjem. Nato smo kolono sprali še s pufrom 3 (Preglednica 13). Nastavljeno kapilarno zanko smo z brizgo ročno sprali trikrat z 20 % etanolom in trikrat z deionizirano vodo. Prefiltriran produkt iz koraka afinitetne kromatografije smo posrkali v brizgo in dodali pufer 3 do volumna 5 ml. Tik pred zagonom metode opisane v preglednici 14 smo na podlagi kromatograma zbrane elucijske frakcije iz koraka afinitetne kromatografije ročno vbrizgali v pripravljeno kapilarno zanko. Elucijske frakcije smo detektirali s spremljanjem absorbance pri valovni dolžini 280 nm.

3.3.5.3.5 Ultrafiltracija (koncentriranje vzorcev)

Z ultrafiltracijo smo želeli zmanjšati volumen zbranih elucijskih frakcij. Najprej smo postopek izvedli po ločevanju z metodo afinitetne kromatografije, nato pa še po gelski filtraciji za koncentriranje končnega produkta. Uporabili smo centrifugirke s filtri (ultrafiltratorje), ki prepuščajo molekule do velikosti 30000 Da. S pipeto smo iz mikrotitrne plošče za zbiranje frakcij iz koraka gelske filtracije zbrali zelene frakcije v čašo in jo med delom shranjevali na ledu. Ultrafiltratorje, v katere smo nalili frakcije, smo centrifugirali 5 minut pri 4 °C in 3220 rcf. Skoncentriran končni produkt smo razdelili na več delov v sveže mikrocentrifugirke in jih shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.3.5.3.6 Merjenje koncentracije proteinov

Koncentracije proteinov v vzorcih smo izmerili s spektrofotometrom pri valovni dolžini 280 nm. Koncentracijo proteinov (c) v vzorcu smo izračunali po enačbi »4«, izpeljani iz Beer-Lambertovega zakona tako, da smo izmerjeno vrednost absorbance pri 280 nm ($A_{280\text{ nm}}$) delili z masnim ekstinkcijskim koeficientom tarčnega proteina (ϵ) in dolžino poti žarka skozi kiveto (l) ter rezultat množili s faktorjem redčitve (R).

$$\text{Koncentracija proteinov } c = \frac{A_{280\text{ nm}}}{\epsilon \times l} \times R \text{ [mol/l]} \quad \dots (4)$$

3.3.6 Biokemijska karakterizacija Ara1_his in Ara2_his

3.3.6.1 Določanje specifične encimske aktivnosti

Encimsko aktivnost smo merili z metodo detekcije reducirajočih sladkorjev (produktov hidrolize tarčnih substratov) z reagentom DNS, ki je opisana v poglavju 3.3.4. Substrate, ki smo jih uporabili v eksperimentu, smo pripravili v koncentraciji 5 mg/ml. Reakcijsko mešanico encima s substratom smo inkubirali 12 minut pri 37 °C.

3.3.6.2 pH-optimum

Univerzalne pufre Britton in Robinson (Preglednica 15) smo pripravljali v volumnih po 100 ml v vodi miliQ. Na koncu smo v vse pufre dodali Triton X-100 do končne koncentracije 0,005 % (V/V). Sestava je opisana v preglednici 15.

Preglednica 15: Sestava univerzalnih pufrov Britton in Robinson s pH med 2 in 12. Vrednosti pH pripravljenih mešanic smo pred končnim umerjanjem volumna natančneje prilagodili z dodajanjem 0,2 M NaOH ob spremljanju s pH elektrodo (Mongay in Cerna, 1974)

pH	Koncentracija (g/l)			
	NaOH	Ledocetna kislina	H ₃ PO ₄	H ₃ BO ₃
1,98	0,381	2,288	3,733	2,355
2,87	1,191	2,044	3,336	2,105
3,78	1,469	1,0961	3,200	2,019
5,02	2,074	1,779	2,904	1,832
5,72	2,286	1,716	2,800	1,767
7,00	2,754	1,575	2,570	1,622
7,96	3,000	1,501	2,450	1,546
8,95	3,224	1,434	2,340	1,477
9,91	3,493	1,353	2,208	1,393
10,88	3,616	1,316	2,148	1,355
11,98	4,000	1,201	1,960	1,237

50 mM Na-acetatne pufre smo pripravili po receptu iz preglednice 16. Manjša odstopanja od želenega pH smo pred končnim umerjanjem volumna popravili z dodajanjem 0,1 M raztopine ledocetne kisline ali Na-acetata. Na koncu smo v vse pripravljene pufre dodali še Triton X-100 v koncentraciji 0,005 % (V/V).

Preglednica 16: Sestava Na-acetatnih pufrov z različnimi vrednostmi pH, končno koncentracijo 50 mM in volumnom 100 ml

pH	0.1 M ledocetna kislina	0.1 M Na-acetat	voda miliQ
4,0	20,5 ml	4,5 ml	Do 100 ml
4,5	15,7 ml	9,3 ml	
5,0	7,37 ml	17,63 ml	
5,25	5,25 ml	19,75 ml	
5,5	3,62 ml	21,38 ml	
5,75	2 ml	23 ml	
6,0	1,3 ml	23,7 ml	

Pufer MES (Preglednica 17) smo pripravili v petih ponovitvah in v vsaki izmed suspenzij umerili pH s kislino ali bazo do želene vrednosti pH (med pH 6 in 7, z intervali po 0,25). Na koncu smo dodali Triton X-100 do koncentracije 0,005 % (V/V). Sestava je prikazana v preglednici 17.

Preglednica 17: Sestava pufrov MES za določanje pH-optimuma

Sestavina	Koncentracija
MES	50 mM
Triton X-100	0,005 % (V/V)

Pufer HEPES (Preglednica 18) smo pripravili v petih ponovitvah in v vsaki izmed suspenzij umerili pH s kislino ali bazo do želene vrednosti (med pH 7 in 8, interval pH 0,25). Dodali smo vodo miliQ do končnega volumna in Triton X-100 v koncentraciji 0,005 % (V/V). Sestava je prikazana v preglednici 18.

Preglednica 18: Sestava pufrov HEPES za določanje pH-optimuma

Sestavina	Koncentracija
HEPES	50 mM
Triton X-100	0,005 % (V/V)

pH-optimum encima smo določali z metodo detekcije reducirajočih sladkorjev z reagentom DNS, ki je opisana v poglavju 3.3.4. V vseh eksperimentih smo uporabili koncentracijo substrata 5 mg/ml. Substrat smo iz založne raztopine 100 mg/ml pripravili z redčenjem v pufrih z vrednostjo pH pri kateri smo želeli testirati encimsko aktivnost. Najprej smo naredili grobo oceno encimske aktivnosti v pufrih, pripravljenih po receptu Britton in

Robinson. Nato smo natančneje določili optimalen pH delovanja encimov v pufrih na osnovi Na-acetata, MES in HEPES.

Izmerjenim absorbancam smo odšteli ozadje meritev. Relativno encimsko aktivnost pri vsaki testirani vrednosti pH smo izračunali po enačbi »5« tako, da smo izmerjeno absorbanco pri valovni dolžini 540 nm ($A_{540\text{nm}}$) v vsaki točki pH delili z najvišjo izmerjeno absorbanco v poskusu ($A_{(540\text{nm})\text{max}}$) in množili s 100, da smo dobili odstotke.

$$\text{Relativna encimska aktivnost} = \frac{A_{540\text{ nm}}}{A_{(540\text{ nm})\text{max}}} \times 100 [\%] \quad \dots (5)$$

3.3.6.3 Temperaturni optimum

Zatehto kemikalije MES za 20 mM pufer (Preglednica 19) smo dodali v 90 ml vode miliQ in premešali, da se je raztopila. Raztopino smo razdelili na 6 delov po 15 ml v steklene čaše. Vsakemu alikvotu pufra smo umerili pH tako, da bo, segret na testirano temperaturo, imel optimalno vrednost pH za encim v reakciji (Preglednica 20). Na koncu smo volumne pufrov z vodo dopolnili do 20 ml in dodali Triton X-100 v koncentraciji 0,005 % (V/V). Pufre smo pripravili v dveh setih. Prvi set pufrov smo pripravili tako, da so imeli pri vseh temperaturah pH 6,8. Drugi set pufrov pa je imel pri vseh temperaturah pH 5,75.

Preglednica 19: Sestava pufra MES za določanje temperaturnega optimuma delovanja encimov

Sestavina	Koncentracija
MES	20 mM
Triton X-100	0,005 % (V/V)

Preglednica 20: Vrednosti pH, na katere smo umerili pufre, ki smo jih uporabili pri določanju temperaturnega optimuma delovanja encimov

Temperatura (°C)	pH pri 24 °C	pH pri 24 °C
23	6,81	5,76
30	6,88	5,83
37	6,96	5,91
42	7,02	5,96
50	7,10	6,05
60	7,21	6,16
Končna pH vrednost posameznega pufra, segretega na navedene (eksperimentalne) temperature.	6,8	5,75

Temperaturni optimum delovanja encima smo določali z metodo detekcije reducirajočih sladkorjev, ki je opisana v poglavju 3.3.4. Encimsko aktivnost smo določali pri temperaturah 23, 30, 37, 42, 50 in 60 °C. V vseh eksperimentih smo uporabili koncentracijo substrata 5 mg/ml. Substrat smo iz založne raztopine 100 mg/ml pripravili z

redčenjem v pufrih tako, da je imela raztopina ustrezen optimalen pH pri izbrani temperaturi. Izmerjenim absorbancam smo odšteli ozadje meritev. Relativno encimsko aktivnost pri vsaki testirani temperaturi smo izračunali po enačbi »5«.

3.3.6.4 Vpliv soli, prisotnosti EDTA in Ca^{2+} ionov na encimsko aktivnost

Vpliv ionske jakosti pufru na encimsko aktivnost smo preverili z dodajanjem natrijevega klorida (NaCl) k pufru v končnih koncentracijah 0,15, 0,5 in 1 M. Z dodatkom EDTA v reakcijsko mešanico z encimom smo želeli preveriti, ali encim za svojo aktivnost potrebuje kofaktorje oziroma ione. Najprej smo preizkusili aktivnost encimov z dodatkom EDTA v končni koncentraciji 5 mM, nato pa smo v primeru, da smo zaznali zmanjšano aktivnost testirali, če se aktivnost encima povrne ob dodatku Ca^{2+} ionov v prebitku (7,5 mM) in prisotnosti EDTA (5 mM).

Založne raztopine:

- 5 M raztopina NaCl,
- 0,5 mM raztopina Ca^{2+} ionov ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$),
- 0,5 M raztopina EDTA.

Vpliv ionske moči pufru, prisotnosti ionov Ca^{2+} in EDTA na encimsko aktivnost smo določali z metodo detekcije reducirajočih sladkorjev, opisano v poglavju 3.3.4. Encimske reakcije smo inkubirali 12 minut pri 37 °C. V vseh eksperimentih smo uporabili koncentracijo substratov 5 mg/ml. Substrat smo iz založne raztopine 100 mg/ml pripravili z redčenjem v pufru MES (20 mM, Preglednica 19) z optimalno vrednostjo pH za encim oziroma v pufru HEPES (50 mM, Preglednica 18) s pH 7,5 v primeru testiranja vpliva Ca^{2+} in EDTA na encimsko aktivnost. Raztopine NaCl, Ca^{2+} oziroma EDTA smo dodajali k substratu v koraku redčenja tako, da smo na račun dodatka teh raztopin zmanjšali volumen dodanega pufru. Izmerjenim absorbancam smo odšteli ozadje meritev. Relativno encimsko aktivnost smo izračunali po enačbi »5«.

3.3.6.5 Tankoplastna kromatografija

Produkte, ki jih encima sproščata ob razgradnji substratov, smo določali z metodo tankoplastne kromatografije. Uporabili smo komercialne kromatografske plošče TLC Silica gel 60 F₂₅₄. Mobilno fazo smo pripravili tako, da smo kloroform, ocatno kislino in vodo zmešali v razmerju 1:1,5:0,1. Za razvijanje kromatografske plošče smo uporabili razvijalec, pripravljen iz 2 % 5-metilresorcinola v etanolu, žveplove kisline in vode v razmerju 8:1:1. Delali smo v digestoriju.

Pred nanašanjem vzorcev smo en centimeter od spodnjega roba plošče označili začetno višino mobilne faze in mesta nanosa vzorcev iz encimskih reakcij oziroma standardov v

volumnu 2 μ l. Kot standarda smo uporabili L-arabinozo in arabinotriozo v koncentraciji 2 mM. Encimske reakcijske mešanice smo pred kromatografsko ločitvijo inkubirali 3 ure pri 37 °C. Koncentracija substratov v encimski reakciji je bila 5 mg/ml. V vzorec negativne kontrole smo namesto encima dodali pufer, s katerim smo redčili encim v pripravi reakcijskih mešanic. Počakali smo, da so se na stacionarno fazo plošče nanešeni vzorci posušili in nato postavili kromatografsko ploščo v stekleno komoro z mobilno fazo. Kromatografsko ploščo smo v mobilni fazi inkubirali dvakrat po 50 minut in vmes ter na koncu ploščo posušili s segrevanjem do 50 °C. Po nanosu razvijalca na stacionarno fazo kromatografske plošče smo le to segrevali pri 300 °C do razvoja stabilne barve in nato rezultat dokumentirali.

3.3.6.6 Encimska kinetika

Eksperimente za določanje kinetičnih lastnosti encimov smo izvedli pri optimalnem pH za vsak encim in temperaturi 37 °C. Uporabljali smo 20 mM pufer MES (Preglednica 19). Založno raztopino posameznega substrata (Preglednica 8) s koncentracijo 100 mg/ml smo redčili s pufrom MES, da smo dobili koncentracije substrata od 2 do 12 mg/ml, ki smo jih nato uporabili v eksperimentih. Eksperimente smo izvedli po prirejeni metodi detekcije reducirajočih sladkorjev, ki je opisana v poglavju 3.3.4. Raztopine substrata in standardnih raztopin L-arabinoze za umeritveno krivuljo smo naredili po enakem postopku, kot pri osnovni metodi (Preglednici 7 in 8). Reakcijsko mešanico smo pripravili tako, da smo v 1,5 ml mikrocetrifugirke odpipetirali po 765 μ l pripravljene raztopine substrata in nato dodali 85 μ l redčenega encima. Iz reakcijske mešanice smo nato štirikrat zaporedoma v enakih časovnih intervalih odvzeli po 200 μ l mešanice in jo prenesli v epruvete, kjer smo imeli pripravljenega po 300 μ l reagenta DNS ter premešali na namiznem mešalniku. Reakcijsko mešanico smo premešali tudi tik pred odvzemom 200 μ l alikvota, da smo se izognili morebitnim napakam na račun lokalnih razlik v koncentraciji nastalega produkta encimske reakcije. Nato smo nadaljevali po osnovnem protokolu. Pri vsaki koncentraciji substrata smo napravili najmanj dve ponovitvi znotraj enega poskusa in najmanj dve neodvisni ponovitvi poskusa.

Od izmerjenih vrednosti absorbanc vzorcev smo najprej odšteli ozadje. Iz enačbe umeritvene krivulje smo izračunali koncentracije nastalega produkta v vzorcu, odvzetem v določenem časovnem intervalu od začetka inkubacije reakcijske mešanice. Izrisali smo grafe koncentracij nastalega produkta v odvisnosti od časa ($d[P]/dt$) in naklon premice, izrisane skozi točke na grafu (k), ki predstavlja začetno hitrost encimske reakcije, uporabili za nadaljnje izračune. Za izračun začetnih hitrosti encimskih reakcije v mM/s pri različnih koncentracijah substrata, smo naklone premic v enotah mM/min (k) delili s 60 po enačbi »6« (Copeland, 2000).

$$\text{Začetna hitrost encimske reakcije } (v) = \frac{d[P]/dt}{60} = \frac{k}{60} [\text{mM/s}] \quad \dots (6)$$

Začetno hitrost encimske reakcije smo delili s koncentracijo encima ([E]), ki je bila uporabljena v encimskih reakcijah po enačbi »7«. Tako smo dobili na koncentracijo encima normalizirane hitrosti encimskih reakcij pri različnih koncentracijah substrata, ki smo jih uporabili za izris grafov encimske kinetike.

$$\text{Hitrost encimske reakcije, normalizirana na konc. encima } v_{[E]} = \frac{v}{[E]} [\text{s}^{-1}] \quad \dots (7)$$

Za normalizacijo vrednosti začetne hitrosti encimske reakcije smo se odločili zato, da smo lahko podatke, ki smo jih dobili pri obeh encimih, primerjali med sabo in s podatki, objavljenimi za druge podobne encime. Namesto maksimalne hitrosti encimske reakcije V_{max} smo pri določanju kinetičnih konstant določili pretvorbno število encima k_{cat} na podlagi enačbe »8« (Wilson in Walker, 2010), ki pravi, da je maksimalna hitrost encimske reakcije (V_{max}) enaka pretvorbenemu številu (k_{cat}) pomnoženem s koncentracijo encima ([E]).

$$\text{Maksimalna hitrost encimske reakcije } V_{max} = k_{cat} \times [E] \quad \dots (8)$$

3.3.6.7 Določanje kinetičnih konstant K_m in k_{cat}

Izračunane vrednosti hitrosti encimske reakcije, normalizirane na koncentracijo encima ($v_{[E]}$), pri vsaki testirani koncentraciji substrata, smo izrisali na grafu v odvisnosti od koncentracije substrata ([S]). Iz grafa lahko na podlagi ustreznega modela določimo K_m in k_{cat} (Dixon in Webb, 1979; Wilson in Walker, 2010). Za izris grafov in določitev vrednosti K_m in k_{cat} smo uporabili program OriginPro8. K točkam na grafu smo izrisali nelinearno krivuljo tako, da smo iz kategorije rastnih oz. sigmoidnih funkcij izbrali funkcijo »Hill« in pustili, da program izriše krivuljo, ki se najbolj prilega točkam na grafu. Vrednosti K_m in k_{cat} smo ocenili iz vrednosti, ki nam jih je na podlagi krivulje podal program.

Za nazornejši prikaz kooperativnega obnašanja encimske kinetike smo izrisali grafe z uporabo naslednjih modelov: Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee in Hanes-Wolff (Dixon in Webb, 1979; Copeland, 2000).

3.3.6.8 Določanje molekulske mase encima

Molekulsko maso encima smo določili z metodo gelske filtracije. Uporabili smo sistem Äkta Avant, komercialno kolono HiLoad 16/600 Superdex 200 pg in 200 µl kapilarno zanko. Postopek smo izvedli v hladni sobi pri 7 °C. Kolono smo pred uporabo pripravili

tako, da smo jo najprej sprali s prefiltrirano in razplinjeno vodo miliQ in nato s pufrom 3 (Preglednica 13). Nastavljeno kapilarno zanko smo z brizgo ročno sprali trikrat z 20 % etanolom in trikrat z vodo miliQ.

Najprej smo po navodilih proizvajalca kalibracijskih standardov (GE Healthcare) kalibrirali kolono. Uporabili smo naslednje standarde: ribonukleaza A (13,7 kDa), konalbumin (75 kDa), aldolaza (158 kDa) in feritin (440 kDa). Nastavitve metode so opisane v preglednici 21. Tik pred zagonom metode smo pripravljene standarde oziroma vzorec encima ročno vbrizgali v nastavljeno zanko.

Preglednica 21: Nastavitve metode ločevanja proteinov z gelsko filtracijo za določanje molekulske mase tarčnih encimov

Faza	Število volumnov kolone	Pretok (ml/min)	Volumen pufru pri spiranju zanke (ml)
1. Uravnoteženje kolone	0,1	0,5	/
2. Nalaganje vzorca na kolono	/	/	2
3. Izokratska elucija	1,2	0,5	/

Iz elucijskih volumnov standardov in vzorca encima smo izračunali porazdelitvene koeficiente (K_{av}) po enačbi »9« (Wilson in Walker, 2010). Izrisali smo kalibracijsko krivuljo porazdelitvenih koeficientov standardov v odvisnosti od molekulskih mas standardov na logaritemski osi x. Iz enačbe umeritvene krivulje, ki smo jo pri tem dobili, smo izračunali neznano molekulsko maso encima.

$$\text{Porazdelitveni koeficient } K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o} \quad \dots (9)$$

V_e je elucijski volumen standarda oziroma vzorca, V_o je prosti volumen kolone, V_c je celotni volumen kolone.

3.3.7 Statistična in matematična obdelava rezultatov

Za osnovno statistično obdelavo rezultatov smo uporabljali programsko opremo Microsoft Office Excel. Statistično značilnost rezultatov smo preverjali s Studentovim t-testom. Statistično značilne razlike s p-vrednostjo pod 0,05 med posameznimi (kontrolnimi) vzorci so na grafičnih prikazih rezultatov označene z zvezdico (*). Za grafične prikaze rezultatov in izris grafov za določanje parametrov encimske kinetike smo uporabili program OriginPro8.

4 REZULTATI

4.1 BIOINFORMATSKA ANALIZA

4.1.1 Osnovne lastnosti tarčnih genov

S pomočjo bioinformatških orodij in podatkovnih baz smo poiskali lastnosti nukleinskega in aminokislinskega zaporedja posameznega gena, s katerimi smo si kasneje pomagali pri delu.

Preglednica 22: Osnovne lastnosti tarčnih genov (podatki v oklepaju veljajo za klonirano zaporedje)

Gen	<i>ara1</i>	<i>ara2</i>	Podatkovna baza ali orodje (vir informacij)
Število nukleinskih kislin	3714 (3526)	3294 (3201)	GenomeNet
Število aminokislin	1246 (1174)	1097 (1067)	GenomeNet
Vsebnost GC	62,30%	60,60%	GC calculator
Vsebnost in število za <i>E. coli</i> redkih kodonov	AGG (2), GGA (4), AUA (3), CCC (9); skupno 18	CGG (1), CGA (3), GGA (5), AUA (2), CUA (3), CCC (8); skupno 22	SMS Codon Usage
Vsebnost cisteinskih ostankov	2	0	ProtParam (Expasy)
Teoretična molekulska masa	130,4 kDa (124,19 kDa)	114,44 kDa (111,96 kDa)	ProtParam (Expasy)
Teoretična izoelektrična točka (pI)	4,74 (4,73)	4,86 (4,8)	ProtParam (Expasy)
Ekstinkcijski koeficient pri 280 nm ($M^{-1} cm^{-1}$)	168235 (171215) 168110* (171090*)	158030 (159520)	ProtParam (Expasy)
Predvidena molekulska funkcija proteina	hidrolazna aktivnost, hidroliza O-glikozidnih vezi	hidrolazna aktivnost, hidroliza O-glikozidnih vezi	GenomeNet, UniProt
Predviden biološki proces	metabolizem ogljikovih hidratov	metabolizem ogljikovih hidratov	UniProt
Celična komponenta (lokacija)	integralna komponenta membrane	integralna komponenta membrane	UniProt
Ohranjene domene	Laminin_G_3, Sialidaza, Big_4, GH_43, FIVAR	Laminin_G_3, Big_4, GH_43	GenomeNet, NCBI, HMMER
Transmembranska domena	od 1219 do 1240 AK	od 1070 do 1092 AK	HMMER, ProtScale,

			UniProt
Signalni peptid	od 1 do 34 AK	od 1 do 32 AK	HMMER, ProtScale, UniProt
Najbližji ortologi (glede na SW vrednost, v oklepaju identičnost nukleinskega zaporedja in funkcija)	<i>B. longum subsp. longum</i> <i>Blb:BBMN68_1444</i> (99,8 %, predvidoma β -ksilozidaza) <i>Halomonas elongata</i> <i>Hel:HELO_2798</i> (41,3 %, velik protein s C-terminalno homologijo z α -arabinofuranosidazo II) <i>B. catenulatum</i> <i>Bcat:BBCT_0647</i> (40,9 %, glikozid hidrolaza)	<i>B. longum subsp. longum</i> <i>Blb:BBMN68_1443</i> (99,6 %, hipotetični protein) <i>B. pseudocatenulatum</i> <i>Bpsc:BBPC_1612</i> (50,3 %, glikozid hidrolaza) <i>Brachybacterium faecium</i> <i>Bfa:Bfae_01090</i> (58,9 %, protein, ki vsebuje Ig-podobno domeno)	GenomeNet
Najbližji paralogi (glede na SW vrednost; v oklepaju identičnost nukleinskega zaporedja in funkcija)	<i>Blm:BLLJ_1851</i> (25,8 %, hipotetični protein) <i>Blm:BLLJ_1853</i> (25,2 %, predvidoma protein na celični površini) <i>Blm:BLLJ_1854</i> (23,8 % predvidoma arabinozidaza)	<i>Blm:BLLJ_1854</i> (27,5 %, predvidoma arabinozidaza) <i>Blm:BLLJ_1850</i> (27,7 %, glikozid hidrolaza) <i>Blm:BLLJ_1852</i> (25,2 %, predvidoma protein na celični površini)	GenomeNet

Vsebnost GC = vsebnost gvaninov in citozinov, kDa = kilo Dalton, AK = aminokislina, SW vrednost = vrednost algoritma Smith Waterman za določanje podobnosti med dvema zaporedjema, * = vrednost ekstinkcijskega koeficienta v pogojih, ko so reducirani vsi cisteini.

V preglednici 22 so zbrani rezultati bioinformatične analize lastnosti nukleinskega in aminokislinskega zaporedja obeh genov. Iz njih je razvidno, da sta teoretični molekularni masi proteinov 130,4 kDa za protein Ara1 in 114,44 kDa za protein Ara2. Disulfidni most je predviden le v zaporedju proteina Ara1. Pri obeh proteinih je predvidena transmembranska domena na C-koncu in signalni peptid na N-koncu. Oboje smo za namen heterolognega izražanja odstranili iz klonirane sekvence. Na N-konec proteinskega zaporedja smo dodali histidinsko oznako (6xHis). Zaradi teh sprememb so v preglednici v oklepajih pri številu nukleinskih in aminokislinskih, pri podatku o teoretični molekularni masi, teoretični pI in ekstinkcijskem koeficientu dodani podatki, ki veljajo za skrajšano, klonirano sekvenco. Heterologno izražena proteina imata tako krajšo aminokislinsko verigo: za protein Ara1_his smo ugotovili teoretično molekularno maso 124,19 kDa, za protein Ara2_his pa 111,96 kDa.

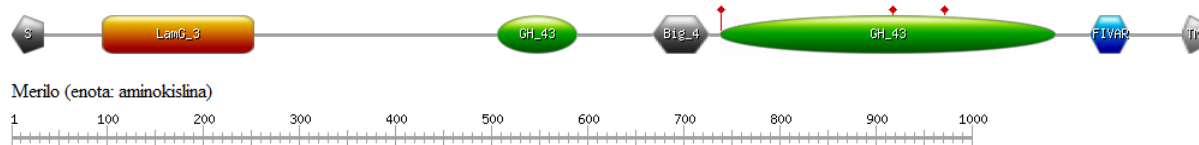
V podatkovnih bazah GenomeNet in UniProt smo poiskali predvideno molekularno funkcijo, celični proces in lokacijo, kjer naj bi se nativna proteina nahajala. Ugotovili smo,

da je za oba proteina predvidena hidrolazna aktivnost in sicer hidroliza *O*-glikozidnih vezi. Podatka iz baze UniProt kažeta, da se oba proteina nahajata v celici kot integralna komponenta celične membrane (vsebujeta transmembransko domeno). Predvideno je tudi, da sodelujeta v procesih metabolizma ogljikovih hidratov. Protein Ara1 vsebuje domene Laminin_G_3, Sialidaza, Big_4, GH_43 in FIVAR. V proteinu Ara2 pa smo identificirali domene Laminin_G_3, Big_4 in GH_43.

Najbližji ortologi gena Ara1 so β -ksilozidaza iz *B. longum* subsp. *longum* BBMN68, protein homologen α -arabinozidazi II iz *Halomonas elongata* in glikozid hidrolaza iz *B. catenulatum*. Njegovi najbližji paralogi pa so geni *bllj_1851* (kodira hipotetični protein), *bllj_1853* (domnevni protein na celični površini) in *bllj_1854* (domnevna arabinozidaza). Najbližji ortologi gena Ara2 so hipotetični protein iz *B. longum* subsp. *longum* BBMN68, glikozid hidrolaza iz *B. pseudocatenulatum* in protein z domeno, podobno Ig iz organizma *Brachybacterium faecium*. Najbližji paralogi pa so geni *bllj_1854* (domnevna arabinozidaza), *bllj_1850* (glikozid hidrolaza) in *bllj_1852* (domnevni protein na celični površini). Vsi ortologi in paralogi obeh genov, izbranih za delo, kodirajo še neokarakterizirane proteine.

4.1.2 Ohranjene proteinske domene

Pri iskanju v podatkovni bazi GenomeNet in pri uporabi orodij HMMER ter BLASTp smo v obeh proteinskih sekvencah identificirali ohranjene domene in njihove lokacije.

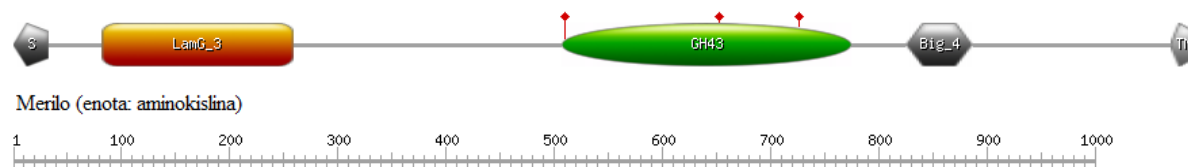


S = signalni peptid, LamG_3 = domena Laminin_G_3, GH_43 = katalitična domena glikozid hidrolaze iz družine 43, Big4 = bakterijska domena podobna Ig iz družine 4, FIVAR = domena, najdena v različnih proteinih (ang. Found In Various proteins), TM = transmembranska domena.

Slika 10: Prikaz domen proteina Ara1, dolgega 1246 aminokislin (merilo od 1 do 1000 aminokislin; orodje: MyDomains Image Creator (Expasy))

Slika 10 prikazuje, kje na polipeptidni verigi proteina Ara1 in v kakšni medsebojni oddaljenosti, se nahajajo ohranjene domene. S sivim petkotnikom sta označena signalni peptid na N-terminalnem delu proteina in transmembranska domena na C-terminalnem delu proteina. Katalitična domena s hidrolazno aktivnostjo, ki spada v družino GH_43, je peta zapovrstna domena iz leve strani, označena z zeleno barvo. Na njej so z rdečimi točkami označene tri aminokisliline, ki sestavljajo aktivno mesto domene. Ostale domene, ki se nahajajo v aminokislinski sekvenci so Laminin_G_3, Big_4 in FIVAR.

V preglednici 23 so zbrani podatki o lokacijah domen v aminokislinskem zaporedju Ara1, definicije domen in lokalno najbolj podobni proteini v podatkovnih bazah NCBIInr in PDB, najdeni z uporabo algoritma BLASTp. Domena z domnevno katalitično aktivnostjo, je glikozid hidrolazna domena iz družine 43 (GH_43) z dolžino 270 aminokislin (350 aminokislin glede na rezultat pri uporabi algoritma BLASTp). Aktivno mesto je sestavljeno iz dveh L-asparaginskih kislin in ene L-glutaminske kisline. Pri iskanju najbolj podobnih proteinov v bazi PDB smo našli dva proteina z znano strukturo, prvi encim je exo-1,5- α -L-arabinofuranosidaza (3AKF_A) s 93 % podobnostjo, sledi pa mu endo-1,4- β -ksilanaza (3KST_A) z 82 % podobnostjo. Z uporabo algoritma BLASTp najdemo še eno domeno GH_43, ki je dolga 84 aminokislin in po predvidevanju algoritma ne vsebuje do sedaj poznanih aktivnih mest. Naslednja domena v zaporedju je Laminin_G_3 (159 aminokislin), ki spada v naddružino domen, značilnih za lektine, podobne konkanavalinu A in nekatere glukanaze (ang. »Concanavalin A-like lectin/glucanase«, IPR013320). Druga domena je po strukturi podobna imunoglobulinom in je značilno prisotna v bakterijskih proteinih, ki sodelujejo pri pritrjevanju (ang. »Bacterial Ig-related«, IPR011081). Tretja je domena FIVAR in se pojavlja v različnih proteinih, povezanih z bakterijsko celično steno in ima domnevno vlogo pri njihovem pritrjevanju (ang. »Found in various architectures«, IPR011490). Za nobeno od teh domen nismo našli proteinov z znanimi strukturami (razen za domeno Big_4, vendar z nizko podobnostjo), lahko pa smo na podlagi zadetkov v bazi NCBIInr sklenili, da se te domene pogosto pojavljajo v glikozid hidrolazah iz družine 43. Verjetnost, da se določena identificirana domena res nahaja v zaporedju proteina Ara1, je v preglednici 23 podana z E-vrednostjo. Manjša kot je E-vrednost, večja je verjetnost, da se domena zares nahaja v proteinu.



S = signalni peptid, LamG_3 = domena Laminin_G_3, GH_43 = glikozid hidrolazna domena iz družine 43, Big4 = bakterijska domena podobna Ig iz družine 4, TM = transmembranska domena.

Slika 11: Prikaz postavitve domen na proteinu Ara2, dolgem 1097 aminokislin (merilo od 1 do 1000 aminokislin; orodje: MyDomains Image Creator (Expasy))

Slika 11 prikazuje lokacijo in medsebojno oddaljenost domen na polipeptidni verigi proteina Ara2. S sivim petkotnikom sta označena signalni peptid na N-terminalnem delu proteina in transmembranska domena na C-terminalnem delu proteina. Katalitična domena s hidrolazno aktivnostjo, ki spada v družino GH_43, je tretja domena iz leve, označena z zeleno barvo. Na njej so z rdečimi točkami označene tri aminokisline, ki sestavljajo aktivno mesto domene. Ostali domeni, ki jih najdemo v aminokislinskem zaporedju, sta Laminin_G_3 in Big_4.

V preglednici 24 so zbrani podatki o lokacijah domen v aminokislinskem zaporedju Ara2, definicije domen in lokalno najbolj podobni proteini v podatkovnih bazah NCBI in PDB, najdeni z uporabo algoritma BLASTp. Domena s katalitično aktivnostjo, je glikozid hidrolazna domena iz družine 43 (GH_43) z dolžino 267 aminokislin (333 aminokislin glede na rezultat pri uporabi algoritma BLASTp) katere aktivno mesto je sestavljeno iz dveh L-asparaginskih kislin in ene L-glutaminske kisline. Pri primerjavi zaporedja te domene z uporabo algoritma BLAST v NCBI smo ugotovili, da so zadetki s podobnostjo med 90 in 100 % vsi hipotetični proteini iz *B. longum* z neznano funkcijo. Pri iskanju podobnih proteinov v bazi PDB nismo uspeli najti nobene podobne sekvence z znano strukturo. Poleg domene GH_43 najdemo v zaporedju še dve domeni. Prva je Laminin_G_3 (177 aminokislin), ki spada v naddružino domen, značilnih za lektine, podobne konkanavalinu A in nekatere glukanaze (ang. »Concanavalin A-like lectin/glucanase«, IPR013320). Najdemo tudi domeno Big_4, ki je po strukturi podobna imunoglobulinom in je značilno prisotna v bakterijskih proteinih, ki sodelujejo pri pritrjevanju (ang. »Bacterial Ig-related«, IPR011081). Za domeno Big_4 smo pri uporabi algoritma BLAST v PDB našli en protein z znano strukturo, ki ima 53 % podobnost s proteinom Ara2 in sicer transpeptidazo LdtMt5 iz organizma *Mycobacterium tuberculosis*. Pri primerjavi zaporedja domene Laminin_G_3 nismo v PDB našli podobnih proteinov z znano strukturo. Verjetnost, da se določena identificirana domena res nahaja v zaporedju proteina Ara2, je v preglednici 24 podana z E-vrednostjo. Manjša kot je E-vrednost, večja je verjetnost, da se domena nahaja v proteinu.

Na slikah 10 in 11 ter na podlagi podatkov v preglednicah 23 in 24 je razvidno, da se v obeh aminokislinskih sekvencah nahajajo domene Laminin_G_3, Big_4 in katalitična domena GH_43 z dvema L-asparaginskima kislinama in eno L-glutaminsko kislino v aktivnem mestu. Poleg tega prav tako obe zaporedji na N-koncu vsebujeta signalno zaporedje in transmembransko domeno na C-koncu aminokislinskega zaporedja.

Preglednica 23: Pregled podatkov o domenah, ki smo jih identificirali v aminokislinskem zaporedju Ara1 in najbolj podobnih zaporedjih v podatkovnih bazah NCBI in PDB.

Domena	Signalni peptid	Laminin_G_3	GH_43	Big_4	GH_43, katalitična domena	FIVAR	TM domena
Lokacija v AK zaporedju	1-34	95-253	506-589	669-725; (668-727)	815 -1084; (738-1087)	1122-1164	1219-1240
Število AK ostankov	34	159	84	57 (60)	270 (350)	43	22
E-vrednost		1,7 ⁻²¹ , (2,71 ⁻²⁰)	2,44 ⁻⁴	1,5 ⁻⁹ , (2,0 ⁻⁷)	9,4 ⁻²⁸ , (4,94 ⁻³⁸)	6,70 ⁻⁴	
Identificirane domene, opombe	Signalni peptid	Spada v nadružino domen, značilnih za konkanavalinu A podobne lektine in nekatere glukanaze	Glikozid hidrolazna domena iz družine 43	Bakterijska domena s strukturo podobno imunoglobulinom	Glikozid hidrolazna domena iz družine 43. Aktivno mesto: 739 D, 917 D, 971 E	Domena, ki se pojavlja v različnih proteinih	Transmembranska domena
Zaporedja z največjo podobnostjo v NCBI in (podobnost)	/	Različne GH_43 iz <i>B. longum</i> (med 90 in 100 %)	Hipotetični protein iz <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> (100 %), različne GH_43 iz <i>B. longum</i> (med 99 in 100 %)	Domena s strukturo podobno Ig iz <i>Streptococcus pyogenes</i> (100 %), različne GH_43 iz <i>B. longum</i> (med 90 in 100 %)	Različne GH_43 iz <i>B. longum</i> (med 90 in 100 %)	Različne GH_43 iz <i>B. longum</i> (med 90 in 100 %)	/
Zaporedja z največjo podobnostjo v PDB (podobnost)	/	Ni zadetkov	Ni zadetkov	Sec7p katalitična domena (4OIY_A, 44 %)	exo-1,5- α -L-arabinofuranosidaza (3AKF_A, 93 %); endo-1,4- β -ksilanaza (3KST_A, 82 %)	Ni zadetkov	/
Baza, orodje	HMMER, ProtScale	KEGG, HMMER, (BLAST)	BLAST	KEGG, HMMER, (BLAST)	KEGG, HMMER, (BLAST)	KEGG	HMMER, ProtScale

AK = aminokislina, E-vrednost = parameter, ki poda oceno statistične signifikantnosti rezultatov poravnave z algoritmom BLAST, manjša kot je E-vrednost, bolj signifikanten je rezultat, 739 D = 739. aminokislinski ostanek (asparaginska kislina), 917 D = 917. aminokislinski ostanek (asparaginska kislina), 971 E = 971. aminokislinski ostanek (glutaminska kislina), TM = transmembranska.

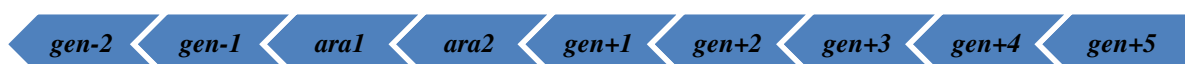
Preglednica 24: Pregled podatkov o domenah, ki smo jih identificirali v aminokislinskem zaporedju Ara2 in najbolj podobnih zaporedjih v podatkovnih bazah NCBIInr in PDB.

Domena	Signalni peptid	Laminin_G_3	GH_43, katalitična domena	Big_4	TM domena
Lokacija v AK zaporedju	1-32	82-258; (81-258)	508-774; (491-823)	825-877; (822-878)	1070-1092
Število AK ostankov	32	177 (178)	267 (333)	53 (57)	23
E-vrednost		7,2 ⁻⁹ ; (1,15 ⁻⁹)	1,8 ⁻⁸ ; (2,33 ⁻⁹⁰)	7,7 ⁻¹⁴ ; (1,28 ⁻¹¹)	
Identificirane domene, opombe	Signalni peptid	Spada v nadružino domen, značilnih za konkanavalinu A podobne lektine in nekatere glukanaze	Glikozid hidrolazna domena iz družine 43. Aktivno mesto: 510 D, 625 D, 726 E	Bakterijska domena s strukturo podobno imunoglobulinom	Transmembranska domena
Zaporedja z največjo podobnostjo v NCBIInr (podobnost)	/	Arabinozidaza iz <i>B. longum</i> (100 %), hipotetični proteini iz <i>B. longum</i> (med 99 in 100 %)	Različni hipotetični proteini iz <i>B. longum</i> (med 90 in 100 %)	Prvi zadetek G ⁺ signalni peptid YSIRK iz <i>B. longum</i> . Različni hipotetični proteini iz <i>B. longum</i> (med 90 in 100 %)	/
Zaporedja z največjo podobnostjo v PDB (podobnost)	/	Ni zadetkov	Ni zadetkov	Transpeptidaza LdtMt5 iz <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (4Z7A_A, 53 %)	/
Vir	HMMER, ProtScale	KEGG, HMMER, (BLAST)	KEGG, HMMER, (BLAST)	KEGG, HMMER, (BLAST)	HMMER, ProtScale

AK = aminokislina, E-vrednost = parameter, ki poda oceno statistične signifikantnosti rezultatov poravnave z algoritmom BLAST, manjša kot je E-vrednost, bolj signifikanten je rezultat, 510 D = 510. aminokislinski ostanek (asparaginska kislina, 625 D = 625. aminokislinski ostanek (asparaginska kislina), 726 E = 726. aminokislinski ostanek (glutaminska kislina), TM = transmembranska.

4.1.3 Umestitev genov v gensko gručo

Znano je, da se pri bifidobakterijah geni za razgradnjo polisaharidov pogosto nahajajo v genskih gručah, sestavljenih iz represorskega proteina tipa *LacI*, oligosaharidnega prenašalca in genov za glikozid hidrolaze (Schell in sod., 2002). Zanimalo nas je, ali sta morda tudi izbrana gena del genske gruče, ki bi kazala podobno sestavo. S pregledom lastnosti sekvenc v okolici tarčnih genov smo prišli do podatkov, ki so prikazani na sliki 12 in v preglednici 25.



Slika 12: Prikaz genov v genski gruči, iz katere sta gena *ara1* in *ara2*

Preglednica 25: Pregled genov v genski gruči iz katere sta gena *ara1* in *ara2* ter njihovih funkcij, predvidenih na osnovi sekvenčne podobnosti in ohranjenih domen

Ime gena	Število NK	Število AK	Predvidena molekulska funkcija proteina (GenomeNet)	Ohranjene domene (HMMER in Blastp)
Gen -2	4995	1664	Glikozid hidrolaza	GH43, Laminin_G_3, Big_3, Lanimin_G_2, FIVAR, Sialidaza, DUF1080, Tex_N
Gen -1	6003	2000	Hipotetični protein	GH43, Lanimin_G_3, Big_2, Big_3, Big_4, S4_2
<i>ara1</i>	3741	1246	Protein, ki se predvidoma nahaja na celični površini; hidrolazna aktivnost, hidroliza O-glikozidnih vezi	Laminin_G_3, Sialidaza, Big_4, GH_43, FIVAR
<i>ara2</i>	3294	1097	Protein, ki se predvidoma nahaja na celični površini; hidrolazna aktivnost, hidroliza O-glikozidnih vezi	Laminin_G_3, Big_4, GH_43
Gen +1	3198	1065	Arabinozidaza	GH_43, Big_2, Big_3_5
Gen +2	606	201	Hipotetični protein	DUF624
Gen +3	843	208	ABC-prenašalec oligosaharidov (permeaza)	BPD_transp_1 (CL0404)
Gen +4	855	284	ABC-prenašalec oligosaharidov (permeaza)	BPD_transp_1 (CL0404)
Gen +5	1017	338	Transkripcijski regulator	Peripla_BP_3, Peripla_BP_1, LacI, Peripla_BP_4, TetR_N

NK = nukleotidov, AK = aminokislin.

Slika 12 prikazuje gensko gručo, v kateri se nahajata izbrana gena *ara1* in *ara2*. Poleg dveh izbranih genov se v genski gruči predvidoma nahaja še 7 genov, njihove domnevne funkcije pa so prikazane v preglednici 25. V neposredni bližini genov *ara1* in *ara2* ležijo še trije geni z domnevno glikozid hidrolazno aktivnostjo, saj vsebujejo ohranjeno domeno GH_43. Produkti vseh genov, ki vsebujejo ohranjeno domeno GH_43, imajo aminokislinsko zaporedje daljše od 1000 aminokislin in kodirajo še vsaj 2 dodatni domeni. Od skupno petih genov, štirje vsebujejo tudi domeno Laminin_G_3. Našli smo tudi 2 gena, ki predvidoma nosita zapis za prenašalec oligosaharidov ter 2 gena, ki nosita zapis za transkripcijski regulator. Gen za transkripcijski regulator na poziciji +5 glede na gen *ara2* ima ohranjeno domeno tipa *LacI*.

4.2 TRANSFORMACIJA IN POSKUSNA PROIZVODNJA PROTEINOV Ara1_his IN Ara2_his

Ekspresijska seva *E. coli* BL21(DE3) in Rosetta smo transformirali s predhodno pripravljenimi plazmidi, ki so vsebovali gena *ara1_his* in *ara2_his* in smo jih izolirali iz kultur založnega seva. V preglednici 26 so podane koncentracije DNK, izmerjene v vzorcih plazmidov, izoliranih iz prekonočne kulture založnih sevov *E. coli* DH5 α . Uspešnost izolacije smo preverili z meritvijo koncentracije DNK na spektrofotometru in izračunali koncentracijo izolirane DNK v obeh vzorcih po enačbi »1«. V vzorcu plazmidov iz bakterijske kulture z genom *ara1_his* smo izmerili koncentracijo DNK 211 ng/ μ l, v izolatu plazmidov iz bakterijske kulture z genom *ara2_his* pa 199 ng/ μ l.

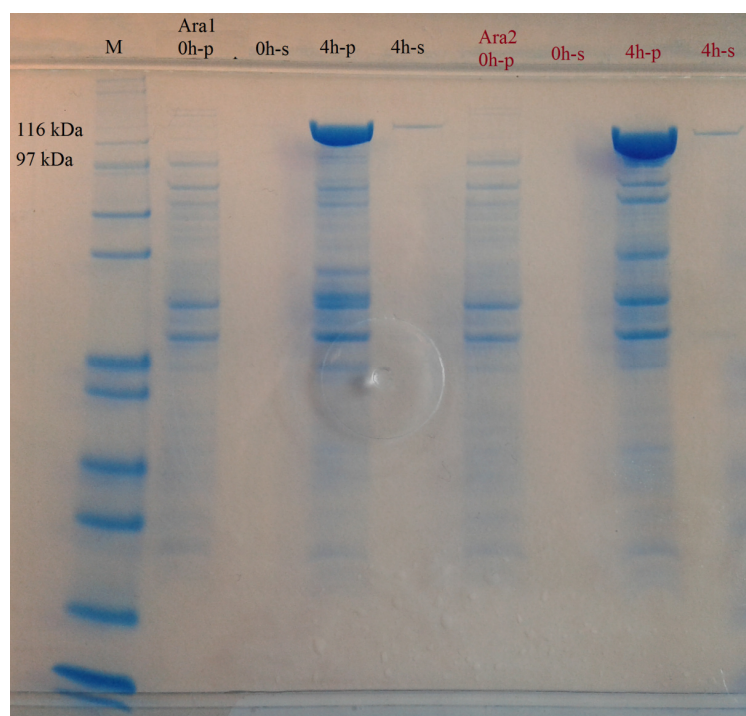
Preglednica 26: Izmerjena koncentracija izoliranih plazmidov

Vzorec	Koncentracija DNK [ng/ μ l]
<i>ara1_his</i>	211
<i>ara2_his</i>	199

Uspešnost transformacije ekspresijskih sevov *E. coli* BL21(DE3) smo potrdili z vidnimi kolonijami na trdnih gojiščih LB z antibiotikom kanamicinom, ki preprečuje rast bakterijam brez gena za kanamicinsko odpornost (tega ekspresijski sev brez plazmida nima, je pa kodiran na plazmidu). Transformante *E. coli* Rosetta pa smo na enak način izselekcionirali na trdnih gojiščih LB z antibiotikoma kanamicin in kloramfenikol.

Da bi preverili izražanje tarčnih proteinov, smo proteinske izolate iz kultur ekspresijskih sevov ločili na gelu. Slika 13 prikazuje gel SDS-PAGE na katerem so proteinski izolati iz vzorcev, odvzetih tekom poskusne proizvodnje obeh encimov pred indukcijo (0h) in 4 ure po indukciji z IPTG. Prvi vzorec iz leve je proteinski označevalec (M), nato pa si sledijo proteinski izolati bakterijske kulture, transformirane s plazmidom z zapisom za encim Ara1_his, najprej pred indukcijo izražanja (p = sediment, s = supernatant), ter nato po 4 urah izražanja (4h-p). V proteinskem izolatu iz sedimenta se po 4 urah izražanja pojavi

nova intenzivna lisa, ki kaže na protein z navidezno molekulsko maso približno 110-120 kDa. Glede na predvideno velikost vstavljenega zapisa za encim Ara1_his (teoretična molekulska masa 124 kDa) sklepamo, da gre za encim Ara1_his. Sledijo rdeče označeni proteinski izolati iz kulture, v katerih smo izražali encim Ara2_his, najprej pred indukcijo in nato po 4 urah izražanja. Tudi pri teh izolatih se je po 4 urah izražanja pojavila nova intenzivna lisa, ki nakazuje protein z navidezno molekulsko maso približno 95-125 kDa. Glede na predvideno velikost vstavljenega zapisa za encim Ara2_his (teoretična molekulska masa 112 kDa) sklepamo, da je to encim Ara2_his.



M = proteinski označevalec Mw (Mark12 NuPage®, 2,5 – 200 kDa), 0h-p = proteinski izolat iz sedimenta kulture pred indukcijo izražanja, 0h-s = vzorec supernatanta pred indukcijo izražanja, 4h-p = proteinski izolat iz sedimenta kulture po 4 urah izražanja, 4h-s = vzorec supernatanta po 4 urah izražanja. Črno označeni vzorci pripadajo kulturi *E.coli* BL(DE), ki je izražala protein Ara1_his, rdeče označeni pa kulturi, ki je izražala encim Ara2_his.

Slika 13: Na SDS-PAGE gelu ločeni vzorci ekspresijskih kultur (poskusno izražanje encimov)

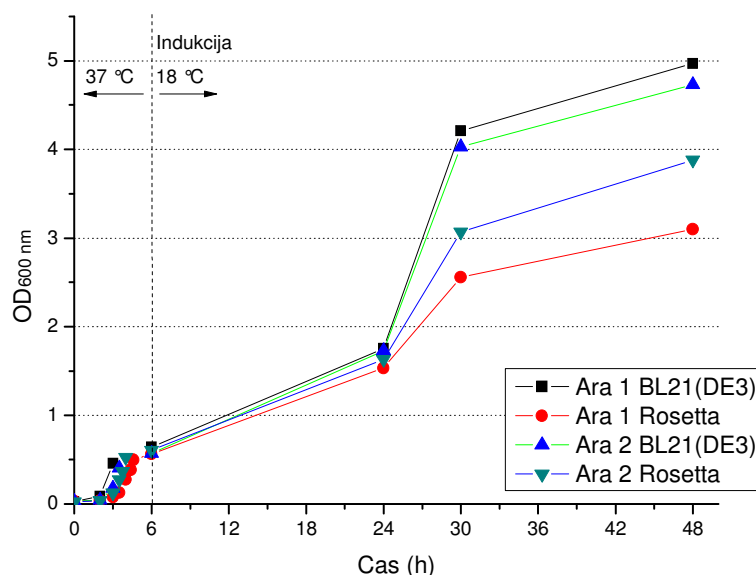
Preglednica 27: Rezultati testa encimske aktivnosti v proteinskih izolatih iz celičnih sedimentov na substratih arabinoksilan, linearni in razvejani arabinan

Protein	Arabinoksilan 10 mg/ml	Linearni arabinan 5 mg/ml	Razvejani arabinan 5 mg/ml
Ara1_his	-	-	+
Ara2_his	-	+	-

Preglednica 27 prikazuje rezultate prvega (hitrega) testa encimske aktivnosti, določene neposredno v proteinskih izolatih iz celičnih sedimentov transformant *E. coli* BL21(DE3). Ugotovili smo, da v proteinskem izolatu iz bakterij *E. coli*, ki so izražale encim Ara1_his zaznamo encimsko aktivnost le na razvejanem arabinanu, v izolatu iz seva, ki je izražal Ara2_his pa smo zaznali encimsko aktivnost na linearnem arabinanu.

4.3 PROIZVODNJA PROTEINOV V LABORATORIJSKEM MERILU

Za proizvodnjo večjih količin proteinov smo transformante *E. coli* BL21(DE3) in Rosetta namnoževali v 2,5 L posodah z 1 L tekočega gojišča LB. Po indukciji je ekspresija potekala pri temperaturi 18 °C.



OD_{600 nm} = optična gostota pri 600 nm, h = ura, Ara 1 BL21(DE3) = kultura *E. coli* BL21(DE3), ki je izražala protein Ara1_his, Ara 1 Rosetta = kultura *E. coli* Rosetta, ki je izražala protein Ara1_his, Ara 2 BL21(DE3) = kultura *E. coli* BL21(DE3), ki je izražala protein Ara2_his, Ara 1 Rosetta = kultura *E. coli* Rosetta, ki je izražala protein Ara2_his.

Slika 14: Grafični prikaz meritev optične gostote pri 600 nm v kulturah ekspresijskih sevov, s katerimi smo spremljali njihovo rast

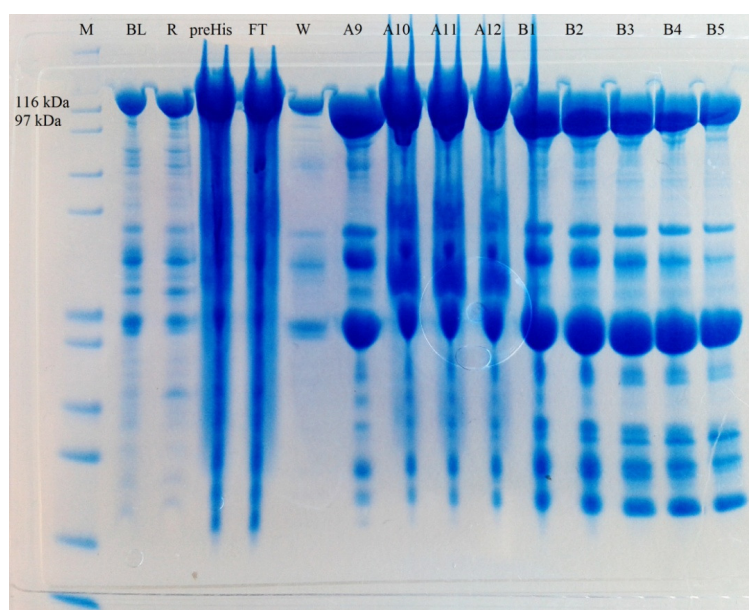
Slika 14 prikazuje rast transformiranih sevov bakterije *E. coli* BL21(DE3) in Rosetta. Črni kvadrati in rdeče točke na sliki predstavljajo seva, ki sta izražala encim Ara1_his, modri in zeleni trikotniki pa seva, ki sta izražala encim Ara2_his. Začetek izražanja je bil sprožen z dodatkom IPTG po 6 urah od začetka inkubacije in je na sliki 14 označen s črtno črto. Proizvodnja je bila zaključena po 48 urah. Iz slike 14 je razvidno, da je izmerjena optična gostota v kulturah ekspresijskega seva *E. coli* BL21(DE3) po indukciji konstantno višja kot

v kulturah ekspresijskega seva Rosetta. To velja tako v primeru sevov, ki so izražali encim Ara1_his, kot Ara2_his.

4.4 IZOLACIJA TARČNIH PROTEINOV

4.4.1 Ločevanje proteinov z afinitetno kromatografijo

Afinitetno kromatografijo smo izvedli po opisu iz poglavja 3.3.5.3.3. Kromatogrami, na podlagi katerih smo se odločili, s katerimi elucijskimi frakcijami bomo nadaljevali zaključne procese, so priloženi v prilogi B.

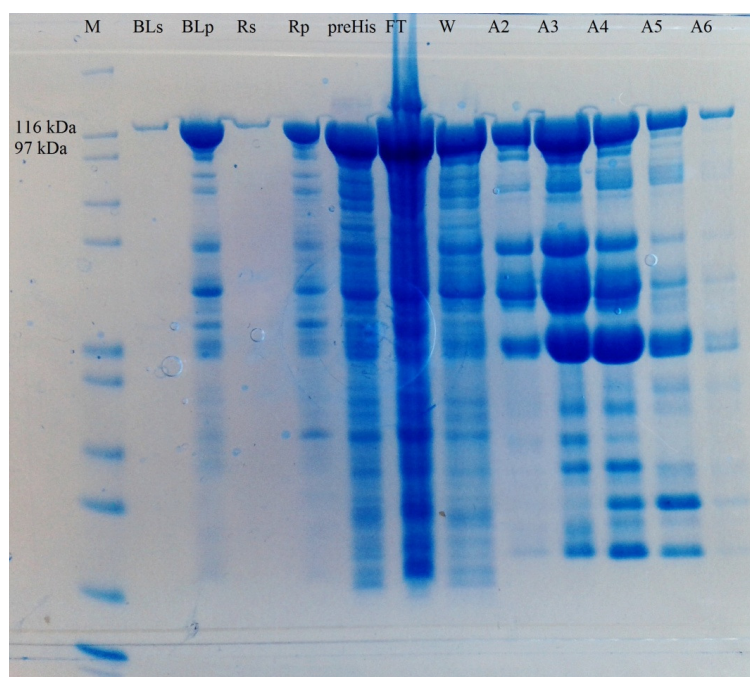


M = proteinski označevalec Mw (Mark12 NuPage®, 2,5 – 200 kDa), BL = proteinski izolat iz sedimenta transformant *E. coli* BL21(DE3), R = proteinski izolat iz sedimenta transformant *E. coli* Rosetta, preHis = vzorec iz celičnega homogenata pred izvedbo afinitetne kromatografije, FT = vzorec iz frakcije, kjer so se zbirali proteini iz celičnega homogenata, ki se na kolono niso vezali, W = vzorec iz frakcije, kjer so se zbirali proteini, ki so se iz kolone sprali, A9 – B5 = elucijske frakcije, poimenovane z oznakami luknjic na mikrotitrski plošči za zbiranje frakcij, kjer so se nahajale.

Slika 15: SDS-PAGE gel, na katerem smo ločili frakcije v različnih fazah čiščenja proteina Ara1_his z afinitetno kromatografijo

Slika 15 prikazuje gel SDS-PAGE z ločenimi frakcijami iz postopka čiščenja encima Ara1_his. Encim Ara1_his ima teoretično molekulsko maso 124 kDa (s ProtParam predvidena molekulska masa klonirane aminokislinske sekvence). Iz slike 15 je razvidno, da se je protein v obeh ekspresijskih sevih uspešno izražal, saj v vzorcih proteinskih izolatov iz sedimentov kultur *E. coli* BL21(DE3) in Rosetta opazimo odebeljeni lisi pri molekulski masi med 116 - 120 kDa (vzorca z oznakama BL in R). V vzorcu iz celičnega homogenata pred izvedbo afinitetne kromatografije (preHis) in v vzorcu z oznako FT (ang.

flow through), ki je predstavljal prvo frakcijo je količina proteinov zelo velika. Vzorci z oznakami od A9 do B5 predstavljajo elucijske frakcije (z oznakami luknjic na mikrotitrski plošči za zbiranje frakcij) v katerih smo pri spremljanju absorbance pri valovni dolžini 280 nm zaznali, da so se iz kolone izločili vezani proteini (kromatogram priložen v prilogi B). Iz slike 15 je razvidno, da vse elucijske frakcije vsebujejo veliko proteinov različnih velikosti, ki so se vezali na kolono. Pri primerjavi z vzorcem preHis je razvidno, da smo se v koraku spiranja kolone znebili nekaterih s histidinsko oznako neoznačenih proteinov, ki se na gelu nahajajo pod oznako W.



M = proteinski označevalec Mw (Mark12 NuPage®, 2,5 – 200 kDa), BLs = vzorec iz supernatanta transformant *E. coli* BL21(DE3), BLp = proteinski izolat iz sedimenta transformant *E. coli* BL21(DE3), Rs = vzorec iz supernatanta transformant *E. coli* Rosetta, Rp = proteinski izolat iz sedimenta transformant *E. coli* Rosetta, preHis = vzorec iz celičnega homogenata pred izvedbo afinitetne kromatografije, FT = vzorec iz frakcije, kjer so se zbirali proteini iz celičnega homogenata, ki se na kolono niso vezali, W = vzorec iz frakcije, kjer so se zbirali proteini, ki so se iz kolone sprali, A2 – A6 = elucijske frakcije, poimenovane z oznakami luknjic na mikrotitrski plošči za zbiranje frakcij, kjer so se nahajale, kDa = kilo Dalton.

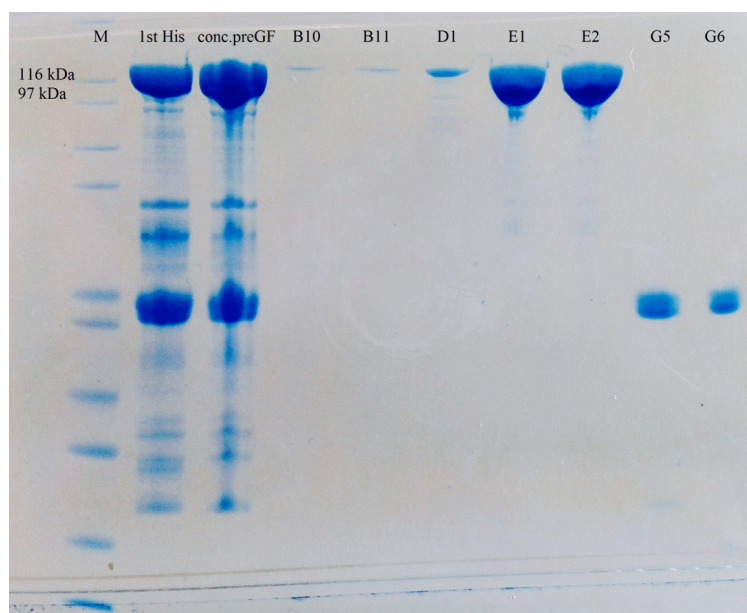
Slika 16: SDS-PAGE gel, na katerem smo ločili frakcije v različnih fazah čiščenja proteina Ara2_{his} z afinitetno kromatografijo

Slika 16 prikazuje gel SDS-PAGE z ločenimi frakcijami iz postopka čiščenja encima Ara2_{his}. Iz slike 16 je razvidno, da se je protein v obeh transformantah uspešno izražal, saj že v vzorcih celokupnih proteinov izoliranih iz frakcij kultur ekspresijskih sevov opazimo odebeljeni lisi molekulske mase približno 116 kDa (vzorci z oznakama BLp in Rp). Tako kot v primeru encima Ara1_{his}, je tudi tu iz gela razvidno, da vzorec z oznako FT (ang. flow through) vsebuje velike količine nevezanih proteinov, ki so se sprali v

koraku nalaganja celičnega homogenata na kolono. Vzorci z oznakami od A2 pa do A6 predstavljajo elucijske frakcije (z oznakami luknjic na mikrotitrski plošči za zbiranje frakcij) v katerih smo pri spremljanju absorbance pri valovni dolžini 280 nm zaznali, da so se iz kolone izločili vezani proteini (kromatogram priložen v prilogi B). Razvidno je, da vse elucijske frakcije še vedno vsebujejo veliko proteinov različnih velikosti, ki so se vezali na kolono. Iz primerjave elucijskih frakcij z vzorcem celičnega homogenata pred izvedbo afinitetne kromatografije (preHis) je razvidno, da smo se z uporabljenimi metodo čiščenja znebili nekaterih neželenih proteinov, ki so se izločili v koraku spiranja kolone in so na gelu nanešeni pod oznako W.

4.4.2 Ločevanje proteinov z gelsko filtracijo

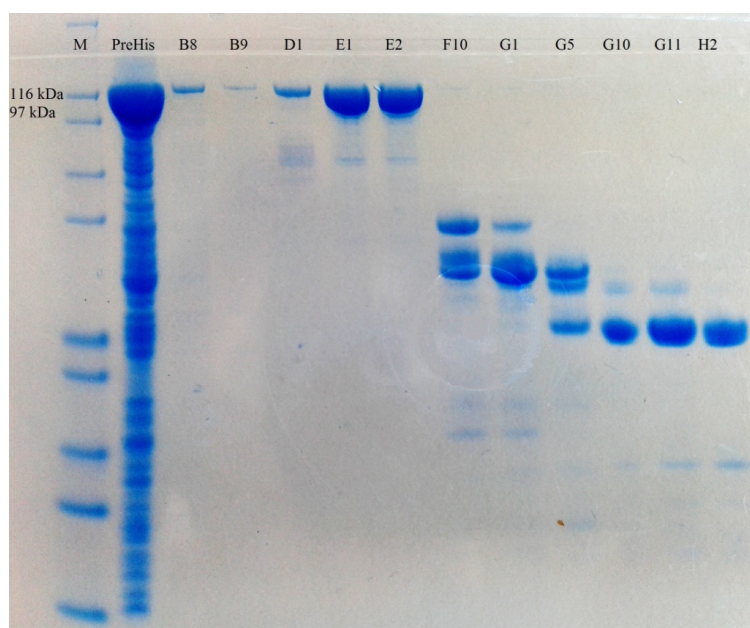
Pred izvedbo gelske filtracije smo združili izbrane elucijske frakcije iz obeh korakov afinitetne kromatografije. Katere frakcije bomo izbrali smo se odločili na podlagi kromatogramov iz koraka afinitetne kromatografije (Priloga B), meritev encimske aktivnosti in analize z SDS-PAGE. Pri gelski filtraciji smo ločevanje proteinov na kromatogramu spremljali preko absorbance pri valovni dolžini 280 nm. Na podlagi dobljenih kromatogramov, ki so priloženi v prilogi C, smo izbrali elucijske frakcije za izvedbo SDS-PAGE.



M = proteinski označevalec Mw (Mark12 NuPage®, 2,5 – 200 kDa), 1st His = elucijske frakcije, zbrane po prvi izvedbi afinitetne kromatografije (pred gelsko filtracijo), conc.preGF = skoncentrirane elucijske frakcije po drugi afinitetni kromatografiji in pred izvedbo gelske filtracije, B10 – G6 = elucijske frakcije, poimenovane z oznakami luknjic na mikrotitrski plošči za zbiranje frakcij, kjer so se nahajale.

Slika 17: SDS-PAGE gel na katerem smo ločili proteinske frakcije pred in v različnih fazah čiščenja Ara1_{his} z gelsko filtracijo

Slika 17 prikazuje gel SDS-PAGE, na katerem smo ločili proteinske frakcije čiščenja produkta encima Ara1_his z gelsko filtracijo. Encim Ara1_his ima predvideno molekulsko maso 124 kDa, na podlagi česar smo sklepali, da predstavlja liso med 95 in 120 kDa, ki se na gelu pojavi pri vzorcih označenih z 1stHis (vzorec po prvi afinitetni kromatografiji), conc.preGF (vzorec po ultrafiltraciji, izvedeni pred gelsko filtracijo), E1 (elucijska frakcija v mikrotitrski plošči na mestu E1) in E2 (elucijska frakcija v mikrotitrski plošči na mestu E2). Elucijske frakcije B10, B11, D1, E1 in E2 so vsebovale večinoma le proteine z molekulsko maso sovpadajočo s predvideno molekulsko maso encima Ara1_his. Frakciji G5 in G6 vsebujeta proteine, manjše od predvidene molekulske mase zelenega produkta. Pri potrjevanju encimske aktivnosti frakcij na substratu razvejani arabinan, smo zaznali encimsko aktivnost v frakcijah z oznakami D1, E1 in E2. V elucijskih frakcijah z oznakami B10, B11, G5 in G6 nismo zaznali encimske aktivnosti. Iz primerjave dela gela z vzorci po gelski filtraciji z vzorcema pred gelsko filtracijo z oznakama 1stHis in conc.preGF je razvidno, da smo se s korakom gelske filtracije uspešno znebili večine manjših proteinov, ki jih je produkt še vedno vseboval po afinitetni kromatografiji.



M = proteinski označevalec Mw (Mark12 NuPage®, 2,5 – 200 kDa), PreHis = vzorec iz celičnega homogenata pred izvedbo afinitetne kromatografije, B8 – H2 = elucijske frakcije, poimenovane z oznakami luknjic na mikrotitrski plošči za zbiranje frakcij, kjer so se nahajale.

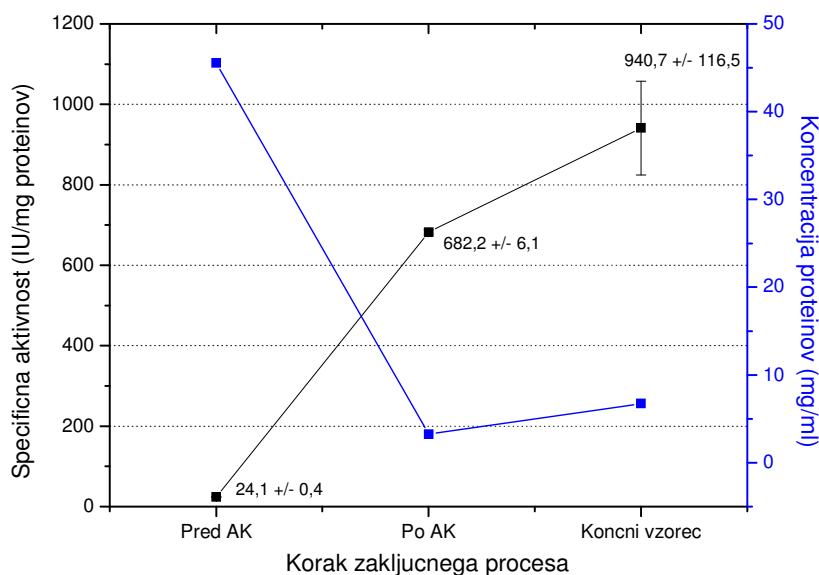
Slika 18: SDS-PAGE gel na katerem smo ločili proteinske frakcije pred in v različnih fazah čiščenja Ara2_his z gelsko filtracijo

Slika 18 prikazuje gel SDS-PAGE, na katerem smo ločili proteinske frakcije čiščenja encima Ara2_his z gelsko filtracijo. Encim Ara2_his ima predvideno molekulsko maso 112 kDa, na podlagi česar smo sklepali, da se na gelu pojavi kot lisa v približni višini med oznakama 116 in 97 kDa. Elucijske frakcije B8, B9, D1, E1 in E2 (oznake luknjic na

mikrotitrski plošči za zbiranje frakcij, kjer so se nahajale) so vsebovale večinoma proteine z molekulsko maso sovpadajočo s predvideno molekulsko maso encima Ara2_his. Frakcije F10, G1, G5, G10, G11 in H2 pa vsebujejo proteine, manjše od predvidene molekulske mase zelenega produkta. Pri testiranju encimske aktivnosti frakcij na substratu linearni arabinan smo zaznali encimsko aktivnost v frakcijah z oznakami D1, E1 in E2. V frakcijah z oznakami B8, B9, F10, G1, G5, G10, G11 in H2 nismo zaznali encimske aktivnosti. Vzorci z oznakami D1, E1 in E2 poleg prevladujočih odebeljenih lis v območju med 116 in 97 kDa vsebujejo zelo malo preostalih, iz česar je razvidno, da smo se v teh frakcijah s kombinacijo gelske filtracije in afinitetne kromatografije uspešno znebili večine neželenih proteinov, ki so bili v produktu prisotni na začetku in jih na gelu vidimo pri vzorcu iz celičnega homogenata pred izvedbo afinitetne kromatografije (preHis).

4.4.3 Spremljanje encimske aktivnosti in koncentracij proteinov v različnih fazah izolacije tarčnih proteinov

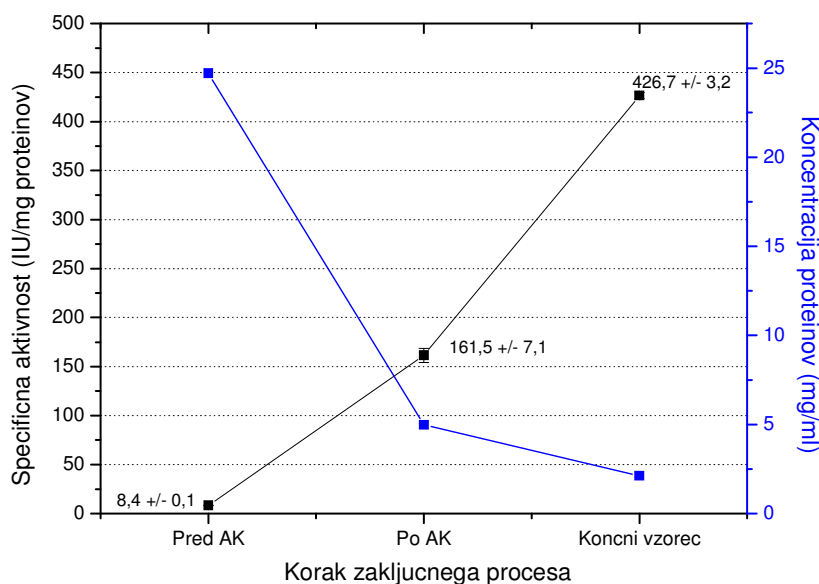
Po vsakem izvedenem koraku zaključnih procesov smo preverili encimsko aktivnost v zbranih elucijskih frakcijah oziroma končnem produktu. Na osnovi rezultatov testiranja aktivnosti proteinskih izolatov iz sedimentov kultur iz poskusne proizvodnje tarčnih proteinov na različnih substratih, smo za kvantitativno določanje encimske aktivnosti pri Ara1_his za substrat uporabljali razvejani arabinan, pri produktu Ara2_his pa linearni arabinan.



AK = afinitetna kromatografija, GF = gelska filtracija. Na sliki so prikazana povprečja in standardni odkloni specifične encimske aktivnosti.

Slika 19: Grafični prikaz sprememb specifične encimske aktivnosti (hidrolize razvejanega arabinana) in koncentracije proteinov v vzorcih po različnih fazah čiščenja encima Ara1_his

Slika 19 prikazuje specifične encimske aktivnosti v vzorcih, odvzetih po različnih fazah čiščenja proteina Ara1_his. Za primerjavo učinkovitosti različnih faz čiščenja tarčnih proteinov, smo na grafični prikaz dodali spremembe v koncentracijah proteinov v vzorcih. Pri proteinu Ara1_his lahko vidimo, da se specifična encimska aktivnost elucijskih frakcij po afinitetni kromatografiji v primerjavi z začetnim vzorcem poveča za približno 28-krat, iz $24,1 \pm 0,4$ IU/mg proteinov na $682,2 \pm 6,1$ IU/mg proteinov. Končni produkt čiščenja proteina Ara1_his ima v primerjavi z neprečiščenim celičnim homogenatom pred začetkom čiščenja približno 39-krat večjo specifično aktivnost in sicer $940,7 \pm 116,5$ IU/mg proteinov. Rezultati merjenja koncentracije proteinov kažejo, da smo se največjega dela neželenih proteinov znebili z afinitetno kromatografijo.



AK = afinitetna kromatografija, GF = gelska filtracija. Na sliki so prikazana povprečja in standardni odkloni specifične encimske aktivnosti.

Slika 20: Grafični prikaz sprememb specifične encimske aktivnosti (hidrolize linearnega arabinana) in koncentracije proteinov v vzorcih po različnih fazah čiščenja encima Ara2_his

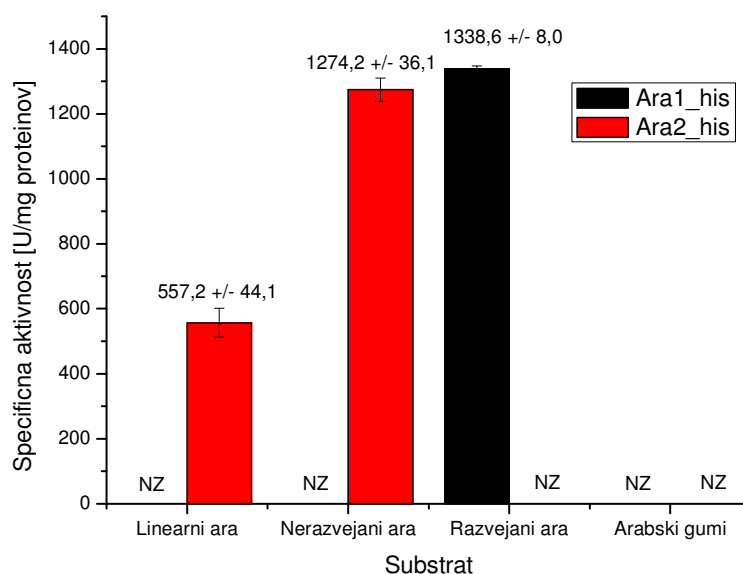
Slika 20 prikazuje spremembe specifične encimske aktivnosti, izmerjene v vzorcih, odvzetih po različnih fazah čiščenja encima Ara2_his. Za primerjavo učinkovitosti različnih korakov izolacije tarčnega proteina smo na grafični prikaz dodali spremembe v koncentracijah proteinov v vzorcih. Pri produktu Ara2_his se je po afinitetni kromatografiji specifična encimska aktivnost povečala za približno 19-krat, iz $8,4 \pm 0,1$ IU/mg proteinov na $161,5 \pm 7,1$ IU/mg proteinov. Končni produkt čiščenja Ara2_his ima 51-krat večjo specifično encimsko aktivnost v primerjavi z vrednostjo, določeno v neprečiščenem celičnem homogenatu (pred afinitetno kromatografijo) in sicer $426,7 \pm 3,2$ IU/mg

proteinov. Iz rezultatov merjenja koncentracije proteinov je razvidno, da smo se tudi v tem primeru največjega dela neželenih proteinov znebili z afinitetno kromatografijo.

4.5 BIOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA TARČNIH PROTEINOV

4.5.1 Kvantitativno vrednotenje encimske aktivnosti na različnih substratih

Encimsko aktivnost očiščenih proteinov Ara1_his in Ara2_his smo sledili preko detekcije sproščenih reducirajočih sladkorjev (produktov hidrolize) z reagentom DNS, ki je opisana v poglavju 3.3.4. Kot substrate smo uporabili linearni, nerazvejani in razvejani arabinan ter arabski gumi.



SA = specifična encimska aktivnost, NZ = ni bilo zaznane encimske aktivnosti, Linearni ara = linearni arabinan, Nerazvejani ara = nerazvejani arabinan, Razvejani ara = razvejani arabinan. Na sliki so prikazana povprečja in standardni odkloni specifične encimske aktivnosti.

Slika 21: Grafični prikaz izmerjene specifične aktivnosti očiščenih encimov Ara1_his in Ara2_his na testiranih substratih: linearni, nerazvejani in razvejani arabinan ter arabski gumi

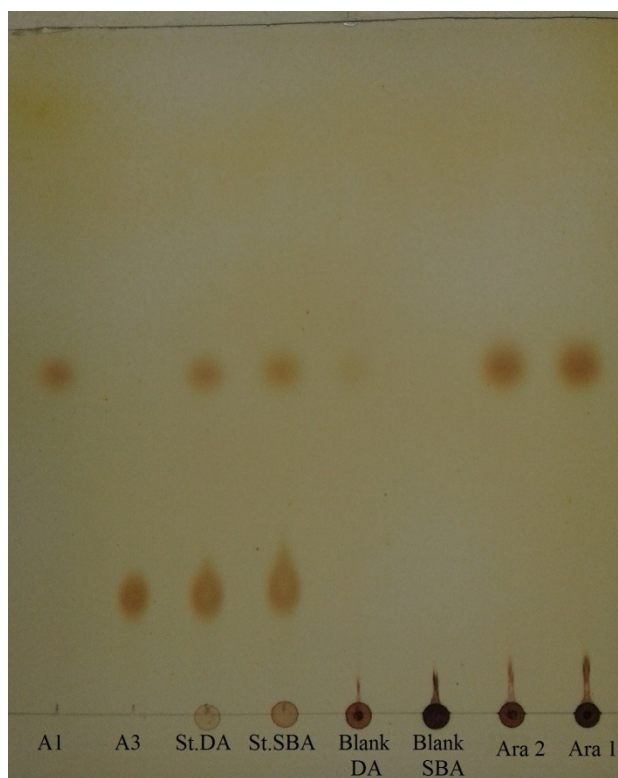
Slika 21 prikazuje vrednosti specifične aktivnosti očiščenih encimov Ara1_his in Ara2_his v IU/mg proteinov na substratih: linearni, nerazvejani in razvejani arabinan ter arabski gumi. Rezultati kažejo, da je encim Ara1_his sposoben razgrajevati le razvejani arabinan. V reakcijski mešanici smo izmerili specifično encimsko aktivnost 1338,6 +/- 8,0 IU/mg proteinov. Encim Ara2_his razgrajuje tako linearni kot nerazvejani arabinan. Pri encimski reakciji v kateri smo kot substrat uporabili linearni arabinan smo izmerili specifično

encimsko aktivnost $557,2 \pm 44,1$ IU/mg proteinov, pri substratu nerazvežani arabinan pa $1274,2 \pm 36,1$ IU/mg proteinov. Pri nobenem od encimov pri pogojih eksperimenta nismo zaznali aktivnosti na substratu arabski gumi.

4.5.2 Ugotavljanje produktov razgradnje

Pri očiščenem encimu Ara1_his smo določali razgradne produkte, ki jih encim sprošča iz substrata razvežanega arabinana, pri Ara2_his pa iz nerazvežanega arabinana.

Slika 22 prikazuje rezultate tankoplastne kromatografije. Rezultati kažejo, da encim Ara1_his pri reakciji z razvežanim arabinanom iz substrata sprošča samo monosaharid arabinozo. Enako tudi encim Ara2_his sprošča enak monosaharid, vendar iz nerazvežanega arabinana.

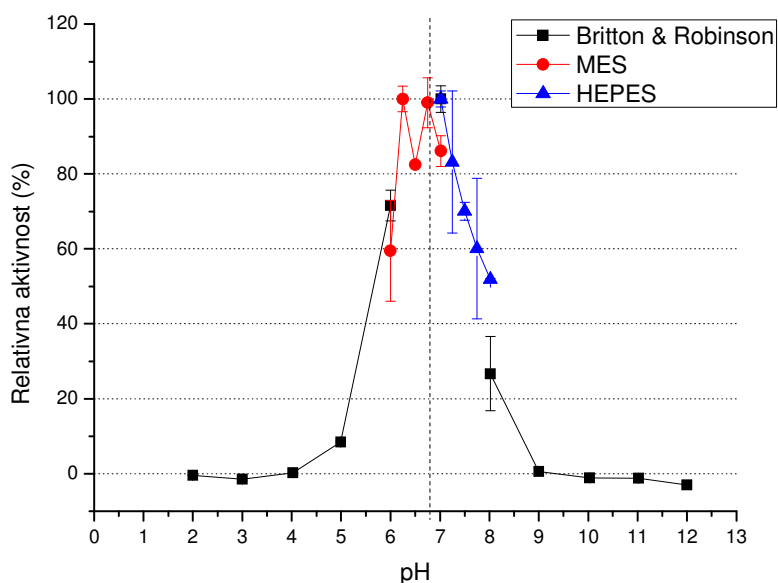


A1 = 2 mM arabinoza, A3 = 2 mM arabinotrioza, St.DA = standardna mešanica arabinoze, arabinotrioze in nerazvežanega arabinana, St.SBA = standardna mešanica arabinoze, arabinotrioze in razvežanega arabinana, Blank DA = slepi vzorec s substratom nerazvežani arabinan in brez dodanega encima, Blank SBA = slepi vzorec s substratom razvežani arabinan in brez encima, Ara 2 = reakcijska mešanica nerazvežanega arabinana in encima Ara2_his, Ara 1 = reakcijska mešanica razvežanega arabinana in encima Ara1_his.

Slika 22: S tankoplastno kromatografijo ločeni produkti razgradnje arabinoznih polisaharidov z encimoma Ara_1 in Ara_2

4.5.3 pH-optimum

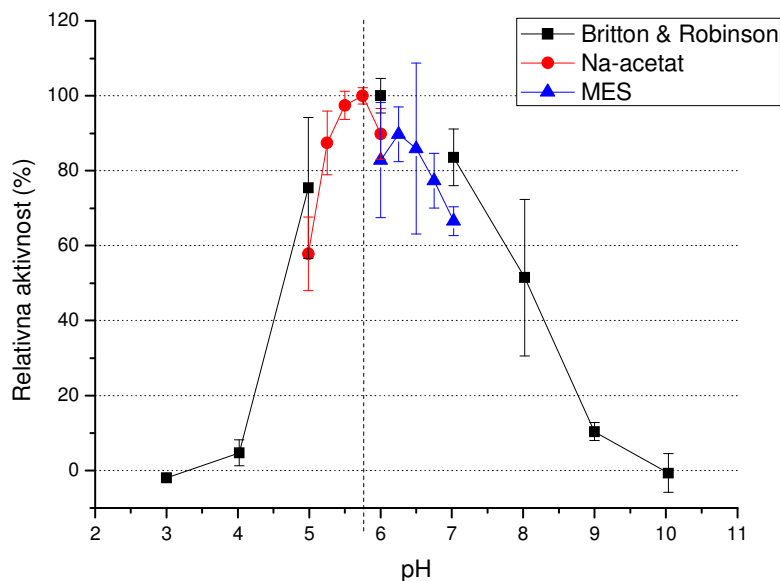
Za encim Ara1_his smo poleg pufrskega sistema Britton in Robinson v območju od pH 6,00 do pH 8,00 za natančno določanje pH-optimuma uporabili pufru 50 mM MES in 50 mM HEPES. Slika 23 prikazuje rezultate določanja pH-optimuma za encim Ara1_his. Iz rezultatov je razvidno, da ima encim Ara1_his optimum delovanja pri pH 6,8 kar je na sliki označeno s črtkano črto. Encim ohrani najmanj 50 % svoje aktivnosti v območju med pH 5,5 in 8.



Britton & Robinson = encimska aktivnost v vzorcih, pripravljenih v pufru po receptu B&R (iz preglednice 15), MES = encimska aktivnost v vzorcih, pripravljenih v pufru MES po receptu iz preglednice 17, HEPES = encimska aktivnost v vzorcih, pripravljenih v pufru HEPES po receptu iz preglednice 18. S črtkano črto je označen pH-optimum encima.

Slika 23: Grafični prikaz encimske aktivnosti očiščenega encima Ara1_his v odvisnosti od pH reakcijske mešanice

Za encim Ara2_his smo poleg pufrskega sistema Britton in Robinson v območju od pH 5,00 do pH 7,00 za natančno določanje pH-optimuma uporabili 50 mM natrijev acetatni pufer in 50 mM pufer MES. Slika 24 prikazuje rezultate določanja pH-optimuma za encim Ara2_his. Iz rezultatov je razvidno, da ima encim Ara2_his optimum delovanja pri vrednosti pH 5,75 in je na sliki označen s črtkano črto. Encim ohrani najmanj 50 % svoje aktivnosti v območju med pH 4,5 in pH 8.



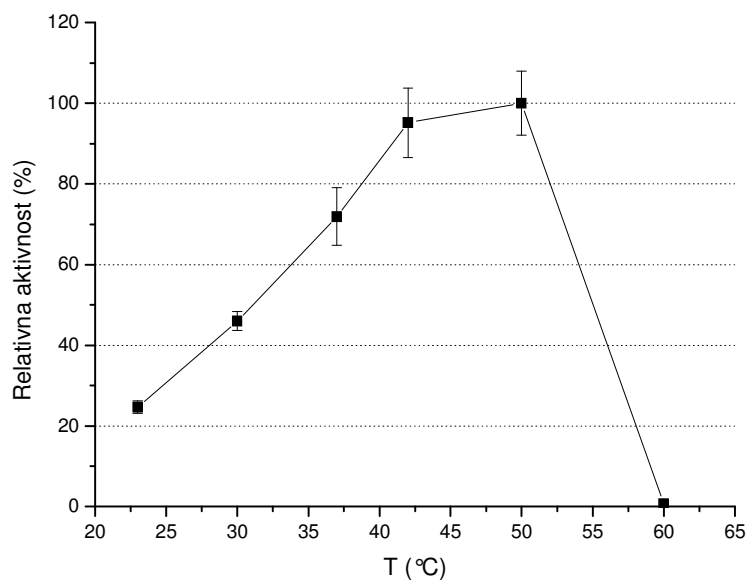
Britton & Robinson = encimska aktivnost v vzorcih, pripravljenih v pufru po receptu B&R (iz preglednice 15), Na-acetat = encimska aktivnost v vzorcih, pripravljenih v Na-acetatnem pufru po receptu iz preglednice 16, HEPES = encimska aktivnost v vzorcih, pripravljenih v pufru HEPES po receptu iz preglednice 18. S črtkano črto je označen pH-optimum encima.

Slika 24: Grafični prikaz rezultatov določanja pH-optimuma za encim Ara2_his

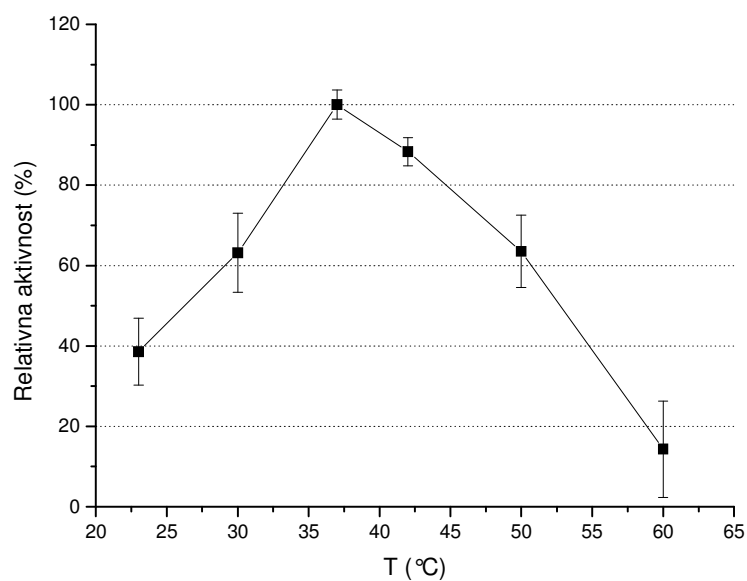
4.5.4 Temperaturni optimum

Slika 25 prikazuje rezultate določanja temperaturnega optimuma za encim Ara1_his. Iz grafa odvisnosti relativne encimske aktivnosti od temperature inkubacije je razvidno, da je temperaturni optimum tega encima 50 °C. Encim ohrani najmanj 50 % svoje aktivnosti v temperaturnem območju med 30 in 50 °C. Encimska aktivnost v temperaturnem območju med 50 in 60 °C strmo upade (pod 10 % relativne aktivnosti pri temperaturi 60 °C).

Slika 26 prikazuje rezultate določanja temperaturnega optimuma za encim Ara2_his. Iz grafa odvisnosti relativne encimske aktivnosti od temperature inkubacije je razvidno, da je temperaturni optimum tega encima 37 °C. Encim ohrani najmanj 50 % svoje aktivnosti v temperaturnem območju med 30 in 50 °C.



Slika 25: Relativna aktivnost encima Ara1_his v odvisnosti od temperature inkubacije reakcijske mešanice



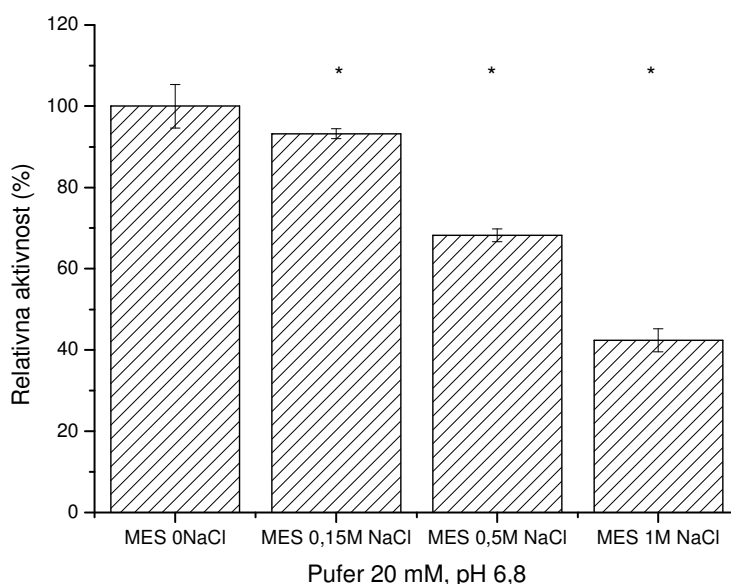
Slika 26: Relativna aktivnost encima Ara2_his v odvisnosti od temperature inkubacije reakcijske mešanice

4.5.5 Vpliv soli, EDTA in Ca^{2+} ionov na encimsko aktivnost

4.5.5.1 Ugotavljanje vpliva ionske moči pufra na encimsko aktivnost

Z dodajanjem soli NaCl k pufru v reakcijskih mešanicah, smo ugotavljali vpliv ionske moči pufra na aktivnost encima.

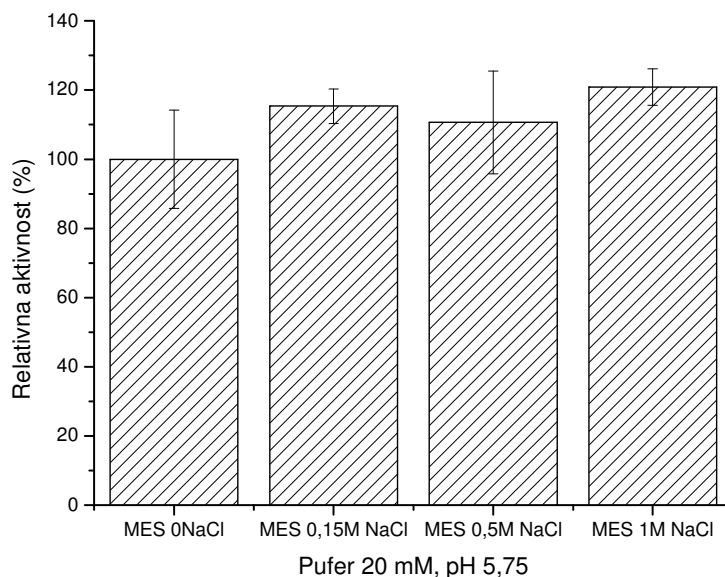
Slika 27 prikazuje rezultate določanja vpliva povečane ionske moči pufra z dodajanjem soli (0-1M NaCl) na aktivnost encima Ara1_his. Kontrolni vzorci so vsebovali samo pufer MES, koncentracije 20 mM in pH 6,8, brez NaCl (MES 0 NaCl na sliki). Rezultati kažejo, da se encimska aktivnost Ara1_his s povečevanjem ionske moči pufra statistično značilno zmanjšuje.



MES 0 NaCl = kontrolna encimska reakcija v pufru MES brez dodatka NaCl, MES 0,15 M NaCl = encimska reakcija v pufru MES s koncentracijo NaCl 0,15 M, MES 0,5 M NaCl = encimska reakcija v pufru MES s koncentracijo NaCl 0,5 M, MES 1 M NaCl = encimska reakcija v pufru MES s koncentracijo NaCl 1 M. Z zvezdico (*) so označene statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno encimsko reakcijo.

Slika 27: Vpliv različnih koncentracij soli na relativno encimsko aktivnost encima Ara1_his

Slika 28 prikazuje rezultate ugotavljanja vpliva dodatka soli in s tem povečanja ionske moči pufra na encimsko aktivnost Ara2_his. Iz grafa je razvidno, da povečanje ionske moči pufra MES s koncentracijo 20 mM in pH 5,75 (v območju do 1M NaCl) ne vpliva na aktivnost encima Ara2_his, saj razlike v primerjavi s kontrolo brez dodane soli niso statistično značilne.



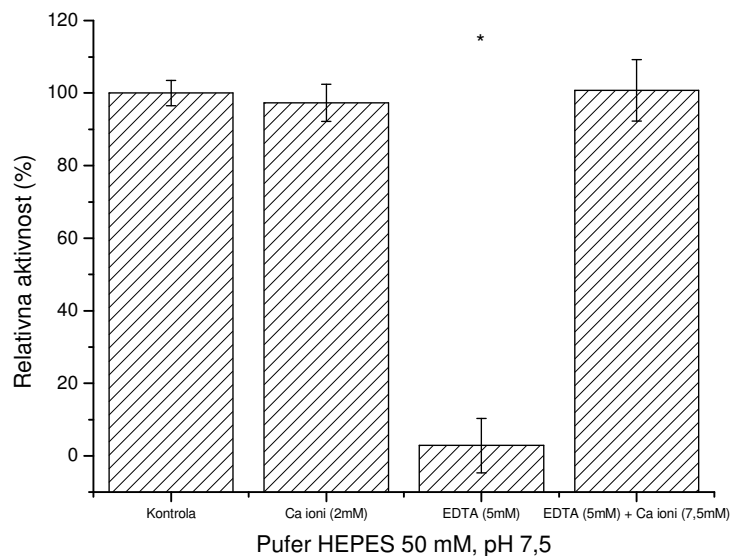
MES 0 NaCl= kontrolna encimska reakcija v pufru MES brez dodatka NaCl, MES 0,15 M NaCl = encimska reakcija v pufru MES s koncentracijo NaCl 0,15 M, MES 0,5 M NaCl = encimska reakcija v pufru MES s koncentracijo NaCl 0,5 M, MES 1 M NaCl = encimska reakcija v pufru MES s koncentracijo NaCl 1 M.

Slika 28: Vpliv različnih koncentracij soli na relativno encimsko aktivnost Ara2_his

4.5.5.2 Ugotavljanje vpliva EDTA in Ca^{2+} ionov na encimsko aktivnost

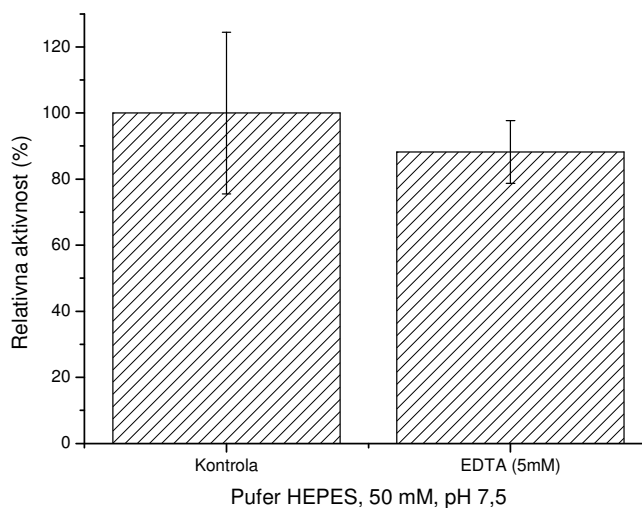
Slika 29 prikazuje graf vpliva EDTA in Ca^{2+} ionov na encimsko aktivnost Ara1_his. Iz njega je razvidno, da dodatek 5 mM EDTA k encimski reakcijski mešanici statistično značilno zmanjša aktivnost encima v povprečju za 97 % v primerjavi s kontrolo. Dodatek Ca^{2+} ionov (2 mM) na encimsko aktivnost v odsotnosti EDTA ne vpliva, v prisotnosti EDTA v reakcijski mešanici pa dodatek Ca^{2+} ionov vrne encimsko aktivnost na raven, ki je enaka kontrolni.

Slika 30 prikazuje graf vpliva EDTA na aktivnost encima Ara2_his iz katerega je razvidno, da dodatek EDTA v reakcijsko mešanico ne vpliva na aktivnost encima, saj ni zaznati statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo.



Kontrola = encimska reakcija brez dodanih Ca^{2+} ionov in EDTA, Ca ioni (2mM) = encimska reakcija z dodanimi Ca^{2+} ioni v koncentraciji 2 mM, EDTA (5mM) = encimska reakcija z dodano EDTA v koncentraciji 5 mM, EDTA (5mM) + Ca ioni (7,5mM) = encimska reakcija z dodanimi EDTA v koncentraciji 5 mM in Ca^{2+} ioni v koncentraciji 7,5 mM. Z zvezdico (*) so označene statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno encimsko reakcijo.

Slika 29: Grafični prikaz rezultatov ugotavljanja vpliva kelatorja EDTA in Ca^{2+} ionov na encimsko aktivnost Ara1_his



Kontrola = encimska reakcija brez dodane EDTA, EDTA (5mM) = encimska reakcija z dodano EDTA v koncentraciji 5 mM.

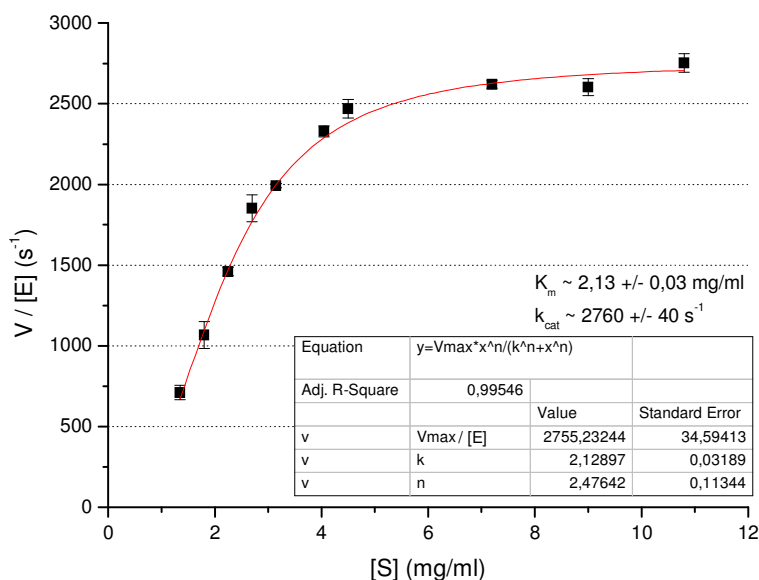
Slika 30: Grafični prikaz rezultatov ugotavljanja vpliva kelatorja EDTA na encimsko aktivnost Ara2_his

4.5.6 Določanje kinetičnih konstant K_m in k_{cat}

Pri določanju kinetičnih konstant encimov Ara1_his in Ara2_his smo uporabili metodo detekcije reducirajočih sladkorjev z reagentom DNS, ki je opisana v poglavju 3.3.4. Dodatne prilagoditve metode pa so opisane v poglavju 3.3.6.6.

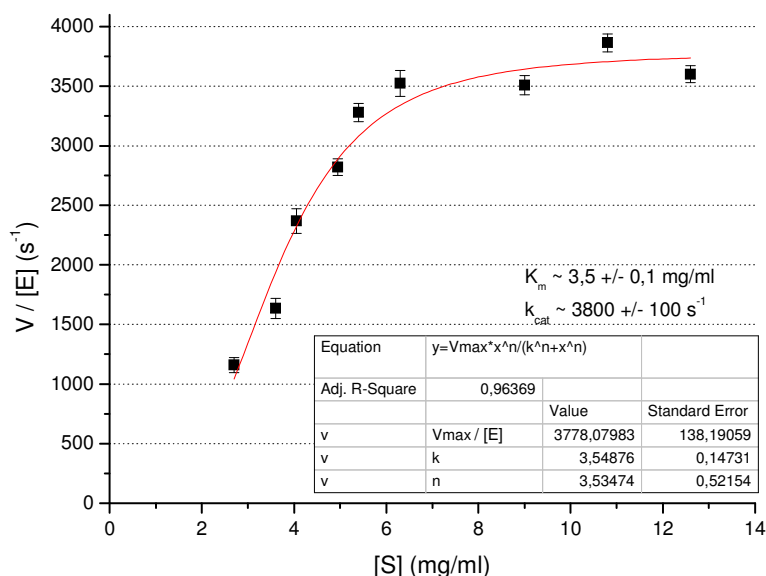
Slika 31 prikazuje graf odvisnosti začetne hitrosti encimske reakcije, normalizirane na koncentracijo encima v reakciji, od koncentracije substrata za encim Ara1_his. Iz slike 31 je razvidno, da smo iz enačbe računalniško izrisane krivulje z najboljšim prileganjem eksperimentalnim podatkom za encim Ara1_his ocenili vrednost K_m na $2,13 \pm 0,03$ mg/ml in k_{cat} na 2760 ± 40 s⁻¹ ($R^2 = 0,99$).

Slika 32 prikazuje graf odvisnosti začetne hitrosti encimske reakcije, normalizirane na koncentracijo encima v reakciji, od koncentracije substrata za encim Ara2_his. Iz enačbe računalniško izrisane krivulje z najboljšim prileganjem eksperimentalnim podatkom, predstavljene na sliki 32, smo za encim Ara2_his ocenili vrednost K_m na $3,5 \pm 0,1$ mg/ml in k_{cat} na 3800 ± 100 s⁻¹ ($R^2 = 0,96$).



V = začetna hitrost encimske reakcije, $[E]$ = koncentracija encima, $[S]$ = koncentracija substrata, K_m = Michaelisova konstanta, k_{cat} = pretvorbena število, v preglednici: Equation = enačba, Adj. R-Square = vrednost R^2 , Value = vrednost, Standard Error = standardni odklon.

Slika 31: Grafični prikaz odvisnosti začetne hitrosti encimske reakcije, normalizirane na koncentracijo encima v reakciji, od koncentracije substrata za encim Ara1_his



V = hitrost encimske reakcije, $[E]$ = koncentracija encima, $[S]$ = koncentracija substrata, K_m = Michaelisova konstanta, k_{cat} = pretvorbno število, v preglednici: Equation = enačba, Adj. R-Square = vrednost R^2 , Value = vrednost, Standard Error = standardni odklon.

Slika 32: Grafični prikaz odvisnosti hitrosti encimske reakcije, normalizirane na koncentracijo encima v reakciji, od koncentracije substrata za encim Ara2_his

4.6 DOLOČANJE MOLEKULSKE MASE Z GELSKO FILTRACIJO

Najprej smo kalibrirali kolono za določanje molekulske mase encimov, da smo pridobili enačbo umeritvene krivulje »10«. Iz porazdelitvenega koeficienta ($y = K_{av}$) smo izračunali neznani molekularni masi izoliranim encimoma. Standardi za kalibracijo metode so globularni proteini, zato dobljeni rezultat držijo ob predpostavki, da sta tudi encima Ara1_his in Ara2_his globularna.

$$y = 2,18065 - 0,35235 \times \log_{10} x \quad (R^2 = 0,996) \quad \dots (10)$$

Preglednica 28: Parametri določanja molekulske mase encimoma Ara1_his in Ara2_his, izračunana in predvidena molekulska masa.

Encim	V_e (ml)	K_{av}	M_w (kDa)	Predvidena M_w z orodjem ProtParam (kDa)
Ara1_his	65,67	0,3199	190,919	124,19
Ara2_his	65,53	0,3182	193,093	111,95

V_e = elucijski volumen v ml, K_{av} = porazdelitveni koeficient, M_w = molekulska masa, kDa = kilo Dalton.

Preglednica 28 prikazuje rezultate izračuna molekulske mase encimov Ara1_his in Ara2_his. Z metodo gelske filtracije smo encimu Ara1_his določili molekulsko maso 190,919 kDa. Določena molekulska masa je od teoretične (izračunane s pomočjo spletnega bioinformatkega orodja ProtParam) večja za 53,7 %. Encimu Ara2_his pa smo na osnovi ločevanja z gelsko filtracijo določili molekulsko maso 193,093 kDa, ki je od teoretične molekulske mase večja za 72,5 %.

5 RAZPRAVA

5.1 BIOINFORMATSKA ANALIZA

Razgradnja rastlinske celične stene je kompleksen proces, pri katerem sodelujejo različni encimi. Med njimi so tudi glikozid hidrolaze, ki so v podatkovni bazi CAZy razvrščene v 135 družin. V družino glikozid hidrolaz 43 je do sedaj uvrščenih 5986 proteinskih zaporedij (Henrissat in sod., 2016). Glede na navedbe podatkovne baze CAZy, je okarakteriziranih le 139 GH43 (Henrissat in sod., 2016). Pri iskanju biokemijskih lastnosti domnevno okarakteriziranih encimov v podatkovni bazi UniProt, smo ugotovili, da je do najvišje 5 stopnje anotiranih le 6 encimov, do 3 ali 4 stopnje pa je anotiranih dodatnih 5 encimov. Stopnja anotacije proteina predstavlja hevristično merilo anotiranih lastnosti pri izbranem vnosu (ang. entry) v podatkovni bazi UniProt. Ocenjuje se jo s pet točkovnim sistemom, pri katerem 1 pomeni najmanj anotiran, 5 pa najbolje anotiran vnos. Izbrana proteina iz bakterije *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 1217, s katerima smo delali v magistrski nalogi (Ara1 in Ara2) in sodita v družino GH43, do sedaj še nista bila okarakterizirana.

V prvem delu magistrske naloge smo se osredotočili na osnovno bioinformatško analizo in na podlagi imen tarčnih genov poiskali osnovne lastnosti njunih produktov, ki smo jih v rezultatih predstavili v preglednicah 22, 23 in 24. Ugotovili smo, da oba gena domnevno kodirata proteina večja od 100 kDa. Produkt gena *ara1* je dolg 1246 aminokislin, kar je, pretvorjeno v teoretično molekulsko maso, približno 130,4 kDa. Produkt gena, ki kodira protein Ara2 pa je dolg 1097 aminokislin in ima teoretično molekulsko maso približno 114,44 kDa. Oba izvorna proteina imata na N-koncu polipeptidne verige signalni peptid in na C-koncu transmembransko domeno. V sekvencah obeh proteinov smo potrdili prisotnost transmembranske domene tudi z orodjem ProtScale. Na podlagi teh podatkov in dejstva, da imata proteina signalni peptid domnevamo, da se po sintezi transportirata iz celice, ob čemer se s transmembransko domeno vsidra v celično membrano. Ugotovitev se sklada z literaturo, ki navaja, da morajo bakterije kompleksne polisaharide najprej encimsko razgraditi na kratkoverižne oligosaharide ali monosaharide, preden lahko ti vstopajo v celice. Zato večina encimov za razgradnjo kompleksnih ogljikovih hidratov vsebuje signalni peptid za izločanje iz bakterijske celice ter transmembransko domeno, ki jih vsidra v membranski del celične stene. Pritrditev encimov na celično steno zagotavlja nastanek razgradnih produktov substrata v neposredni bližini bakterije (El Kaoutari in sod., 2013). Pri iskanju predvidene molekularne funkcije tarčnih proteinov v podatkovni bazi UniProt, smo ugotovili, da gre pri obeh produktih za domnevni hidrolazi, ki hidrolizirata O-glikozidne vezi s čimer sodelujeta pri procesu metabolizma ogljikovih hidratov. To smo potrdili tudi pri analizi domen genov *ara1* in *ara2* med katerimi smo identificirali glikozid hidrolazno domeno iz družine 43 (GH_43). Domene GH_43 so znane po svoji terciarni strukturi zviti v 5-kratni β -propeler (ang. 5-fold β -propeller) s katalitičnim nukleofilom asparaginsko kislino in katalitičnim donorjem protona glutaminsko kislino v aktivnem

centru. Tretji aminokislinski ostanek v aktivnem centru je še ena asparaginska kislina, ki deluje kot modulator pKa in vpliva na protonacijsko stanje ostalih dveh aminokislinskih ostankov (Nurizzo in sod., 2002; Pons in sod., 2004; De Sanctis in sod., 2010). Domena GH_43 se pojavlja v encimih z naslednjimi aktivnostmi: β -ksilozidazno, β -1,3-ksilozidazno, α -L-arabinofuranozidazno, arabinanazno, ksilanazno, galaktan-1,3- β -galaktozidazno, α -1,2-L-arabinofuranozidazno, ekso- α -1,5-L-arabinofuranozidazno in ekso- α -1,5-L-arabinanazno (Henrissat in sod., 2016). Podatke o biokemijski karakterizaciji smo uspeli najti za 13 encimov s katalitično domeno GH_43 in sicer za eno α -L-arabinofuranozidazo (Morales in sod., 1995), devet različnih α -1,5-L-arabinanaz (McKie in sod. 1997; Skjot in sod. 2001; Takao in sod. 2002; Leal, 2004; Inacio in de Sa-Nogueira, 2008; Squina in sod., 2010; Shulami in sod., 2011; Sakamoto in sod., 2012; Shi in sod. 2014), eno ekso- α -1,5-L-arabinofuranozidazo (Matsuo in sod. 2000), eno β -1,3-ksilozidazo (Umemoto in sod., 2008) in eno arabinoksilan α -L-1,3-arabinofuranohidrolazo (Burgois in sod., 2007). Poleg katalitične domene, se v obeh proteinskih sekvencah nahajata še domeni Laminin_G_3 in bakterijska domena, s strukturo podobno imunoglobulinom (Ig), Big_4 (ang. »Bacterial Ig-related«, IPR011081). Pri iskanju informacij o domeni Laminin_G_3 (PF13385) v podatkovnih bazah InterPro in Pfam (EMBL-EBI) smo ugotovili, da spada v naddružino domen, značilnih za lektine, podobne konkanavalinu A in nekatere glukanaže (ang. »Concanavalin A-like lectin/glucanase«, IPR013320, CL0004). Ta vsebuje 25 različnih družin, večinoma gre za ogljikohidrat-vezavne in glikozid hidrolazne domene. Za to naddružino je značilna struktura sendviča z 12-14 beta zavoji in 2 listoma. Glede na navedbe v opisu domene v podatkovni bazi InterPro, lahko domene Laminin_G najdemo v mnogih zunajceličnih proteinih. Proteini, ki vsebujejo domeno Laminin_G imajo lahko zelo različne vloge. Pogosto se nahajajo v proteinih, ki so pomembni pri celični adheziji, signaliziranju, migraciji in diferenciaciji. Natančnejše informacije o funkciji domene Laminin_G_3 še niso znane. Funkcije domene Big_4 prav tako še niso znane. Po navedbah v podatkovni bazi InterPro, jo pogosto najdemo v proteinih, ki se nahajajo na bakterijski površini. Pri iskanju najbolj podobnih sekvenc domenam Laminin_G_3 in Big_4 z algoritmom BLASTp smo ugotovili, da so med prvimi zadetki v podatkovni bazi NCBI nr proteini z glikozid hidrolazno aktivnostjo iz različnih vrst rodu *Bifidobacterium*, iz česar sklepamo, da se omenjene domene pogosto pojavljajo v teh encimih in imajo glede na ohranjenost predvidoma neko pomembno funkcijo, katere pa iz znanih virov ne moremo natančno določiti. V proteinskem zaporedju Ara1 pa najdemo tudi domeno FIVAR (ang. »Found in various architectures«, IPR011490), ki se prav tako, kot domena Big_4, pojavlja v proteinih, povezanih s celično steno. Predvidevajo, da je vezavna domena, saj nima do sedaj poznanih katalitičnih aminokislinskih ostankov (InterPro).

Pri bifidobakterijah se geni za razgradnjo polisaharidov pogosto nahajajo v genskih gručah, ki kažejo ohranjeno modularno zgradbo. Običajno so sestavljene iz represorskega proteina tipa *LacI*, oligosaharidnega prenašalca in od 1 do 6 genov za glikozid hidrolaze (Schell in sod., 2002). Z bioinformatičnimi analizami smo poiskali podatke o genih, ki se nahajajo v

okolici tarčnih genov *ara1* in *ara2* in jih predstavili v preglednici 25. Zanimalo nas je namreč, ali sta morda tudi izbrana gena del genske gruče za razgradnjo polisaharidov podobne sestave. Ugotovili smo, da se v neposredni bližini izbranih genov nahajajo še trije geni, ki kodirajo domnevne glikozid hidrolaze z ohranjeno domeno GH_43. Sklepamo, da ti geni kodirajo encime, ki verjetno sodelujejo pri postopni razgradnji kompleksnih polisaharidnih substratov. Vsi od skupno petih genov z ohranjeno domeno GH_43 vsebujejo še dodatne domene. Pri štirih od petih genov najdemo domeno Laminin_G_3. Pogosto se pojavlja tudi domena Big različnih skupin (2, 3 in 4). Druge domene, ki so ohranjene v genih so še Sialidaza, FIVAR in Laminin_G_2. Domena iz družine Sialidaz (IPR026856) je, glede na navedbe iz podatkovne baze InterPro, vključena v hidrolizo α -2,3-, α -2,6- in/ali α -2,8- glikozidnih vezi terminalnih ostankov sialične kisline v oligosaharidih, glikoproteinih, glikolipidih in sintetičnih substratih. Identificirali smo tudi dva gena, ki kodirata domnevna prenašalca oligosaharidov tipa ABC. Poleg genov za prenašalca se v gruči nahaja še gen za transkripcijski regulator, z ohranjeno domeno podobno *LacI*. Na podlagi tega sklepamo, da gen verjetno kodira represorski protein z lastnostmi represorskega proteina tipa *LacI*, ki se pogosto nahaja v genskih gručah za razgradnjo polisaharidov pri bifidobakterijah. Gruča genov v kateri se nahajata gena *ara1* in *ara2* je torej sestavljena iz skupno devetih genov in kaže podobnosti s predvideno ohranjeno organizacijo genskih gruč za razgradnjo polisaharidov (»PUL«) pri bakteriji *B. longum* (Schell in sod., 2002). Schell in sod. (2002) so pri genomskem sekvenciranju in analizi genoma *B. longum* identificirali sedem genskih gruč za razgradnjo različnih oligosaharidov, na podlagi katerih so sklepali na ohranjeno organizacijo »PUL«.

5.2 HETEROLOGNO IZRAŽANJE

Oba tarčna proteina v izvorni obliki vsebujeta transmembransko domeno na C-koncu in signalni peptid na N-koncu polipeptidne verige. V plazmide za heterologno izražanje genov *ara1* in *ara2* sta bila klonirana gena brez teh dveh domen, ker sta za namen heterolognega izražanja nepotrebni. Na N-konec nukleinskega zaporedja za kloniranje je bila dodana histidinska oznaka (6xHis), ki je omogočila izolacijo tarčnih proteinov z afinitetno kromatografijo z imobiliziranimi Ni^{2+} ioni. Heterologno izražena proteina imata zaradi opisanih modifikacij krajšo aminokislinsko verigo: z orodjem ProtParam smo za protein Ara1_his določili teoretično molekulsko maso 124,19 kDa, za protein Ara2_his pa 111,96 kDa. Pri bioinformatiki analizi nukleotidne sekvence smo ugotovili, da obe sekvenci vsebujeta nekatere za *E. coli* redke kodone hkrati pa sta oba produkta relativno velika. Oboje lahko pri heterolognem izražanju povzroča težave, kot so nizka raven izražanja, nepravilno zvitje proteina v ekspresijskem sevu in slaba aktivnost encima (Rosano in Ceccarelli, 2014). Da bi se temu izognili, smo preizkusili dva različna ekspresijska seva *E. coli* in sicer BL21(DE3) in Rosetta. Sev *E. coli* BL21(DE3) je najpogostejše uporabljan sev za heterologno izražanje proteinov (Rosano in Ceccarelli, 2014). Izraža T7 polimerazo, katere izražanje se sproži z dodatkom IPTG v gojišče.

Primeren je za izražanje genov, katerih produkti niso strupeni za *E. coli*. Sev *E. coli* Rosetta je primeren za izražanje genov s kodoni, ki se redko pojavljajo pri *E. coli* (manj kot 1 % frekvenca pojavljanja) (Rosano in Ceccarelli, 2014). Ta sev ima dodaten plazmid, ki kodira tRNK molekule za kodone AUA, AGG, AGA, CUA, CCC in GGA ter gen za kloramfenikolno rezistenco (Novagen, 2016). Za sev BL21(DE3) smo se odločili, ker je najpogostejše uporabljan sev za heterologno izražanje (Rosano in Ceccarelli, 2014). Hkrati pa smo transformirali še sev Rosetta zato, ker nismo bili prepričani ali bodo redki kodoni, ki se pojavljajo v genskih zapisih, predstavljali težavo pri izražanju proteinov. Gen *ara1* vsebuje namreč 18 za *E. coli* redkih kodonov, gen *ara2* pa 22 (Preglednica 22). Uspešnost transformacije ekspresijskih sevov s plazmidi z vstavljenimi tarčnimi geni smo potrdili z vidnimi kolonijami na trdnem gojišču LB z antibiotikom, ki zavira rast bakterij, ki niso privzele plazmida s tarčnim genom in genom za odpornost na kanamicin. Pri poskusnem izražanju v sevu *E. coli* BL21(DE3) smo na gelu SDS-PAGE (Slika 13) potrdili izražanje obeh tarčnih genov, saj sta se v obeh vzorcih kulture po indukciji z IPTG (100 mM) in 4-urni inkubaciji pri temperaturi 30 °C na gelu pojavili novi lisi, ki sta bili v okviru ocenjene teoretične molekulske mase izbranih proteinov. V vzorcih kulture, ki so bili odvzeti pred indukcijo izražanja genov, teh lis nismo zaznali. Pri proteinu Ara1_{his} smo novo liso v vzorcu po inkubaciji opazili pri velikosti približno 116 kDa, kar je za 6,5 % manj kot je teoretična molekulska masa proteina (124 kDa) (Slika 13). Pri proteinu Ara2_{his} pa smo novo liso na gelu opazili pri velikosti približno 100 kDa, kar je za 10,7 % manj kot je predvidena teoretična molekulska masa proteina 112 kDa (Slika 13). Domnevamo, da je do odstopanj, ki jih opazimo na gelu, prišlo zaradi nepopolnega razvitja proteinov ali pa vpliva aminokislinske sestave proteinov na vezavo SDS (Rath in sod., 2009). Na gelu smo tudi potrdili, da se izražen protein nalaga znotraj celic (nova lisa se je pojavila v proteinskih izolatih iz celičnega sedimenta), kar smo pričakovali zaradi manjkajoče signalne sekvence za izločanje proteinov iz celice. Ali v celicah nastajata aktivna proteina smo v vzorcih poskusnega izražanja preverili z analizo sproščanja reducirajočih sladkorjev v reakcijski mešanici arabinoznih substratov in izoliranih proteinov. Aktivnost obeh heterologno izraženih encimov smo posredno potrdili v vzorcih proteinov, izoliranih iz sedimentov celic, ki so ju izražale. Pri kulturi, transformirani s plazmidom, ki je kodiral protein Ara1_{his}, smo zaznali aktivnost na substratu razvejani arabinan (Preglednica 27). Pri kulturi, ki je izražala protein Ara2_{his}, pa smo encimsko aktivnost zaznali na substratu linearni arabinan (Preglednica 27). Na podlagi teh podatkov smo zaključili, da pri heterolognem izražanju proteinov brez signalne sekvence v celicah niso nastala inkluzijska telesca in se v pogojih, ki smo jih uporabili v poskusu, oba proteina zvijeta v aktivno obliko.

Iz rastnih krivulj transformiranih sevov (Slika 14) je razvidno, da je ekspresijski sev *E. coli* BL21(DE3) rasel hitreje kot sev Rosetta ne glede na to, kateri tarčni protein je izražal. Razliko v hitrosti rasti lahko najverjetneje pripišemo lastnostim sevov. Sev Rosetta je namenjen izražanju proteinov, ki vsebujejo večje število za *E. coli* redkih kodonov, saj

izraža molekule tRNK za te redke kodone (Novagen, 2016). Domnevamo, da se zaradi vložka energije v izdelavo dodatnih tRNK molekul, ta sev deli z manjšo frekvenco kot sev BL21(DE3).

Iz bioprocesne brozge (kultur ekspresijskih sevov) smo v skupno sedmih korakih zaključnih procesov pridobili končna produkta – encima Ara1_his in Ara2_his. Blokovna shema bioprocesa je priložena v prilogi A. Celični sediment po prvem centrifugiranju smo razbili z mehansko homogenizacijo s tlačnim celičnim homogenizatorjem. Naprej smo nadaljevali z metodo afinitetne kromatografije s supernatantom celičnega homogenata po centrifugiranju, ki smo ga nanegli na kolono za ločevanje proteinov, označenih s histidinsko oznako. Afinitetno kromatografijo smo izvedli dvakrat, saj smo se tako znebili nekaterih dodatnih nečistoč, ki se pri prvi kromatografiji zaradi prevelike količine proteinov v koloni niso dobro sprale v koraku pred elucijo. Po prvi afinitetni kromatografiji smo z analizo frakcij na gelu (SDS PAGE) ugotovili, da zbrane začetne frakcije nevezanih proteinov (»FT« vzorec iz koraka nalaganja vzorca na kolono) še vedno vsebujejo veliko tarčnega proteina (slike gelov niso priložene). Zaradi tega smo pri izvedbi druge kromatografije na kolono, poleg izbranih elucijskih frakcij, naložili tudi te frakcije. Z metodo gelske filtracije smo nato dokončno izolirali tarčna proteina. Tekom čiščenja smo z metodo detekcije reducirajočih sladkorjev ugotovili, da se je specifična encimska aktivnost v vzorcih po koncu čiščenja v primerjavi z vzorci na začetku povečala. Pri proteinu Ara1_his se je specifična encimska aktivnost povečala za 39-krat (iz 24,1 +/- 0,4 na 940,7 +/- 116,5 UI/mg proteinov) (Slika 19), pri proteinu Ara2_his pa za 51-krat (iz 8,4 +/- 0,1 na 426,7 +/- 3,2 UI/mg proteinov) (Slika 20). S spremljanjem količine celokupnih proteinov v vzorcih pa smo (pričakovano) ugotovili, da se ta tekom zaključnih procesov zmanjša v vzorcih obeh tarčnih proteinov (Sliki 19 in 20). Na podlagi rezultatov spremljanja encimske aktivnosti v vzorcih iz različnih stopenj čiščenja in koncentracije proteinov v končnem produktu, smo zaključili, da smo z izbranim postopkom uspešno proizvedli in očistili tarčna proteina. Pridobili smo zadostno količino očiščenih aktivnih tarčnih proteinov za izvedbo vseh predvidenih metod karakterizacije.

5.3 BIOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA

Na podlagi vrst substratov, ki jih hidrolizirajo do sedaj okarakterizirani encimi iz družine GH43, smo se odločili, da pri testih encimske aktivnosti uporabimo naslednje substrate: razvejani, nerazvejani in linearni arabinan, arabinoksilan ter arabski gumi. Razvejani, nerazvejani in linearni arabinan so izolirani iz kaše sladkorne pese in se med seboj razlikujejo po razvejanosti glavne verige. V specifikacijskem listu substrata razvejani arabinan je navedeno, da je sestavljen iz glavne verige arabinoznih monosaharidov, med sabo povezanih z α -1,5 vezmi, na njo pa so z α -1,3 vezmi (možne so redke α -1,2 vezi) pripeti L-arabinofuranozni ostanki (Arabinan, 2016). Proizvajalec navaja, da je približno 60 % glavne verige substituirane z enojnimi arabinofuranoznimi skupinami, vezanimi z α -

1,3 vezmi. Razvejani arabinan vsebuje arabinozo (88 %), galaktozo (3 %), ramnozo (2 %) in galakturonsko kislino (7 %) (Arabinan, 2016). Nerazvejani arabinan je pripravljen iz razvejanega tako, da z encimom α -L-arabinofuranozidazo odstranijo vse arabinozne ostanke, vezane z α -1,2 in α -1,3 vezmi. Nerazvejani arabinan vsebuje arabinozo (71 %), galaktozo (26 %) in ramnozo (3 %) (Debranched arabinan, 2016). Linearni 1,5- α -L-arabinan (linearni arabinan) pa je ločen od nerazvejanega z ionsko izmenjevalno kromatografijo, s katero odstranijo nabito pektinsko frakcijo. 97,5 % linearnega arabinana sestavlja arabinoza (Linear arabinan, 2016). Pri testiranju encimske aktivnosti v proteinskih izolatih iz poskusnega eksperimenta smo preizkusili tudi substrat arabinoksilan, vendar pri izbranih pogojih encimske reakcije nismo zaznali aktivnosti v nobenem od vzorcev. Arabski gumi smo uporabili zaradi njegove kompleksne sestave, ki vsebuje arabinogalaktane. Preveriti smo želeli, ali sta encima sposobna prepoznave in razgradnje kompleksnejšega substrata. Pri ugotavljanju na kakšnih substratih sta izolirana encima aktivna smo ugotovili, da je encim Ara1_his kataliziral le hidrolizo razvejanega arabinana (Slika 21). V reakciji smo izmerili specifično encimsko aktivnost 1338,6 $\pm$ 8,0 IU/mg proteinov. Pri enakih pogojih nismo zaznali encimske aktivnosti na linearnem in nerazvejanem arabinanu, niti na bolj kompleksnem arabskem gumiju, ki vsebuje arabinogalaktan. Odsotnost aktivnosti na linearnem in nerazvejanem arabinanu kaže, da encim ni sposoben cepiti α -1,5 vezi. Glede na lastnosti razvejanega arabinana, navedene v specifikacijskem listu sklepamo, da encim cepi α -1,3 vezi in/ali morebitne α -1,2- vezi, ki se pojavljajo v substratu. Iz tega sklepamo, da je encim Ara1_his najverjetneje arabinofuranozidaza. Pri določanju produktov razgradnje tarčnih substratov s tankoplastno kromatografijo smo ugotovili, da encim Ara1_his iz substrata razvejani arabinan sprošča samo monosaharide arabinoze (Slika 22). Encim Ara1_his je torej predvidoma zunajcelična α -L-arabinofuranozidaza s katalitsko domeno iz družine GH43.

Pri encimu Ara2_his smo encimsko aktivnost zaznali na substratih linearni arabinan in nerazvejani arabinan (Slika 21). Pri spremljanju hidrolize substrata linearni arabinan smo izmerili specifično encimsko aktivnost 557,2 $\pm$ 44,1 IU/mg proteinov, na substratu nerazvejani arabinan pa 1274,2 $\pm$ 36,1 IU/mg proteinov. Rezultati določanja specifične encimske aktivnosti torej kažejo, da encim Ara2_his učinkoviteje razgrajuje nerazvejani arabinan. Encimske aktivnosti nismo zaznali na razvejanem arabinanu in arabskem gumiju. Iz rezultatov lahko sklepamo, da encim Ara2_his cepi le α -1,5 vezi glavne polisaharidne verige v substratu in je predvidoma α -1,5-L-arabinanaza. Pri določanju produktov razgradnje nerazvejanega arabinana s tankoplastno kromatografijo smo ugotovili, da pri tem nastajajo samo monosaharidi (Slika 22). Iz tega sklepamo, da encim Ara2_his substrat cepi s koncev verige (je ekso-aktiven). Glede na strukturno podobnost z nerazvejanim arabinanom sklepamo, da je končni produkt encimskega delovanja na linearnem arabinanu enak kot v primeru nerazvejanega arabinana (produktov razgradnje pa nismo posebej analizirali). Encim Ara2_his torej lahko okarakteriziramo kot zunajcelično ekso-1,5- α -L-arabinanazo, s katalitsko domeno, ki spada v družino GH43. Arabinogalaktan je zaradi

svoje strukturne kompleksnosti težko razgradljiv polisaharid. Za razgradnjo arabinogalaktana tipa I je potrebno sodelovanje več različnih encimov, kot so endo-galaktanaze, ekso-galaktanaze, endo-arabinanaze in arabinofuranozidaze (Huisman in sod., 1999). Za razgradnjo arabinanov pa sta potrebni le dve vrsti encimov. α -L-arabinanaze hidrolizirajo glavno verigo α -1,5 vezanih arabinofuranoznih ostankov, α -L-arabinofuranozidaze pa hidrolizirajo stranske ostanke, vezane z α -1,3 in α -1,2- vezmi. Pri njunem delovanju se iz substrata sproščajo monosaharidi arabinoze in/ali arabino-oligosaharidi (Kaneko in sod., 1998; Sogabe in sod., 2011). α -L-arabinofuranozidaze najdemo med glikozid hidrolazami iz družin 43, 51, 54 in 62 (Cantarel in sod., 2009). α -L-arabinanaze, glede na razlike v aminokislinskih sekvencah razvrščajo v dve družini glikozid hidrolaz: GH43 in GH93 (Henrissat in Davies, 1997). Ločimo endo-aktivne encime, ki sproščajo arabino-oligosaharide in ekso-aktivne encime, ki iz arabinozne verige sproščajo monosaharide (Inacio in de Sa-Nogueira, 2008).

Bioinformatična analiza je pokazala, da se gena, ki kodirata encima Ara1 in Ara2 nahajata v genski gruči, v njuni bližini pa se nahajajo še trije geni, ki domnevno kodirajo katalitsko domeno GH_43. Če te rezultate povežemo z ugotovitvami, da izbrana encima razgrajujeta le strukturno manj kompleksne polisaharide arabinana, lahko predpostavimo, da verjetno ostali geni v genski gruči kodirajo encime, ki so sposobni razgradnje kompleksnega osnovnega substrata, iz katerega sprostijo polisaharide arabinana. Gena na prvem in drugem mestu pred izbranim genoma kodirata zapisa za proteina, večja od naših dveh in vsebujeta še dodatne domene, ki jih v genih za proteina Ara1 in Ara2 ne najdemo. Produkt gena, ki sledi *ara1* in *ara2*, pa jima je po domenski sestavi bolj podoben. Na podlagi tega bi lahko predpostavili, da kompleksni osnovni substrat, predvidoma arabinogalaktan, najprej razgradijo nekateri od ostalih, v genski gruči prisotnih encimov, nato pa produkte razgradnje, predvidoma različne arabinozne polisaharide ali oligosaharide, dokončno razgradita encima Ara1 in Ara2. Za potrditev te domneve bi bila potrebna biokemijska karakterizacija ostalih proteinov iz gruče. Podobno strategijo razgradnje kompleksnih arabinoznih polisaharidov so predvideli pri bakteriji *Bacillus subtilis*. Razvejani arabinan zunaj celice razgradijo encimi arabinanaze in arabinofuranozidaze na manjše oligosaharide in/ali monosaharide, ki nato preko transporterjev vstopijo v bakterijsko celico, kjer znotrajcelični encimi razgradijo oligosaharide na monosaharide (Inacio in de Sa-Nogueira, 2008).

Karakterizacija encimov Ara1_{his} in Ara2_{his}, izvedena v okviru opisanega eksperimentalnega dela, je obsegala ugotavljanje pH in temperaturnega optima, odvisnosti aktivnosti encimov od ionske moči pufr, potrebo encimov po Ca^{2+} ionih ter določanje encimsko kinetičnih konstant (K_m in k_{cat}). Rezultate določanja biokemijskih lastnosti smo primerjali z do sedaj objavljenimi podatki. V podatkovni bazi CAZy je navedeno, da je v družini GH43 okarakteriziranih 139 glikozid hidrolaz (Henrissat in sod., 2016). Glede na to, da ta družina vsebuje poleg arabinofuranozidaz in arabinanaz še β -

ksilozidaze, β -1,3-ksilozidaze, ksilanaze in galaktan 1,3- β -galaktozidaze, smo te izvzeli iz analize in za primerjavo z izbranimi encimoma uporabili le podatke prvih dveh. Na podlagi podatkov za arabinofuranozidaze in arabinanaze iz podatkovne baze UniProt in v objavljenih člankih, smo sestavili pregled biokemijskih lastnosti karakteriziranih encimov, ki je predstavljen v preglednici v prilogi D. Pri pregledu podatkov o splošnih biokemijskih značilnostih arabinofuranozidaz in arabinanaz iz podatkovnih baz smo ugotovili, da so določene le za 10 encimov (od tega 2 arabinofuranazama in 8 arabinanazam). Dva encima izhajata iz evkarionstkih organizmov, in sicer iz organizma *Aspergillus aculeatus* in *Penicillium chrysogenum*, vsi ostali pa so iz prokariotskih organizmov (*Bacillus subtilis*, *Cellvibrio japonicus*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Streptomyces chartreusis*, *Thermotoga petrophila* in *Thermotoga thermarum*).

Izolirana encima Ara1_{his} in Ara2_{his} se med seboj razlikujeta v pH-optimumih delovanja. Encim Ara1_{his} ima optimum pri pH 6,8 ter ohrani 50 % aktivnost v območju med pH 5,5 in 8 (Slika 23). Encim Ara2_{his} pa ima optimum pri pH 5,75 in ohrani 50 % encimske aktivnosti v območju med pH 4,5 do 8 (Slika 24). Iz primerjave z okarakteriziranimi encimi, predstavljenimi v preglednici v prilogi D je razvidno, da sta optimalni vrednosti pH obeh encimov podobni, kakor pri do sedaj opisanih encimih z enakimi aktivnostmi (med pH 5,5 do 7). Do sedaj najnižji pH-optimum je bil določen za encim endo- α -1,5-L-arabinanazo iz *Aspergillus aculeatus* (pH 5,5) (Skjot in sod., 2001). Encim Ara2_{his} je v primerjavi z encimi, navedenimi v prilogi D, drugi okarakteriziran encim, ki ima optimum delovanja pod pH 6. Najvišja pH-optimuma med do sedaj opisanimi encimi, ki razgrajujejo arabinozne substrate iz družine GH43 (pri pH 7) imata encima endo- α -1,5-L-arabinanaza iz *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (Inacio in de Sa-Nogueira, 2008) in ekso- α -1,5-L-arabinofuranozidaza II iz *Streptomyces chartreusis* (Matsuo in sod., 2000). Encim Ara1_{his} z optimumom delovanja pri pH 6,8 uvrstimo med encime z nevtralinim optimumom delovanja (med 6,5 in 7), v kateri je do sedaj že pet okarakteriziranih arabinanaz in arabinofuranozidaz iz družine GH43, ki razgrajujejo arabinozne substrate.

Pri določanju temperaturnega optimuma encima Ara1_{his} smo ugotovili, da je njegova aktivnost najvišja pri temperaturi 50 °C in nato med 50 °C in 60 °C pade za 99 % (Slika 25). Naglo zmanjšanje encimske aktivnosti pri temperaturah nad 50 °C je posledica izgube aktivnosti zaradi temperaturno odvisnih sprememb terciarne strukture encima. Podobno kot v primeru Ara1_{his}, so za encim endo- α -1,5-L-arabinanaza iz bakterije *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ugotovili temperaturni optimum pri 50 °C, pri temperaturi 60 °C pa aktivnost encima pade na 15 % (Ignacio in Sa Noguera, 2008). Aktivnost encima Ara2_{his} je najvišja pri temperaturi 37 °C (Slika 26). Pri nadaljnjem povečevanju temperature inkubacije encimske reakcije je aktivnost padala in pri temperaturi 60 °C padla za 80 % v primerjavi z aktivnostjo pri temperaturnem optimumu. Izmerjeni temperaturni optimum encima Ara2_{his} je najnižji do sedaj določen optimum med encimi v družini GH43, ki so

predstavljeni v preglednici iz priloge D. Najnižja do sedaj izmerjena optimalna temperatura delovanja po aktivnosti podobnih encimov je 50 °C pri encimih endo- α -1,5-L-arabinanaza (*Aspergillus aculeatus*, Skjot in sod., 2001), endo- α -1,5-L-arabinanaza (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, Inacio in de Sa-Nogueira, 2008) in exo- α -1,5-L-arabinofuranozidaza II (*Streptomyces chartreusis*, Matsuo in sod., 2000). Do sedaj objavljena zgornja meja temperaturnega optimuma encimov, ki so podobni našima, je 75 °C (endo-arabinanaza, *Thermotoga thermarum* (Shi in sod., 2014)). Oba preučevana encima v primerjavi z 10 do sedaj okarakteriziranimi encimi, spadata med encime z najnižjim temperaturnim optimumom. Encima sta zaradi te lastnosti posebej zanimiva za uporabo pri biotehnoloških procesih, ki temeljijo na razgradnji polisaharidov iz rastlinskih celičnih sten, saj lahko procese vodimo pri nižjih temperaturah, kot bi jih v primeru uporabe ostalih navedenih okarakteriziranih encimov.

Pri ugotavljanju občutljivosti izoliranih encimov na ionsko moč pufru smo ugotovili, da aktivnost encima Ara1_his statistično značilno pada s povečevanjem ionske moči pufru (Slika 27). Pri koncentraciji NaCl 1 M (v pufru MES s pH 6,8) je aktivnost encima padla za 58 % v primerjavi z aktivnostjo izmerjeno v pufru brez dodanega NaCl. Domnevamo, da spreminjanje ionske moči pufru vpliva na fizikalno-kemijske lastnosti aktivnega mesta encima in s tem posledično na njegovo aktivnost. Ionska sestava pufru lahko direktno vpliva na katalitični proces encimske reakcije tako, da ali zagotavlja potrebne kofaktorje ali pa jih odvzame (Bisswagner, 2014). Po drugi strani ionska moč pufru vpliva na naboj aminokislinskih ostankov v aktivnih mestih encimov, kjer je kataliza pogojena s prenosom nabitih molekul ali skupin (Chaplin in Bucke, 1990). Pri encimu Ara2_his v pogojih eksperimenta nismo dokazali vpliva ionske moči pufru na aktivnost (Slika 28).

Značilna struktura katalitične domene GH43 je 5-kratni β -propeler z votlino skozi sredino proteina (Slika 4). Aktivno mesto se nahaja znotraj omenjene votline in ga sestavljata dva aminokislinska ostanka asparaginske kisline in en ostanek glutaminske kisline, ki so ohranjeni pri vseh encimih, uvrščenih v družine GH32, 43, 62 in 68 (Pons in sod., 2004; de Sanctis in sod., 2010). Pri nekaterih do sedaj okarakteriziranih encimih iz družine GH43 so ugotovili, da je njihova encimska aktivnost odvisna od prisotnosti ionov, najpogosteje dvovalentnega iona Ca^{2+} , ki se nahaja znotraj votline blizu aktivnega mesta encima (Nurizzo in sod., 2002; Alhassid in sod., 2009; de Sanctis in sod., 2010; McVey in sod., 2014). Z dodatkom kelatorja EDTA v encimsko reakcijo smo želeli ugotoviti, ali je aktivnost encimov Ara1_his in Ara2_his odvisna od prisotnosti ionov. Na podlagi dosedanjih objav smo se odločili, da preizkusimo tudi vpliv dodatka Ca^{2+} ionov v reakcijsko mešanico. Ob dodatku kelatorja EDTA (5 mM) v reakcijsko mešanico je encimska aktivnost Ara1_his padla za več kot 80 % (Slika 29). Po dodatku kalcijevih ionov v prebitku (v reakcijsko mešanico encima in EDTA), pa se je aktivnost encima povrnila nazaj na začetno raven. Padec encimske aktivnosti ob dodatku kelatorja EDTA nam je pokazal, da so za encimsko aktivnost potrebni dvovalentni ioni. Z dodatkom

kalcijevih ionov v reakcijsko mešanico, se je encimska aktivnost povrnila na prvotni nivo, s čimer smo pokazali, da encim Ara1_his za svojo aktivnost potrebuje kalcijeve ione. Prisotnost Ca^{2+} ionov predvidoma prispeva k stabilnosti β -propelerske strukture encima in pomembno vpliva na aktivnost encima (de Sanctis in sod., 2010; McVey in sod., 2014). Ugotovljeno je bilo, da ob mutaciji histidinskega ostanka, ki se nahaja znotraj votline blizu aktivnega mesta encima, v alanin ali glutamin, mutantam signifikantno pade encimska aktivnost v primerjavi z divjim tipom ali pa je popolnoma izgubljena. Pri mutantah niso našli Ca^{2+} ionov v bližini aktivnega mesta znotraj votline v β -propelerski strukturi (de Sanctis in sod., 2010). Histidinski ostanek blizu aktivnega mesta in Ca^{2+} ion predvidoma zagotavljata ustrezno protonacijsko stanje katalitičnih ostankov in s tem vplivata na encimsko aktivnost in učinkovitost (McVey in sod., 2014). Pri encimu Ara2_his dodatek EDTA (5 mM) v reakcijsko mešanico ni spremenil encimske aktivnosti v statistično značilni meri, iz česar smo sklepali, da ta encim za svojo aktivnost ne potrebuje ionov, ki jih nase veže EDTA (Slika 30). Primerjava ugotovitev s podatki, zbranimi v preglednici iz priloge D, kaže, da se odvisnost encimske aktivnosti od Ca^{2+} ionov pogosto pojavlja pri encimih, ki imajo temperaturne optimume nad 60 °C. Pri treh okarakteriziranih arabinanazah iz termofilnih organizmov so pokazali odvisnost encimske aktivnosti od prisotnosti Ca^{2+} ionov (*Geobacillus thermodenitrificans* (Takao in sod., 2002), *Thermotoga petrophila* (Squina in sod., 2010) in *Thermotoga thermarum* (Shi in sod., 2014)). Trditev velja samo za do sedaj okarakterizirane arabinofuranozidaze in arabinanaze, za ostale vrste encimov, ki so uvrščeni v družino GH43 pa tega ne moremo trditi, saj jih nismo obravnavali v tem delu.

V eksperimentih analize kinetike encimov Ara1_his in Ara2_his smo določili Michaelis-ovo konstanto K_m in pretvorbno število k_{cat} . K_m predstavlja koncentracijo substrata, pri kateri je hitrost encimske reakcije enaka polovici maksimalne hitrosti. Nizke vrednosti K_m pomenijo veliko afiniteto encima do substrata, visoke vrednosti K_m pa majhno. Pretvorbno število k_{cat} pa predstavlja število molekul produkta, ki nastanejo na enoto časa, na molekulo encima, prisotnega v encimski reakciji. k_{cat} definira maksimalno hitrost, pri kateri poteka encimska reakcija pri fiksni koncentraciji encima in neomejeni količini substrata. Za predstavitev hitrosti encimske reakcije smo izbrali pretvorbno število zato, ker ni odvisno od koncentracije encima in omogoča primerjavo hitrosti različnih encimskih reakcij (Copeland, 2000). Pri analizi rezultatov kinetičnih poskusov za določanje K_m in k_{cat} obeh encimov smo ugotovili, da encima, predvidoma zaradi števila različnih domen, ki jih vsebujeta, ne sledita popolnoma Michaelis-Menteninemu modelu encimske kinetike. Pri encimih, ki vsebujejo več proteinskih podenot ali domen, kinetika encimske reakcije pogosto odstopa od modela po Michaelis-Mentenovi (Copeland, 2000). Kljub temu, da smo pri modeliranju rezultatov opazili odstopanja od običajne hiperbolične oblike, smo z optimizacijo parametrov uspeli oceniti vrednosti kinetičnih konstant.

Za encim Ara1_his smo na osnovi predlaganega modela (Slika 31) ocenili vrednost K_m na $2,13 \pm 0,03$ mg/ml in k_{cat} na 2760 ± 40 s⁻¹ za substrat razvejani arabinan. Encim Ara1_his ima najnižjo do sedaj določeno vrednost K_m in najvišjo vrednost k_{cat} v primerjavi z okarakteriziranimi encimi, ki hidrolizirajo razvejani arabinan, predstavljenimi v prilogi D. Encim endo-arabinanaza iz organizma *Thermotoga thermarum* ima K_m 54,4 mg/ml in k_{cat} 1,9 s⁻¹ (Shi in sod., 2014), endo- α -1,5-L-arabinanaza iz bakterije *Geobacillus thermodenitrificans* pa 45 mg/ml, k_{cat} ni objavljen (Takao in sod., 2002). Pri encimu ekso- α -1,5-L-arabinofuranozidazi II iz streptomicete *Streptomyces chartreusis*, kjer so tudi potrdili hidrolizo razvejanega arabinana pa niso določali kinetičnih parametrov (Matsuo in sod., 2000).

Za encim Ara2_his smo na osnovi predlaganega modela (Slika 32) ocenili vrednost K_m na $3,5 \pm 0,1$ mg/ml in k_{cat} na 3800 ± 100 s⁻¹ ob hidrolizi substrata nerazvejani arabinan. Kinetične konstante do sedaj okarakteriziranih encimov (Priloga D), aktivnih na nerazvejanem arabinanu, obsegajo vrednosti K_m od 3,3 do 19,9 mg/ml (Skjot in sod., 2001; Takao in sod., 2002; Squina in sod., 2010; Shi in sod., 2014). Encim Ara2_his tako spada med encime na spodnji meji vrednosti K_m in ima torej v primerjavi z ostalimi okarakteriziranimi encimi veliko afiniteto do linearnega arabinana. Vrednost k_{cat} je do danes objavljena samo za eno endo-arabinanazo iz družine GH43 (iz organizma *Thermotoga thermarum*) in sicer 169,6 s⁻¹ (Shi in sod., 2014) ter je nižja od vrednosti, določene za Ara2_his. Vrednosti k_{cat} za metabolne encime sicer variirajo od 1 pa vse do 10⁶ s⁻¹ (Traut, 2008). Pretvorbeni števili encimov Ara1_his in Ara2_his sta torej v območju, povprečnem za metabolne encime.

Za primerjavo encimov med seboj je najprimernejša vrednost katalitične učinkovitosti k_{cat}/K_m (Copeland, 2000), zato smo v preglednici v prilogi D podali tudi to vrednost za naša encima Ara1_his in Ara2_his. Katalitična učinkovitost encima Ara1_his za substrat razvejani arabinan je 1592 ml/mg*s, za encim Ara2_his in substrat nerazvejani arabinan pa 1086 ml/mg*s. Katalitične učinkovitosti so do sedaj objavljene samo za encim endo-arabinanaza iz organizma *Thermotoga thermarum* in so nižje v primerjavi z našima encimoma (1,9 ml/mg*s na razvejanem in 51,4 ml/mg*s na nerazvejanem arabinanu) (Shi in sod., 2014). Ker za substrate, uporabljene v eksperimentalnem delu, ni mogoče določiti natančne molske mase, vrednosti katalitične učinkovitosti ne moremo pretvoriti v enote s⁻¹*M⁻¹. Izračunanih vrednosti za naša encima zato ne moremo relevantno primerjati z vrednostmi, ki jih navaja Traut (2008). Glede na njegove navedbe so vrednosti katalitične učinkovitosti encimov v naravi običajno večje ali enake 10⁵ s⁻¹*M⁻¹.

Pri analizi encimske kinetike tarčnih encimov smo iz različnih grafičnih prikazov rezultatov encimske kinetike, ki se nahajajo v prilogah F in G, ugotovili, da ta ne sledi popolnoma kinetičnemu modelu Michaelis-Mentenove in linearnim dvojnimi recipročnim grafom. Takšno obnašanje kinetičnih rezultatov je značilno za alosterične encime (Dixon

in Webb, 1979; Copeland, 2000), možno pa je pojav v nekaterih primerih zaznati tudi pri nealosteričnih encimih. V primeru, da vzorec encima vsebuje mešanico različnih izooblik, ki imajo različno K_m do enakega substrata, se lahko to pri določanju kinetičnih lastnosti odrazi v sigmoidni kinetiki. Kooperativno obnašanje encimske kinetike lahko kažejo nekateri encimi, ki razgrajujejo dve vrsti substrata po med seboj različni hitrosti in je aktivnost obeh aktivnih mest neodvisna (se pravi nista zares kooperativni). Tretji primer pa so monomerni encimi z enim aktivnim mestom, pri katerih vezava substrata sproži katalitično potrebne strukturne spremembe encima (Copeland, 2000).

Za natančnejšo oceno kinetičnih konstant tarčnih encimov smo nekatere vrednosti, ki so izstopale zaradi velikih standardnih odklonov izvzeli iz grafov, ki so predstavljeni v rezultatih. Pri encimu Ara1_his (Slika 31) smo izvzeli rezultate pri koncentracijah substrata 0,9 in 3,6 mg/ml. Graf odvisnosti hitrosti normalizirane začetne hitrosti encimske reakcije od koncentracije substrata z vsemi rezultati je priložen v prilogi F. Pri encimu Ara2_his (Slika 32) pa smo izvzeli rezultate pri koncentracijah substrata 1,8, 4,5 in 7,2 mg/ml. Omenjen graf z vsemi rezultati je priložen v prilogi G. Pri izrisu linearnih grafov za prikaz encimske kinetike po Lineweaver-Burku, Eadie-Hofsteeu in Hanes-Wolffu so odstopanja encimske kinetike od običajnih recipročnih grafov prišla še bolj do izraza, kar je kazalo, da se pri obeh tarčnih encimih pojavi kooperativni efekt (Dixon in Webb, 1979). Tako pri encimu Ara1_his (Priloga F) kot pri encimu Ara2_his (Priloga G) smo iz primerjave različnih grafičnih prikazov naših rezultatov z grafi, ki sta jih objavila Dixon in Webb (1979) za alosterične encime (Priloga E) ugotovili, da se pri encimski reakciji pojavi pozitiven kooperativen efekt. Najbolj jasen pozitiven kooperativen efekt je v primeru obeh tarčnih encimov razviden iz prikaza podatkov encimske kinetike po Hanes-Wolffu in Eadie-Hofsteeu. Na podlagi teh prikazov rezultatov domnevamo, da gre za alosterična encima. Možno je, da na afiniteto katalitične domene GH_43 v encimu pozitivno vpliva katera od ostalih domen, ki so prisotne v encimu. Možnosti, da vezava substrata na aktivno mesto encima sproži strukturne spremembe, ki se odrazijo v sigmoidni kinetiki prav tako ne moremo izključiti (Copeland, 2000). Na podlagi bioinformatične analize, ki je pokazala, da nobena od drugih prisotnih domen ne vsebuje do sedaj poznanih katalitičnih aktivnih mest, domnevamo, da te domene ne vsebujejo dodatnih aktivnih mest, ki bi vplivala na razgradnjo substrata (čeprav tega brez eksperimentalnih podatkov ne moremo izključiti). Za potrditev kooperativnosti bi bilo potrebno izvesti dodatne raziskave. Poznavanje funkcij ostalih domen, ki so prisotne v encimu, bi prav tako razjasnilo njihov vpliv na encimsko aktivnosti. Pri obeh encimih so podani rezultati kinetičnih konstant K_m in k_{cat} le ocena, saj sta oba encima kompleksna proteina in nobeden od njiju ne sledi Michaelis-Mentenini kinetiki popolnoma. Za natančnejšo določitev kinetičnih lastnosti bi bilo potrebno zahtevnejše modeliranje rezultatov ali pa ločeno kloniranje in izražanje aktivnih domen ter ponovna določitev kinetičnih konstant.

Zvijanje proteinov narekuje hidrofobni efekt, ki teži k temu, da je čim manjši del polipeptidne verige v stiku s polarnim topilom. Mnogi proteini se zaradi tega zvijejo v globularno molekulo, ki predstavlja optimalno stanje z najmanjšo površino. Kljub temu se proteini pojavljajo tudi v podolgovatih oblikah (ovalne oblike). Podolgovati proteini se lahko pri metodi določanja molekulске mase z gelsko filtracijo, iz kolone izločijo hitreje kot globularni proteini enake molekulске mase, kar navidezno pokaže večjo molekulsko maso proteina (Erickson, 2009). Gelska filtracija proteine loči na podlagi koeficienta trenja proteina in ne na podlagi dejanske molekulске mase (Erickson, 2009). Koeficient trenja je odvisen od velikosti in oblike proteina. Proteini velikosti med 10 in 30 kDa se običajno zvijejo v monomerne molekule. Tisti, ki so večji od 50 kDa, pa so pogosto sestavljeni iz dveh ali več polipeptidov, torej tvorijo multimerne molekule. Multimerni proteini se (v fizioloških pogojih) med ločevanjem z gelsko filtracijo iz kolone izločijo hitreje kot monomerni, saj kažejo večjo molekulsko maso od teoretične (Erickson, 2009). Za neznani protein ne poznamo realne velikosti, kvartarne strukture in oblike, kar je potrebno upoštevati pri interpretaciji rezultatov.

Molekulski masi proizvedenih encimov smo določali z metodo gelske filtracije na osnovi predhodne kalibracije kolone. Pri tem smo pri obeh encimih ugotovili, da kažeta večji navidezni molekulski masi od teoretično predvidenih (izračunane na osnovi AK zaporedja). Encimu Ara1_his smo z gelsko filtracijo določili molekulsko maso 190,919 kDa, kar je za 53,7 % večja molekulska masa od teoretične (124,19 kDa) (Preglednica 29). Encimu Ara2_his pa smo določili molekulsko maso 193,093 kDa, kar je za 72,5 % večja molekulska masa od teoretične (111,95 kDa) (Preglednica 29). Rezultate lahko razložimo na dva načina. Prvič, proteina kažeta večjo molekulsko maso v primerjavi s teoretično zato, ker nista zvita v globularno obliko, temveč v podolgovato. Drugič, proteina se pojavljata v multimernem stanju (Erickson, 2009). Predpostavko, da je protein podolgovat, bi lahko potrdili na primer z izvedbo analitskega ultracentrifugiranja, pri katerem bi določili sedimentacijski koeficient proteina (S). Iz razmerja med izračunanim maksimalnim sedimentacijskim koeficientom za gladko kroglo brez vezane vode ($S_{\max}$) in določenim sedimentacijskim koeficientom (S) lahko ocenimo, ali je protein globularne oblike ali podolgovat (Erickson, 2009). Ali je protein sestavljen iz več domen bi lahko ugotovili z izvedbo gelske filtracije v reducirajočih pogojih, kjer bi se podenote proteina izločile pri večjem elucijskem volumnu kot nativni protein v nereducirajočih pogojih. Drugi način bi bila izvedba SDS-PAGE brez reducenta, kjer bi nativni protein kazal ustrezno večjo navidezno molekulsko maso na gelu v primerjavi z disociiranimi podenotami v reducirajočih pogojih. Uporabili pa bi lahko tudi metode kot so kristalografija, elektronska mikroskopija, jedrna magnetna resonančna spektroskopija (NMR spektroskopija) (Erickson, 2009; Gell in sod., 2012).

S potrditvijo, da se encima nahajata v multimernem stanju, bi lahko delno potrdili tudi pozitiven kooperativen efekt, ki smo ga zasledili pri encimski kinetiki (Dixon in Webb,

1979). Ker encima kažeta molekulsko maso, ki je skoraj dvakrat večja v primerjavi s teoretično, je mogoče, da je njuna nativna kvartarna oblika dimer iz dveh enakih podenot. Vsaka podenota bi torej lahko vsebovala aktivno mesto domene GH43, ki sodeluje pri hidrolizi substrata. Afiniteti teh dveh aktivnih mest sta lahko medsebojno odvisni od konformacijskih sprememb, ki jih povzroči vezava substrata na prvo aktivno mesto, kar se odrazi kot pozitiven kooperativen efekt (Dixon in Webb, 1979). Primer takega multimernega proteina je hemoglobin, ki je sestavljen iz štirih enakih podenot, kjer vezava kisika na prvo podenoto sproži konformacijske spremembe, ki olajšajo vezavo kisika na ostala vezavna mesta (Dixon in Webb, 1979; Copeland, 2000).

V magistrski nalogi pridobljeni rezultati so doprinesli k znanju na področju glikozid hidrolaz iz družine GH43 in bakterijske razgradnje arabinanov v človeškem prebavnem traktu. Izbrana encima Ara1 in Ara2 sta prva biokemijsko okarakterizirana encima s katalitično domeno GH43 bakterije *B. longum*. Encima lahko v kombinaciji z drugimi (hemi)celulolitičnimi encimi potencialno uporabimo tudi v biotehnoloških procesih encimske razgradnje rastlinske biomase (Squina in sod., 2010; McVey in sod., 2014). Na njuno biotehnološko uporabnost kaže še posebno dejstvo, da sta ugotovljena temperaturna optimuma delovanja Ara1 in Ara2 med najnižjimi do sedaj določenimi optimumi encimov s tovrstno aktivnostjo, ter rezultati encimske kinetike, iz katerih je razvidno, da sta katalitično učinkovita encima.

6 SKLEPI

- Bioinformatična analiza genov *ara1* in *ara2*, katerih produkta smo izbrali za izolacijo in karakterizacijo, je pokazala, da gre za glikozid hidrolazi, ki poleg aktivnih domen GH43 vsebujeta še dodatne proteinske domene (Laminin_G_3, Big_4, FIVAR). Gena sta del genske gruče, sestavljene iz devetih genov, ki kaže podobnost z ohranjeno organizacijo genskih gruč za razgradnjo polisaharidov pri do sedaj preučenihi bifidobakterijah (»PUL«).
- Produkta izbranih genov z dodano His oznako (Ara1_his in Ara2_his) smo uspešno heterologno izrazili v dveh različnih ekspresijskih sevih bakterije *E. coli* BL21(DE3) in Rosetta. Potrdili smo tudi, da oba proteina v izbranih pogojih nastajata v aktivni obliki in ju lahko v taki obliki izoliramo s kombinacijo afinitetne kromatografije z imobiliziranimi kovinskimi ioni in gelske filtracije.
- Analiza aktivnosti encimov Ara1_his in Ara2_his na različnih substratih je pokazala, da nobeden od encimov samostojno ne razgrajuje kompleksnega arabinogalaktana, temveč oba hidrolizirata le posamezne enostavnejše arabinozne substrate. Encim, ki smo ga poimenovali Ara1_his, razgrajuje razvejani arabinan, encim, ki smo ga poimenovali Ara2_his, pa razgrajuje nerazvejani in linearni arabinan. Produkti razgradnje substratov so v obeh primerih monosaharidi arabinoze.
- Obema encimoma smo uspešno določili biokemijske značilnosti: temperaturni in pH-optimum, vpliv ionov na aktivnost, K_m , k_{cat} in molekularno maso.
- Obema encimoma smo eksperimentalno določili večjo molekularno maso od teoretične, določene na podlagi aminokislinskega zaporedja. Encim Ara1_his je velik 190,919 kDa, encim Ara2_his pa 193,093 kDa.

7 POVZETEK

Sestava človeške črevesne mikrobiote je tarča različnih raziskav že dolga leta, prav tako pa tudi uravnavanje le te v primerih črevesnih bolezenskih stanj. Znano je, da sestava bakterijske združbe variira v odvisnosti od mnogih dejavnikov (starost človeka, okolje, način prehranjevanja, izpostavljenost antibiotikom...) in da vpliva na gostiteljevo ravnovesje energije preko fermentacije prehranskih vlaknin. V želji, da bi pomagali uravnovesiti črevesno mikrobioto v primerih neravnovesja, so se razvile tri vrste pripravkov in sicer probiotiki, prebiotiki in simbiotiki. Probiotiki so definirani kot »živi mikrobní dodatek k hrani, ki ugodno vpliva na gostitelja z izboljšanjem njegovega črevesnega ravnovesja« (Fuller, 1989). Med prebiotike štejemo neprebavljive sestavine hrane, ki ugodno vplivajo na gostitelja s selektivno vzpodbuditvijo rasti in/ali aktivnosti ene ali omejenega števila bakterij v debelem črevesju in s tem izboljšujejo gostiteljevo zdravje (Gibson in Roberfroid, 1995). Simbiotiki pa so kombinacija obojih. Kot najbolj učinkoviti so se do sedaj izkazali prebiotiki in sicer različni ogljikovi hidrati, nekateri proteini in lipidi, ki jih človeški encimi ne razgrajujejo in so v debelem črevesu substrat za mikrobioto. Zadnje raziskave kažejo, da imajo arabinozni poli in oligosaharidi velik potencial na tem področju. Arabinozne polisaharide so v debelem črevesju v večini sposobne razgraditi bakterije iz rodov *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* in *Faecalibacterium* in le zelo redke patogene bakterije. Pri bifidobakterijah kar 8 % celotnega genoma sestavljajo geni, povezani z razgradnjo in privzemom polisaharidov. Njihovo razgradnjo vršita dva tipa encimov, glikozid hidrolaze in polisaharid liaze. Mnogih encimov za razgradnjo in privzem arabinoznih polisaharidov pri bifidobakterijah kljub velikemu biotehnološkemu potencialu še ne poznamo. V tem magistrskem delu smo heterologno izrazili in okarakterizirali dva izbrana encima iz bakterije *Bifidobacterium longum*, za katera smo na podlagi bioinformatike analize domnevali, da sodelujeta pri razgradnji arabinoznih polisaharidov (arabinogalaktanov). Pri bioinformatiki analizi genov smo ugotovili, da imata oba encima poleg katalitične domene GH_43 še domeni Laminin_G_3 in Big_4. Ugotovili smo tudi, da se nahajata v genski gruči za razgradnjo polisaharidov s sestavo, ki je značilna za bifidobakterije. V praktičnem delu naloge smo ugotovili, da encim, poimenovan Ara1_his, razgrajuje razvejani arabinan (ne pa nerazvejanega in linearnega arabinana ter arabskega gumija). Optimalni pH njegovega delovanja je 6,8 in temperaturni optimum 50 °C. Vrednosti K_m in k_{cat} encima Ara1_his (za omenjeni substrat) smo ocenili na 2,13 +/- 0,03 mg/ml in 2760 +/- 40 s⁻¹. Za encim Ara2_his smo ugotovili, da hidrolizira nerazvejani in linearni arabinan, ima optimalni pH delovanja 5,75, temperaturni optimum pa 37 °C – to je najnižji do sedaj določen temperaturni optimum delovanja arabinanaz iz družine GH43. Na substratu nerazvejani arabinan smo za encim Ara2_his ocenili K_m in k_{cat} na 3,5 +/- 0,1 mg/ml in 3800 +/- 100 s⁻¹. Oba encima imata v primerjavi z do sedaj objavljenimi arabinanazami in arabinofuranozidazami iz GH43 visoke vrednosti k_{cat} , kar kaže na to, da sta katalitično učinkovita encima. S tankoplastno kromatografijo smo ugotovili, da oba karakterizirana

encima iz substratov sproščata le monosaharid arabinozo (sta ekso- encima). Z gelsko filtracijo smo Ara1_his in Ara2_his določili večji molekulski masi od teoretično določenih, kar kaže na to, da se oba proteina pojavljata ali v multimerni obliki ali pa sta podolgovate oblike. Na podlagi rezultatov bioinformatične analize in substratne specifičnosti izbranih encimov domnevamo, da oba encima v sodelovanju z ostalimi encimi, ki so kodirani v genski gruči sodelujeta pri razgradnji kompleksnejših arabinoznih polisaharidov. Šele dokončna karakterizacija vseh encimov v genski gruči bo tako verjetno razkrila mehanizem razgradnje kompleksnih arabinogalaktanskih ali arabinoznih polisaharidov pri bakteriji *B. longum*. Rezultati, ki smo jih pridobili v magistrski nalogi, dopolnjujejo dosedanje znanje na področju glikozid hidrolaz iz družine 43. Izbrana encima sta prva biokemijsko okarakterizirana encima s katalitično domeno GH43 pri bakteriji s probiotičnim potencialom *B. longum* subsp. *longum*. Zaradi nizkih temperaturnih optimumov encimov in katalitične učinkovitosti sta encima potencialno uporabna v različnih biotehnoloških procesih, ki temeljijo na razgradnji rastlinske biomase.

8 VIRI

- Alhassid A., Ben-David A., Tabachnikov O., Libster D., Naveh E., Zoloznitsky G., Shoham Y., Shoham G. 2009. Crystal structure of an inverting GH 43 1,5- α -L-arabinanase from *Geobacillus stearothermophilus* complexed with its substrate. *Biochemical Journal*, 422, 1: 73-82
- Arabinan (sugar beet, Lot 80902b). 2016. Wicklow, Irska, Megazyme (spremna dokumentacija substrata)
- Backhed F., Manchester J. K., Semenkovich C. F., Gordon J. I. 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 104: 979-984
- Barrangou R., Briczinski E. P., Traeger L. L., Loquasto J. R., Richards M., Horvath P., Coute-Monvisin A. C., Leyer G., Rendulic S., Steele J. L., Broadbent J. R., Oberg T., Dudley E. G., Schuster S., Romero D. A., Roberts R. F. 2009. Comparison of the complete genome sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and BI-04. *Journal of Bacteriology*, 191, 13: 4144-4151
- Biavati B., Mattarelli P. 2001. The family Bifidobacteriaceae. V: Prokaryotes. An evolving electronic resource for microbiological community, 3. izdaja. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackbrandt E. (ur.). New York, Springer-Verlag: 1-70
- Bisswanger H. 2014. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1: 41-55
- Bjursell M. K., Martens E. C., Gordon J. I. 2006. Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the suckling period. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 47: 36269-36279
- Burgois T. M., Van Craeyveld V., Van Campenhout S., Courtin C. M., Delcour J. A., Robben J., Volckaert G. 2007. Recombinant expression and characterization of XynD from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051: a GH 43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase. *Biotechnologically relevant enzymes and proteins. Applied Microbiology and Biotechnology*, 75: 1309-1317
- Bottacini F., Medini D., Pavesi A., Turroni F., Foroni E., Riley D., Giubellini V., Tettelin H., van Sinderen D., Ventura M. 2010. Comparative genomics of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology-SGM*, 156: 3243-3254
- Caffall K. H., Mohnen D. 2009. The structure, function and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344, 14: 1879-1900
- Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37: D233-D238
- Cantarel B. L., Lombard V., Henrissat B. 2012. Complex Carbohydrate Utilization by the Healthy Human Microbiome. *PLoS ONE*, 7, 6: e28742, doi: 10.1371/journal.pone.0028742: 10 str.

- Chaplin M., Bucke C. 1990. Enzyme Technology. Chapter 1: Fundamentals of enzyme kinetics. Cambridge University Press.
<http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/ph.html> (28. avg. 2016)
- Clarke A. E., Anderson R. L., Stone B. A. 1979. Form and function of arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry*, 18, 4:521-540
- Collins S. M., Bercik P. 2009. The Relationship Between Intestinal Microbiota and the Central Nervous System in Normal Gastrointestinal Function and Disease. *Gastroenterology*, 136: 2003-2014
- Copeland R. A. 2000. Cooperativity in enzyme catalysis. V: *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. 2. izdaja. New York, Wiley-VCH Inc.: 367-383
- Cultrone A., Tap J., Lapaque N., Dore J., Blottiere H. M. 2015. Metagenomics of the human intestinal tract: from who is there to what is done there. *Current Opinion in Food Science*, 4: 64-68
- Cummings J. H. 1981. Short chain fatty-acids in the human-colon. *Gut*, 22: 763-779
- Cummings J. H., Englyst H. N. 1991. Measurement of starch fermentation in the human large-intestine. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 69: 121-129
- Cummings J. H., Gibson G. R., Macfarlane G. T. 1989. Quantitative estimates of fermentation in the hind gut of man. *Acta Veterinaria Scandinavica*: 76-82
- Daguet D., Oinherio I., Verhelst A., Possemiers S., Marzorati M. 2016. Arabinogalactan and fructooligosaccharides improve the gut barrier function in distinct areas of the colon in the Simulator of the human intestinal microbial system. *Journal of Functional Foods*, 20: 369-379
- D'Argenio G., Mazzacca G. 1999. Short-chain fatty acids in the human colon – Relation to inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Advances in Nutrition and Cancer* 2, 472:149-158
- Darvill A. G., McNeil M., Albersheim P. 1978. Structure of plant-cell walls 8. New pectic polysaccharide. *Plant Physiology*, 62, 3: 418-422
- Debranched arabinan (sugar beet, Lot 100401c). 2016. Wicklow, Irska, Megazyme (spremnna dokumentacija substrata)
- De Sanctis D., Inacion J. M, Lindley P. F., se Sa-Nogueira I., Bento I. 2010. New evidence for the role of calcium in the glycosidase reaction of GH43 arabinanases. *Febs Journal*, 277, 21: 4562-4574
- de Vrese M., Schrezenmeir J. 2008. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. V: *Food Biotechnology*. Stahl, U., Donalies, U. E. B., Nevoigt, E. (ur.). Berlin, Springer-Verlag Berlin, 1-66
- Degnan B. A., Macfarlane G. T. 1995. Arabinogalactan utilization in continous cultures of *Bifidobacterium longum*: Effect of co-culture with *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Anaerobe*, 1-103-112
- Dethlefsen L., Eckburg P. B., Bik E. M., Relman D. A. 2006. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends in Ecology & Evolution*, 21: 517-523

- Devries W., Stoutham A. H. 1976. Pathway of glucose fermentation in relation to taxonomy of Bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, 93, 2: 574-576
- Dixon M., Webb E. C. 1979. Enzyme inhibition and activation. V: Enzymes. 3. izdaja. London, Longman Group Limited: 399-467
- Drasar B.S. 1989. The bacterial-flora of the stomach and small-intestine. *Gastroenterologie Clinique Et Biologique*, 13: B18-B20
- El Kaoutari A., Armougom F., Gordon J. I., Raoult D., Henrissat B. 2013. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 11: 497-504
- EMBL. 2016. EMBL Vectors.
https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/choice_vector/ecoli/embl/popup_emblvectors/ (9. jun. 2016)
- Erickson H. P. 2009. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration and electron microscopy. *Biological Procedures Online*, 11, 1: 32-51
- Fanaro S., Vigi V., Chierici R., Boehm G. 2003. Fecal flora measurements of breastfed infants using an integrated transport and culturing system. *Acta Paediatrica*, 92: 634-635
- Favier C. F., Vaughan E. E., De Vos W. M., Akkermans A. D. L. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 219-226
- Felis G. E., Dellaglio F. 2007. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues of Intestinal Microbiology*, 8, 2: 44-61
- Fernandez L., Langa S., Martin V., Maldonado A., Jimenez E., Martin R., Rodriguez J. M. 2013. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69, 1:1-10
- Fincher G. B., Stone B. A., Clarke A. E. 1983. Arabinogalactan proteins – Structure, biosynthesis and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 34: 47-70
- Finegold, S. M. 1983. Body-fluids and infectious-diseases - clinical and microbiologic advances - summary of clinical aspects. *American Journal of Medicine*, 75: 139-142
- Fontes C. M., Gilbert H. J. 2010. Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annual Review of Biochemistry*, 79: 655-681
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378
- GE Healthcare. 2007. Affinity chromatography: Principles and Methods. GE Healthcare Europe GmbH. Germany. 159-160
- Gell D. A., Grant R. P., Mackay J. P. 2012. The detection and quantitation of protein oligomerization. V: Protein Dimerization and Oligomerization in Biology. Mattwes J. M. (ur.). Berlin, Springer-Verlag Berlin: 19-41

- Gibson G. R., Roberfroid M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125, 6: 1401-1412
- Gilmore M. S., Ferretti J. J. 2003. Microbiology: The thin line between gut commensal and pathogen. *Science*, 299, 5615: 1999-2002
- Godoy A. S., de Lima M. Z. T., Ramia M. P., Camilo C. M., Muniz. J. R. C., Polikarpov I. 2016. Crystal structure of a putative exo-beta-1,3-galactanase from *Bifidobacterium bifidum* S17. *Acta Crystallographica*, F72: 288-293
- Hamer H., Jonkers D., Troost F., Vanhoutvin S., Kodde A., Venema K., Kock G. H., Brummer R. J. 2008. Effects of butyrate on the colonic mucus layer in healthy humans. *Gastroenterology*, 134: A694-A694
- Harmsen H. J. M., Wildeboer-Veloo A. C. M., Raangs G. C., Wagendorp A. A., Klijn N., Bindels J. G., Welling G. W. 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30, 1: 61-67
- Henrissat B., Coutinho P. M., Lombard V., Drula E., Lenfant N., Hainaut M., Terrapon N. 2016. Carbohydrate-Active Enzymes Database.
<http://www.cazy.org/> (20. sept. 2016)
- Henrissat B., Davies G. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 637-644
- Hinz S. W. A., Verhoef R., Schols H. A., Vincken J. P., Voragen A. G. J. 2005. Type I arabinogalactan contains beta-D-Galp-(1-3)-beta-D-Galp structural elements. *Carbohydrate Research*, 340, 13: 2135-2143
- Holck J., Lorentzen A., Vigsnaes L. K., Licht T. R., Mikkelsen J. D., Meyer A. S. 2011. Feruloylated and Nonferuloylated Arabino-oligosaccharides from Sugar Beet Pectin Selectively Stimulate the Growth of *Bifidobacterium* spp. in Human Fecal in Vitro Fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 6511-6519
- Hooper L. V. 2004. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends in Microbiology*, 12: 129-134
- Huisman M. M. H., Brull L. P., Thomas-Oates J. E., Haverkamp J., Schols H. A., Voragen A. G. J. 2001. The occurrence of internal (1-5)-linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances. *Carbohydrate Research*, 330, 1: 103-114
- Huisman M. M. H., Schols H. A., Voragen A. G. J. 1999. Enzymatic degradation of cell wall polysaccharides from soybean meal. *Carbohydrate Polymers*, 38, 4: 299-307
- IBI Scientific. 2016. 2,5 L TUNAIR™ shake flasks.
<http://www.ibisci.com/product-category/microbioprod/tunairshakeflasks/2-5l-tunair-shake-flasks> (10. jan. 2015)
- Inacio J. M., Correia I. L., de Sa-Nogueira I. 2008. Two distinct arabinofuranosidases contribute to arabino-oligosaccharide degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology-SGM*, 154: 2719-2729

- Inacio J. M., de Sa-Nogueira I. 2008. Characterization of *abn2* (*yxiA*), encoding a *Bacillus subtilis* GH43 arabinanase, *Abn*«, and its role in arabinopolysaccharide degradation. *Journal of Bacteriology*, 190, 12: 4272-4280
- Ishibashi N., Yaeshima T., Hayasawa H. 1997. Bifidobacteria: their significance in human intestinal health. *Malaysian Journal of Nutrition*, 3: 149-159
- Kaneko S., Ishii T., Kobayashi H., Kusakabe I. 1998. Substrate specificities of alpha-L-arabinofuranosidases produced by two species of *Aspergillus niger*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62, 4: 695-699
- Khoruts A., Dicksved J., Jansson J. K., Sadowsky M. J. 2010. Changes in the Composition of the Human Fecal Microbiome After Bacteriotherapy for Recurrent *Clostridium difficile*-associated Diarrhea. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 44: 354-360
- Kim J. F., Jeong H., Yu D. S., Choi S. H., Hur C. G., Park M. S., Yoon S. H., Kim D. W., Ji G. E., Park H. S., Oh T. K. 2009. Genome sequence of the probiotic bacterium *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* AD011. *Journal of Bacteriology*, 191, 2: 678-679
- Korakli M., Ganzle M. G., Vogel R. F. 2002. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 958-965
- Koropatkin N. M., Cameron E. A., Martens E. C. 2012. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 10: 323-335
- Leal T. F., de Sa-Nogueira I. 2004. Purification, characterization and functional analysis of an endo-arabinanase (*AbnA*) from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 241: 41-48
- Lee J. H., Karamychev V. N., Kozyavkin S. A., Mills D., Pavlov A. R., Pavlova N. V., Polouchine N. N., Pichardson P. M., Shakhova V. V., Weimer B., O'Sullivan D. J. 2008. Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. *BMC Genomics*, 9: 247, doi: 10.1186/1471-2164-9-247: 16 str.
- Ley R. E., Turnbaugh P. J., Klein S., Gordon J. I. 2006. Microbial ecology: human intestinal microbes associated with obesity. *Nature*, 444: 1022-1023
- Linear arabinan from beet arabinan (Lot 80901). 2016. Wicklow, Irska, Megazyme (spremnna dokumentacija substrata)
- Lombard V., Ramulu H. G., Drula E., Coutinho P. M., Henrissat, B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42: D490-D495
- Macfarlane G. T., Gibson G. R., Cummings J. H. 1992. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 57-64
- Macfarlane G.T., Steed H., Macfarlane S. 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 305-344

- Makarova E. N., Shakhmatov E. G., Udoratina E. V., Kutchin A. V. 2015. Structural and chemical characteristics of pectins, arabinogalactans and arabinogalactan proteins from conifers. *Russian Chemical Bulletin*, 64, 6: 1302-1318
- Margolles A., de los Reyes-Gavilan C. G. 2003. Purification and functional characterization of a novel alpha-L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 9: 5096-5103
- Marteau P., Pochart P., Dore J., Bera-Maillet C., Bernalier A., Corthier G. 2001. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4939-4942
- Matsuo N., Kaneko S., Kuno A., Kobayashi H., Kusakabe I. 2000. Purification, characterization and gene cloning of two alpha-L-arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreusis* GS901. *Biochemical Journal*, 346: 9-15
- Mazmanian S. K., Liu C. H., Tzianabos A. O., Kasper D. L. 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122: 107-118
- McKie V. A., Black G. W., Millward S. J., Hazelwood G. P., Laurie J. I., Gilbert H. J. 1997. Arabinanase A from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* exhibits both endo- and an exo- mode of action. *Biochemical Journal*, 323: 547-555
- McNeil, M., Darvill A. G., Fry S. C., Albersheim P. 1984. Structure and function of the primary-cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry*, 53: 625-663
- McVey C. E., Ferreira M. J., Correia B., Lahiri S., de Sanctis D., Carrondo M. A., Lindley P. F., Nogueira I. D., Soares C. M., Bento I. 2014. The importance of the Abn2 calcium cluster in the endo-1,5-arabinanase activity from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 19, 5: 505-513
- Mevissenverhage E. A. E., Marcelis J. H., Devos M. N., Harmsen van Amerongen W. C. M., Verhoef J. 1987. *Bifidobacterium*, *Bacteroides* and *Clostridium* spp in fecal samples from breast-fed and bottle-fed infants with and without iron supplement. *Journal of Clinical Microbiology*, 25, 2: 285-289
- Miller G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 3: 426-428
- MoBio Laboratories. 2016a. LB Agar powder growth media. Catalog No. 12107-1. Instruction manual.
<https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12107.pdf> (20. avg. 2016)
- MoBio Laboratories. 2016b. LB Broth powder growth media. Catalog No. 12106-1. Instruction manual.
<http://www.genex.cl/stock/MoBio121061.html> (20. avg. 2016)
- Mongay C., Cerda V. 1974. A Britton-Robinson buffer of known ionic strength. *Annali di Chimica*, 64: 409-412
- Moon J. S., Shin S. Y., Choi H. S., Joo W., Cho S. K., Li L., Kang J. H., Kim T. J., Han N. S. 2015. In vitro digestion and fermentation properties of linear sugar-beet arabinan and its oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 131: 50-56

- Morales P., Sendra J. M., Perez Gonzales J. A. 1995. Purification and characterization of an arabinofuranosidase from *Bacillus polymixa* expressed in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 1-2: 112-117
- Naumoff D. G. 2001. Beta-fructosidase superfamily: homology with some alpha-L-arabinases and beta-D-xylosidases. *Proteins-Structure, Function and Bioinformatics*, 42, 1: 66-76
- Nelson D., Cox M. 2005. Carbohydrates and glycobiology. V: *Lehninger Principles of biochemistry*. 4. izdaja. New York, W. H. Freeman and Company: 238-272
- Novagen. 2016. Competent cells: What a difference a strain makes. Merck Biosciences. www.novagen.com (8. maj 2016)
- Nurizzo D., Turkendubr J. P., Charnock S. J., Roberts S. M., Dodson E. J., McKie V. A., Taylor E. J., Gilbert H. J., Davier G. J. 2002. *Cellvibrion japonicus* alpha-L-arabinanase 43A has a novel five-blade beta-propeller fold. *Nature Structural Biology*, 9, 9: 665-668
- O'Hara A. M., Shanahan F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7, 7: 655-746
- Oosterveld A., Voragen A. G. J., Schols H. A. 2002. Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan protein. *Carbohydrate Polymers*, 49, 4: 407-413
- Palframan R. J., Gibson G. R., Rastall R. A. 2003. Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 4, 2: 71-75
- Park J. M., Jang M. U., Oh G. W., Lee E. H., Kang J. H., Song Y. B., Han N. S., Kim T. J. 2015. Synergistic action modes of arabinan degradation by exo- and endo-arabinosyl hydrolases. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 2: 227-233
- Picard C., Fioramonti J., Francois A., Robinson T., Neant F., Matuchansky C. 2005. Review article: Bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 22, 6: 495-512
- Pokusaeva K., Fitzgerald G. F., van Sinderen D. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes and Nutrition*, 6: 285-306
- Pons T., Naumoff D. G., Martinez-Fleites C., Hernandez L. 2004. Three acidic residues are at the active site of a beta-propeller architecture in glycoside hydrolase families 32, 43, 62 and 68. *Proteins – Structure, Function and Bioinformatics*, 54, 3: 424-432
- Promega. 2016. How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample? <https://www.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/> (28. avg. 2016)
- Rath A., Glibowicka M., Nadeau V. G., Chen G., Deber C. M. 2009. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *PNAS*, 106, 6: 1760-1765
- Ridley B. L., O'Neill M. A., Mohnen D. A. 2001. Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 6: 929-967

- Rombeau J. L., Kripke S. A. 1990. Metabolic and intestinal effects of short-chain fatty-acids. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 14: S181-S185
- Rosano G. L., Ceccarelli E. A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5: 172, doi: 10.3389/fmicb.2014.00172: 17 str.
- Saha B. C. 2000. Alpha-L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 5: 403-423
- Sakamoto T., Inui M., Yasui K., Tokuda S., Akiyoshi M., Kobori Y., Nakaniwa T., Tada T. 2012. Biochemical characterization and gene expression of two endo-arabinanases from *Penicillium chrysogenum* 31B. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 3: 1087-1096
- Sakamoto T., Sakai T. 1995. Analysis of structure of sugar-beet pectin by enzymatic methods. *Phytochemistry*, 39, 4: 821-823
- Schell M. A., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Pessi G., Zwahlen M. C., Desiere F., Bork P., Delley M., Pridmore R. D., Arigoni F. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 14422-14427
- Scott K. P., Martin J. C., Duncan S. H., Flint H. J. 2014. Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro. *Fems Microbiology Ecology*, 87: 30-40
- Shallom D., Shoham Y. 2003. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 219-228
- Shi H., Ding H. H., Huang Y. L., Wang L. L., Zhang Y., Li X., Wang F. 2014. Expression and characterization of a GH43 endo-arabinanase from *Thermotoga thermarum*. *BMC Biotechnology*, 14: 35, doi: 10.1186/1472-6750-14-35: 9 str.
- Shulami S., Raz-Pasteur A., Tabachnikov O., Gilead-Gropper S., Shner I., Shoham Y. 2011. The L-arabinan utilization system of *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 193: 2838-2850
- Simon, G. L., Gorbach, S. L. 1986. The human intestinal microflora. *Digestive Diseases and Sciences*, 31: S147-S162
- Skjot M., Kauppinen S., Kofod L. V., Fuglsang C., Pauly M., Dalboge H., Andersen L. N. 2001. Functional cloning of an endo-arabinanase from *Aspergillus aculeatus* and its heterologous expression in *A-oryzae* and tobacco. *Molecular Genetics and Genomics*, 256, 5: 913-921
- Sogabe Y., Kitatani T., Yamaguchi A., Kinoshita T., Adachi H., Takano K., Inoue T., Mori Y., Matsumura H., Sakamoto T., Tada T. 2011. High-resolution structure of exo-arabinanase from *Penicillium chrysogenum*. *Acta Crystallographica*, 67, 5: 415-422
- Squina F. M., Santos C. R., Ribeiro D. A., Cota J., de Oliveira R. R., Ruller R., Mort A., Murakami M. T., Prade R. A. 2010. Substrate cleavage pattern, biophysical characterization and low-resolution structure of a novel hyperthermostable arabinanase

- from *Thermotoga petrophila*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 399, 4: 505-511
- Stephen A. M., Haddad A. C., Phillips S. F. 1982. Dietary sources of carbohydrate in the human colon. Gastroenterology, 82, 5: 1189-1189
- Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon J. J., Gibson G. R., Collins M. D., Dore J. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. Applied and Environmental Microbiology, 65: 4799-4807
- Sulek K., Vigsnaes L. K., Schmidt L. R., Holck J., Frandsen H. L., Smedsgaard J., Skov T. H., Meyer A. S., Licht T. R. 2014. A combined metabolomic and phylogenetic study reveals putatively prebiotic effects of high molecular weight arabino-oligosaccharides when assessed by in vitro fermentation in bacterial communities derived from humans. Anaerobe, 28: 68-77
- Takao M., Yamaguchi A., Yoshikawa K., Terashita T., Sakai T. 2002. Molecular cloning of the gene encoding thermostable endo-1,5- α -L-arabinanase of *Bacillus thermodenitrificans* TS-3 and its expression in *Bacillus subtilis*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 66, 2: 430-433
- Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet J. P., Ugarte E., Munoz-Tamayo R., Paslier D. L. E., Nalin R., Dore J., Leclerc M. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. Environmental Microbiology, 11: 2574-2584
- Terpend K., Possemiers S., Daguet D., Marzorati M. 2013. Arabinogalactan and fructo-oligosaccharides have a different fermentation profile in the Simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME®). Environmental Microbiology Reports, 5, 4: 595-603
- Traut T. 2008. The limits for life define the limits for enzymes.V: Allosteric regulatory enzymes. Boston MA, Springer US: 29-48
- Trofimova N. N., Medvedeva E. N., Ivanova N. V., Malkov Y. A., Babkin V. A. 2012. Polysaccharides from larch biomass. V: The complex world of polysaccharides. Rijeka, InTech: 153-195
- Turnbaugh P. J., Ridaura V. K., Faith J. J., Rey F. E., Knight R., Gordon J. I. 2009. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. Science Translational Medicine, 1, 6: 6ra14, doi: 10.1126/scitranslmed.3000322: 12 str.
- Umemoto Y., Onishi R., Araki T. 2008. Cloning of a novel gene encoding beta-1,3-xylosidase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. Strain XY-214, and characterization of the gene product. Applied Environmental Microbiology, 74: 305-308
- Van den Abbeele P., Gerard P., Rabot S., Bruneau A., El Aidy S., Derrien M., Kleerebezem M., Zoetendal E. G., Smidt H., Verstraete W., Van de Wiele T., Possemiers S. 2011. Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats. Environmental Microbiology, 13, 10: 2667-2680

- Van Den Broek L. A. M., Voragen A. G. J. 2008. Bifidobacterium glycoside hydrolases and (potential) prebiotics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 4: 401-407
- Van Laere K. M. J., Abee T., Schols H. A., Beldman G., Voragen A. G. J. 2000. Characterization of a novel beta-galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4: 1379-1384
- Van Laere K. M. J., Voragen C. H. L., Kroef T., Van den Broek L. A. M., Beldman G., Voragen A. G. J. 1999. Purification and mode of action of two different arabinoxylan arabinofuranohydrolases from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 5: 606-613
- Vigsnaes L. K., Holck J., Meyer A. S., Licht T. R. 2011. In vitro fermentation of sugar beet arabino-oligosaccharides by fecal microbiota obtained from patients with ulcerative colitis to selectively stimulate the growth of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 23: 8336-8344
- Voragen A. G. J., Rombouts F. M., Searle van Leeuwen M. F., Schols H. A., Pilnik W. 1987. The degradation of arabinans by endo-arabinanase and arabinofuranosidases purified from *Aspergillus niger*. *Food Hydrocolloids*, 1, 5-6: 423-437
- Wallace T. C., Guarner F., Madsen K., Cabana M. D., Gibson G., Hentges E., Sanders M. E. 2011. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutrition Reviews*, 69, 7: 392-403
- Wilson K., Walker J. 2010. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. Cambridge University Press, New York, United States of America, 581-624
- Withers S. 2001. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydrate Polymers*, 44: 325-337
- Wolin M. J., Miller T. L. 1983. Interactions of microbial-populations in cellulose fermentation. *Federation Proceedings*, 42: 109-113
- Yoshida S., Hespen C. W., Beverly R. L., Mackie R. I., Cann I. K. O. 2010. Domain analysis of a modular alpha-L-arabinofuranosidase with a unique carbohydrate binding strategy from the fiber-degrading bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. *Journal of Bacteriology*, 192, 20: 5424-5436

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Maši Vodovnik za dodeljeno temo naloge, pri kateri sem lahko v praksi preizkusila veliko znanja, pridobljenega tekom študija in razširila svojo mrežo poznanstev v znanstvenih krogih. Hvala za vložen čas, pomoč in nasvete pri pisanju.

Velika zahvala gre tudi prof. dr. Maheru Abou Hachem-u za trdno podporo in vodenje pri eksperimentalnem delu naloge ter zaupanje v moje znanje. Hvala tudi vsem ostalim članom Oddelka za sistemsko biologijo, encimsko in proteinsko kemijo, ki so mi pomagali pri delu.

Najlepše se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Kristini Sepčič za nasvete in izjemno hiter ter temeljit pregled naloge.

Nenazadnje se iskreno zahvaljujem tudi svojim staršem in bratu, študijskim kolegicam in kolegom, prijateljicam in prijateljem, ki so me podpirali in prenašali v dobrih in slabih časih (in upam, da me bodo še naprej ☺).

ACKNOWLEDGMENT

I thank to my mentor professor dr. Maša Vodovnik for assigned master thesis topic in which I was able to put into practice a lot of knowledge acquired during the study, and expand my network of contacts in the scientific community. Thank you for your time, help and advice in writing.

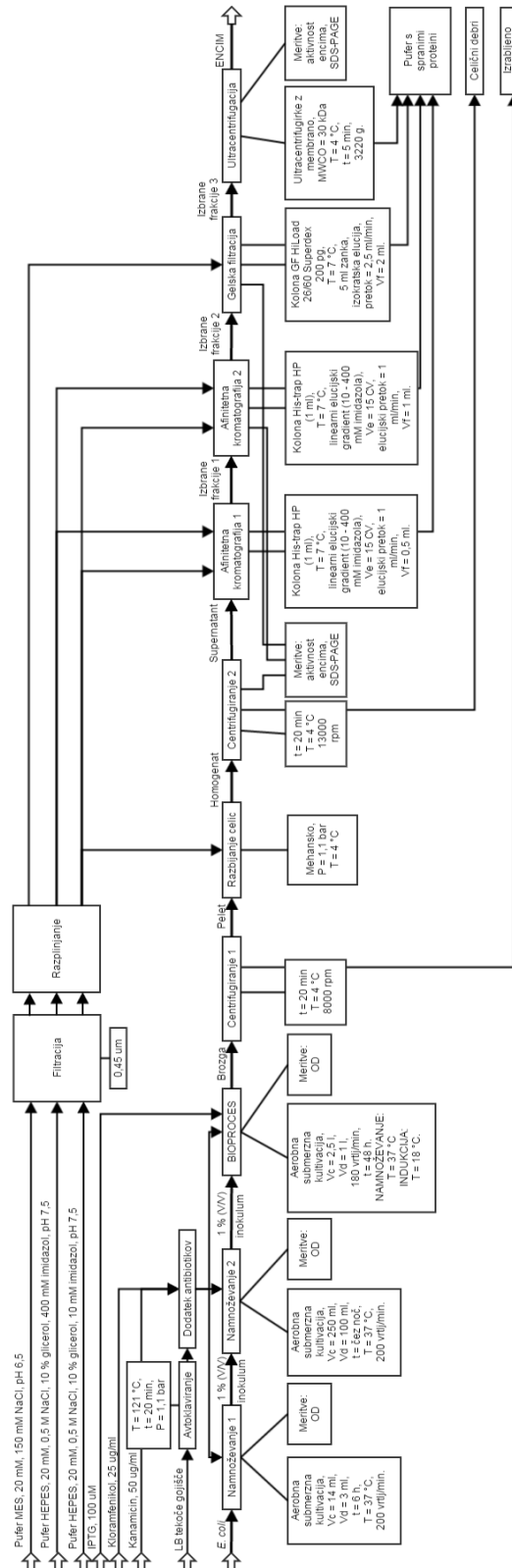
Great thanks also go to professor dr. Maher Abou Hachem for strong support and guidance in the experimental part of the work and trust in my knowledge. I would like to thank to all the other members of the Department of Systems Biology, Enzyme and Protein Chemistry who helped me with my work.

I thank also to the reviewer, professor dr. Kristina Sepčič, for advices and extremely fast and thorough review of the thesis.

Finally, my sincere thanks also to my parents and brother, fellow academic colleagues and friends who have supported me in good and bad times (and I hope they will continue to do so ☺).

PRILOGA A

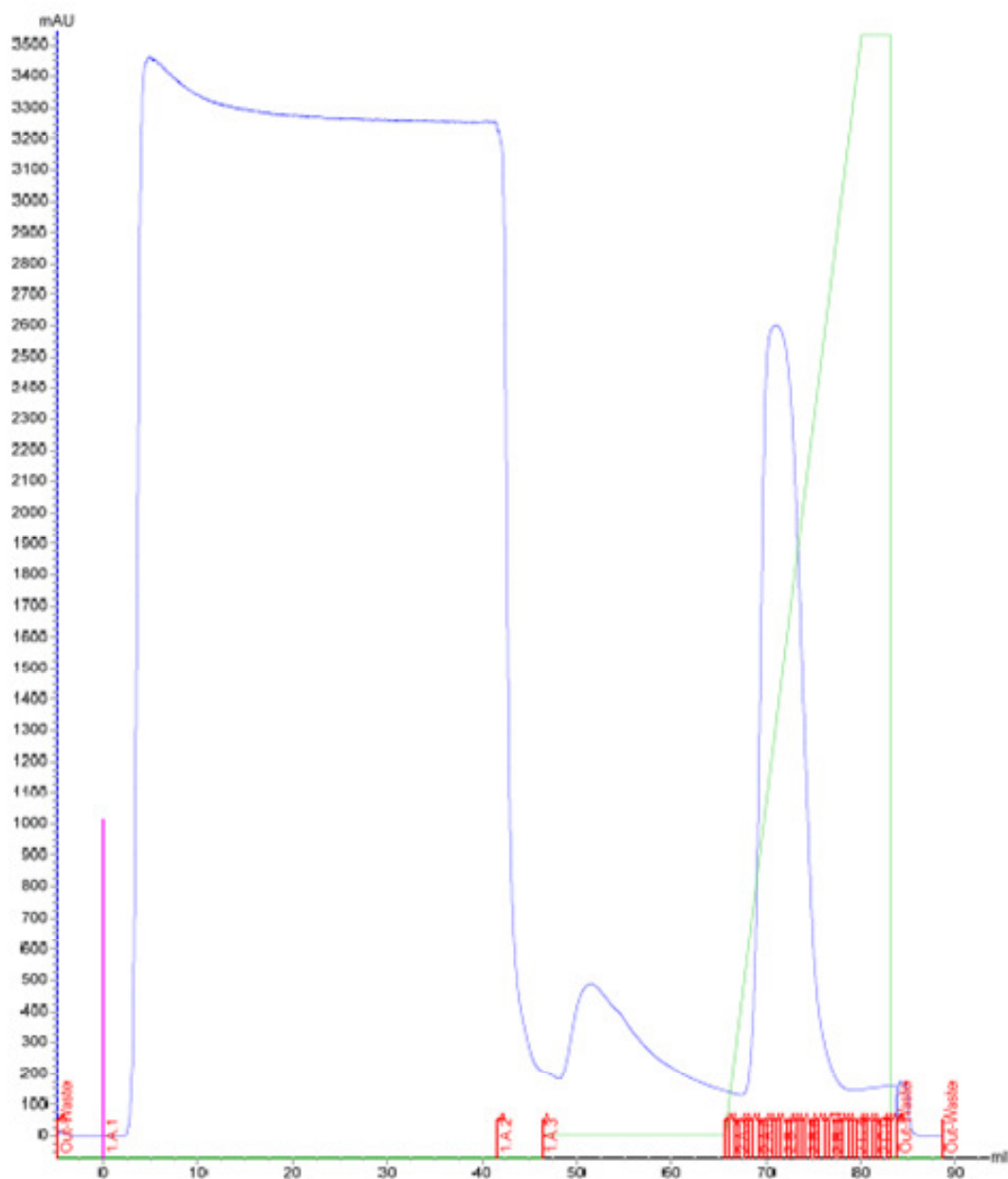
Blokovna shema proizvodnega procesa v laboratorijskem merilu



PRILOGA B

Kromatogrami iz afinitetne kromatografije

Modro obarvane črte na kromatogramih predstavljajo signal absorbance, izmerjene pri valovni dolžini 280 nm. Zeleno obarvane črte pa predstavljajo elucijski gradient. Na x-osi so z rdečo označene elucijske frakcije.

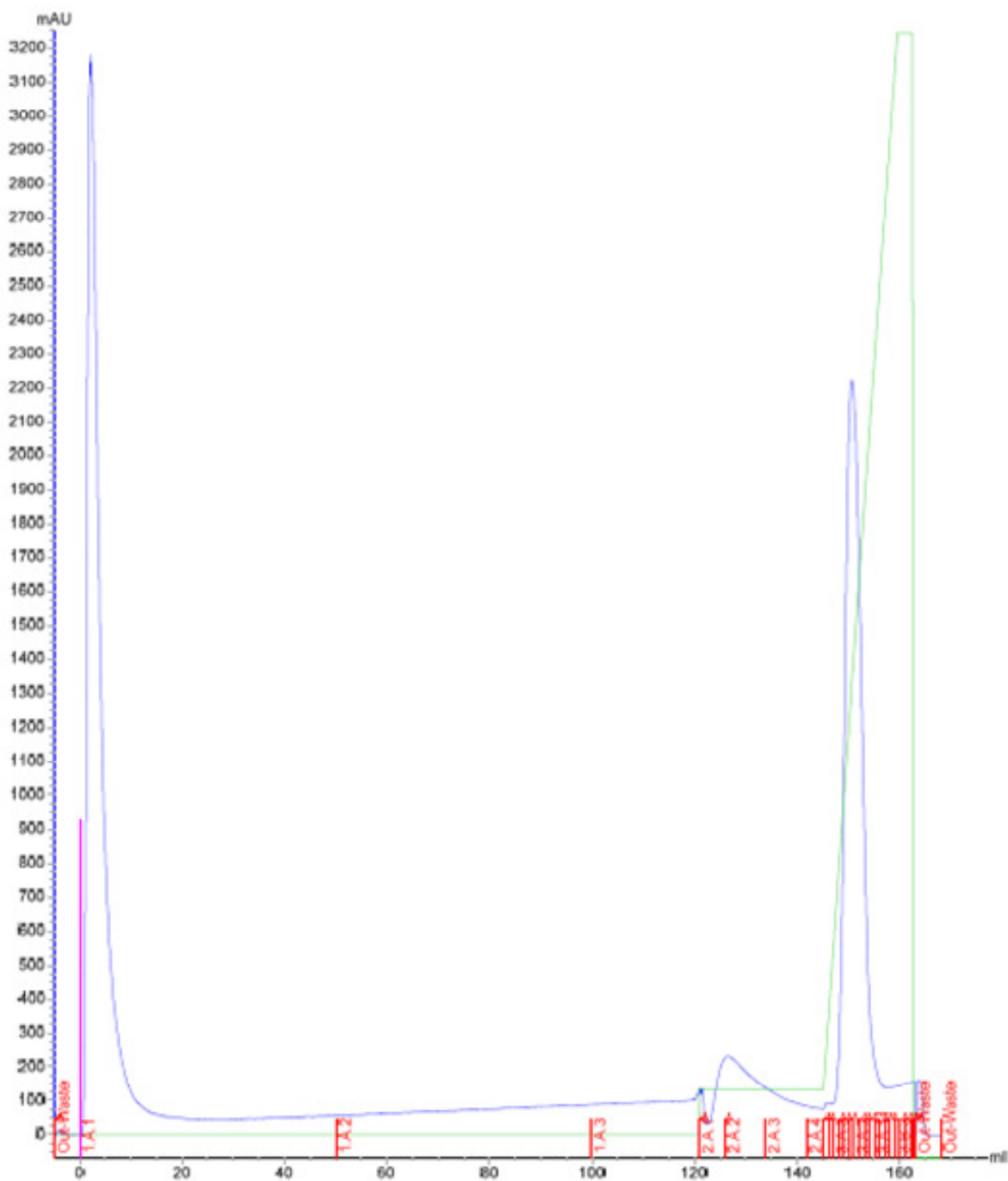


Kromatogram iz prvega koraka afinitetne kromatografije pri encimu Ara1_his.

Se nadaljuje...

NADALJEVANJE PRILOGE B

Kromatogrami iz afinitetne kromatografije

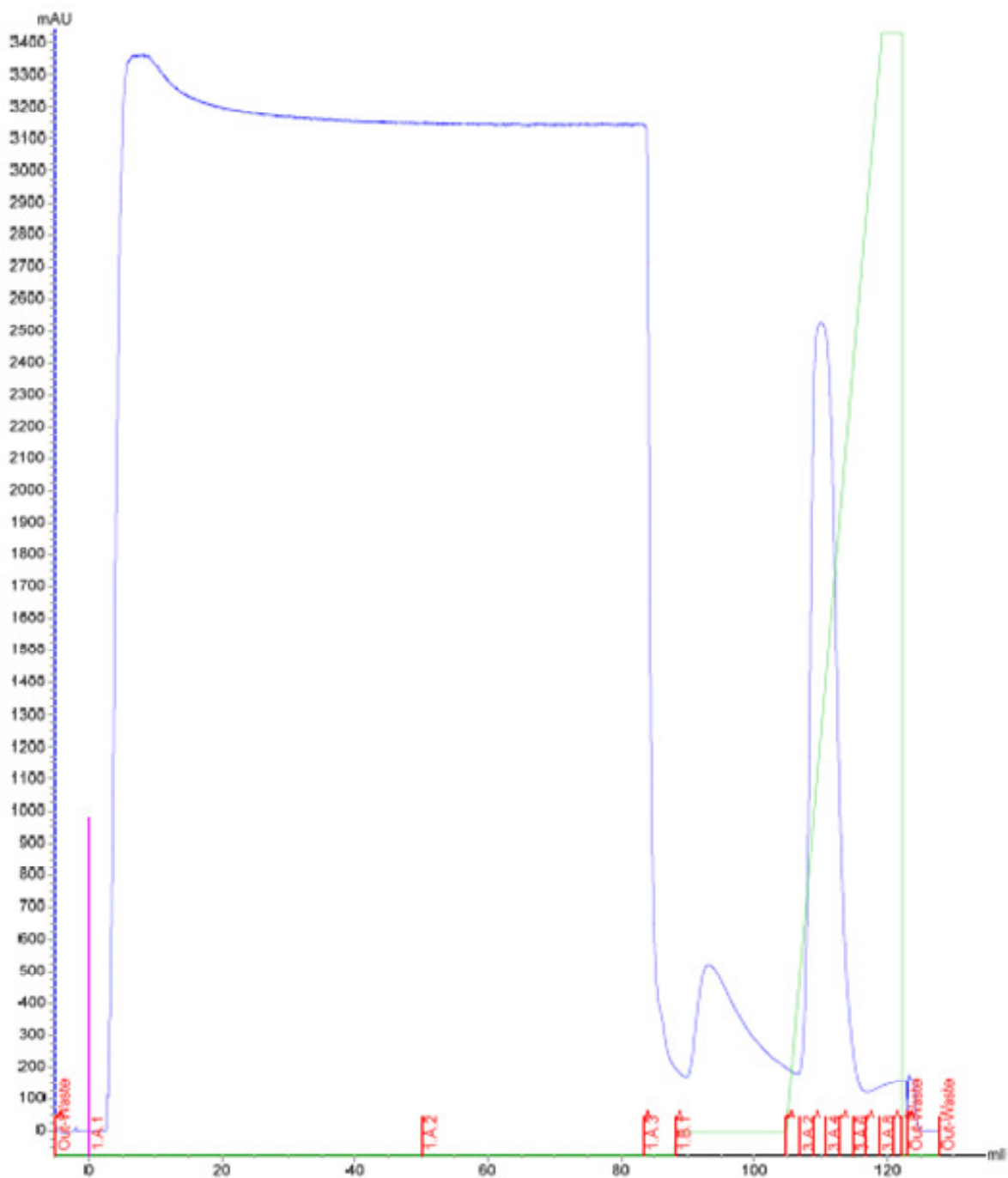


Kromatogram iz drugega koraka afinitetne kromatografije pri encimu Ara1_his.

Se nadaljuje...

NADALJEVANJE PRILOGE B

Kromatogrami iz afinitetne kromatografije

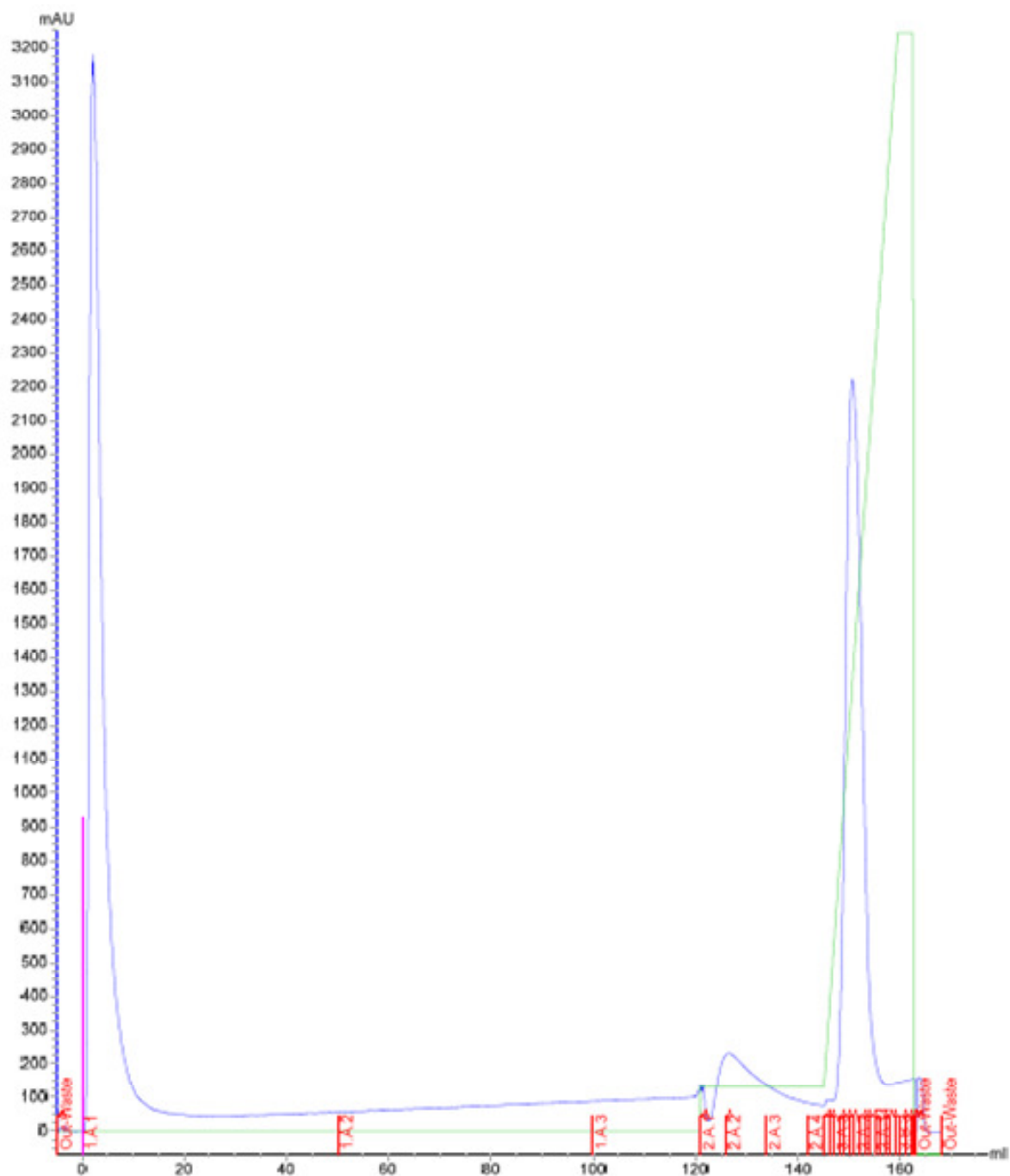


Kromatogram iz prvega koraka afinitetne kromatografije pri encimu Ara2_his.

Se nadaljuje...

NADALJEVANJE PRILOGE B

Kromatogrami iz afinitetne kromatografije

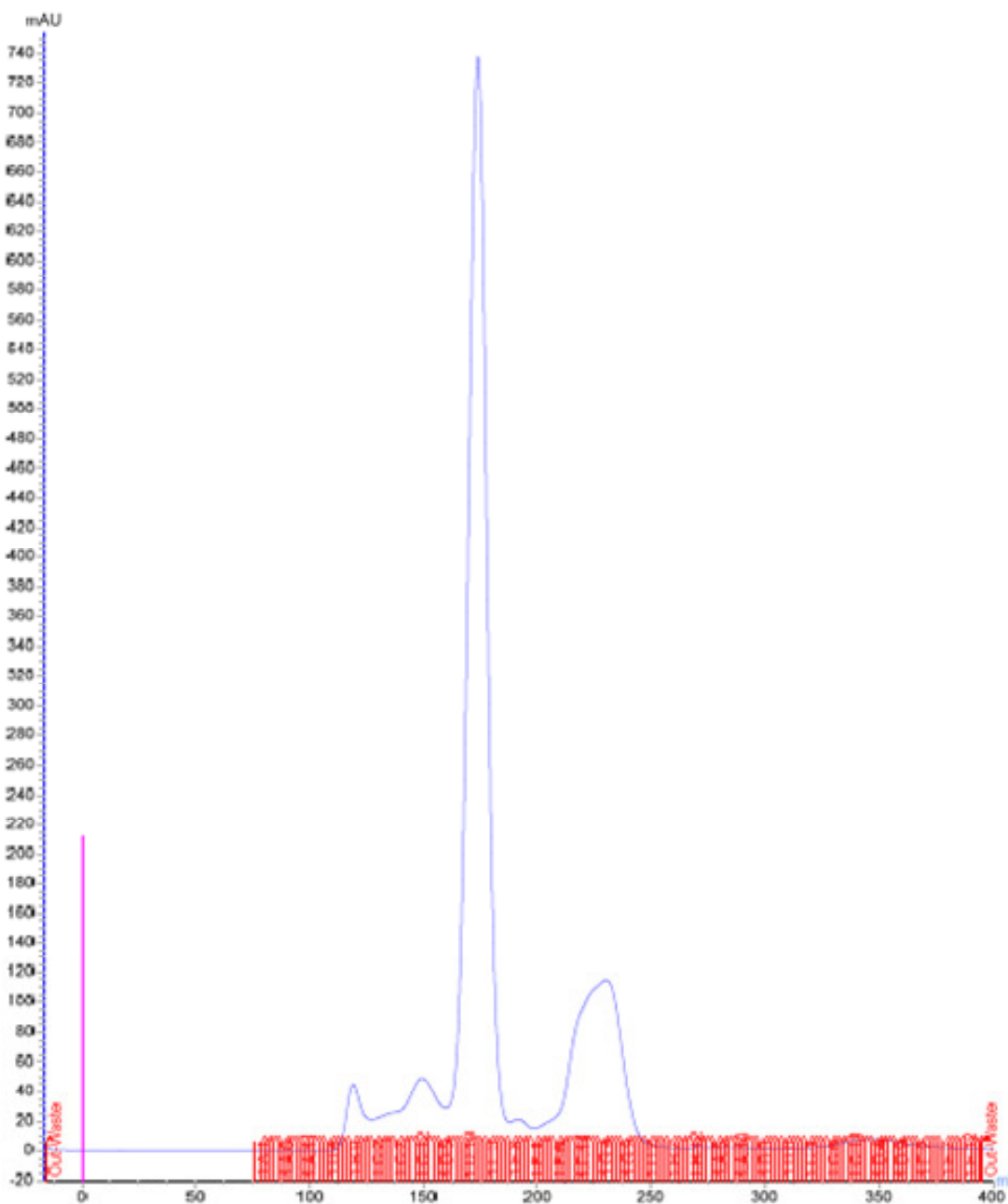


Kromatogram iz drugega koraka afinitetne kromatografije pri encimu Ara2_{his}.

PRILOGA C

Kromatograma iz gelske filtracije

Modro obarvane črte na kromatogramih predstavljajo signal absorbance, izmerjene pri valovni dolžini 280 nm. Na x-osi so z rdečo označene elucijske frakcije.

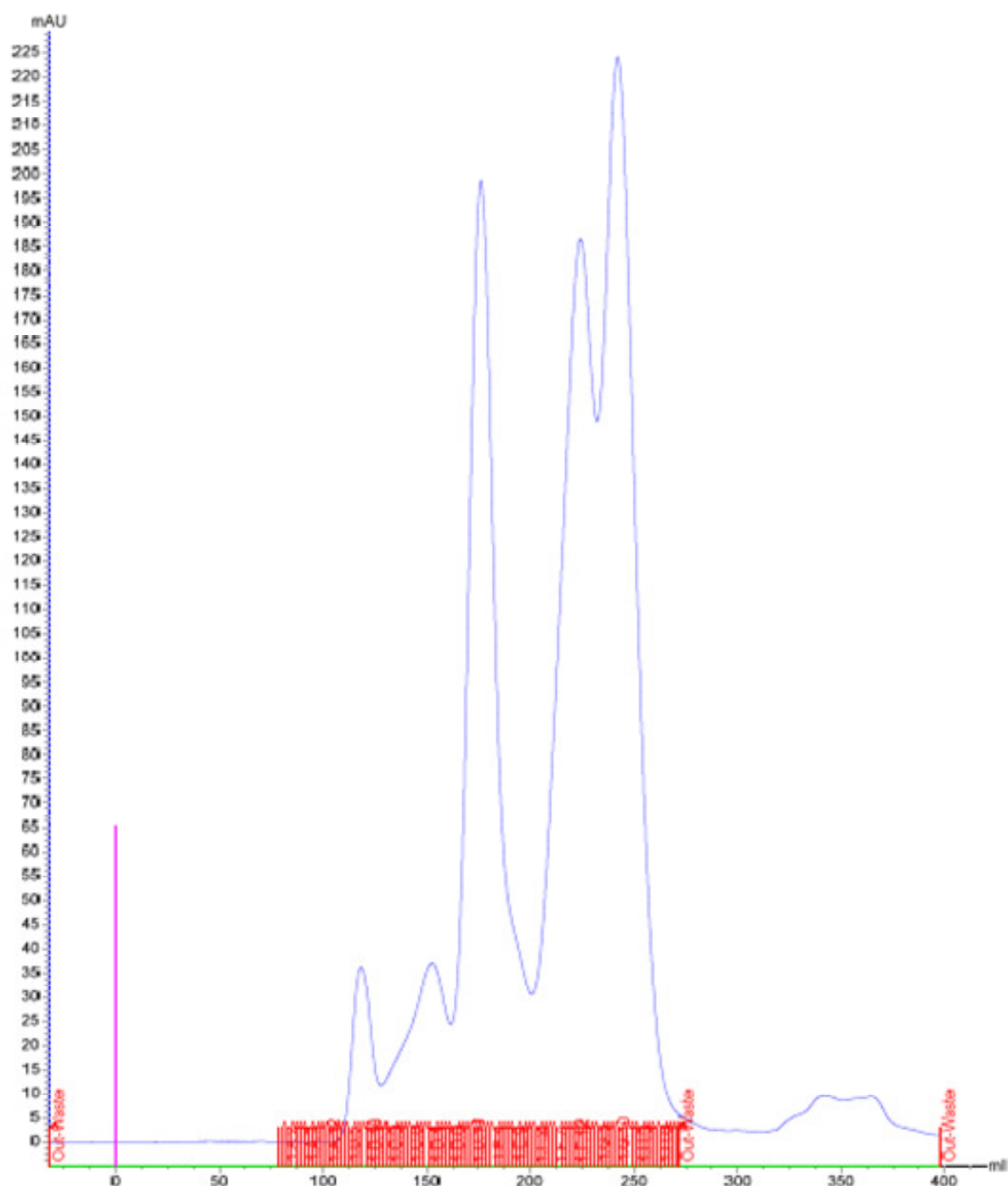


Kromatogram iz gelske filtracije pri encimu Ara1_{his}.

Se nadaljuje...

NADALJEVANJE PRILOGE C

Kromatograma iz gelske filtracije



Kromatogram iz gelske filtracije pri encimu Ara2_{his}.

PRILOGA D

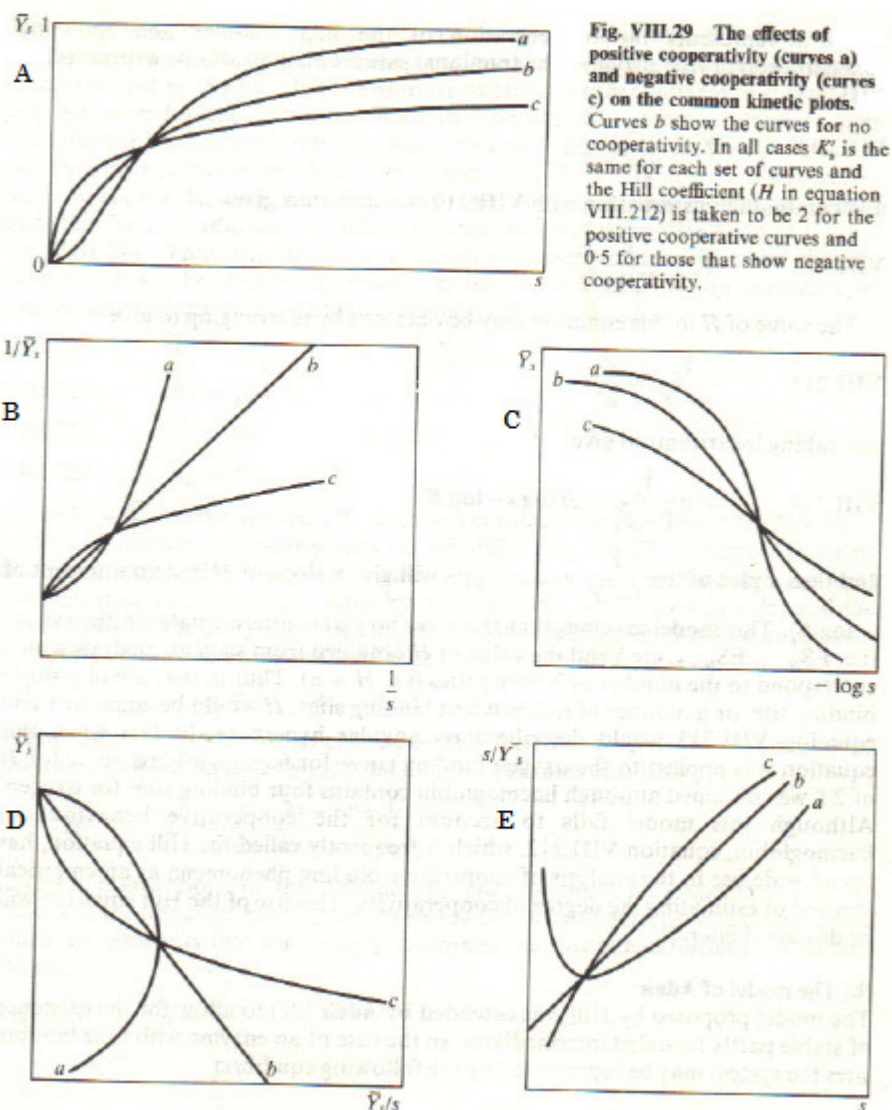
Preglednica lastnosti okarakteriziranih encimov iz naloge in drugih objavljenih arabinaz in arabinofuranozidaz

Ime proteina (organizem)	T opt. [°C]	pH-opt.	Sub- strat	K_m [mg/ml]	V_{max} [mmol/ min *mg]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [ml/mg*s]	Ioni	Vir
α -L-arabinofuranozidaza Ara1_his (<i>Bifidobacterium longum</i>)	50	6,8	R	2,13	62,15	3390	1592	Ca ²⁺	To delo
ekso-1,5- α -L-arabinanaza Ara2_his (<i>Bifidobacterium longum</i>)	37	5,75	N	3,5	58,65	3800	1086	Ne	To delo
endo- α -1,5-L-arabinanaza (<i>Aspergillus aculeatus</i> CBS101-43)	50	5,5	N	66 mM	0,011 min ⁻¹	ND	ND	ND	Skjot in sod., 2001
endo- α -1,5-L-arabinanaza (<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str.168)	50	7	L	2	0,25	ND	ND	Ne	Inacio in de Sa- Nogueira, 2008
endo- α -1,5-L-arabinanaza (<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str.168)	60	6	L	5,92	1,31	ND	ND	Ca ²⁺	Leal in de Sa- Nogueira, 2004
endo- α -1,5-L-arabinanaza / exo- α -1,5-L-arabinanaza 43A (<i>Cellvibrio japonius</i> Ueda107)	ND	ND	L	2,6	ND	17,1	ND	ND	McKie in sod., 1997
endo- α -1,5-L-arabinanaza (<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> TS-3)	70	6	N in R	8,5 (N), 45 (R)	1,6 (N), 1,1 (R)	ND	ND	Ca ²⁺	Takao in sod., 2002
α -L-arabinofuranozidaza 43A (<i>Paenibacillus polymyxa</i> ATCC 842)	55	6,5	X	ND	ND	ND	ND	ND	Morales in sod., 1995
endo- α -1,5-L-arabinanaza (<i>Penicillium chrysogenum</i> 31B)	60	6,5	N	ND	ND	ND	ND	ND	Sakamoto in sod., 2012
exo- α -1,5-L- arabinofuranozidaza II (<i>Streptomyces chartreusis</i> GS901)	50	7	X, G, R in N	ND	ND	ND	ND	ND	Matsuo in sod. 2000
endo- α -1,5-L-arabinanaza (<i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1)	73	6	N	19,9	478,2 mg/ml/min	ND	ND	Ca ²⁺	Squina in sod., 2010
endo-arabinanaza (<i>Thermotoga thermarum</i> DSM 5069)	75	6,5	L, N in R	12,3(L), 3,3 (N), 28,6 (R)	ND	349,3(L), 169,6(N), 54,4 (R)	28,4 (L), 51,4(N), 1,9 (R)	Ca ²⁺	Shi in sod. 2014

T opt = temperaturni optimum, pH-opt. = pH-optimum, K_m = Michaelisova konstanta, V_{max} = maksimalna hitrost encimske reakcije, k_{cat} = pretvorbena število, k_{cat}/K_m = vrednost katalitične učinkovitosti, R = razvejani arabinan, N = nerazvejani arabinan, L = linearni arabinan, X = arabinoksilan, G = arabinogalaktan, ND = ni določeno.

PRILOGA E

Vpliv pozitivne in negativne kooperativnosti na krivulje encimske kinetike (Dixon in Webb, 1979)

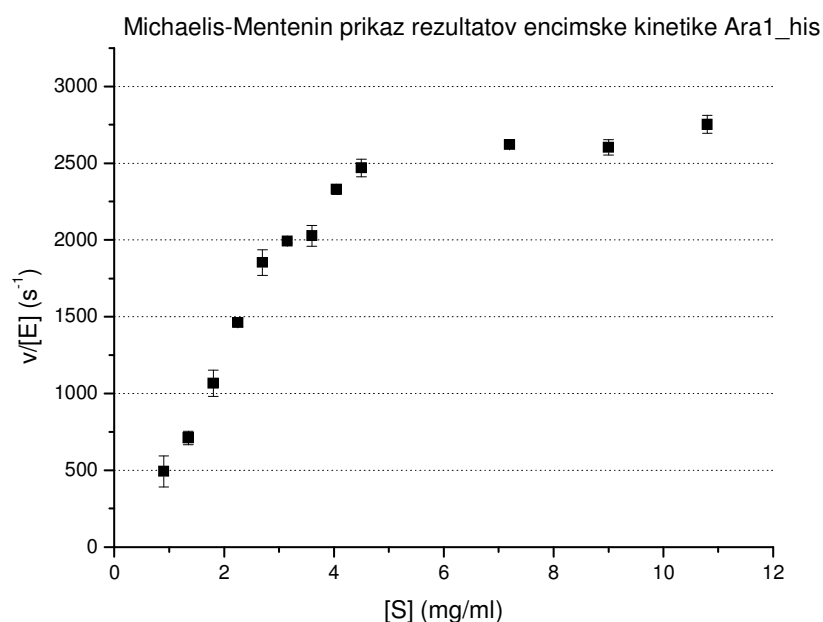


A = Michaelis-Mentenin model, B = Lineweaver-Burkov model, C = hitrost zasičenja vezavnih mest v odvisnosti od negativnega logaritma koncentracije substrata, D = Eadie-Hofsteeov model, E = Hanes-Wolffov model, s = koncentracija substrata oziroma vezanega liganda, $\bar{V}$ = hitrost zasičenja vezavnih mest, a = oblika krivulje v primeru pozitivne kooperativnosti, b = oblika krivulje brez kooperativnega efekta, c = oblika krivulje v primeru negativne kooperativnosti.

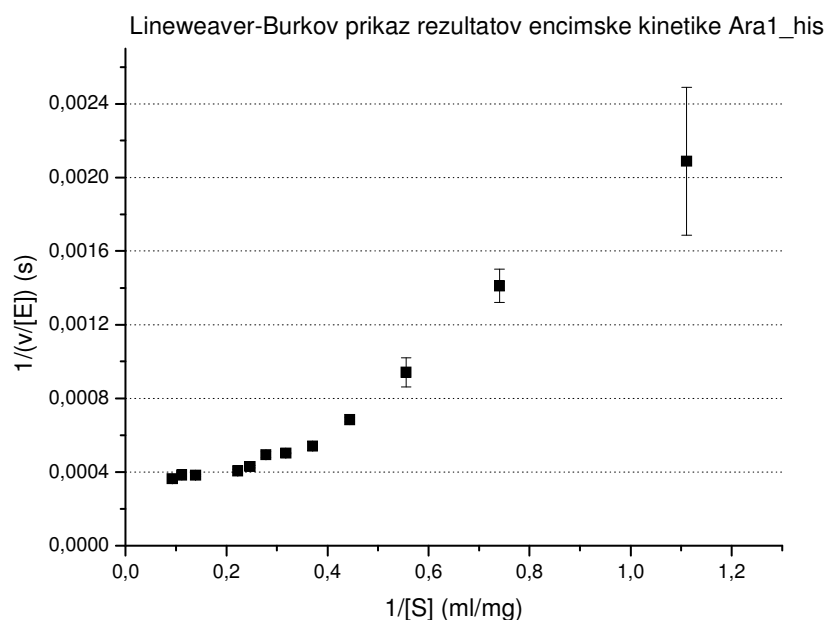
Za primerjavo smo uporabili grafe, ki so na sliki označeni s črkami A, B, D in E. Hitrost zasičenja vezavnih mest ($\bar{V}$) je enaka relativni hitrosti encimske reakcije, ob predpostavki, da je hitrost reakcije direktna funkcija stopnje zasičenja (Dixon in Webb, 1979).

PRILOGA F

Grafični prikazi vseh podatkov encimske kinetike Ara1_his na različne načine



$v/[E]$ = hitrost encimske reakcije normalizirana na koncentracijo encima $[E]$, s = sekunda, $[S]$ = koncentracija substrata.

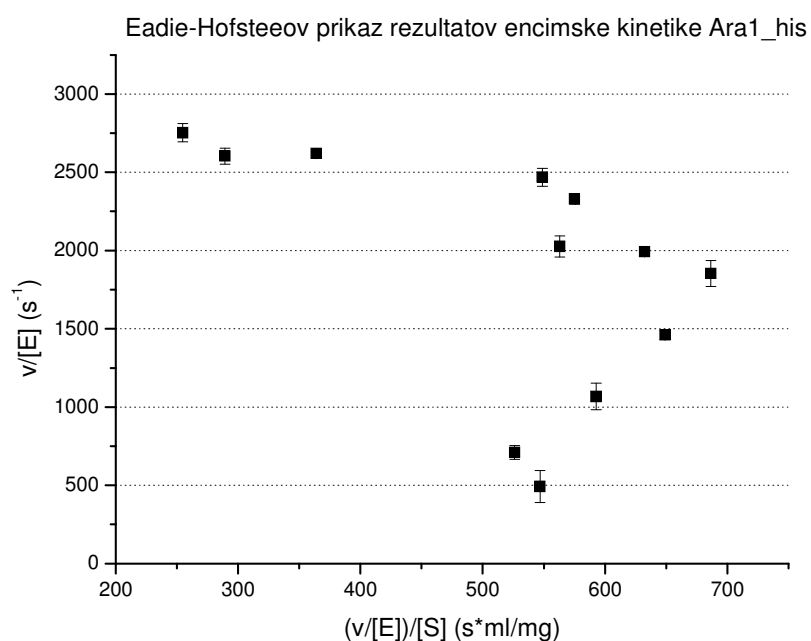


$1/(v/[E])$ = recipročna vrednost hitrosti encimske reakcije normalizirane na koncentracijo encima $[E]$, s = sekunda, $1/[S]$ = recipročna vrednost koncentracije substrata.

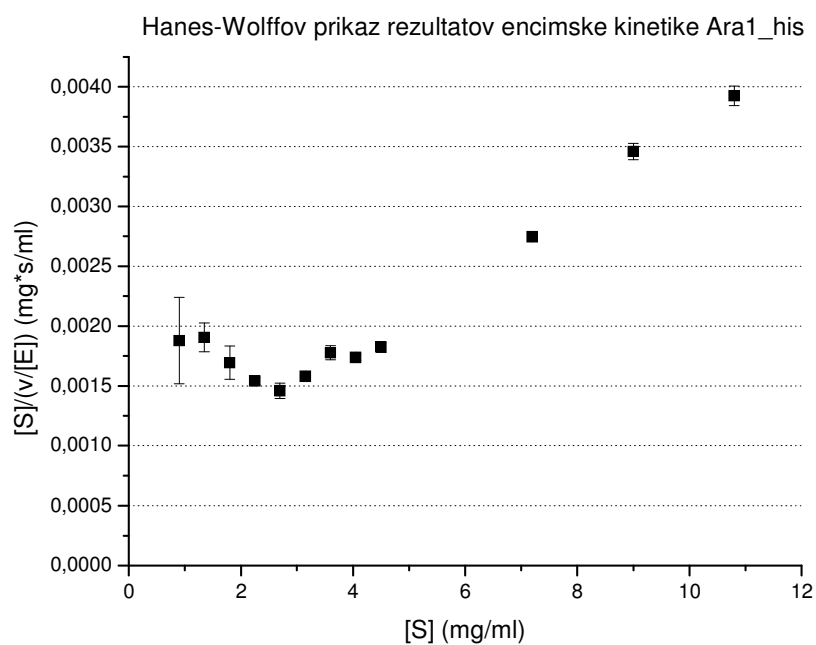
Se nadaljuje...

NADALJEVANJE PRILOGE F

Grafični prikazi vseh podatkov encimske kinetike Ara1_his na različne načine



$v/[E]$ = hitrost encimske reakcije normalizirana na koncentracijo encima $[E]$, s = sekunda, $[S]$ = koncentracija substrata.

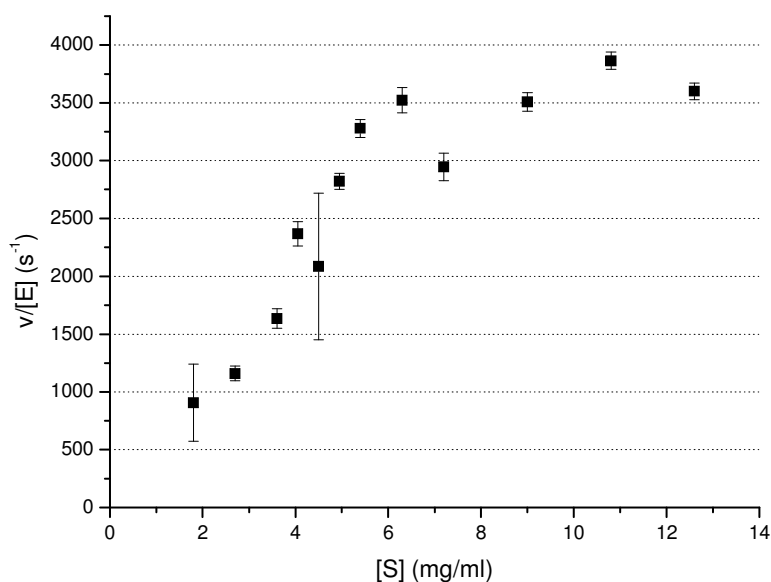


$v/[E]$ = hitrost encimske reakcije normalizirana na koncentracijo encima $[E]$, s = sekunda, $[S]$ = koncentracija substrata.

PRILOGA G

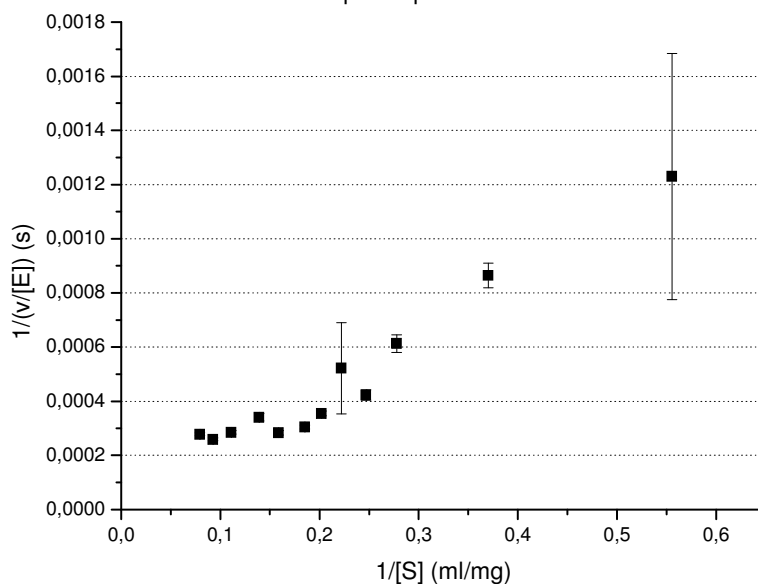
Grafični prikazi vseh podatkov encimske kinetike Ara2_his na različne načine

Michaelis-Menten prikaz podatkov encimske kinetike Ara2_his



$v/[E]$ = hitrost encimske reakcije normalizirana na koncentracijo encima $[E]$, s = sekunda, $[S]$ = koncentracija substrata.

Lineweaver-Burkov prikaz podatkov encimske kinetike Ara2_his

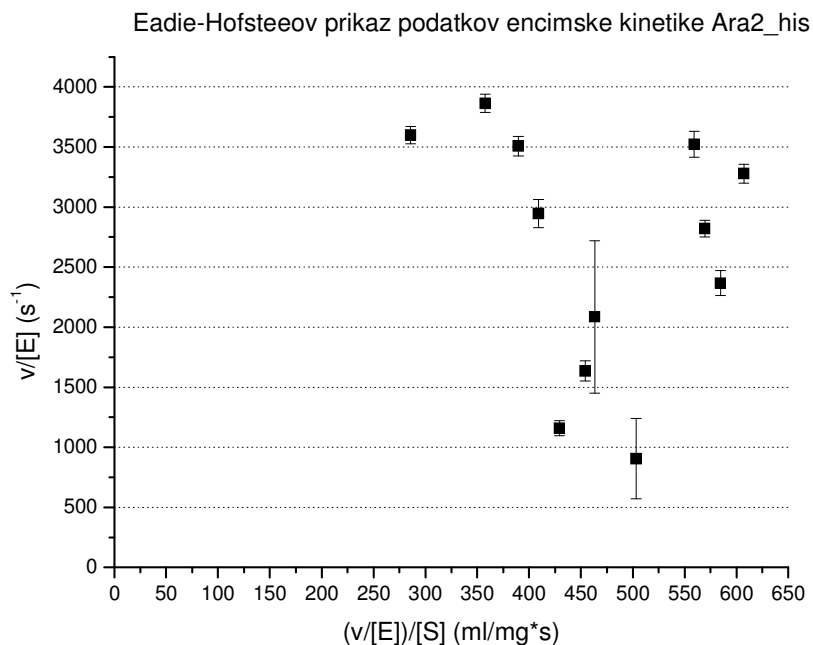


$1/(v/[E])$ = recipročna vrednost hitrosti encimske reakcije normalizirane na koncentracijo encima $[E]$, s = sekunda, $1/[S]$ = recipročna vrednost koncentracije substrata.

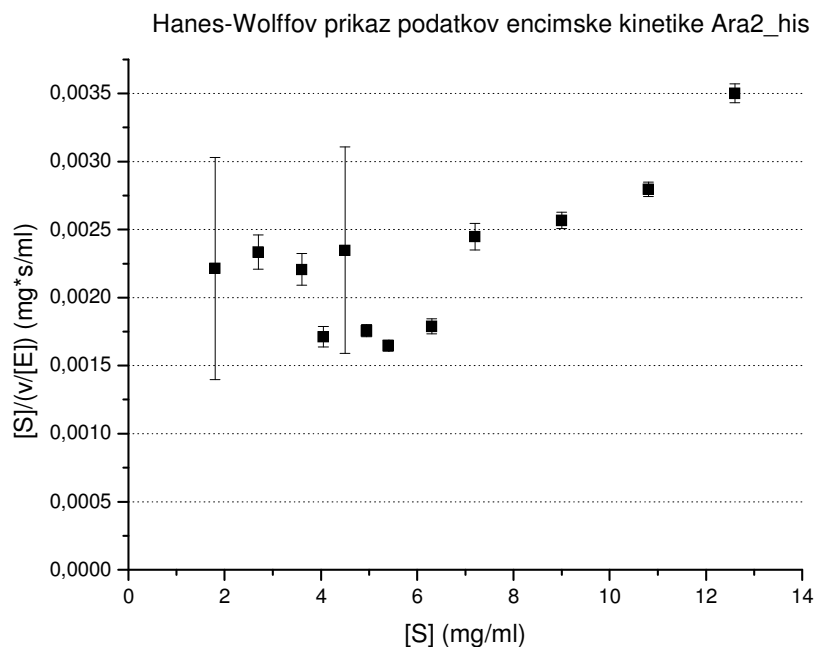
Se nadaljuje...

NADALJEVANJE PRILOGE G

Grafični prikazi vseh podatkov encimske kinetike Ara2_his na različne načine



$v/[E]$ = hitrost encimske reakcije normalizirana na koncentracijo encima $[E]$, s = sekunda, $[S]$ = koncentracija substrata.



$v/[E]$ = hitrost encimske reakcije normalizirana na koncentracijo encima $[E]$, s = sekunda, $[S]$ = koncentracija substrata.