

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Kadri Mardo

***Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc2
iseloomustamine, inaktiivsete mutantide konstrueerimine ja
võrdlus Lsc3 valguga**

Bakalaureusetöö

Juhendajad dots Tiina Alamäe, bioloogiakandidaat

Karin Mardo, magister



TARTU 2014

SISUKORD

SISUKORD	2
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1. Levaansukraasid gramnegatiivsetel ja -positiivsetel bakteritel	5
1.2. Levaansukraaside struktuur ja katalüütiline tsenter.....	6
1.3. <i>Pseudomonas syringae</i> levaansukraasid.....	10
1.4. Fruktooligosahhariidide ja levaani võimalikud rakendused.....	12
2. EKSPERIMENTAALOSA	14
2.1. Töö eesmärgid	14
2.2. Materjal ja meetodika.....	14
2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid	14
2.2.2. Levaansukraasi muteerimine, kloonimine ja geelelektroforees.....	15
2.2.3. Plasmidse DNA viimine bakterirakku, selle eraldamine, kontrollimine, puhastamine ja sekveneerimine	17
2.2.4. Levaansukraasi valkude heteroloogiline süntees ja puhastamine.....	18
2.2.5. Levaansukraasi aktiivsuse määramine.....	19
2.2.6. Transfruktosüüliva aktiivsuse määramine ja polümerisatsiooniproductide analüüs	20
2.2.7. Levaani sünteesi kineetika jälgimine mikroplaadil	22
2.2.8. Thermofluor.....	22
2.2.9. Arvutipõhised meetodid	23
2.3. Tulemused ja arutelu	23
2.3.1. Lsc2 ja Lsc3 valkude järjestuste võrdlus ja nende kristalliseeritavuse hindamine.....	24
2.3.2. Lsc2 parameetrite iseloomustamine	27
2.3.3. Lsc2 ennustatud katalüütilise kolmiku eksperimentaalne tõestamine.....	32
2.3.4. Lsc2 ja tema katalüütiliselt inaktiivsete mutantide termostabiilsuse uurimine doonor- ja aktseptorsubstraatide juuresolekul	37
KOKKUVÕTE	42
SUMMARY	44
KASUTATUD KIRJANDUS	45
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	51
LISA 1	52
LISA 2	53
LIHTLITSENTS.....	54

KASUTATUD LÜHENDID

ah – aminohape

Amp – ampitsilliin

ap – aluspaar

DNSA – 3,5-dinitrosalitsüülhape

FOS – fruktooligosahhariid

GH – glükosiidi hüdrolaas

HPLC – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (*High-Performance Liquid Chromatography*)

IPTG – isopropüül- β -D-1-tiogalaktopüranosiid

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

kDa – kilodalton

K_m – Michaelis'e konstant, mis näitab ensüümi afiinsust substraadile (mM)

LB – Luria-Bertani (sööde)

LevU – *Zymomonas mobilis*'e levaansukraas

Lsc1, Lsc2, Lsc3 – *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasid

LscA, LscB, LscC – *Pseudomonas syringae* pv. glycinea levaansukraasid

LsdA – *Gluconacetobacter diazotrophicus*'e levaansukraas

LsrA – *Rahnella aquatilis*'e levaansukraas

MsFFase – *Microbacterium saccharophilum* tüve K-1 β -fruktofuranosidaas

OD – optiline tihedus (*optical density*)

PA – polümeerisatsiooniaste

PDB – *Protein Data Bank*, valgustruktuuride andmebaas

pv. – patovar, haigust põhjustav alamliik

SacB – *Bacillus subtilis*'e või *B. megaterium*'i levaansukraas

SDS – Na-dodetsüülsulfaat

TA – transfruktosüüliv aktiivsus

TAE – Tris-atsetaat-EDTA

TEV – tubakaviirus (*Tobacco Etch Virus*)

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

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

SISSEJUHATUS

Levaansukraas on bakteriaalne rakuväline ensüüm, millel on nii substraati hüdrolyüsiv kui ka polümeriseeriv aktiivsus. Tema põhisubstraadiks on sahharoos ning reaktsiooniproduktideks pika ahelaga levaan ja lühikesed fruktooligosahhariidid. Bakterid kasutavad fruktaane erinevatel eesmärkidel: pindadele kinnitumiseks, biofilmi moodustamiseks, virulentsusfaktorina taimepatogeneesis ja varuainena stressitingimustes. Inimesele võiksid mikroobsed fruktaanid olla kasulikud nende prebiootilise toime tõttu – nad soodustavad jämesooles elutsevate kasulike bakterite kasvu. Lisaks on fruktaanidel täheldatud immuunsüsteemi stimuleerivat ja vähivastast toimet ning neid saaks kasutada ka kosmeetikatööstuses. Meie grupis on põhjalikult uuritud taimepatogeeni *Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc3 ja näidatud, et see valk sünteesib sahharoosist suures koguses fruktooligosahhariide ja levaani.

Levaansukraasid kuuluvad glükosiidi hüdrolaaside perekonda 68, mille liikmetele on omane viielabaline β -propellerstruktuur. Ensüümi tsentraalses õõnsuses paikneb tema aktiivtsenter, milles võtmepositsioonil on kolm happelist aminohapet, nn katalüütiline kolmik. Katalüütilise kolmiku mutante saaks kasutada näiteks valgu kristalliseerimiseks koos aktiivtsentrisse seostunud substraadiga, sahharoosi, rafinoosi või stahhüoosiga. Sellisel juhul seotakse substraat tugevalt ensüümiga, kuid sellele ei järgne katalüüsi.

Minu bakalaureusetöö esimeseks eesmärgiks oli ekspresseerida *Escherichia coli*'s ja puhastada *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraas Lsc2 ning võrrelda selle katalüütilisi omadusi meie töögrupis varasemalt kirjeldatud Lsc3 valgu omadega. Teiseks eesmärgiks oli tõestada eksperimentaalselt Lsc2 valgu varem ennustatud katalüütilise kolmiku aminohapped. Täpsemad töö eesmärgid on toodud peatükis 2.1.

Töö tehti Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudis Geneetika õppetoolis, ETA granti GLOMR 9072 ja SA Archimedes koordineeritava biotehnoloogia projekti 3.2.0701.12-0041 „*Design and application of novel levansucrase catalysts for the production of functional food ingredients (Functional Food Ingredients)*“ SLOMR12215T raames. Tahaksin tänada oma juhendajaid Tiina Alamäed ja Karin Mardot, kes aitasid käesoleva töö koostada ja praktilist tööd planeerida. Veel tänaksin Dmitri Lubenetsi ja teisi TÜMRI töötajaid, kes panustasid töö valmimisse ning Heiki Vijat Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudist (Tallinn), kes tegi kõrgefektiivse vedelikkromatograafia analüüsid.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Levaansukraasid gramnegatiivsetel ja -positiivsetel bakteritel

Levaansukraasid (EC 2.4.1.10) on bakteriaalsed rakuvälised ensüümid, mis katalüüsivad nii hüdroolüüsi- kui ka polümerisatsioonireaktsioone. Ensüümi peamiseks substraadiks on sahharoos, millelt eemaldatud fruktoosijääkide ülekandmisel aktseptorile moodustuvad nii fruktooligosahhariidid (FOS-id) kui ka polümeerne levaan. Sahharoosi hüdroolüüsireaktsioonis, kus aktseptoriks on vesi, tekivad produktidena glükoos ja fruktoos (Lammens *et al.*, 2009). Levaansukraase on leitud nii grampositiivsetel kui ka -negatiivsetel bakteritel, aga ka mõnedel arhedel. Grampositiivsetest bakteritest sünteesivad seda ensüümi näiteks *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Streptococcus mutans*, *Microbacterium saccharophilum* ja mitmed laktobatsillid. Gramnegatiivsetest bakteritest on levaansukraas näiteks *Gluconacetobacter diazotrophicus*'el, *Pseudomonas syringae* patovaridel (pv.), *Rahnella aquatilis*'el, *Erwinia amylovora*'l ja *Zymomonas mobilis*'el (<http://brenda-enzymes.info>). Levaansukraasid erinevad üksteisest mitmete tunnuste, näiteks molekulmassi, sekretsioonimehhanismi ja ka biokeemiliste omaduste poolest.

Gramnegatiivsete bakterite levaansukraasid on suhteliselt väikesed, enamasti 415-431 aminohappe pikkused (<http://www.cazy.org>). Molekulmassid varieeruvad 45 kilodaltonist (kDa) kuni 64 kDa-ni (Kang *et al.*, 2005). Näiteks *R. aquatilis*'e LsrA molekulmass on 45.9 kDa, *P. syringae* levaansukraasidel Lsc2 ja Lsc3 on vastavad näitajad 45.9 ja 47.8 kDa ning *G. diazotrophicus*'e LsdA molekulmass on 64.9 kDa (Arrieta *et al.*, 1996; Seo *et al.*, 2000; Visnapuu, 2012). Grampositiivsete bakterite levaansukraasid on enamasti suuremad. Näiteks laktobatsillide levaansukraasid on üle 800 aminohappe pikkused ning nende molekulmassid ulatuvad 90-110 kDa-ni (van Hijum *et al.*, 2001; Tiekling *et al.*, 2005). Grampositiivsete bakterite levaansukraasidel on N-terminaalses otsas signaalpeptiid, mis osaleb valgu sekreteerimisel (Ito *et al.*, 2002; Meng ja Fütterer, 2003; van Hijum *et al.*, 2006). Gramnegatiivsete bakterite levaansukraasidel signaalpeptiidi üldjuhul ei esine, välja arvatud *G. diazotrophicus*'e LsdA valgul, mille N-terminaalne 30-aminohappeline signaalpeptiid lõigatakse ära ensüümi transportimisel periplasmasse (Hernandez *et al.*, 2000). Teiste gramnegatiivsete bakterite levaansukraaside sekretsioonimehhanismid on veel ebaselged, kuid arvatakse, et need valgud väljutatakse rakust signaalpeptiidist sõltumatu raja kaudu (Song ja Rhee, 1994; Li *et al.*, 2006).

Grampositiivsete bakterite levaansukraaside aktiivsuse ja struktuuri säilitamiseks on vajalikud Ca^{2+} -ioonid. *B. subtilis*'e levaansukraasis osalevad selle sidumisel Asp339 ja alus-hape katalüüsija Glu342. Arvatakse, et Ca^{2+} -ioonid seovad valgu erinevaid osi ning stabiliseerivad sellega valgu struktuuri (Meng ja Fütterer, 2003). *Lactobacillus reuterii* 121 levaansukraasis (Lev) osaleb Ca^{2+} -ioonide sidumises Asp500. Kui Lev valgus asendati Asp500 asparagiiniga võialaniiniga, siis muutus valk märgatavalt termolabiilsemaks (Ozimek *et al.*, 2005). Gramnegatiivse bakteri *P. syringae* pv. tomato levaansukraasi (Lsc3) stabiilsust ega aktiivsust ei mõjuta Ca^{2+} -ioonide juuresolek (Visnapuu, 2012) ja kui asendada Lsc3 valgus Asp300 (vastab Lev valgu Asp500 positsioonile) asparagiiniga, siis sellega ei kaasne olulist termostabiilsuse langust (Mardo, 2011; Mardo *et al.*, 2014b). Martinez-Fleites *et al.* (2005) näitavad, et näiteks *G. diazotrophicus*'e levaansukraasis stabiliseerib valgu struktuuri hoopis disulfiidsild kahe tsüsteiini vahel, kuid vastavate aminohapete positsioonid pole levaansukraasides konserveerunud.

Levaansukraasid on valdavalt rakuvälised ensüümid (Hernandez *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2006), kuid on ka erandeid. Näiteks *P. syringae* pv. glycinea levaansukraas LscB paikneb ekstratsellulaarselt, kuid LscC jääb periplasmasse (Li ja Ullrich, 2001). Laktobatsillide levaansukraasidel on C-terminaalses osas omapärane ankurdomeen, mille abil jääb valk sekretsioonijärgselt ajutiselt rakukestaga seotuks (Tieking *et al.*, 2005; van Hijum *et al.*, 2006). Kui aga levaansukraase ekspresseerida *E. coli*'s, jäävad ensüümid kas periplasmasse või tsütoplasmasse, kuna soolekepikese sekretsiooniaparaat ei suuda neid rakust välja suunata (Jang *et al.*, 1999). On näidatud, et näiteks *P. syringae* pv. tomato levaansukraas Lsc3 paikneb *E. coli*'s ekspresseerimise korral 88% ulatuses bakteri tsütoplasmas ja 12% ulatuses periplasmas (Visnapuu *et al.*, 2008), kuid näiteks *B. subtilis*'e levaansukraas SacB paikneb peamiselt periplasmas. Kui SacB valku ekspresseerivad *E. coli* rakke kasvatada sahharoosi sisaldaval söötmel, siis rakud lõhkevad, sest läbi välismembraani pooride periplasmasse jõudvast sahharoosist sünteesitakse suures koguses levaani (Steinmetz *et al.*, 1983).

1.2. Levaansukraaside struktuur ja katalüütiline tšenter

Levaansukraasid kuuluvad glükosiidi hüdrolaaside perekonda 68 (GH68) koos β -fruktofuranosidaaside ehk invertaaside ja bakteriaalsete inulosukraasidega. Levanaasid, mitmed invertaasid, taimede fruktaanide sünteesis osalevad fruktosüüli transferaasid, inulosukraasid ja muud ehituselt sarnased valgud on paigutatud GH32 perekonda. Koos moodustavad nad glükosiidi hüdrolaaside klanni J (GH-J) (<http://www.cazy.org>). Grampositiivsete bakterite levaansukraasid on enamasti suuremad ning on neis saab eristada

lisafunktsiooniga piirkondi. Gramnegatiivsete bakterite levaansukraasid on väiksemad ja kompaktsemad (vt 1.1.).

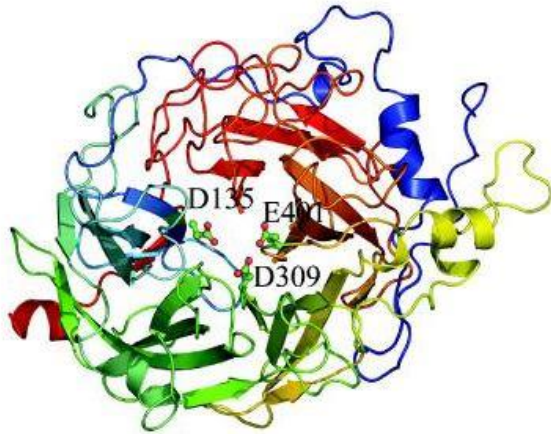
Praeguseks on teada *Bacillus subtilis*'e, *B. megaterium*'i ja *G. diazotrophicus*'e levaansukraaside kristallstruktuurid (Meng ja Fütterer, 2003; 2008; Martinez-Fleites *et al.*, 2005; Strube *et al.*, 2011). *Bacillus subtilis*'e levaansukraasi katalüütiliselt inaktiivne mutant on kristalliseeritud ka kompleksis sahharoosi ning rafinoosiga (Meng ja Fütterer, 2003; 2008). Lisaks on kristallstruktuur tehtud kindlaks ka *Microbacterium saccharophilum* (endine nimetus *Arthrobacter* sp. K-1) β -fruktofuranosidaasil, mis on levaansukraasidega järjestuselt ja ehituselt väga sarnane (Ito *et al.*, 2002; Tonozuka *et al.*, 2012; Ohta *et al.*, 2014). On publitseeritud töö ka *Erwinia amylovora* levaansukraasi valgukristallide saamise kohta (Caputi *et al.*, 2013), kuid valgustruktuuride andmebaasis (PDB) nende kristallide röntgenanalüüsi andmeid veel ei ole.

Tabel 1. Kristalliseeritud levaansukraasid. Andmed pärinevad PDB andmebaasist (<http://www.pdb.org>).

Ensüüm	Ensüümi tähistus	Bakter	PDB ID	Ligand	Difraktsiooni määr (Å)	Viide
Levaansukraas	SacB	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> tüvi 168	1OYG	–	1.50	Meng ja Fütterer, 2003
			1PT2	sahharoos	2.07	Meng ja Fütterer, 2003
			3BYN	rafinoos	2.03	Meng ja Fütterer, 2008
Levaansukraas	LsdA	<i>G. diazotrophicus</i> SRT4	1W18	–	2.50	Martinez-Fleites <i>et al.</i> , 2005
Levaansukraas	SacB	<i>B. megaterium</i>	3OM2	–	1.90	Strube <i>et al.</i> , 2011
β -frukto-furanosidaas*	MsFFase	<i>M. saccharophilum</i>	3VSR	–	2.00	Tonozuka <i>et al.</i> , 2012
			3VSS	fruktoos	1.97	Tonozuka <i>et al.</i> , 2012

*Struktuurilt sarnane levaansukraasidega

Valgukristallide röntgenanalüüs on näidanud, et perekondade GH68 ja GH32 valkudele on iseloomulik 5-labalise β -propelleri struktuur, milles iga laba koosneb omakorda neljast antiparalleelsest β -ahelast. Propelleri labad ümbritsevad valgu negatiivselt laetud taskut, mille põhjas asub aktiivtsenter (Meng ja Fütterer, 2003; Lammens *et al.*, 2009). Joonisel 1 on näidatud *G. diazotrophicus*'e levaansukraasi struktuur.



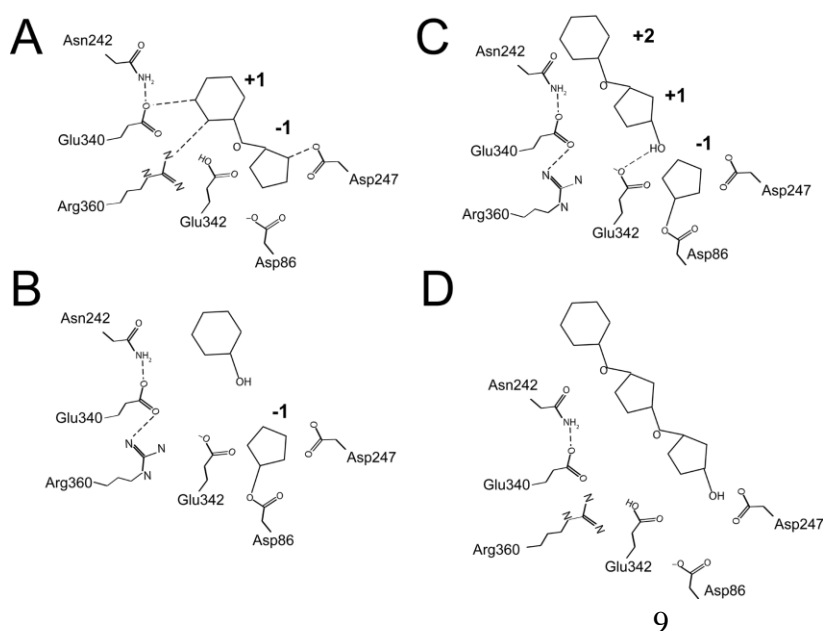
Joonis 1. *Gluconacetobacter diazotrophicus*'e levaansukraasi LsdA struktuur. Joonisel on eri värvidega tähistatud viis β -propelleri laba ning valgu katalüütilise kolmiku aminohapped, mis moodustavad valgu aktiivtsentri (Martinez-Fleites *et al.*, 2005).

Aktiivtsentri aminohapped, kaks aspartaati ja glutamaat, on konserveerunud kõigil seni uuritud GH-J klanni ensüümidel. Üks aspartaat käitub kui nukleofiil, teine kui vaheühendi stabiliseerija ja glutamaat kui alus-hape katalüüsija. Need kolm aminohapet paiknevad propelleri labade sisemistel β -ahelatel (Joonis 1; Martinez-Fleites *et al.*, 2005). *B. subtilis*'e levaansukraasi SacB katalüütilise kolmiku aminohapeteks on Asp86, Asp247 ja Glu342. Kinnitamaks, et need aminohapped kuuluvad aktiivtsentrisse, asendati vastavad aminohappedalaniinidega. See vahetus ei muutnud aktiivtsentri geomeetriat, küll aga langetas tugevalt ensüümi katalüüsivõimet (Meng ja Fütterer, 2008). Meie grupis on eksperimentaalselt kindlaks tehtud katalüütilise kolmiku aminohapped *P. syringae* pv. tomato levaansukraasil Lsc3. Nendeks on Asp62, Asp219 ja Glu303. Nende aminohapete asendamiselalaniinidega langes valgu reaktsioonivõime kuni 130 000 korda (Mardo *et al.*, 2014a). Levaansukraaside joenduselt leiame mitmeid konserveerunud piirkondi, eriti just katalüütilise kolmikusse kuuluvate aminohapete ümbrusest. Näiteks **WD**-motiivi Asp (Asp86 SacB valgus), mis toimib nukleofiilina, seob spetsiifiliselt ensüümi seostumistaskusse sisenenud sahharoosist pärinevat fruktoosijääki (vt Joonis 2). **RDP**-motiivis asub aktiivtsentri teine aspartaat ehk vaheühendi stabiliseerija (Asp247 SacB valgus), mis otseselt katalüüsis ei osale, kuid fikseerib vesiniksidemete abil sahharoosi molekuli substraaditaskusse, seostudes fruktoosijäägiga (Yanase *et al.*, 2002; Nagem *et al.*, 2004; Meng ja Fütterer, 2008; vt ka Joonis 2). Alus-hape katalüüsija asub **D(E/Q)(T/I/V)ER** motiivis, milles glutamaat (Glu342 SacB valgus) osaleb substraadi sidumisel, glükosiidsideme lagundamisel ja uue sideme sünteesil (Meng ja Fütterer, 2003; 2008; Martinez-Fleites *et al.*, 2005; Joonis 2). Neid kolme konserveerunud piirkonda on uuritud ka meie grupis. Töös Mardo *et al.* (2014a) muteeriti mitmeid aminohappeid *P. syringae* pv. tomato Lsc3 valgu piirkondadest, mis paiknesid katalüütilise kolmiku aminohapete ümbruses. Näiteks nukleofiili kõrval oleva Trp61 ja alus-hape

katalüüsijale järgneva aminohappe Arg304 muteerimine alandas drastiliselt ensüümi k_{cat} väärtust ning Gln301 muteerimine alandas väga tugevasti ensüümi polümeriseerimisvõimet (Mardo *et al.*, 2014a).

Substraadi seostumistasku saab jagada alapiirkondadeks. Alapiirkond -1 on kõrge spetsiifilisusega, sinna seostub vaid fruktoosijääk. Alapiirkond +1 on väiksema spetsiifilisusega ja sinna võivad seostuda doonormolekuli (sahharoosi või rafinoosi) glükoosijääk või ka aktseptormolekuli, näiteks sahharoosi, fruktoosijääk (Meng ja Fütterer, 2003; 2008; Martinez-Fleites *et al.*, 2005; Ozimek *et al.*, 2006). Alapiirkonda +1 võivad seostuda ka nn mittetraditsioonilised aktseptorid – glükoproteiinid, glükolipiidid ja mitmed suhkrud, mille tulemusena hakatakse tootma lisaks fruktooligosahhariididele ka heterooligofruktaane (Seibel *et al.*, 2006; Visnapuu *et al.*, 2011). Näiteks *P. syringae* Lsc3 on võimeline transfruktosüleerima vähemalt 11 erinevat akseptormolekuli: D-ksüloosi, D-fukoosi, L- ja D-arabinoosi, D-riboosi, D-sorbitooli, ksülitooli, ksülobioosi, D-mannitooli, D-galakturoonhapet ja metüül- α -D-glükopüranosiidi, mille tulemusena tekivad heterooligofruktaanid polümerisatsiooniastmega vähemalt 5 (Visnapuu *et al.*, 2011).

B. subtilis'e levaansukraasi SacB näitel on kirjeldatud ensüümi transfruktosüleerimisreaktsiooni etappe (vt Joonis 2). Esmalt seostub sahharoos vesiniksidemete abil aktiivtsentri -1 ja +1 alapiirkondadesse (A) ning lõhutakse fruktoosi ja glükoosi vaheline glükosiidside. Glu342 käitub kui hape ja loovutab prootoni eralduvale glükoosijäägile (B). Fruktoosijääk jääb kovalentselt seotuks nukleofiiliga Asp86 (B). Viimasena seostub +1 alapiirkonda aktseptormolekul (C), sünteesitakse glükosiidside ja vabaneb ühe fruktoosijäägi võrra pikenenud aktseptor (D) (Meng ja Fütterer, 2008).



Joonis 2. Levaansukraasi reaktsioonimehhanism *B. subtilis*'e SacB näitel. Esmalt toimub substraadi seondumine ensüümi aktiivtsentrisse (A) ning lõhutakse fruktoosi ja glükoosi vaheline side (B). Seejärel seondub aktseptormolekul (C) ja toimub selle pikendamine ühe fruktoosijäägi võrra (D). Rasvases kirjas numbrid tähistavad ensüümi substraadi seondumise alapiirkondi.

1.3. *Pseudomonas syringae* levaansukraasid

Pseudomonas syringae on taimepatogeen ja tal on kirjeldatud üle 50 erineva patovari, mis erinevad üksteisest nakatatava peremeestaime poolest. *Pseudomonas syringae* nakatab tüvespetsiifiliselt näiteks uba, tomatit, oliivipuud, kurki ja veel teisi majanduslikult tähtsaid taimi. Näiteks *P. syringae* pv. tomato DC3000 nakatab tomatit ja müürlooka (*Arabidopsis thaliana*), *P. syringae* pv. glycinea PG4180 on aga sojaosa patogeen. Mõlemad põhjustavad taime lehtedel ning vartel nekroosilaike. Arvatakse, et levaansukraas võib rolli mängida fütopatogeneesis, sest kui vastavat ensüümi kodeeriv geen inaktiveerida, siis haigusnähud vähenevad (Koczan *et al.*, 2009). Levaani tootmine võib olla oluline bakteri kinnitumisel lehe pinnale ja levaan võib kaitsta mikroobi varajases nakatamisfaasis taime kaitsemehhanismide eest (Hettwer *et al.*, 1995; Li ja Ullrich, 2001).

P. syringae pv. tomato DC3000, *P. syringae* pv. syringae B728a ja *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A genoomide analüüs näitab, et enamikel *P. syringae* patovaridel on kolm levaansukraasi geeni, millest kaks paiknevad kromosoomis ja üks plasmiidil (www.pseudomonas-syringae.org; Li ja Ullrich, 2001; Srivastava *et al.*, 2012). Näiteks *P. syringae* pv. tomato DC3000 puhul paikneb *lsc3* plasmiidil pDC3000A ja kaks ülejäänud levaansukraasi kodeerivat geeni (*lsc1* ja *lsc2*) on kromosoomis. Plasmiid pDC3000A (73661 ap) on üks kahest selles tüves leiduvast plasmiidist, millel paikneb rohkesti virulentsusgene (Buell *et al.*, 2003). Samas *P. syringae* pv. syringae B728a puuduvad plasmiidid ja tema kaks levaansukraasi kodeerivat geeni paiknevad mõlemad kromosoomis (www.pseudomonas-syringae.org).

P. syringae patovaride levaansukraasid on väga sarnased. Näiteks *P. syringae* pv. tomato levaansukraasid Lsc1 ja Lsc3 on 96% ulatuses identsed ja kumbki on 95% identne Lsc2-ga (Visnapuu, 2007; vt Tabel 3). *P. syringae* levaansukraaside peamine erinevus ilmneb valgus N-terminaalses osas: 431 aminohappe pikkusel valgul on N-terminuses 16 ah pikkune järjestus, mis 415 ah valgul puudub. N-terminaalse lisajärjestuse funktsioon on täpselt teadmata, kuid suure tõenäosusega ei osale ta valgus sekretsioonis (Li ja Ullrich, 2001; Li *et al.*, 2006). Arvatavasti on lühem levaansukraas ürgsema päritoluga. On tõendeid selle kohta, et *P. syringae* pikemad (431 ah) levaansukraasid võisid tekkida lühikesest (415 ah) levaansukraasist. Srivastava *et al.* (2012) ja Khandekar *et al.* (2014) näitasid oma töödes, et see võis toimuda nii, et bakteriofaagi osalusel sisenes DNA lõik mittefunktsionaalse promotoriga levaansukraasi geenikoopia kodeeriva järjestuse ette, mille tagajärel tekkis geenile töötav promootor ja valgus N-terminusse lisandus 16 aminohapet. Mittetöötava

promootoriga levaansukraasi geen on ka *lscA* *P. syringae* pv. *glycinea*'l. Alles siis, kui seda geeni ekspresseeriti *E. coli*'s LacZ promootorilt, toimus LscA valgu süntees (Hettwer *et al.*, 1998). Huvitaval kombel oli *P. syringae* pv. *glycinea* *lscA* geeni promootor funktsionaalne *Erwinia herbicola*'s (Srivastava *et al.*, 2012). *P. syringae* pv. *glycinea* teised kaks levaansukraasi, LscB ja LscC, paiknevad looduslikus peremeesbakteris erinevalt: LscC on periplasmas ja LscB suunatakse rakust välja. Siiski, vähemalt üks levaansukraasi kodeeriv geen peaks peremehes avalduma, sest kui rakke kasvatada sahharoosi sisaldaval söötmel, toodavad bakterid levaani ja kolooniad on limased (Li ja Ullrich, 2001).

Levaansukraasid on võimelised kasutama substraadiks üldjuhul sahharoosi (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2) β -D-Fruf; Glc-Fru), kuid on näidatud ka mõnede teiste suhkru kasutamist. Näiteks *P. syringae* pv. *tomato* levaansukraasid suudavad sünteesida levaani ka rafinoosist (α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2) β -D-Fruf; GalGlc-Fru) ja stahhüoosist (α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fruf; Gal₂Glc-Fru), kuid väidetavalt selle bakteri pv. *phaseolicola* levaansukraas rafinoosi kasutada ei suuda (Hettwer *et al.*, 1995; Visnapuu *et al.*, 2008; Visnapuu *et al.*, 2011). Ka on näidatud, et nii Lsc2 kui ka Lsc3 puhul takistab rafinoos sahharoosi lõhustamist konkurentselt (Visnapuu, 2007; Visnapuu *et al.*, 2008). *P. syringae* pv. *phaseolicola* vastava ensüümi afiinsus sahharoosile on väga väike ($K_m=160$ mM), võrreldes pv. *tomato* levaansukraasidega (Hettwer *et al.*, 1995). Lsc3 valgul on K_m väärtuseks sahharoosile palju madalam, 18.5 mM. Lsc2 puhul on aga afiinsus sahharoosile veidi madalam, $K_m=25$ mM. Afiinsus rafinoosile on neil ensüümidel aga umbes poole väiksem kui sahharoosile. Seega peaksid rafinoos ja sahharoos seostuma Lsc3 ja Lsc2 ensüümide aktiivtsentri sama piirkonnaga (inhibeerivad konkurentselt teineteise seondumist) ning sahharoos seostub tugevamini kui rafinoos (Visnapuu, 2007; Visnapuu *et al.*, 2008; Alamäe *et al.*, 2012).

Levaansukraasi katalüüsiv reaktsioon sõltub tugevalt temperatuurist. Madalamatel temperatuuridel suureneb polümeriseeriv ja kõrgematel sahharoosi hüdroolüüsiv aktiivsus. Näiteks *P. syringae* pv. *phaseolicola*'l oli levaani sünteesiks parim temperatuur 18 °C ja sahharoosi hüdroolüüs toimus kõige aktiivsemalt temperatuuril 60 °C (Hettwer *et al.*, 1995).

Eksoensüümidele on oluline valgu stabiilsus ja ensümaatilise aktiivsuse säilitamine looduskeskkonnas. Näiteks *P. syringae* pv. *phaseolicola*'l on näidatud äärmiselt suurt vastupidavust korduvale külmutamisele ja sulatamisele, erinevatele proteaasidele ja ka keemilistele denatureerijatele. Lisaks ei kaotanud ensüüm oma aktiivsust, kui teda hoiti kuus kuud temperatuuril 4 °C (Hettwer *et al.*, 1995). Meie töögrupi uuritaval levaansukraasil Lsc3

on samuti näidatud aktiivsuse säilimist temperatuuril 37 °C 30 päeva ja temperatuuril 4 °C vähemalt kuus kuud (Visnapuu *et al.*, 2011) ning inkubeerimisaja pikendamisel viie kuuni (temperatuuril 37 °C) säilis 50% ensüümi aktiivsusest (Mardo *et al.*, 2014b). Ka pH mõjutab ensüümi aktiivsust. *P. syringae* pv. *phaseolicola* levaansukraaside tööks optimaalne pH jääb nõrgalt happelisse piirkonda, pH 6 lähedale (Hettwer *et al.*, 1995; Visnapuu, 2012). On testitud ka ensüümi tundlikkust metallioonidele. Näiteks Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} ja Hg^{2+} inaktiveerisid *P. syringae* pv. *phaseolicola* levaansukraasi tugevasti (Hettwer *et al.*, 1995). *P. syringae* pv. *tomato* Lsc2 ja Lsc3 valke inhibeerisid tugevasti Hg^{2+} ja Ag^+ ioonid, kuid teised testitud metallioonid erilist mõju ei avaldanud (Visnapuu, 2012). Levaansukraasid taluvad hästi ka denatureerivaid ja redutseerivaid aineid. Näiteks *P. syringae* pv. *phaseolicola* levaansukraasi puhul vähendas 10% SDS lisamine ensüümi aktiivsust vähe – see alanes 73%-ni (Hettwer *et al.*, 1995). Meie andmed siiski näitasid, et sama bakteri pv. *tomato* levaansukraasid Lsc2 ja Lsc3 kaotasid SDS-töötlusel täielikult oma aktiivsuse (Visnapuu, 2012). Mõlema patovari levaansukraasidel on uuritud ka redutseerivate ainete ditiotreitooli ja merkaptotoetanooli mõju: *P. syringae* pv. *tomato* ensüümidele need ained mõju ei avaldanud ja pv. *phaseolicola* ensüümi aktiivsus alanes ainult nende ainete väga kõrgel kontsentratsioonil (100 mM). Saadud tulemustest saab järeldada, et nendel ensüümidel pole valgus disulfiidsildu (Hettwer *et al.*, 1995; Visnapuu, 2012).

1.4. Fruktooligosahhariidide ja levaani võimalikud rakendused

Nii taimed kui ka bakterid toodavad fruktaane. Taimed kasutavad neid varuainena ja arvatakse, et fruktaanid kaitsevad neid külmakahjustuste ja põua eest (Pontis, 1989; Hendry, 1993; Vijn ja Smeekens, 1999). Bakterid kasutavad fruktaane olenevalt nende elukeskkonnast erinevatel eesmärkidel. Näiteks *Streptococcus mutans* on suus elav bakter ja peamine kaariese põhjustaja. Fruktaanide abil saab ta pindadele kinnituda (Bergeron ja Burne, 2001). Mullas elutsev *B. subtilis* kasutab levaani varuainena keskkonnastressi puhul. Arvatakse, et limajas levaanikiht aitab bakteril kinnituda paremini mullaosakestele, vältida kuivamist ja siduda saasteaineid ümbritsevast keskkonnast (Ammar *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2005). Lisaks võib levaansukraas osaleda ka taime ja bakteri vahelises sümbioosis. Näiteks *G. diazotrophicus* elab suhkruroo juhtkudedes ning sünteesib suhkrurikkast taimemahlast lühikese ahelaga fruktaane, näiteks kestoosi, mida peremeestaim saab kasutada taimeomaste fruktaanide sünteesis (Hernandez *et al.*, 1995). Taimepatogeen *E. amylovora* põhjustab roosõielistel viljapuu-bakterpõletikku. Temal ja teistel taimi nakatavatel bakteritel on levaansukraasi

reaktsiooniproductid (levaan) virulentsusfaktoriks, mis takistab bakteri äratundmist ja pakub ka kaitset taime poolt eritavate ainete eest (Geier ja Geider, 1993; Li, 2001).

Levaansukraaside reaktsiooniproductideks on lühikese ahelaga fruktooligosahhariidid ja polümeerne levaan. Sellised fruktaanid võiksid leida kasutust meditsiinis, toiduainetööstuses ja ka kosmeetikas. Eriti huvi pakkuvad on aga FOS-d, millel on täheldatud prebiootilist toimet ning neid võiks kasutada toidulisandina (Verdonk *et al.*, 2005). Need suhkrud on inimesele seedumatud ja soodustavad spetsiifiliselt jämesooles elutsevate kasulike bakterite kasvu ja paljunemist, sest mitmed bifidobakterid ja ka laktobatsillid suudavad kasutada FOS-e süsinikuallikana. Lisaks vähendavad FOS-id ka patogeensete bakterite arvukust soolestikus (Trowell, 1976; Crittenden ja Playne, 1996; Bornet *et al.*, 2002; Kelly, 2008). Fruktaanide kasutamise tõhusus sõltub ahela pikkusest. Näiteks bifidobakterid kasutavad vägagi efektiivselt lühikese ahelaga fruktaane. Pikema ahelaga sahhariidide lõhustamiseks vajavad nad aga teiste soolebakterite abi (Biedrzycka ja Bieleca, 2004). Kaur ja Gupta (2002) näitasid, et inuliin ja lühikesed oligofruktaanid stimuleerisid immuunsüsteemi, vähendasid veresuhkru sisaldust ja ka kahjulike bakterite hulka soolestikus. Pikemal polümeeril, näiteks levaanil, võiks olla rasvumise ja kasvajate vastane toime (Yoo *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2006).

Varasemalt on üsna palju uuritud inuliini-tüüpi FOS-ide prebiootilist mõju, sest neid saab lihtsamini tööstuslikult toota siguri ja daalia juurtest eraldatud inuliinist (<http://www.beneo.com>). Küll aga on täheldatud, et levaanitüüpi FOS-id (fruktoosi jääkide vahel on β -2,6 glükosiidside) on isegi efektiivsema prebiootilise toimega kui inuliinitüüpi FOS-id (β -2,1 side) (Marx *et al.*, 2000). Seega võiks prebiootikumina toota just levaanitüüpi FOS-e, kuid ilmselt on nende tootmine ja puhastamine kulukas ning levaani-tüüpi FOS-e ei ole müügis. Levaani on võimalik osta, kuid ta on kallis. Näiteks 1 g *Z. mobilis*'e levaani maksab firmast Sigma-Aldrich ostes 219.5 eurot. Samas maksab samast firmast ostes 100 g siguri juurtest puhastatud inuliini 402 eurot ning daalia juurtest puhastatud 100 g inuliini hind on 204 eurot (<http://www.sigmaaldrich.com/>). Järelikult oleks vaja levaani ja levaanitüüpi FOS-de tööstuslikuks tootmiseks leida odavamaid lahendusi.

Fruktaane saab kasutada ka toidulisanditena. Näiteks pikema ahelaga inuliini polümeeridel puudub maitse ning neil on rasvataoline struktuur. Inuliini on kasutatud lisandina vorstis rasva osaliseks asendamiseks vähendamiseks (Mendoza *et al.*, 2001). Lühema ahelaga fruktaanid on magusa maitsega ning neid saaks kasutada toiduainetööstuses madala kalorsusega magusainetena sahharoosi asemel (Vijn ja Smeekens, 1999). Viskoossus, vastupidavus sooladele, kõrgele temperatuurile, pindaktiivsetele ainetele, hapetele ja alustele, lahustuvus

vees ja õlis – kõik need fruktaanide omadused võimaldavad kasutada neid emulgaatorite, paksendajate, kapslimaterjalina ja stabilisaatorina nii mitmeski eluvaldkonnas. Meditsiinis võiksid fruktaanid kasutust leida ka vereplasma asendajana (Bekers *et al.*, 2005; Banguela ja Hernandez, 2006).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Töö koostamiseks püstitati järgmised ülesanded:

1. Ekspresseerida *Escherichia coli* tüves BL21(DE3) nii N- kui ka C-terminaalse His₆-märgisega *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraasi Lsc2.
2. Puhastada Lsc2 valgud ja võrrelda valkude substraadikasutust, polümerisatsiooni-võimet ja reaktsiooniproductide spektrit Lsc3 valgu vastavate näitajatega.
3. Konstrueerida Lsc2 valgu ennustatud katalüütilise kolmiku (Asp46, Asp203 ja Glu287) asendusmutandid alaniiniga ja ekspresseerida mutantseid valke *E. coli* tüves BL21(DE3).
4. Puhastada mutantsed valgud ja iseloomustada nende omadusi.
5. Hinnata *in silico* Lsc2 ja Lsc3 valkude kristalliseeritavust.
6. Uurida Thermofluor'i meetodit kasutades, kuidas erinevad fruktosüüli aktseptorid mõjutavad metsiktüüpi Lsc2 valgu termostabiilsust ja kuidas sahharoos, rafinoos ja stahhüoos mõjutavad Lsc2 mutantide termostabiilsust.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Konstruktide tegemiseks kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α (*supE44 lacU169* (ϕ 80 *lacZAM15*) *recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1*) (Invitrogen, USA; Miller, 1972). Mutantseid valke ekspresseeriti *E. coli* tüves BL21(DE3) (*hsdS gal* (λ cIts857 *ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1*)) (Studier ja Moffatt, 1986). Selles töös konstrueeritud ja kasutatud plasmiidid on esitatud Tabelis 2. Metsiktüüpi ja mutantsete levaansukraaside ekspresseerimiseks kasutati pURI3-TEV või pURI3-Cter vektoreid (Curiel *et al.*, 2011), kuhu oli kloneeritud *P. syringae* pv. tomato DC3000 algne või mutante levaansukraasi kodeeriv geen *lsc2*. Levaansukraasi pURI3-TEVlsc2 plasmiidilt ekspresseerides lisandub Lsc2 valgule N-terminaalne His₆-järjestus, mis on eemaldatav TEV proteaasiga. pURI3-Cterlsc2 puhul on polühistiidiini märgis valgu C-terminaalses otsas.

Tabel 2. Töös kasutatud plasmiidid, nende päritolu, koodonite ja vastavate aminohapete asendused ning vastavate mutatsioonide asukohad valgus.

Plasmiid	Koodoni asendus	Aminohappe asendus	Aminohappe positsioon valgus	Viide
pURI3-TEV (ekspressioonivektor)	–	–	–	Curiel <i>et al.</i> , 2011
pURI3-Cter (ekspressioonivektor)	–	–	–	Curiel <i>et al.</i> , 2011
pURI3-TEVlsc2	–	–	–	Karin Mardo, avaldamata andmed
pURI3-Cterlsc2	–	–	–	Karin Mardo, avaldamata andmed
pURI3-Cterlsc2D46A	GAC → GCC	Asp → Ala	46	Käesolev töö
pURI3-Cterlsc2D203A	GAT → GCC	Asp → Ala	203	Käesolev töö
pURI3-Cterlsc2E287A	GAG → GCG	Glu → Ala	287	Käesolev töö

2.2.2. Levaansukraasi muteerimine, kloneerimine ja geelelektroforees

Mutatsioonide viimiseks *lsc2* geeni kasutati PCR-põhist megaprimeri meetodit (Wei *et al.*, 2004; Visnapuu *et al.*, 2011). Vastavad koodonivahetused on näidatud Tabelis 2. Kõik muteerimiseks ja kloneerimiseks vajalikud PCR-i reaktsioonid tehti *Pfu* DNA polümeraasiga (Thermo Scientific, USA), millel on vigu parandav aktiivsus. Megaprimer sünteesiti PCR reaktsioonisegus, mis sisaldas 1x *Pfu* puhvrit (Thermo Scientific, USA), 0.2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Thermo Scientific, USA), 4 mM MgSO₄, mõlemat praimerit 0.5 pmol/μl ja 0.025 U/μl *Pfu* DNA polümeraasi. Matriits DNA-na kasutati muteerimata *lsc2* geeni sisaldavat plasmidi pURI3-Cterlsc2, mida lisati umbes 0.2 μl. Megaprimeri amplifikatsioonil kasutati päripraimerina T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') ja vastupraimerina Asp46Ala puhul D62ARev (5' CATGGTGGCCAGATGAAT 3') või Asp203Ala puhul D219ARev (5' ACTGGGGGCGCGAAAGTTC 3'). Glu287 asendamiselalaniiniga kasutati päripraimerina E303AFw (5' TGATCAGACCGCGCGGCC 3') ja vastupraimerina Ampsaba (5' CTGAGATAGGTGCCTCAC 3'). Muteerimispraimeritena kasutati Lsc3 valgu muteerimise jaoks koostatud primereid D62ARev, D219ARev ja E303AFw (Mardo *et al.*, 2014a) seetõttu, et DNA järjestused on neis piirkondades *lsc2* ja *lsc3* geenidel samasugused. Praimerid sisaldavad selliseid nukleotiidivahetusi (praimerite järjestustes allajoonitud), mis tekitavad vastavasse positsiooni alaniini koodoni (näidatud hallil taustal). Saadud 224 ap, 695 ap ja 539 ap pikkused DNA fragmendid lahutati

geelelektroforeesiga 0.8 % agarosgeelil (metoodika allpool) ning sobiva pikkusega DNA fragmendid puhastati geelist MoBio (USA) Ultra Clean™ 15 DNA puhastamise komplektiga vastavalt tootjapoolsele protokollile. Järgnevalt pikendati megapraimerid PCR-i abil. Reaktsioonisegu sisaldas megapraimerit, 1x *Pfu* puhvrit, 4 mM MgSO₄, 0.04 mM dNTP, 0.05 U/μl *Pfu* DNA polümeraasi ja matriits-DNA-na kasutati pURI3-Cterlsc2. Seejärel töödeldi proove restriктаasi *DpnI*-ga (Thermo Scientific, USA) temperatuuril 37 °C ~12 h, et lagundada metüleeritud DNA (matriitsina kasutatud pURI3-Cterlsc2). Ensüüm inaktiveeriti proovide kuumutamiseks 20 minuti jooksul temperatuuril 80 °C. Muteeritud *lsc2* geeni amplifitseerimiseks kasutati praimereid Lsc2CterFw (5' TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGTAACATCAACTACGCACCTA 3') ja Lsc2CterRev (5' GCTATTAATGATGATGATGATGGCTCAACGTAATATCCT 3'). Kasutatud praimerid on osaliselt komplementaarsed *lsc2* geeni järjestusega (allajoonitud) ja osaliselt pURI3Cter vektoriga (kaldkirjas). PCR-i produkti (1294 ap) olemasolu kontrolliti 0.8% agarosgeelil ja puhastati geelist MoBio (USA) Ultra Clean™15 komplektiga. Järgnevalt kloneeriti muteeritud geen pURI3Cter vektorisse PCR-i põhise meetodiga. Tulemuseks saadi pikad üheahelalise DNA ahelad, mille ühes otsas on *lsc2* geen ja sellele järgneb pURI3-Cter plasmiidjärjestus. Reaktsioonisegu töödeldi *DpnI*-ga, et vabaneda metüleeritud pURI3-Cter DNA-st. DNA transformeeriti *E. coli* DH5α tüvesse, saadud kolooniaid kontrolliti geeni olemasolu suhtes PCR-iga. Selleks kasutati praimeritepaari T7 ja Ampsaba ning *Taq* DNA polümeraasi (produkti pikkus 1467 ap). Kolooniatest eraldati plasmiidne DNA ja mutatsioonide olemasolu kontrolliti DNA sekveneerimisega (vt ptk 2.2.3.). Konstrueeritud plasmiidid nimetati pURI3-Cterlsc2D46A, pURI3-Cterlsc2D203A ja pURI3-Cterlsc2E287A (Tabel 2).

Geelelektroforees

DNA fragmendid lahutati elektroforeesiga etiidiumbromiidi (0.35 μg/ml) sisaldavas 0.8% agarosgeelis. Elektroforees toimus 0.5x TAE puhvril (40 mM Tris-atsetaatpuhver, 1 mM EDTA; pH 8.2) toatemperatuuril pingel 10 V/cm. DNA fragmente vaadeldi ultravioletvalguses ja nende suuruse hindamiseks võrreldi neid DNA suurusmarkeriga (GeneRuler™ 1 kb, Thermo Scientific, USA).

Valkude lahutamiseks kasutati denatureerivat SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforeesi (SDS-PAGE) 10% geelis (Sambrook ja Russell, 2001). Valguproovidele (3 μl) lisati 6 μl 2x Laemmli laadimispuhvrit (Laemmli, 1970), 3 μl mQ vett ning neid kuumutati 5 min temperatuuril 96 °C. Proov kanti geelile ja valkude suuruse hindamiseks kasutati markerit

PageRuler™ SM0671 (Thermo Scientific, USA). Valgud lahutati 1x SDS puhvriga (25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0.1% SDS) pingel 12 V/cm, kasutades Mini-PROTEAN Tetra foreesisüsteemi (BIO-RAD, USA) ja seejärel geel värviti Comassie Brilliant Blue G250 sisaldava värviga.

2.2.3. Plasmiidse DNA viimine bakterirakku, selle eraldamine, kontrollimine, puhastamine ja sekveneerimine

Lsc2 geenid transformeeriti kloneerimisel *E. coli* DH5 α tüvesse ning nende ekspresseerimiseks *E. coli* BL21(DE3) (Sambrook *et al.*, 1989) rakkudesse, kasutati Inoue *et al.* (1990) meetodil ette valmistatud bakterirakke. Jäält võetud kompetentsetele rakkudele lisati plasmiidset DNA-d, tehti temperatuurišokk (1 min 30 sek 42 °C) ning rakke kasvatati 1 tund 1 ml LB (Luria-Bertani) vedelsöötmes loksutil temperatuuril 37 °C. Transformeerimisel DH5 α tüvesse lisati 5 μ l PCR-i segu (vt ptk 2.2.2.) ja geenide ekspressiooniks BL21(DE3) tüves lisati 1 μ l plasmiidset DNA-d. Seejärel plaaditi rakud ampitsilliini (Amp; 0.15 mg/ml) sisaldavale selektiivsöötmele ja kasvatati üleöö temperatuuril 37 °C. Amp-resistentsed kolooniad külvati LB-Amp tardsöötmele ja ekspressioonitüve puhul ka 10% sahharoosi sisaldavale LB-Amp 1 mM IPTG-ga (isopropüül- β -D-1-tiogalaktopüranosiid) tardsöötme. Viimast kasutati selleks, et kontrollida transformantide kolooniatel sahharoosist levaani sünteesi võimet. *lsc2* geeni olemasolu kontrolliti PCR-iga, milleks kasutati praimereid T7 ja Lsc2Rev1 (5' ACGCCTTTGTCTGACGTG 3') (fragmendi pikkus 592 ap). *lsc2* geeni sisaldavad transformandid külvati 5 ml LB-Amp söötmesse, kasvatati loksutil temperatuuril 37 °C üleöö ning rakkudest eraldati plasmiidne DNA Favor Prep™ Plasmid Extraction Mini Kit-iga (Favorgen Biotech Corp., Taiwan).

Mutatsioonide olemasolu ja korrektsust *lsc2* geenis kontrolliti sekveneerimisega. Sekveneerimiseks kasutati BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Kanada) komplekti ja modifitseeritud tootjapoolset protokollit. Esmalt tehti PCR, mille reaktsioonisegu sisaldas 1 μ l plasmiidset DNA-d, 1x *Taq* puhvrit (Naxo, Eesti), 6.25 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.05 U/ μ l *Taq* DNA polümeraasi ja mõlemat praimerit 0.1 pmol/ μ l. Praimeritepaarina kasutati T7 ja Lsc2Rev1 (592 ap) ning Lsc2Fw1 (5' TGTTGAACGACAACGGTGAT 3') ja Ampsaba (978 ap). Järgnevalt toimus proovide *ExoI*-FastAP töötlus 15 min 37 °C, mille käigus FastAP (aluseline fosfaatas; Thermo Scientific, USA) eemaldab DNA mõlemast otsast fosfaatühmed ning *ExoI* (Thermo Scientific, USA) lagundab üheaahelalise DNA 3'→5' suunas. Ensüümid inaktiveeriti 15 min 80 °C. Edasi valmistati proovid sekveneerimiseks ette tootjapoolsete reaktiividega (0.7 μ l BigDye

premiksi, 2 µl 5x lahjenduspuhvit, 4 pmol/µl praimerit ja 1 µl DNA-d) Peale sünteesietappi sadestati DNA etanooliga. Ettevalmistatud proovid saadeti sekveneerimisele TUMRI sekveneerimiskeskusesse.

2.2.4. Levaansukraasi valkude heteroloogiline süntees ja puhastamine

Levaansukraaside heteroloogiliseks ekspresseerimiseks transformeeriti mutantset *lsc2* geeni sisaldavad pURI3-Cter plasmiidid *E. coli* BL21(DE3) tüvesse (Visnapuu *et al.*, 2011; vt ptk 2.2.3.). Transformandid külvati esmalt 5 ml LB-Amp vedelsöötmesse, kasvatati loksutil üleöö ning külvati edasi 200 ml LB vedelsöötmesse algtihedusega OD₆₀₀=0.05 (optiline tihedus). Rakke kasvatati kuni tiheduseni OD₆₀₀~0.5, siis lisati levaansukraasi geeni transkriptsiooni algamiseks IPTG-d lõppkontsentratsiooniga 0.5 mM ja levaansukraasi üleekspressiooniks kasvatati rakke temperatuuril 22 °C 20 tundi. Bakterid eraldati söötmest tsentrifuugimisega (2400 g, 10 min, 4 °C), pesti kaks korda 10 ml 100 mM Na-fosfaatpuhvriga (pH 7.0) ja säilitati temperatuuril -20 °C kuni valgu puhastamiseni.

Rakud sulatati ja suspendeeriti 5 ml puhvris A (10 mM imidasool, 10% glütserool, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl; pH 6.0) ning purustati ultraheliga töödeldes (Ultrasonic Homogenizer 4710, Cole-Parmer Instrument Co., USA). Sonikaati tsentrifuugiti 2400 g; 30 min; 4 °C) ja supernatant filtreeriti läbi 0.45 µm pooriga süstlafiltri (Minisart®, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Saksamaa). Valgu puhastamiseks kasutati vedelikkromatograafia süsteemi ÄKTAprime™ plus ja 1 ml Ni²⁺-afiinsuskromatograafia kolonne HisTrap™ FF (mõlemad GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rootsi). Puhastus viidi läbi tootjapoolseid soovitusi järgides (programm: *Affinity purification any His-Trap*). Töös kasutatud levaansukraasid sisaldavad valgu N- või C-terminaalses otsas polühistidiini märgist, mis seondub kolonnis Ni²⁺-ioonidega. Valk elueeriti kolonnist puhver B-ga (500 mM imidasool, 10% glütserool, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄; pH 6.0). Kolonnist elueeritud fraktsioonides kontrolliti levaansukraasi olemasolu SDS-geelil (vt ptk 2.2.2.) ning uuritavat valku sisaldavad fraktsioonid liideti. Vastavad fraktsioonid kanti 12-14 kDa poorisuurusega ServaPor® dialüüsimembraani (SERVA Electrophoresis GmbH, Saksamaa) ja dialüüsiks kasutati McIlvaine'i puhvit (130 mM Na₂HPO₄, 40 mM sidrunhape, 0.02% Na-asiid; pH 6.0). Dialüüs toimus 24 h 4 °C ning puhvit vahetati kaks korda. Järgnevalt kontsentreeriti valgulahust Amicon® Ultra (*M_w cutoff* 10 kDa, Millipore, Iirimaa) tsentrifuugimisfiltritega (2400 g, ~20 min, 4 °C) kuni lahuse maht oli vähenenud ~1 ml-ni. Valgu kontsentratsiooni leidmiseks mõõdeti puhastatud valgupreparaadi OD₂₈₀ väärtus mikroplaadil (NanoQuantPlate; Tecan Group Ltd., Šveits), kasutades Tecan Infinite M200 Pro™ mikroplaadilugeja (Tecan

Group Ltd., Šveits) programmi Tecan i-control™ 1.7 (Tecan Group Ltd.). Kontsentratsiooni arvutamisel kasutati valgu ekstinktsioonikoefitsenti (ϵ), mis arvutati valgujärjestuse alusel ExPasy Proteoomika Serveris (Gasteiger *et al.*, 2005; <http://web.expasy.org/protparam/>) ning valemit $C \text{ (mg/ml)} = OD_{280} / \epsilon \times L$, kus teepikkus L on 0.05 cm.

2.2.5. Levaansukraasi aktiivsuse määramine

Koguaktiivsuse määramine glükoosi tekke alusel

Levaansukraasi sahharoosi lõhustavat aktiivsust ehk koguaktiivsust määrati temperatuuril 37 °C, mõõtes reaktsiooni algkiirust glükoosi eraldumise järgi. Selleks kasutasime Glucose Liquicolor-i reaktiivi (Human GmbH, Saksamaa) ja meie poolt eelnevalt väljatöötatud meetodit (Visnapuu *et al.*, 2008). Reaktsioonisegu sisaldas puhastatud valgu sobivat lahjendust, McIlvaine'i puhvrit ning segus varieeriti erinevaid sahharoosi kontsentratsioone (5-400 mM). Reaktsioon algatati valgu lisamisega reaktsioonisegule. Erinevatel ajapunktidel võeti reaktsioonisegust välja 50 μ l proovi, mis lisati 150 μ l Tris (trihüdroksümetüül-aminometaan)-HCl puhvrile (200 mM; pH 8.3) ja proove kuumutati 5 min temperatuuril 96 °C reaktsiooni peatamiseks. Proovid jahutati jääl, neile lisati 800 μ l Glucose Liquicolor'i reaktiivi ja inkubeeriti 5 min 37 °C, et tuvastada sahharoosi lõhustamisel eraldunud glükoosi. Glükoosi hulga määramiseks mõõdeti optilise tiheduse väärtus spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 500 nm ning vastav glükoosi kogus leiti kasutades kaliibergraafikut. Koguaktiivsus väljendati sahharoosi lõhustamisel vabanenud glükoosi hulgana mikromoolides minutis mg valgu kohta (U/mg).

K_m ja maksimaalne reaktsioonikiirus (V_{max}) määrati Michaelis-Menteni võrrandit kasutades programmi SigmaPlot 2001 (SYSTAT, USA) ensüümikineetika mooduliga (Enzyme Kinetics Module 1.1). Katalüütiline konstant k_{cat} (1/s) arvutati vastava valgu V_{max} väärtuse ja molekulmassi järgi. Molekulmassid arvutati valgujärjestuse alusel ExPasy serveris (http://expasy.org/tools/pi_tool.html). Katalüütiline efektiivsus (1/M x min) arvutati k_{cat} ja K_m jagatisena.

Koguaktiivsuse määramine redutseerivate suhkrute tekke alusel

Levaansukraasi sahharoosi (Glc-Fru), rafinoosi (Gal-Glc-Fru) ja stahhüoosi (Gal₂-Glc-Fru) kasutamise võimet saab hinnata mõõtes nende substraatide lõhustamise algkiirusi redutseerivate suhkrute moodustumise kaudu. Sahharoosist moodustub redutseerivate suhkrutena glükoos (Glc) ja fruktoos (Fru), rafinoosist melibioos (Gal-Glc) ja Fru ning stahhüoosist redutseeriv trisahhariid ja Fru. Sahharoos, rafinoos ja stahhüoos ise on

mitteredutseerivad suhkrud. Redutseerivate suhkrute kontsentratsiooni määramiseks kasutati 3,5-dinitrosalitsüülhappe (DNSA) reaktiivi (Miller, 1959). Reaktsioonisegu (1.5 ml) sisaldas McIlvaine'i puhvrit, 20 µl levaansukraasi valgu sobivat lahjendust ja 100 mM sahharoosi, rafinoosi või stahhüoosi. Erinevatel aegadel võeti välja proovid (200 µl) ning segati 400 µl DNSA reaktiiviga. Proove kuumutati 5 min temperatuuril 100 °C ning jahutati jääl (Visnapuu *et al.*, 2008). Enne optilise tiheduse mõõtmist (OD_{540}) lisati proovidele 800 µl mQ vett. Sahharoosi või rafinoosi kasutamise aktiivsus väljendati substraadist 1 minuti jooksul moodustunud redutseerivate suhkrute hulgana mikromoolides mg valgu kohta (U/mg). Tekkinud redutseerivate suhkrute kogused leiti kaliibergraafikut kasutades. Lisaks arvutati rafinoosi ja sahharoosi ning stahhüoosi ja sahharoosi kasutamise suhe, mis väljendati protsendina, kus sahharoosi kasutamise aktiivsuseks võeti 100%.

Metsiktüüpi levaansukraasidel mõõdeti rafinoosi suhtes K_m ja V_{max} määramiseks redutseerivate suhkrute teket rafinoosist selle erinevatel kontsentratsioonidel (10-200 mM). Kineetilised parameetrid arvutati programmi SigmaPlot 2001 (SYSTAT, USA) ensüümikineetika moodulit kasutades (vt eestpoolt).

2.2.6. Transfruktosüüliva aktiivsuse määramine ja polümerisatsiooniproductide analüüs

Transfruktosüüliva aktiivsuse määramiseks ja polümerisatsiooniproductide analüüsiks viidi levaansukraasi reaktsioon läbi järgmiselt: 2.7 U/ml puhastatud metsiktüüpi valku ja 100 µg/ml muteeritud valku reageeris 37 °C 20 h 1200 mM või 300 mM sahharoosiga (lõpp-kontsentratsioon) McIlvaine'i puhvris. Lisatav valgu kogus sõltus preparaadi koguaktiivsusest, mis mõõdeti 100 mM sahharoosiga temperatuuril 37 °C. Reaktsioon peatati proovide kuumutamiseega (96 °C, 5 min). Proovidest määrati ensümaatilisel glükoosi ja fruktoosi sisaldus, õhukese kihiga kromatograafiaga tuvastati fruktoosi sisaldavad produktid ja kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) analüüsiga määrati fruktooligosahhariidide sisaldus.

Transfruktosüüliva aktiivsuse määramine

Transfruktosüüliv aktiivsus (TA) ehk levaansukraasi polümeriseeriv võime määrati meetodiga, millega mõõdetakse reaktsioonis sahharoosist moodustunud vaba glükoosi ([Glc]) ja fruktoosi ([Fru_v]) kontsentratsiooni reaktsioonisegus. Nende produktide kontsentratsioonide vahe järgi saab välja arvutada, kui suur osa reageerinud sahharoosis sisalduvast fruktoosist polümeriseeritakse (van Hijum *et al.*, 2001; Yanase *et al.*, 2002; Mardo *et al.*, 2014a). TA

arvutatakse valemiga $([Glc]-[Fru_v])/[Glc] \times 100$, milles $[Glc]$ näitab glükoosi ja $[Fru_v]$ vaba polümeriseerimata fruktoosi kontsentratsiooni reaktsioonisegus.

Lsc2 valgu katalüütilise kolmiku mutantidel glükoosi ja fruktoosi sisalduse ensümaatiliseks määramiseks tehti eelnevalt valmistatud proovidest sobivad lahjendused ja 10 µl lahjendust pipeteeriti spektrofotomeetri küvetti (sobivad UV vahemiku mõõtmiseks; Naxo, Eesti), mis sisaldas 970 µl Tris-HCl puhvrit (50 mM, pH 7.5), 5 mM MgCl₂; 2 mM β-NAD-i; 1.1 mM ATP-d ja 2.8 U *Leuconostoc mesenteroides*'e glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaasi (Sigma-Aldrich, USA). Spektrofotomeetriliselt mõõdeti lahuse algne optiline tihedus (A_0) 340 nm juures (OD_{340}). Seejärel lisati küvetti 10 µl (1.5 U) pärmi heksokinaasi (Roche, Šveits) ning lasti reaktsioonil toimuda seni, kuni OD_{340} enam ei suurenenud. Nimetatud OD_{340} väärtuse (A_1) kaudu saab arvutada glükoosi hulka. Fruktoosi hulga määramiseks lisati seejärel küvetti 10 µl (1.4 U) fosfoglükoisomeraasi (Sigma-Aldrich, USA) ning lahuse OD_{340} mõõdeti seni, kuni selle väärtus enam ei suurenenud (saadi OD_{340} väärtus A_2). Sahharoosist moodustunud glükoosi ja fruktoosi hulk arvutati järgmise valemi abil:

$$C_{\text{glükoos}} \text{ (mM)} = \Delta A_1 \times 100 / 6.22$$

$$C_{\text{fruktoos}} \text{ (mM)} = \Delta A_2 \times 100 / 6.22$$

$$\Delta A_1 = A_1 - A_0$$

$$\Delta A_2 = A_2 - A_1$$

Polümerisatsiooniproductide analüüs kõrgefektiivse vedelikukromatograafiaga (HPLC)

HPLC analüüsiga määrati glükoosi, fruktoosi, sahharoosi ja FOS-ide kogused reaktsioonisegus ning arvutati ka TA väärtus metsiktüüpi valkudel. Kromatograafia läbiviimiseks kasutati Acquity UPLC süsteemi (Waters, USA) koos Acquity ELS (*Evaporative Light-Scattering*) detektoriga. Standardsuhkrutena kasutati sahharoosi (Serva, Saksamaa), D-glükoosi, D-fruktoosi (Sigma-Aldrich, Saksamaa), rafinoosi (Naxo, Eesti), 1-kestoosi ja nüstoosi (Sigma-Aldrich, Saksamaa). Standardsuhkrute väljumisaegade alusel kolonnist tuvastati uuritavates proovides vastavad ained. Polümerisatsioonistmega 3-8 FOS-ide koguse kalibreerimine toimus rafinoosi alusel. Metoodikat on põhjalikumalt kirjeldanud Mardo *et al.* (2014b). HPLC analüüsi viis läbi meie koostööpartner Heiki Vija (KBFI, Tallinn).

Reaktsiooniproductide spektri analüüs õhukese kihi kromatograafiaga

Õhukese kihi kromatograafia (*Thin Layer Chromatography*, TLC) tegemiseks kasutati silikageelplaate (TLC Silica gel 60 F₂₅₄; Merck, Saksamaa). Plaadi kontsentreeriva osa

stardijoonele kanti 0.5 µl eelnevalt 4 korda mQ veega lahjendatud proovi ning seejärel plaat kuivatati. Markeritena kasutati 0.7% Lsc3 levaani, 8 mM 1-kestoosi ja nüstoosi ning 30 mM D-fruktoosi ja sahharoosi (Mardo *et al.*, 2014a). Markerite lahust kanti plaadile 0.5 µl. Kromatograafiaplaat asetati voolutuslahusesse, mis koosnes kloroformist, äädikhapest ja mQ veest (mahu järgi 60:70:10) (Stiengele *et al.*, 1999) ning plaati voolutati kaks korda ülemise servani, seda vahepeal kuivatades. Seejärel töödeldi plaati urea reaktiiviga (3% urea, 1 M fosforhape veega küllastatud butanoolis), et teha nähtavaks fruktoosi sisaldavad suhkrud. Plaat kuumutati ~10 min 120 °C kuni suhkrulaikude värvumiseni (St. John *et al.*, 1996).

2.2.7. Levaani sünteesi kineetika jälgimine mikroplaadil

Levaani sünteesi kineetikat jälgiti mikrotiiterplaadil (Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol; CELLSTAR[®], Greiner Bio-One GmbH, Saksamaa), registreerides mikroplaadilugejas Tecan Infinite M200 ProTM (Tecan Group Ltd., Šveits) reaktsioonisegu hägususe suurenemist optilisel tihedusel 400 nm. Proove inkubeeriti temperatuuril 37 °C 12 h ning OD₄₀₀ väärtust mõõdeti iga 15 minuti järel. Reaktsioonisegu maht ühes kannukeses oli 200 µl ja see sisaldas erinevates kontsentratsioonides sahharoosi (300, 600 või 1200 mM), McIlvaine'i puhvrit ja 10 µg/ml valku (Visnapuu *et al.*, 2011).

2.2.8. Thermofluor

Valkude termostabiilsuse mõõtmiseks kasutati Thermofluor'i meetodit ja reaalaja PCR masinat LightCycler 480 System (Roche, Šveits). Reaktsioonisegu pipeteeriti Roche LightCycler[®] 480 valgele mikroplaadile (kogumahuga 20 µl) ning sisaldas puhvrit (lõppkontsentratsioonid: 100 mM MES, pH 6.5; 150 mM NaCl), 2 µM valku ja 5x SYPRO Orange (Sigma-Aldrich, Saksamaa) fluorestseeruvat värvi. Proovide temperatuuri tõsteti vahemikus 27-95 °C ja samaaegselt mõõdeti fluorestsentsi intensiivsust (465-580 nm). Temperatuuri tõstmisel valk denatureerub ja värv seondub algselt valgu sisemuses paiknenud, kuid denatureerumisel paljastuvate hüdrofoobsete aminohapetega. Vesikeskkonnas on SYPRO Orange fluorestsents vaigistatud. Andmed salvestati LightCycler[®] 480 (1.5.0 SP3) tarkvaraga ja nende edasisel töötlemisel programmiga *Excel* leiti tuletis $y=(\Delta y/\Delta x)$, mis allub

valemile:
$$-\frac{1}{2} \left(\frac{y_{i+1} - y_i}{x_{i+1} - x_i} + \frac{y_i - y_{i-1}}{x_i - x_{i-1}} \right)$$
, kus y_i ja x_i tähistavad tundmatu väärtusi punktis i .

Valkude sulamistemperatuuriks (T_m) loetakse temperatuuri, kus pooled lahuses olevad valgumolekulid on denatureerunud. T_m on leitav punktina x-teljel, mil tuletise väärtus y-teljel on minimaalne.

Thermofluor'i meetodil testiti, kuidas mõjutab Lsc2 substraatide lisamine tema termostabiilsust. Katalüütiliselt inaktiivsete mutantide Lsc2D46A, Lsc2D203A ja Lsc2E287A puhul kasutasime substraatidena sahharoosi, rafinoosi ja stahhüoosi (Sigma-Aldrich, Saksamaa), varieerides nende kontsentratsioone vahemikus 0-300 mM. Muteerimata, katalüütiliselt aktiivse valguga puhul kasutasime substraatidena aineid, mis võiksid toimida fruktosüüli aktseptorina. Testisime D-sorbitooli (Serva, Saksamaa), D-mannitooli (Chemapol, Tšehhi), D-ksüloosi, D-fukoosi, L- ja D-arabinoosi, D-riboosi, ksülitooli, ja metüül- α -D-glükopüranosiidi, glükoosamiini, D-maltoosi, trehaloosi, D-tsellobioosi (kõik Sigma-Aldrich, Saksamaa), D-laktoosi (AppliChem, Saksamaa) mõju Lsc2 termostabiilsusele. Potentsiaalsete aktseptorite kontsentratsioone varieerisime vahemikus 0-300 mM.

2.2.9. Arvutipõhised meetodid

Erinevate bakterite levaansukraaside primaarjärjestused joondati veebipõhise programmiga MUSCLE (Edgar, 2004). Vastavad valgujärjestused võeti UniProt (<http://www.uniprot.org/>) andmebaasist ning joonduse visualiseerimiseks ja katalüütiliste aminohapete asukoha tuvastamiseks kasutati programmi BioEdit 7.0.5 (Hall, 1999). DNA järjestuste, plasmiidide visualiseerimiseks ning virtuaalseks kloneerimiseks kasutati programmi pDRAW 1.1.107 (<http://www.acaclone.com/>). Sisseviidud mutatsioonide kontrollimisel kasutati programmi BioEdit, millega võrreldi sekveneerimisel saadud muteeritud *lsc2* geeni ja algse geeni nukleotiidseid järjestusi.

Levaansukraasi struktuuri modelleerimiseks kasutati alusena *B. subtilis*'e levaansukraasi SacB kristallstruktuuri (PDB ID: 3BYN; Meng ja Fütterer, 2008), mudel visualiseeriti programmiga PyMol (DeLano, 2002). Lsc2 ja Lsc3 valkude kristalliseeritavuse hindamiseks kasutati veebiserverit XtalPred (<http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>; Slabinski *et al.*, 2007).

2.3. Tulemused ja arutelu

Levaansukraas on bakteriaalne eksoensüüm, mis lõhub sahharoosis oleva fruktoosi ja glükoosi vahelise sideme ning liidab fruktoosijäägid polümeerseks levaaniks ja lühikesteks fruktooligosahhariidideks. *P. syringae* pv. tomato DC3000 genoomis on kolm levaansukraasi geeni: *lsc1*, *lsc2* ja *lsc3*, millest *lsc3* on plasmiidse päritoluga ja kaks ülejäänut paiknevad kromosoomis (Visnapuu *et al.*, 2008). Varasemalt on meie töögrupis põhjalikumalt kirjeldatud levaansukraasi Lsc3 (Visnapuu *et al.*, 2008; 2009; 2011; Mardo *et al.*, 2014a; 2014b) ning vähesel määral ka levaansukraasi Lsc2 (Visnapuu, 2012; Alamäe *et al.*, 2012). Lsc3 valgul puhul on näidatud, et ta sünteesib sahharoosist ja rafinoosist potentsiaalselt

prebiootilisi fruktooligosahhariide (Visnapuu *et al.*, 2009), mida oleme saanud HPLC analüüsiga kvantiteerida (Mardo *et al.*, 2014a). Lsc3 valgul on uuritud ka alternatiivsete fruktosüüli aktseptorite kasutamist ning näidatud, et see valk suudab sünteesida heterooligofruktaane (Visnapuu *et al.*, 2011). Käesolev bakalaureusetöö on pühendatud Lsc2 valgule, mida meie grupis seni on vähem uuritud. Lsc2 valku ei olnud varem His-märgisega ekspresseeritud ega muteeritud, ka ei olnud varem kvantiteeritud tema polümerisatsiooni-produkte ja analüüsitud levaani sünteesi kineetikat. Töö detailsed eesmärgid on esitatud peatükis 2.1.

2.3.1. Lsc2 ja Lsc3 valkude järjestuste võrdlus ja nende kristalliseeritavuse hindamine

Minu töös seati eesmärgiks analüüsida põhjalikumalt *P. syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc2 omadusi, võrreldes neid Lsc3 valguga omadega. Lsc3 ja Lsc2 on vastvalt 431 ja 415 aminohappe pikkused. Ka teistel *P. syringae* patovaridel on mõlema pikkusega levaansukraase. 431 ah pikkustel levaansukraasidel on 16 ah pikkune N-terminaalne peptiid, mis 415 ah pikkustel valkudel puudub (Visnapuu *et al.*, 2008; vt ptk 1.3. ja Lisa 1). Tänapäev ei ole teada, miks on *P. syringae*'l vaja mitut levaansukraasi geeni ja valku.

Tabel 3 näitab, et Lsc2 ja Lsc3 valgud on järjestuselt 95% identsed, Lsc3 ja Lsc1 on omavahel koguni 96% identsed. Lsc2 ja Lsc3 järjestuste omavaheline võrdlemine näitas, et neile ühises 415 ah pikkuses alas oli erinevusi ainult 22 positsioonis. Need on tähistatud valkude joonduses Lisas 1 punaste täppidega ja paiknevad enamasti nendes positsioonides, mis ei ole levaansukraasides konserveerunud. Meie töögrupis on mitmeid positsioone Lsc3 valgus muteeritud struktuurifunktsioon analüüsiks (Mardo, 2009; Tiirik, 2010; Elmi, 2011; Mardo, 2011; Visnapuu *et al.*, 2011; Vaher, 2013; Gromkova, 2013; Mardo *et al.*, 2014a; 2014b), kuid neid, mille poolest Lsc2 ja Lsc3 omavahel erinevad, ei ole Lsc3 valgus seni muteeritud. Joonisel 2 on toodud *P. syringae* pv. tomato kolme levaansukraasi aminohappelise järjestuse võrdluse N-terminaalne osa. Joondusel on näha N-terminaalne 16 ah pikkune lisapeptiid, mis esineb Lsc1 ja Lsc3 valkudel, kuid puudub Lsc2 valgul.

ei saa olla eriti täpsed, sest modelleeritava valgu ja matriitsi (kristalliseeritud valk) järjestused on liiga erinevad. Näiteks Lsc3 valgu järjestuse identsus *G. diazotrophicus*'e levaansukraasiga on 45% ja *B. subtilis*'e levaansukraasiga ainult 27% (Tabel 3). Kristalliseeritud levaansukraasidest on Lsc3 ja Lsc2 valkudele järjestuselt kõige sarnasem *E. amylovora* levaansukraas, identsus on vastavalt 77 ja 78% (Tabel 3). Lsc3 valgu struktuuri modelleerimisel oleks seega parim kasutada matriitsina *E. amylovora* levaansukraasi kristallstruktuuri andmeid. Kuigi *E. amylovora* levaansukraas on kristalliseeritud (Caputi *et al.*, 2013), ei ole röntgenstruktuuranalüüsi andmeid veel publitseeritud.

Et saada Lsc3 valgu kristalle, oleme teinud koostööd Hispaanias Madriidis asuva laboriga, kus meie partneriks on Dr. Jose Miguel Mancheño. Kristalliseerimiseks ekspresseeris Karin Mardo Lsc3 valku nii N-terminaalse kui ka C-terminaalse His₆-järjestusega. Ta testis ja optimeeris ligi 300 erinevat kristallide saamise tingimust, kuid moodustunud kristallide difraktsiooni järgi saadi parimaks resolutsiooniks 3.8 Å, mis ei võimalda valgu 3D struktuuri täpselt määratleda.

Valkude kristalliseerimisel kasutatakse sageli nende lühendatud variante, mis on kompaktsemad ja moodustavad kvaliteetsemad kristalle. Näiteks *M. saccharophilum* β-fruktofuranosidaas (578 ah) kristalliseeriti ilma N-terminaalse signaalpeptiidita ja lisaks lühendati seda ka C-terminaalsest otsast – kristalliseeritud valku kuulusid aminohapped 37-532 (Tonozuka *et al.*, 2012). Samad autorid proovisid kristalliseerida sama valku signaalpeptiidita ka täispikkuses (37-578 ah), kuid katsed ebaõnnestusid. Ka Lsc3 valgu variante, mis olid N-terminaalsest otsast 15 või 25 aminohappe võrra lühendatud, proovis Karin Mardo Hispaanias kristalliseerida. 15 aminohappe eemaldamine valgust ei andnud paremaid kristalle ning 25 aminohappe eemaldamisel sadenes valk täielikult. Kuna Lsc2 on looduslikult 16 aminohappe võrra lühem kui Lsc3, siis eeldasime, et ta võiks olla kompaktsemalt pakitud ning seetõttu paremini kristalliseeritav.

Valkude kristalliseeritavuse tõenäosust on võimalik arvutipõhiselt ennustada. Selleks sisestasime XtalPred serverisse (<http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>; Slabinski *et al.*, 2007) Lsc2 ja Lsc3 valgujärjestused ja kontrolliks ka mõnede selliste levaansukraaside järjestused, mille struktuur on kas lahendatud (*B. subtilis*'e levaansukraas; Meng ja Fütterer, 2003; 2008) või on esmased andmed kristallide kohta publitseeritud (*E. amylovora* levaansukraas; Caputi *et al.*, 2013). Programm ennustab skaalal 1-5, milline võiks olla kvaliteetsete kristallide saamise tõenäosus. Hinne 1 tähendab väga suurt tõenäosust ja hinne 5 väikseimat. XtalPred programm ennustuse järgi on kõigi meid huvitanud levaansukraaside

kristallstruktuur kas väga raskesti või raskesti lahendatav. Lsc2 sai parima skoori (4), teised kolm valku, sh ka *B. subtilis*'e levaansukraas, mille kristallstruktuur on lahendatud, said skooriks 5. Kõigile analüüsitud valkudele ennustati korrapäratut N-terminaalset osa. Lsc3 puhul oli see pikem (15 ah) kui Lsc2 valgul (4 ah). See tähendab, et moodustuvates kristallides ei pruugi valgumolekulid olla korrapäraselt pakitud ning liiga palju on ruumi veelmolekulidele, mis takistavad struktuuranalüüsi. Ka Lsc3 valgu *in silico* ennustatud 3D mudel näitas, et N-terminaalne osa on struktuuritu ling, mis võib ilmselt vesilahuses liikuda ja sellega takistada valgu korrapäraseks kristalliks koondumist (Mardo, 2011).

Kuna Lsc2 valk on kompaktsem kui Lsc3 ja tema skoor XtalPred serveris oli parem kui Lsc3 valgul, otsustasime edasistes võimalikes kristallimiskatsetes kasutada Lsc2 valku. Et oleks võimalik valku kristalliseerida ka koos substraadiga aktiivtsentris, otsustasime konstrueerida Lsc2 valgu katalüütiliselt inaktiivsed mutandid, milles katalüütilise kolmiku aminohapped on asendatudalaniiniga. Selliste valkude kristallide analüüs võimaldaks kindlaks teha substraadi paigutust aktiivtsentris ja näidata aminohappeid, mis osalevad substraadi sidumises. Katalüütilise kolmikualaniini asendusmutante on kasutatud ka teiste bakterite levaansukraaside struktuuri ja substraatide seondumise kirjeldamisel, näiteks on kristalliseeritud *B. subtilis*'e SacB alus-hape katalüüsija Glu342Ala mutant koos sahharoosi ja rafinoosiga aktiivtsentris (Meng ja Fütterer, 2003; 2008; vt ptk 1.2. Tabel 1).

2.3.2. Lsc2 parameetrite iseloomustamine

2.3.2.1. Lsc2 valgu puhastamine ja substraatide lõhustamise kineetika

Antud töös kirjeldatud Lsc2 variandid erinevad polühistidiini (His₆) järjestuse paigutuse poolest: Lsc2 valk sünteesiti nii N- kui ka C-terminaalse His₆-järjestusega. Valgud sünteesiti ekspresseerides vastvaid levaansukraasi geene *E. coli* BL21(DE3) tüves, kus induktorina kasutati IPTG-d. Ensüümide puhastamine bakterite lüsaadist toimus Ni²⁺-afiinsuskromatograafiaga. Kõigist valgu puhastamise etappidest võeti proovid ning kontrolliti ensüümi olemasolu ja puhtust SDS-polüakrüülamiidgeelil (vt ptk 2.2.4.).

Puhastatud valkudel määrati sahharoosi lõhustamise (koguaktiivsuse) reaktsiooni k_{cat} ja K_m . Lsc2 valgu substraadispetiifilisuse hindamiseks mõõdeti 100 mM sahharoosist, rafinoosist ja stahhüoosist redutseerivate suhkrute vabanemise algkiirusi, et nende jagatise kaudu väljendada ensüümi substraadieelistust. Redutseerivate suhkrute teket mõõtes määrati ka Lsc2 valgu afiinsus rafinoosile. Andmeid analüüsiti Michaelis-Menteni võrrandi alusel SigmaPlot programmi ensüümikineetika mooduliga (vt ptk 2.2.5.). Tulemused on esitatud Tabelis 4.

Tabel 4. *P. syringae* pv. tomato levaansukraaside kineetilised parameetrid substraatide kasutamisel.

Valk	SAHHAROOS		RAFINOOS		STAHHÜOOS
	K_m (mM)	k_{cat} (1/s)	K_m (mM)	Rafinoosi ja sahharoosi kasutamise suhe (%)	Stahhüoosi ja sahharoosi kasutamise suhe (%)
Lsc3TEV^a	18.5 ± 2.5	504.4	44.8±3.4	52.0±5.0	48.0±3.0
Lsc2TEV	17.1±1.4	328.3	49.0±2.2	50.7±0.6	38.2±0.5
Lsc2Cter	17.0±1.2	300.2	44.4±5.1	53.2±1.3	37.9±0.9
Lsc2*	25.3 ± 1.6	273.3	53.2 ± 4.3 (K_i)	48.0±1.0	36.0±4.0

^aLsc3TEV valgu kineetilised parameetrid on mõõtnud T. Visnapuu (Visnapuu *et al.*, 2011).

*Andmed ilma märgiseta Lsc2 valgu kohta on pärit töödest Visnapuu, 2012 ja Alamäe *et al.*, 2012.

Katalüütilise konstandi (k_{cat}) väärtused sahharoosi lõhustamisel on mõlemal levaansukraasil väga sarnased, kuid Lsc3 on katalüütiliselt veidi aktiivsem kui Lsc2. Kui võrrelda Lsc2 ja Lsc3 valkude katalüütilise konstandi väärtuseid teiste gramnegatiivsete bakterite levaansukraasidega (*G. diazotrophicus* LsdA k_{cat} =65.0 1/s ja *Z. mobilis* LevU k_{cat} =28.3 1/s), siis Lsc2 ja Lsc3 valkudel on need kordades kõrgemad (Yanase *et al.*, 2002; Martinez-Fleites *et al.*, 2005).

Lsc2 ja Lsc3 afiinsus sahharoosile oli mõõdukas, K_m väärtused jäid vahemikku 17.0 kuni 25.3 mM. Samas kirjanduse andmetel (Hettwer *et al.*, 1995) on *P. syringae* pv. phaseolicola levaansukraasil väga madal afiinsus sahharoosile (K_m =160 mM). Väga madal afiinsus sahharoosile on levaansukraaside hulgas pigem erandlik. Samas töös (Hettwer *et al.*, 1995) väidetakse ka, et uuritud levaansukraasi ei suutnud kasutada rafinoosi. Levaansukraasidest on kõige suurem afiinsus sahharoosile *B. megaterium*'i ensüümil, mille K_m sahharoosile on 6.6 mM. Sellel ensüümil on ka väga kõrge k_{cat} väärtus, 2 272 1/s (Homann *et al.*, 2007). Rafinoosi, stahhüoosi ja sahharoosi kasutamise võrdlemine (vt Tabel 4) näitas, et nii Lsc2 kui ka Lsc3 eelistavad substraadina kasutada sahharoosi, ning nii rafinoosi kui ka stahhüoosi kasutatakse ligikaudu poole väiksema efektiivsusega. Ka *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* levaansukraasile LscA on rafinoos vähem sobiv substraat kui sahharoos, K_m sahharoosile on 24.1 mM ning K_i rafinoosile on ~81 mM (Visnapuu, 2012). Seetõttu erinevad Lsc2, Lsc3 ja LscA oma substraadivaliku poolest kindlasti *Z. mobilis*'e levaansukraasist, mis eelistab rafinoosi sahharoosile – tema rafinoosi ja sahharoosi kasutamise suhe on 117% ja stahhüoosi kasutatakse sama hästi kui sahharoosi (Yanase *et al.*, 2002). Sahharoosis, rafinoosis ja

stahhüoosis on kõigis ühine osa – sahharoosi molekul. Ilmselt seostub just see osa substraadist ensüümi aktiivtsentrisse.

Töös kasutasime kahte Lsc2 valgu varianti, mis erinesid teineteisest His₆-märgise asetsemise poolest. Levaansukraaside puhul on kasutatud valgu puhastamise hõlbustamiseks nii N- kui ka C-terminaalset His-märgist. Näiteks *Z. mobilis*'e LevU ekspresseerimisel liideti His-märgise valgu N-terminaalsesse otsa (Li *et al.*, 2008), kuid mõnede teiste levaansukraaside puhastamiseks on kasutatud ka C-terminaalset märgist (van Hijum *et al.*, 2004; Tiekling *et al.*, 2005; Biedendieck *et al.*, 2007). Meie tulemused näitasid, et märgise paiknemine valgus ei mõjutanud oluliselt substraatide lõhustamist ja kineetikat. Lisaks ei täheldanud me olulisi erinevusi Lsc2 ja Lsc3 valkude kineetilistes parameetrites ja substraadivalikus.

2.3.2.2. Lsc2 polümeriseerivad omadused

Levaansukraaside peamiseks produktideks on pikk levaani polümeer ja/või lühemad fruktooligosahhariidid. Polümeriseeriv aktiivsus sõltub suuresti keskkonna pH-st, temperatuurist ja substraadi kontsentratsioonist (Hettwer *et al.*, 1995; Sangiliyandi *et al.*, 1999; van Hijum *et al.*, 2004). Samas sõltub polümerisatsiooniproductide loomus ka ensüümist. Näiteks *B. subtilis*'e levaansukraas SacB sünteesib peamiselt pika ahelaga produkti – levaani, kuid *G. diazotrophicus*'e levaansukraas LsdA toodab peamiselt FOS-e (Chambert *et al.*, 1974; Hernandez *et al.*, 1995). Selle töö üheks eesmärgiks oli mõõta Lsc2 valgu polümeriseerivat aktiivsust, levaani tekke kineetikat, iseloomustada sünteesitavate FOS-ide spektrit ja kogust ning võrrelda saadud tulemusi Lsc3 valgu vastavate parameetritega.

Polümerisatsioonireaktsioon FOS-ide sünteesiks viidi läbi temperatuuril 37 °C 20 h jooksul ning reaktsioonisegu sisaldas 300 mM, 600 mM või 1200 mM sahharoosi. Puhastatud levaansukraasi valku lisati koguses 2.7 U/ml. Transfruktosüleeriva aktiivsuse mõõtmiseks määrati glükoosi ja fruktoosi sisaldust reaktsioonisegudes, samu proove analüüsiti ka õhukese kihi kromatograafiaga (vt ptk 2.2.6.). Glükoosi ja fruktoosi sisalduse vahe kaudu reaktsioonisegus arvutati ensüümi transfruktosüüliv aktiivsus (vt ptk 2.2.6.). TA avaldati protsendina, mis näitab, kui suur osa reageerinud sahharoosist sisaldunud fruktoosist polümeriseeritakse, st liidetakse polümerisatsiooniproductide koostisesse. Reaktsioonisegudes mõõdeti HPLC analüüsil ka erineva ahelapikkusega FOS-ide sisaldus. Varasemalt on võrdlevalt uuritud *P. syringae* pv. tomato Lsc3 valgu ja *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* LscA valgu polümeriseerivaid omadusi (Visnapuu *et al.*, 2008; 2011). Need katsed näitasid, et edukas polümerisatsioonireaktsioon vajab kõrget substraadi kontsentratsiooni ja pikaajalist inkubeerimist.

Tabel 5 näitab, et kõrgele sahharoosi kontsentratsioonil (1200 mM) on nii Lsc2 kui ka Lsc3 valgul kõrge transfruktosüüliv aktiivsus, ligikaudu 71% sahharoosist sisaldunud fruktoosist polümeriseeritakse. LscA valgul on vastav TA 73% (Visnapuu *et al.*, 2011). Madalamatel sahharoosi kontsentratsioonidel on kõigi valkude TA madalam, 300 mM sahharoosi puhul on see vaid ~25-28%.

Tabel 5. Lsc2 ja Lsc3 transfruktosüüliv aktiivsus, moodustunud FOS-ide spekter ning saagis ensüümi reageerimisel 300, 600 või 1200 mM sahharoosiga 20 h jooksul.*

Ensüüm	Transfruktosüüliv aktiivsus (%)			FOS polümerisatsiooniaste (PA)			FOS (g/mg valgu kohta)		
	Sahharoos			Sahharoos			Sahharoos		
	300 mM	600 mM	1200 mM	300 mM	600 mM	1200 mM	300 mM	600 mM	1200 mM
Lsc2TEV	26.9±1.2	44.1±0.5	71.3±1.5	3-5	3-6	3-8	1.1±0.1	4.0±0.0	13.1±0.8
Lsc2Cter	27.7±1.2	44.7±0.1	71.6±1.5	3-5	3-6	3-8	1.1±0.1	3.9±0.0	12.2±0.7
Lsc3TEV	25.3±0.5	43.2±0.4	71.4±1.8	3-5	3-6	3-8	1.1±0.1	3.9±0.1	11.7±0.8

*Produktide kontsentratsioonid määrati HPLC-ga. Ensüümi lisati 2.7 U/ml.

Sünteesitud FOS-ide HPLC analüüs näitas, et nii Lsc3 kui ka Lsc2 toodavad FOS-e kuni polümerisatsiooniastmega 8 (Tabel 5). Meie kogemused näitavad, et alati ei ole PA 8 produkte kromatogrammidel näha, sest neid moodustub vähe (vt Lisa 2). FOS-ide summaarne saagis 20 h reaktsioonis oli kõigil analüüsitud valkudel sarnane, ligikaudu 12 g/mg valgu kohta.

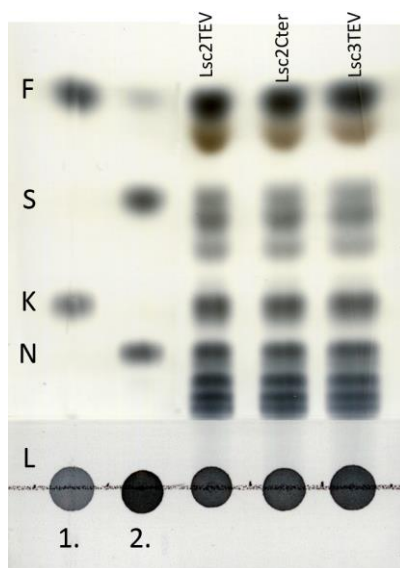
Tabel 6 näitab, et nii Lsc2 kui ka Lsc3 sünteesivad kõige suuremas koguses lühikesi FOS-e, polümerisatsiooniastmega 3-5. Võrreldes Lsc2 valguga sünteesib Lsc3 rohkem kestoosi (PA 3), nüstoosi (PA 4) ja FOS-i, mille PA on 5. Lsc2 ja Lsc3 erinevad produktide spektri poolest kindlasti *G. diazotrophicus*'e levaansukraasist, mis sünteesib polümerisatsiooniproduktina peamiselt kestoosi (PA 3) (Hernandez *et al.*, 1995). Samas *B. subtilis*'e levaansukraas SacB sünteesib rohkem pikemat levaani polümeeri ning vähesel määral fruktoooligosahhariide. FOS-ide süntees on veidi rohkem eelistatud kõrgematel temperatuuridel (Euzenat *et al.*, 1997).

Tabel 6. Erineva polümerisatsioonastmega FOS-ide saagised levaansukraaside reagerimisel 1200 mM sahharoosiga 20 h jooksul.*

Polümerisatsioonaste (PA)	Fruktooligosahhariidid (FOS) (g/mg)		
	Lsc2TEV	Lsc2Cter	Lsc3TEV
PA 3	3.4±0.2	3.2±0.2	3.7±0.1
PA 4	3.0±0.1	2.9±0.2	3.5±0.2
PA 5	3.1±0.1	3.1±0.1	3.4±0.3
PA 6	1.7±0.1	1.7±0.1	1.6±0.1
PA 7	0.7±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1
PA 8	0.3±0.2	0.3±0.2	0.3±0.2
KOKKU	12.2±0.7	11.7±0.8	13.1±0.8

*Ensüümi lisati 2.7 U/ml. Produktide kontsentratsioon määrati HPLC-ga.

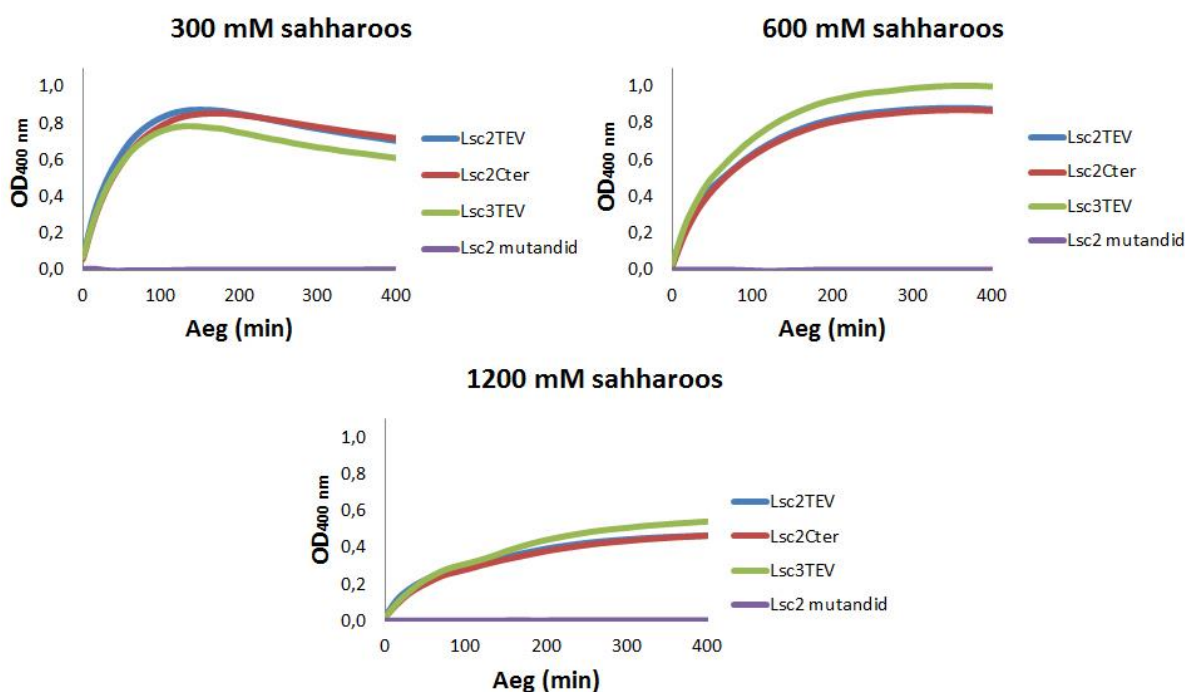
Polümerisatsiooniproductide analüüsiks tehti ka õhukese kihi kromatograafia analüüs. Ensüümi inkubeeriti 1200 mM sahharoosiga 20 h temperatuuril 37 °C. Täpsem metoodika on kirjeldatud peatükis 2.2.6. FOS-ide spekter oli TLC analüüsil sama nagu HPLC-1 määratuna, olulisi erinevusi kahe valguga produktide spektris ei ilmnenu. TLC analüüsi tulemused on esitatud Joonisel 3.



Joonis 3. Lsc2 ja Lsc3 valkudega sahharoosist sünteesitud produktide analüüs õhukese kihi kromatograafiaga. Reaktsioonisegud sisaldasid 1200 mM sahharoosi ja 2.7 U/ml valku. Proove lahjendati 4 korda ja silikageelplaadi stardijoonele kanti 0.5 µl proovi. Rada 1: 30 mM fruktoos (F), 8 mM 1-kestoos (K; PA 3), 0.7% levaan. Rada 2: 30 mM sahharoos (S), 8 mM nüstoos (N; PA 4), 0.7% levaan.

Lisaks FOS-ide tekkele uuriti levaani sünteesi spektrofotomeetriliselt. Levaansukraas sünteesib hägust levaani ja seetõttu saab levaani teket hinnata hägususe tõusu järgi, mõõtes neeldumist lainepikkusel 400 nm. Reaktsioon viidi läbi 300, 600 ja 1200 mM sahharoosi kontsentratsioonil 12 tunni jooksul temperatuuril 37 °C. Valku oli reaktsioonisegus 10 µg/ml.

Levaani sünteesi graafikud (Joonis 4) näitavad, et levaani teke on eelistatud madalamatel sahharoosi kontsentratsioonidel. Kõrgemal sahharoosi sisaldusel toodetakse peamiselt fruktooligosahhariide (vt Tabel 5), mis lahuse hägusust palju ei tõsta.



Joonis 4. Levaani süntees Lsc2 ja Lsc3 valkudega. Levaani teket mõõdeti erinevatel sahharoosi kontsentratsioonidel. Graafikutele on lisatud ka andmed Lsc2 katalüütilise kolmiku mutantide kohta.

Graafikutelt on näha, et kõige kiiremini moodustub levaani 300 mM sahharoosist. Nii Lsc2 valgu kaks varianti kui ka Lsc3TEV saavutasid levaani tekke maksimumi 300 mM sahharoosi kontsentratsioonil umbes 2.5 tunni möödudes reaktsiooni algusest. Hiljem hakkab reaktsioonisegu hägusus langema, mida saaks seletada levaani agregeerumise ning polümeersete produktide hägususe muutusega. Samas teame ka, et levaansukraas on võimeline vähesel määral levaani hüdrolüüsima, mis omakorda võib hägusust vähendada (Mardo, 2011). Meie katsed näitasid, et Lsc2 ja Lsc3 valgud on levaani sünteesi kineetika poolest väga sarnased. Ka ei mõjutanud His-märgise paiknemine levaani sünteesi kineetikat Lsc2 valgul. Katalüütilise kolmiku asendusmutandidalaniiniga (vt ptk 2.2.3.) ei suutnud levaani sünteesida. Nende käitumine on näidatud Joonisel 4 (tähistus „Lsc2 mutantid“) ühise joonega.

2.3.3. Lsc2 ennustatud katalüütilise kolmiku eksperimentaalne tõestamine

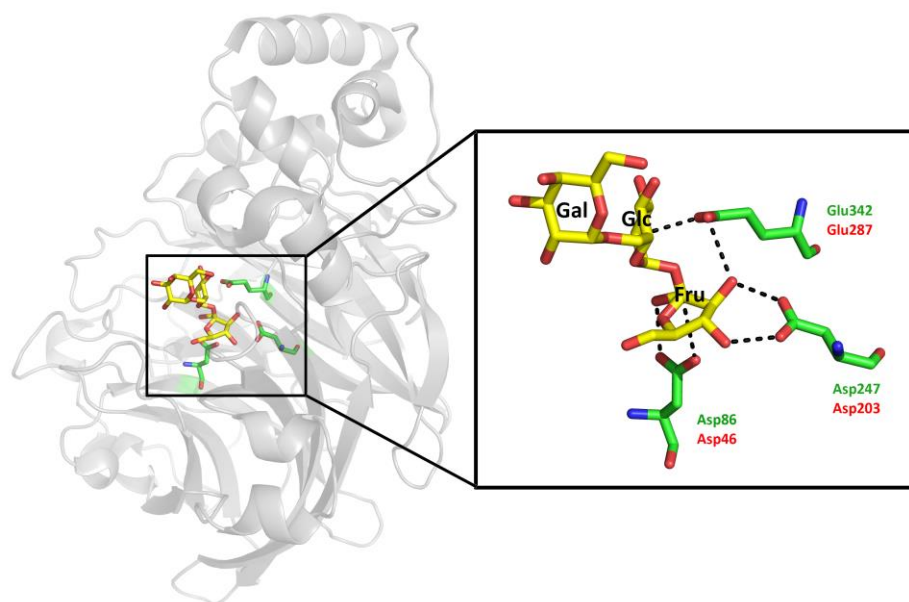
Antud töö üheks eesmärgiks oli Lsc2 valgu katalüütiliselt inaktiivsete mutantide konstrueerimine ja nende biokeemiline iseloomustamine. Varem on meie grupis ennustatud

levaansukraaside joonduste ja kirjanduse analüüsi põhjal (Alamäe *et al.*, 2012) Lsc2 valgu katalüütilise kolmiku aminohapeteks Asp46 (nukleofiil), Asp203 (RDP-motiivis asuv vaheühendi stabiliseerija) ja Glu287 (alus-hape katalüüsija). Eksperimentaalselt on näidatud, et vastavateks aminohapeteks Lsc3 valgus on Asp62, Asp219 ja Glu303 (Mardo *et al.*, 2014a). Joonisel 5 on esitatud väljavõtte seitsme levaansukraasi (sh ka Lsc2 ja Lsc3) joondusest. Joondamiseks kasutati veebipõhist programmi MUSCLE (Edgar, 2004) ning kõikide valkude aminohappelised järjestused võeti UniProt (<http://www.uniprot.org/>) andmebaasist. Joonduse visualiseerimiseks kasutati programmi BioEdit 7.0.5 (Hall, 1999).

			Asp46			Asp203			Glu287			
<i>Pst</i> Lsc2	32	SPDFP-VMSD	TVFTIDFMPL	50	200	NFRDQSPFFID	E-NDGRLYMW	218	272	ILPPLVTAVG	VNDQTERPBY	291
<i>Pst</i> Lsc3	48	SADFP-VMSD	TVFTIDFMPL	66	216	NFRDQSPFFID	E-NDGRLYMW	234	288	ILPPLVTAVG	VNDQTERPBY	307
<i>G.d.</i> LsdA	121	PADEP-VINE	DVWVIDFWIL	139	306	NFRDQPTFED	EKHEGVNVMW	325	386	ELSPILSANC	VNDQTERPQV	405
<i>P.c.</i> LscA	39	SADFP-VLSN	EVFTIDFMPL	57	207	GFRDQWPERD	E-NDGRLYMW	225	279	ILPPLVTAVG	VNDQTERPHE	298
<i>E.a.</i> EaLsc	32	DIAPF-VMSD	EVFTIDFMPL	50	200	NFRDQSPFFID	R-NDGRLYMW	218	272	ILPPLVTAVG	VNDQTERPHE	291
<i>Z.m.</i> LevU	34	DYDFP-VMTD	KYWVIDFMPL	52	191	DFRDQHVFTN	E-EDGRTYAL	209	263	ILPPLVTAFG	VNDQTERPBY	282
<i>M.s</i> K-1 MsFFase	97	PDDEPMSNE	QVWVIDFMPL	116	279	NFRDQPTFED	EAHEGETELW	298	359	ELPPLSANC	VNDQTERPQI	378
Consensus	16	** : .	::*.*	25	81	..**	* : . * : :	90	112	:*.*::*	*.***::*	126

Joonis 5. *P. syringae* pv. tomato Lsc2 valgu joondus teiste valkudega: *P. syringae* pv. tomato Lsc3, *G. diazotrophicus*'e LsdA, *P. chlorophis* subsp. *aurantica* LscA, *E. amylovora* EaLsc, *Z. mobilis*'e LevU ja *M. saccharophilum* β-fruktofuranosidaas. Identsed piirkonnad valkudes on tähistatud mustaga, sarnased on esitatud hallil taustal. Punase raami sees on näidatud katalüütilise kolmiku aminohapped ning punases kirjas on Lsc2 vastavad aminohapped: Asp46, Asp203 ja Glu287.

Joonisel 6 on esitatud *B. subtilis*'e levaansukraasi SacB mudel, mis on saadud valgu kristallstruktuuri (PDB ID: 3BYL; Meng ja Fütterer, 2008) visualiseerimisel programmiga PyMol (DeLano, 2002). SacB alus-hape katalüüsija mutant Glu342Ala kristalliseeriti koos rafinoosiga aktiivtsentris (Meng ja Fütterer, 2008), kuid visualiseerimise käigus muutisime Ala342 tagasi glutamaadiks (Glu342). Joonisel 6 tähistasime SacB katalüütilise kolmiku aminohapped rohelisega ja neile vastavad Lsc2 valgu aminohapped punaselt.



Joonis 6. *Bacillus subtilis*'e levaansukraas SacB (PDB ID: 3BYL; Meng ja Fütterer, 2008) kompleksis rafinoosiga. SacB katalüütilise kolmiku aminohapped on tähistatud rohelisega, võimalikud vesiniksidemed substraadiga on näidatud punktiirjoonega. Punasega on märgitud vastavad ennustatud katalüütilise kolmiku positsioonid Lsc2 valgus. Joonise tegi Karin Mardo.

Eksperimentaalseks tõestamiseks, et Asp46, Asp203 ja Glu287 moodustavad katalüütilise kolmiku, kasutati koht-suunatud mutageneesi. Asp46, Asp203 ja Glu287 asendatialaniinidega, mis ei tohiks muuta valgu geomeetriat. Siiski peaks need asendused alandama märgatavalt ensüümi reaktsioonivõimet, kui need positsioonid on katalüüsis olulised. Näiteks Lsc3 valgu Asp62, Asp219 ja Glu303 asendusmutandid alaniiniga olid katalüütiliselt inaktiivsed, nende k_{cat} väärtused sahharoosi lõhustamisel olid alanenud kuni 130 000 korda (Mardo *et al.*, 2014a; vt ka Tabel 7). Vastavalt muteeritud *lsc2* geenid konstrueeriti megapraimeri meetodiga, mille käigus paljundati *lsc2* geeni soovitud mutatsioone sisaldavate praimeeritega (Wei *et al.*, 2004; Tiirik, 2010; vt ptk 2.2.2.). Mutantsed *lsc2* geenid kloneriti pURI3Cter vektorisse, kus geeni ekspresseerides liitub valgu C-terminaalsesse otsa His₆-järjestus. Saadi plasmiidid pURI3-Cterlsc2D46A, pURI3-Cterlsc2D203A, pURI3-Cterlsc2E287A (Tabel 2). Plasmiidid viidi *E. coli* BL21(DE3) tüvesse valgu üleekspressiooniks ning levaansukraasid puhastati rakkudest Ni²⁺-afiinsuskromatograafiaga nagu kirjeldatud peatükis 2.2.4.

2.3.4.1. Lsc2 katalüütilise kolmiku mutantide omadused

Mutantsete valkude kineetiliste parameetrite ja produktide spektri analüüsil ilmnas, et Asp46, Asp219 ja Glu287 on katalüüsiks hädavajalikud ja peaksid seega kuuluma katalüütilisse kolmikusse. Kuna need mutandid olid katalüütiliselt praktiliselt inaktiivsed, siis kineetiliste

parameetrite määramiseks pikendasime reaktsiooniaegu ja suurendasime valguga kogust reaktsioonisegus. Samamoodi on toimitud ka *L. reuteri* inulosukraasi ja levaansukraasi aktiivtsentri mutantide iseloomustamisel (Ozimek *et al.*, 2005) ning Lsc3 valguga katalüütilise kolmiku mutantide kirjeldamisel (Mardo *et al.*, 2014a). Lsc2 aktiivtsentri mutante inkubeerisime erinevatel sahharoosi kontsentratsioonidel ligi kolm ööpäeva, et saaks arvutada välja kineetilised parameetrid. Mutantide k_{cat} väärtused olid langenud 1000-6000 korda võrreldes muteerimata valguga, samas K_m sahharoosile ei muutunud palju (vt Tabel 7). Analoogilisi tulemusi on publitseeritud ka teiste levaansukraaside kohta. Näiteks *B. subtilis*'e levaansukraasi SacB vaheühendi stabiliseerija Asp247 muteerimisel asparagiiniks kolmes levaansukraasi homologis alandas valguga k_{cat} väärtust 75-3500 korda, samal ajal kui K_m väärtused jäid sarnaseks metsiktüüpi valguga (Meng ja Fütterer, 2003). Sarnased tulemused olid ka *G. diazotrophicus*'e levaansukraasil LsdA, mil potentsiaalse nukleofiili ja vaheühendi stabiliseerija muteerimisel vastavalt asparagiiniks jaalaniiniks langetas katalüütilise konstandi väärtust vastavalt 2300 ja 75 korda, kuid afiinsus sahharoosile jäi sarnaseks algse valguga (Martinez-Fleites *et al.*, 2005).

Tabel 7. Levaansukraasi Lsc2 katalüütilise kolmiku mutantide afiinsus sahharoosile, katalüütiline konstant ja selle vähenemine võrrelduna Lsc3 aktiivtsaidi mutantidega.

	K_m (mM)	k_{cat} (1/s)	k_{cat} vähenenud (x)
Lsc2Cter	17.0±1.2	273.3	0
Lsc2Asp46Ala	21.4±2.1	0.3	1 000
Lsc2Asp203Ala	27.0±2.5	0.05	6 000
Lsc2Glu287Ala	36.1±5.6	0.07	4 300
Lsc3TEV^a	18.5±2.5	504.4	0
Lsc3Asp62Ala^b	20.7±2.1	<0.001	50 000
Lsc3Asp219Ala^b	43.4±10.2	<0.0001	130 000
Lsc3Glu303Ala^b	27.1±5.5	<0.01	5 000

^aMetsiktüüpi Lsc3 andmed pärinevad T. Visnapuult (Visnapuu *et al.*, 2011).

^bVõrdluseks esitatud Lsc3 katalüütilise kolmiku mutantsete valkude andmed pärinevad Karin Mardolt (Mardo *et al.*, 2014a).

Lsc2 valguga mutantide puhul oli kõige aktiivsem Asp46Ala mutant, millel katalüütilise konstandi väärtus langes 1 000 korda. Lsc3 valguga mutantide puhul oli katalüütiliselt kõige aktiivsem alus-hape katalüüsija mutant (Lsc3Glu303Ala), mille katalüütilise konstandi väärtus langes võrreldes metsiktüüpi valguga 5 000 korda (Tabel 7). Kokkuvõetuna näitasid meie andmed seda, et Lsc2Asp46Ala, Lsc2Asp203Ala ja Lsc2Glu287Ala on võimelised substraati siduma, kuigi edasist katalüüsi praktiliselt ei toimu. See peaks võimaldama inaktiivseid valke kristalliseerida koos seotud substraadiga.

2.3.3.2. Muteeritud Lsc2 valgud polümeriseerijatena

Kuna Lsc2Asp46Ala, Lsc2Asp203Ala ja Lsc2Glu287Ala valkudel oli minimaalne katalüütiline aktiivsus olemas, uurisime ka nende polümeriseerimisvõimet. Kõigepealt määrasime mutantsete valkude transfruktosüüliva aktiivsuse. Selleks määrati sahharoosist vabanenud fruktoosi ja glükoosi hulk ensümaatilisel (vt ptk 2.2.6.). Kuna ensüümid olid praktiliselt inaktiivsed, siis produkte moodustus nii vähe, et HPLC meetodiga ei saanud nende koguseid määrata. Tulemused on toodud Tabelis 8.

Tabel 8. Lsc2 mutantide transfruktosüüliv aktiivsus võrrelduna metsiktüüpi valkudega.

Valk	Lsc2TEV ^a	Lsc2Cter ^a	Asp46Ala ^b	Asp203Ala ^b	Glu287Ala ^b
Transfruktosüüliv aktiivsus (%)	71.3±1.5	71.6±1.5	56.4±1.8	51.8±2.5	60.0±0.4

^aTA arvutati HPLC analüüsiga

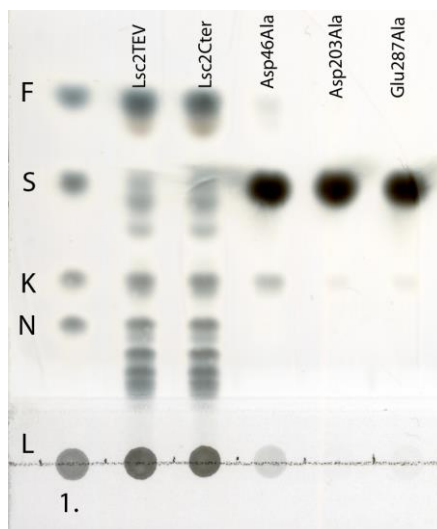
^bTA arvutati ensümaatilisel meetodil

Tabel 8 näitab, et mutantsete Lsc2 valkude TA väärtused on enam-vähem samad kui muteerimata valgul. Sarnased tulemused on saadud ka Lsc3 valgu katalüütilise kolmiku mutante analüüsides (Mardo *et al.*, 2014a). Ka teiste bakterite levaansukraaside aktiivtsentri aminohapete muteerimisel on ilmnenud ensüümi k_{cat} väärtuste drastilised langused, kuid transfruktosüülimise % on jäänud ligikaudu samaks. Näiteks *Z. mobilis*'e LevU Glu278 (alus-hape katalüüsija) muteerimisel aspartaadiks või histidiiniks langes ensüümi katalüütiline efektiivsus vastavalt 30 ja 210 korda, kuid mutantide transfruktosüleeriv aktiivsus oli 77% ja 55%, mis on suhteliselt sarnane metsiktüüpi LevU sama väärtusega (65%) (Yanase *et al.*, 2002).

Lsc2 mutantsetel valkudel mõõdeti ka levaani teket. Nägime, et Lsc2 katalüütilise kolmiku mutandid ei suuda sünteesida levaani (vt Joonis 4). Levaani sünteesi ei toimunud ka *B. subtilis*'e katalüütilise kolmiku mutantidel Asp86Ala, Asp247Ala ja Glu342Ala (Meng ja Fütterer, 2003).

Nagu näitab Tabel 8, suutsid Lsc2 valgu katalüütilise kolmiku mutandid hoolimata ülimaldast katalüütilisest aktiivsusest, vähesel määral siiski fruktoosijääke polümeriseerida. Reaktsiooniproduktide analüüsiks viisime läbi õhukese kihi kromatograafia. Reaktsioonisegus kasutati substraadina 1200 mM sahharoosi ja valku lisati suures koguses, 100 µg/ml. TLC analüüs näitas, et katalüütiliselt kõige aktiivsem mutant, Asp46Ala, sünteesis vähesel määral ka 1-kestoosi ja plaadi stardijoonel oli näha ka veidi levaani. Asp203Ala ja Glu287Ala mutantide puhul oli TLC plaadil näha vaid reageerimata sahharoos ja minimaalne hulk kestoosi (Joonis 7). Lsc3 puhul oli väga nõrk levaani ja FOS-ide süntees täheldatav

Glu303Ala mutandil, kui reaktsioonisegusse lisati väga suur kogus (100 µg/ml) valku. Lsc3 mutantide Asp62Ala ja Asp219Ala puhul ei suudetud ei levaani ega FOS-e reaktsiooniproductide hulgas tuvastada (Mardo *et al.*, 2014a).



Joonis 7. Lsc2 katalüütilise kolmiku mutantide sahharoosist sünteesitud polümeerisatsiooniproductide analüüs õhukese kihi kromatograafiaga. Reaktsioonisegud sisaldasid 1200 mM sahharoosi. Plaadi stardijoonele kanti 0.5 µl 4 korda lahjendatud proovi. Rada 1 markersuhkrud: 30 mM fruktoos (F), 30 mM sahharoos (S), 8 mM 1-kestoos (K; PA 3), 8 mM nüstoos (N; PA 4), 0.7% levaan.

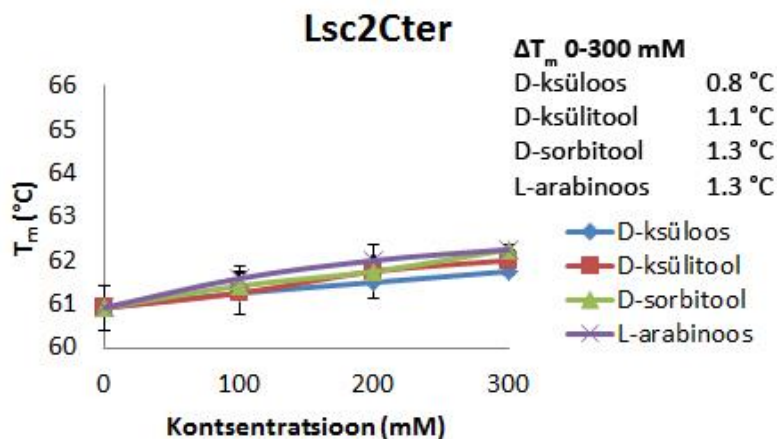
2.3.4. Lsc2 ja tema katalüütiliselt inaktiivsete mutantide termostabiilsuse uurimine doonor- ja aktseptorsubstraaside juuresolekul

2.3.4.1. Muteerimata Lsc2 valgu termostabiilsus erinevate aktseptormolekulidega

Valkude termostabiilsuse määramiseks kasutati Thermofluori meetodit, mida saab rakendada valkude kristalliseerimisel, et hinnata erinevate puhvrite ja ligandide mõju valgu stabiilsusele. Erinev soolade sisaldus, puhvri pH ja ligandi seondumine valguga võivad stabiliseerida valgu struktuuri. Näiteks *E. amylowora* levaansukraasi kristalliseerimisel kasutati just seda meetodikat, et leida parimad tingimusi kvaliteetsete kristallide moodustumiseks (Caputi *et al.*, 2013). Thermofluori meetodit on kasutatud ka uute ravimite väljatöötamisel – on vaadeldud, kuidas erinevad ligandid (reeglina inhibiitorid) mõjutavad haiguses olulise märklaudvalgu termostabiilsust (Pantoliano *et al.*, 2001). Näiteks östrogeeni retseptor on valguline kompleks, mille erinevad domeenid seovad östrogeeni ja seejärel DNA-d, ning seeläbi algatatakse transkriptsioon. Pantoliano töögrupp (2001) näitas, et ligandiga seostumata retseptori sulamistemperatuur oli 44.5 °C, kuid tamoksifeeniga (östrogeeni antagonist) seostunud retseptori T_m tõusis 49.5 °C-ni. Tamoksifeeni seondumine östrogeeni retseptorile takistab transkriptsiooni. Meie oleme varem kasutanud Thermofluor meetodit Lsc3 mutantide

termostabiilsuse hindamiseks. Meie tulemused näitasid, et tulemused, mis saadi Thermofluor meetodiga korreleerusid hästi tulemustega, mis saadi traditsioonilist töömahukat meetodit kasutades (Mardo *et al.*, 2014b). Selle töö üheks eesmärgiks oli uurida, kas Thermofluor meetodit saaks kasutada ka ligandide (sahharoos, rafinoos, stahhüoos, aktseptorsuhkrud) seostumise uurimiseks levaansukraasiga.

Thermofluori meetodi puhul kuumutatakse valku ja hüdrofoobset värvi sisaldavat proovi ning kui valk hakkab lagunema, siis seostub värv valgu denatureerumisel eksponeeritavate hüdrofoobsete aminohapetega ja tekib fluorestsents. Valkude sulamistemperatuurina tähistatakse temperatuuri, mil pooled lahuses olevad valgud on denatureerunud. Muutused valgu T_m -i väärtustes viitavad tema stabiilsuse muutumisele. Metsiktüüpi Lsc2 valgul testiti, kuidas mõjutavad alternatiivsed fruktosüüli aktseptorid tema stabiilsust. Kasutasime meetodi testimisel neid aineid, mis toimisid Lsc3 valgu puhul fruktosüüli aktseptoritena ja võimaldasid heterooligofruktaanide sünteesi (Visnapuu *et al.*, 2011), eeldades, et aktiivsaiti seondunud aktseptorid võiksid valku stabiliseerida. Traditsioonilisi levaansukraasi substraate (sahharoos, rafinoos ja stahhüoos) metsiktüüpi valgu puhul kasutada ei saa, sest siis käivituks ensüümi katalüüsireaktsioon. Täpsemat Thermofluori meetodikat on kirjeldatud peatükis 2.2.8. Lsc2 valgu sulamistemperatuuri muutused aktseptorsuhkrute juuresolekul on näidatud Joonisel 8.



Joonis 8. Erinevate aktseptormolekulide mõju metsiktüüpi Lsc2 valgu termostabiilsusele. Graafikul on näidatud T_m -i muutused võrreldes valguga, millele ligande ei lisatud.

Lsc2 valgu puhul ei mõjuta His₆-märgise asukoht valgus (kas N- või C-terminaalses otsas) ensüümi katalüütilisi omadusi. Thremofluori katsetes selgus, et märgise paigutus ei mõjuta ka valgu termostabiilsust, sest nii puhastatud Lsc2TEV kui ka Lsc2Cter puhul on T_m sama: 60.9 °C. Sellest lähtudes kasutasime edasistes katsetes fruktosüüliaktseptoritega Lsc2Cter valku.

Suhteliselt kõrge T_m väärtus võiks näidata, et Lsc2 võiks olla kristalliseeritav. Näiteks Dupeux *et al.* (2012) näitasid 657 paljudest erinevatest organismidest pärineva valguga, et Thermofluor meetodil määratud T_m väärtus võimaldas ennustada kristallide saamise edukust. Kui T_m oli üle 45 °C, siis oli edukus hea – 43% juhtudest saadi kristallid. Kui aga T_m oli madalam, siis oli edukus vaid 23%.

Termostabiilsuse mõõtmisel katsetasime 14 erineva aktseptori seondumist Lsc2Cter valguga. Suurimat stabiliseerivat mõju avaldasid D-ksüloos, D-ksülitool, D-sorbitool ja L-arabiinool. Varasemalt on meie töögrupis näidatud, et kõik nad toimivad Lsc3 valgul fruktosüüli aktseptoritena (Visnapuu *et al.*, 2011).

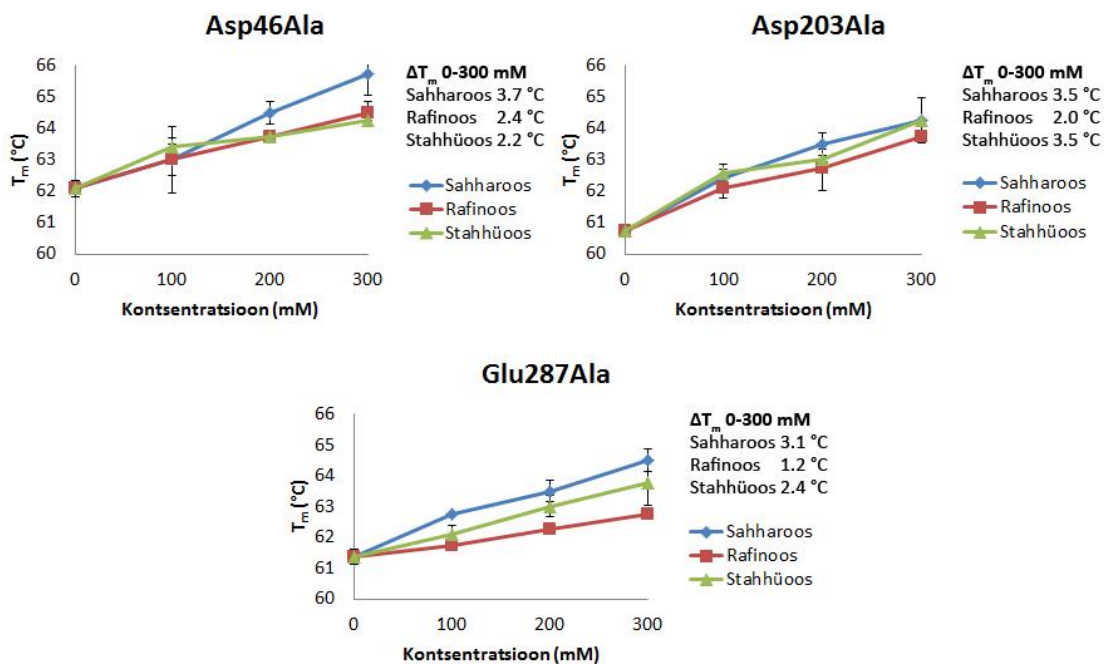
Ligandi juuresolek tõstis valguga sulamistemperatuuri siiski vähe, maksimaalselt 1.3 kraadi (Joonis 8). Teistel testitud aktseptorite puhul oli valguga sulamistemperatuuri tõus veelgi väiksem. Järeldame, et proovitud aktseptorid seostuvad valguga nõrgalt ega muuda seetõttu valgu oluliselt stabiilsemaks. See on ka loogiline, sest levaansukraasid seovad aktseptormolekuli +1 alapiirkonda, mis ei ole kõrge spetsiifilisusega. Sinna võib seonduda sahharoosi glükoosijääk, rafinoosi galaktoosijääk või siis pikendatava FOS-i fruktoosijääk (Ozimek *et al.*, 2006; Meng ja Fütterer, 2008; Visnapuu *et al.*, 2011).

Lsc2 valguga T_m oli mõnevõrra madalam (60.9 °C) kui Lsc3 valguga (65.4 °C). See võiks tähendada seda, et Lsc3 võiks olla mõnevõrra stabiilsema konformatsiooniga. See ei kinnita meie ennustust Lsc2 valguga parema sobivuse kohta kristalliseerimiseks. Siiski on Lsc2 ja Lsc3 valgud kindlasti termostabiilsemad kui *E. amylovora* levaansukraas (T_m 57 °C; Caputi *et al.*, 2013), mille kristallid on saadud ning struktuur ilmselt lahendamisel. Ensüümi stabiilsust saab suurendada ka keskkonna (puhvrid) optimeerimisega, millega on võimalik saavutada T_m väärtuse tõusu vähemalt 2 °C võrra (Ericsson *et al.*, 2006).

2.3.4.2. Lsc2 valguga katalüütiliselt inaktiivsete mutantide termostabiilsus

Lsc2 katalüütilise kolmiku mutantide Thermofluor'i mõõtmised viidi läbi samamoodi nagu katsetes metsiktüüpi valguga, erinevus oli kasutatud ligandides. Nende valgude puhul saime uurida sahharoosi, rafinoosi ja stahhüoosi seondumise mõju valguga stabiilsusele, sest tänu mutantide katalüütilisele inaktiivsusele substraadi seostumisele reaktsiooni ei järgne. Katalüütilise kolmiku mutante saaks kasutada valguga kristalliseerimisel koos aktiivtsentrisse seostunud substraadiga (sahharoos, rafinoos või stahhüoos). Substraadiga seondunud valguga termostabiilsus võiks tõusta. Selle hüpoteesi kontrollimiseks viisime läbi Thermofluori katse,

kasutades valkude ligandidena erinevaid suhkruid nende erinevatel kontsentratsioonidel (100-300 mM) (vt ptk 2.2.8.).



Joonis 9. Lsc2 valkude katalüütilise kolmiku mutantide termostabiilsuse hindamine Thermofluor'i meetodiga. Reaktsioonisegudes kasutati erinevates kontsentratsioonides (100-300 mM) sahharoosi, rafinoosi ja stahhüoosi. Graafikutel on ära näidatud ka ligandi seostumisega kaasnev maksimaalne täheldatud T_m tõus (ΔT_m 0-300 mM).

Suurimat sulamistemperatuuri tõusu oli näha sahharoosi kasutamisel ligandina. Näiteks Asp46Ala mutandil tõusis valgu T_m 3.7 °C võrra, kui valgule lisati 300 mM sahharoosi. Kahel teisel mutantsel valgul oli T_m -i muutus veidi väiksem. Asp203Ala ja Glu287Ala mutantidel stabiliseeris valku hästi ka 300 mM stahhüoos ja rafinoosi juuresolek mõjutas nende valkude termostabiilsust kõige vähem mõju (vt Joonis 9). Asp46Ala mutandil mõjutas aga rafinoos valgu termostabiilsust rohkem kui stahhüoos, tõstes T_m -i maksimaalselt 2.4 kraadi võrra. Seega võiks järeldada, et sahharoos tõstab katalüütiliselt inaktiivsete valkude termostabiilsust kõige rohkem, ta peaks valguga kõige tugevamini seostuma ja oleks seega kõige sobilikum ligand valgu kristalliseermisel koos substraadiga. Thermofluor katse tulemused on heas kooskõlas selles töös saadud andmetega Lsc2 substraadivaliku kohta. Lsc2 afiinsus sahharoosile on suurem kui rafinoosile (Tabel 4). Ka rafinoosi ja sahharoosi ning stahhüoosi ja sahharoosi kasutamise suhted näitavad, et ensüümile on parimaks substraadiks sahharoos (Tabel 4). Sahharoosiga seotud levaansukraasi kristallid on saadud ka *B. subtilis*'e levaansukraasil SacB (Meng ja Fütterer, 2003). Mõlemal puhul immutatati SacB valgukristalle 150 mM suhkrulahuses (Meng ja Fütterer, 2003; 2008). *M. saccharophilum* β -

fruktofuranosidaas kristalliseeriti kompleksis fruktoosi molekuliga ja selleks immutati valku 1.67 M fruktoosi lahuses (Tonozuka *et al.*, 2012). Thermofluori katsetest mõõdetuna võiks Lsc2 puhul sobida substraadiga koos kristalliseerimisel just kõrgemad substraadi kontsentratsioonid (300 mM), mis stabiliseerisid meie katses valku kõige enam.

KOKKUVÕTE

Levaansukraase leidub nii gramnegatiivsete kui ka -positiivsete bakteritel. Kuigi erinevate bakterite levaansukraaside valgujärjestused varieeruvad, on neil kõigil sarnane struktuur ja aktiivtsenter. Ensüüm on viielabalise β -propelleri struktuuriga, mille keskel asub substraadi seondumistasku. Substraadimolekuli seondumisel on eriti olulised kolm aminohapet, kaks aspartaati ja üks glutamaat. Need aminohapped moodustavad nn katalüütilise kolmiku. Ensüüm hüdrolyüsib substraadi molekulis (substraadiks on näiteks sahharoos) glükosiidsideme ja polümeriseerib vabanevad fruktoosijäägid β -2,6 sidemega pikaks polümeeriks (levaaniks) ja fruktooligosahhariidideks. Mõlemat tüüpi produktidel on potentsiaalseid tehnoloogilisi rakendusi.

Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 genoomis on kolm levaansukraasi geeni: *lsc1*, *lsc2* ja *lsc3*. Varasemalt on meie töögrupis põhjalikuma vaatluse all olnud levaansukraas Lsc3. Sellest valgust on tehtud palju mutante, mille analüüsil saab teha järeldusi konkreetsete aminohapete rolli kohta valgus. Selliste järelduste tegemisel oleks suureks abiks valgu kristalliseerimine ja struktuuri lahendamine.

Antud töö üheks põhieesmärgiks oli iseloomustada Lsc2 valku ja võrrelda tema omadusi Lsc3 valgu omadega. Võrreldi valkude substraadivalikut, polümerisatsioonivõimet, reaktsiooniproductide spektrit ja termostabiilsust. Töö teiseks ülesandeks oli hinnata arvutipõhiste meetoditega Lsc2 valgu kristalliseeritavust ja eksperimentaalselt tõestada, millised aminohapped moodustavad valgu katalüütilise kolmiku. Selleks muteeriti *lsc2* geeni, ekspresseeriti mutantseid levaansukraase *E. coli*'s ja iseloomustati saadud mutantseid valke.

Töö põhitulemused olid järgmised:

1. Substraadivaliku, polümerisatsioonivõime ja reaktsiooniproductide spektri alusel ei ilmnenud olulisi erinevusi Lsc2 ja Lsc3 valkude vahel. Sarnaselt käitusid ka Lsc2 mõlemad variandid, mil polühistiidiini märgis paiknes valgu erinevates otstes. Nii Lsc2 kui ka Lsc3 eelistavad kasutada substraadina sahharoosi. Rafinoosi ja stahhüoosi kasutatakse ligikaudu poole väiksema efektiivsusega. Levaani süntees on eelistatud madalamatel kontsentratsioonidel ja FOS-e polümerisatsiooniastmega 3-7(8) sünteesitakse kõrgel (1200 mM) sahharoosi kontsentratsioonil saagisega ~12 g/mg valgu kohta.

2. Aminohapete Asp46, Asp203 ja Glu287 asendaminealaniiniga langetas drastiliselt *P. syringae* pv. tomato Lsc2 valgu võimet lagundada sahharoosi ja toota levaani. Järeldame, et need aminohapped moodustavad Lsc2 valgu katalüütilise kolmiku.
3. Valkude kristalliseeritavuse hindamine *in silico* näitas, et Lsc2 valk peaks paremini sobima kristalliseerimiseks kui Lsc3.
4. Katalüütiliselt inaktiivsete Lsc2 mutantide analüüs Thermofluor'i meetodit kasutades näitas, et valkude termostabiilsust suurendas kõige enam sahharoosi juuresolek. Seega võiks neid mutante kasutada koos sahharoosiga kristalliseerimiseks.

Characterization of levansucrase Lsc2 from *Pseudomonas syringae* pv. tomato, construction of its active site mutants and comparison with Lsc3 protein

Kadri Mardo

SUMMARY

Levansucrases are bacterial extracellular enzymes which belong to the GH68 family of glycoside hydrolases. They are found in both Gram-negative and Gram-positive bacteria. These enzymes split glycoside bond in the substrate (for example sucrose) and transfer its fructosyl residue to a variety of acceptors. Levansucrases produce short-chain fructooligosaccharides (FOS) and long-chain levan, in which fructose residues are linked with β -2,6 bonds. FOS can be used as potential health-promoting prebiotics in human and animal intestine. For levan, immune-stimulating effect has been described.

Levansucrases and other enzymes belonging to glycoside hydrolase family 68 have a common five-blade β -propeller fold with a deep central cavity. At the bottom of the cavity resides the active centre which contains three catalytically important acidic amino acids, two aspartates and a glutamate, also named as catalytic triad. One aspartate acts as catalytic nucleophile and the other as transition state stabilizer. Glutamate has a role of general acid-base catalyst.

The aim of this study was to characterize *P. syringae* pv. tomato DC3000 levansucrase Lsc2 and compare its properties with those of Lsc3 protein. Substrate specificity, polymerizing activity and spectrum of reaction products were under observation. As it turned out, these two proteins were biochemically highly similar. They had similar substrate specificity, kinetic and polymerizing properties.

Another purpose of this work was to prove experimentally that Asp46, Asp203 and Glu287 form the catalytic triad of Lsc2. Using site-directed mutagenesis we substituted these amino acids with alanines. As these substitutions drastically reduced catalytic activity of the enzyme, our earlier prediction was correct. Finally we tested how different substrate and acceptor molecules affect thermal stability of Lsc2 using a novel high-throughput Thermofluor method. We showed that tested by us fructosyl acceptors did not significantly increase thermostability of wild-type Lsc2. In case of catalytic triad mutants of Lsc2, presence of sucrose molecule significantly elevated thermostability of the protein. Stabilizing effects of raffinose and stachyose were lower. Thus, sucrose binds the active site more strongly than the other two substrates that coincides with the data of substrate specificity analysis of Lsc2.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Alamäe, T., Visnapuu, T., Mardo, K., Mäe, A., Zamfir, A. D. (2012). Levansucrases of *Pseudomonas* bacteria: novel approaches for protein expression, assay of enzymes, fructooligosaccharides and heterooligofructans, p. 176-191. In Rauter, A. P., Lindhorst, T. K. (ed.), Carbohydrate Chemistry, Specialist Periodical Reports, vol. 38. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Ammar, Y. B., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., Minamuiira, N. (2002). Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *J. Biotechnol.* 99: 111-119.
- Arrieta, J., Hernández, L., Coego, A., Suárez, V., Balmori, E., Menéndez, C., Petit-Glatron, M.-F., Chambert, R., Selman-Housein, G. (1996). Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiology* 142: 1077-1085.
- Banguela, A., Hernandez, L. (2006). Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotech. Appl.* 23: 202-210.
- Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Laukevics, J., Grube, M., Vigants, A., Linde, R. (2005). Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochem.* 40: 1535-1539.
- Bergeron, L. J., Burne, R. A. (2001). Roles of fructosyltransferase and levansucrase of *Actinomyces naeslundii* in fructan and sucrose metabolism. *Inf. Imm.* 69: 5395-5402.
- Biedendieck, R., Beine, R., Gamer, M., Jordan, E., Buchholz, K., Seibel, J., Dijkhuizen, L., Malten, M., Jahn, D. (2007). Export, purification, and activities of affinity tagged *Lactobacillus reuteri* levansucrase produced by *Bacillus megaterium*. *Appl. Microbiol. Biot.* 74: 1062-1073.
- Biedrzycka, E., Bieleca, M. (2004). Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci. Tech.* 15: 170-175.
- Bornet, F. R. J., Brouns, F., Tashiro, Y., Duvillier, V. (2002). Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digest. Liver Dis.* 34: 111-120.
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., Dodson, R. J. *et al.* (2003). The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10181-10186.
- Caputi, L., Cianci, M., Benini, S. (2013). Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of EaLsc, a levansucrase from *Erwinia amylovora*. *Acta Crystallogr. F* F69: 570-573.
- Chambert, R., Treboul, G., Dedonder, R. (1974). Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 41: 285-300.
- Crittenden, R. G., Playne, M. J. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci. Tech.* 7: 353-361.

- Curiel, J. A., Rivas, B. de Las, Mancheño, J. M., Muñoz, R. (2011). The pURI family of expression vectors: a versatile set of ligation independent cloning plasmids for producing recombinant His-fusion proteins. *Protein Expr. Purif.* 76: 44-53.
- DeLano, W. L. (2002). The PyMOL molecular graphics system. California, USA: DeLano Scientific, San Carlos.
- Dupeux, F., Röwer, M., Seroul, G., Blot, D., Márquez, J. A. (2011). A thermal stability assay can help to estimate the crystallization likelihood of biological samples. *Acta Cryst.* 67: 915-919.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792-1797.
- Elmi, T. (2011). *Pseudomonas syringae* DC3000 levaansukraasi Lsc3 katalüütalise tsentri aminohapete kindlakstegemine mutatsioonanalüüsiga. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- Ericsson, U. B., Hallberg, B. M., DeTitta, G. T., Dekker, N., Nordlund, P. (2006). Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal. Biochem.* 357: 289-298.
- Euzenat, O., Guibert, A., Combes, D. (1997). Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochem.* 32: 237-243.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, p. 571-607. *In* J. M. Walker (ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Geier, G., Geider, K. (1993). Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42: 387-404.
- Gromkova, M. (2013). *Pseudomonas syringae* DC3000 levaansukraasi Lsc3 transfruktosüülimisreaktsiooniks oluliste aminohapete kindlakstegemine mutatsioonanalüüsiga. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hendry, G. A. F., Wallace, R. K. (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans – acclimatological, biogeographical and mechanistic appraisal. *New Phytol.* 123:3-14.
- Hernandez, L., Arrieta, J., Menendez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M. F., Chambert, R. (1995). Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* 309: 113-118.
- Hernandez, L., Sotolongo, M., Rosabal, Y., Menendez, C., Ramirez, R., Caballero-Mellado, J., Arrieta, J. (2000). Structural levansucrase gene (*lsdA*) constitutes a functional locus conserved in the species *Glyconacetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.* 174: 120-124.
- Hettwer, U., Gross, M., Rudolph, K. (1995). Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J. Bacteriol.* 177: 2834-2839.

- Hettwer, U., Jaeckel, F. R., Boch, J., Meyer, M., Rudolph, K., Ullrich, M. S. (1998). Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. syringae* pv. *phaseolicola*. *Appl. Env. Microbiol.* 64: 3180-3187.
- van Hijum, S. A. F. T., Bonting, K., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2001). Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 323-328.
- van Hijum, S. A. F. T., Szalowska, E., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2004). Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol.* 150: 621-630.
- van Hijum, S. A. F. T., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., van Geel-Schutten, I. G. H. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Mol. Biol. Rev.* 70: 157-176.
- Homann, A., Biedendieck, R., Gotze, S., Jahn, D., Seibel, J. (2007). Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* 407: 189-198.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Ito, T., Fujita, K., Hara, K., Tonozuka, T., Sakano, Y. (2002). Cloning and expression of β -fructofuranosidase gene from *Arthrobacter* sp. K-1. *J. Appl. Glycosci.* 49: 291-296.
- Jang, K. H., Seo, J. W., Song, K. B., Kim, C. H., Rhee, S. K. (1999). Extracellular secretion of levansucrase from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. *Bioprocess Eng.* 21: 453-458.
- Kang, H. K., Seo, M. Y., Seo, E. S., Kim, D., Chung, S. Y., Kimura, A., Day, D. F., Robyt, J. F. (2005). Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1727: 5-15.
- Kang, S. A., Hong, K., Jang, K. H., Kim, Y. Y., Choue, R., Lim, Y. (2006). Altered mRNA expression of hepatic lipogenic enzyme and PPAR α in rats fed dietary levan from *Zymomonas mobilis*. *J. Nutr. Biochem.* 17: 419-426.
- Kaur, N., Gupta, A. K. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosci.* 27: 703-714.
- Kelly, G. (2008). Inulin-type prebiotics – a review: part 1. *Altern. Med. Rev.* 13: 315-329.
- Khandekar, S., Srivastava, A., Pletzer, D., Stahl, A., Ullrich, M. S. (2014). The conserved upstream region of *lscB/C* determines expression of different levansucrase genes in plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *BMC Microbiol.* 14: 79-90.
- Koczan, J. M., McGrath, M. J., Zhao, Y., Sundin, G. W. (2009). Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. *Phytopathol.* 99: 1237-1244.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., van Laere, A., Rabijns, A., van den Ende, W. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *J. Exp. Bot.* 60: 727-740.
- Li, H., Ullrich, M. S. (2001). Characterization and mutational analysis of three allelic *lsc* genes encoding levansucrase in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 183: 3282-3292.
- Li, H., Schenk, A., Srivastava, A., Zhurina, D., Ullrich, M. S. (2006). Thermo-responsive expression and differential secretion of the extracellular enzyme levansucrase in the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *FEMS Microbiol. Lett.* 265: 178-185.
- Li, S. Y., Chen, M., Li, G., Yan, Y. L., Yu, H. Y., Zhan, Y. H., Peng, Z. X., Wang, J., Lin, M. (2008). Amino acid substitutions of His296 alter the catalytic properties of *Zymomonas mobilis* 10232 levansucrase. *Acta Biochim. Pol.* 55: 201-206.
- Mardo, K. (2009). *Pseudomonas syringae* levaansukraasi mutangeniseerimine: mutantide selektsioon ja iseloomustamine. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- Mardo, K. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc3 struktuuri modelleerimine ja mutantide iseloomustamine. Magistritöö, Tartu Ülikool.
- Mardo, K., Visnapuu, T., Vija, H., Elmi, T., Alamäe, T. (2014a). Mutational analysis of conserved regions harboring catalytic triad residues of the levansucrase proteiin encoded by the *lsc-3* gene (*lsc3*) of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 61: 11-21.
- Mardo, K., Visnapuu, T., Gromkova, M., Aasamets, A., Viigand, K., Vija, H., Alamäe, T. (2014b, saadetud avaldamiseks). High-throughput assay of levansucrase variants in search of feasible catalysts for the synthesis of fructooligosaccharides and levan. *Molecules*.
- Martinez-Fleites, C., Ortiz-Lombardia, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E. J., Arrieta, J. G., Hernandez, L., Davies, G. J. (2005). Crystal structure of levansucrase from the Gramnegative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem. J.* 390: 19-27.
- Marx, S. P., Winkler, S., Hartmeier, W. (2000). Metabolization of β -(2,6)-linked fructoseoligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 182: 163-169.
- Mendoza, E., Gracia, M. L., Casas, C., Selgas, M. D. (2001). Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. *Meat Sci.* 57: 387-393.
- Meng, G., Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Struct. Biol.* 10: 935-941.
- Meng, G., Fütterer, K. (2008). Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct. Biol.* 8: 16-28.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.

- Nagem, R. A. P., Rojas, A. L., Golubev, A. M., Korneeva, O. S., Eneyskaya, E. V., Kulminskaya, A. A., Neustroev, K. N., Polikarpov, I. (2004). Crystal structure of exoinulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *J. Mol. Biol.* 344:471-80.
- Ohta, Y., Hatada, Y., Hidaka, Y., Shimane, Y., Usui, K., Ito, T., Fujita, K., Yokoi, G., Mori, M., Sato, S., Miyazaki, T., Nishikawa, A., Tonozuka, T. (2014). Enhancing thermostability and the structural characterization of *Micorbacterium saccharophilum* K-1 β -fructofuranosidase. *Appl. Microbiol. Biot.*, trükkimisel.
- Ozimek, L. K., Euverink, G. J. W., van der Maarel, M. E. C. and Dijkhuizen, L. (2005). Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes. *FEBS Lett.* 579: 1124-1128.
- Ozimek, L. K., Kralj, S., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology* 152: 1187-1196.
- Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B. A., Lane, P., Salemme, F. R. (2001). High-density miniaturized thermal shift assay as a general strategy for drug discovery. *J. Biomol. Screen.* 6: 429-440.
- Pontis, H. G. (1989). Fructans and cold stress, *J. Plant Physiol.* 134: 148-150.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *In Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, p. A8.40-4. *In* J. Argentine, N. Irwin *et al.* (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sangiliyandi, G., Ray, K. C., Gunasekaran, P. (1999). Elevated temperature and chemical modification selectively abolishes levan forming activity of levansucrase of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 21: 179-182.
- Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Buchholz, K., Na'ammieh, S., Pawlowski, A., Hecht, H. J. (2006). Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydr. Res.* 341: 2335-2349.
- Seo, J. S., Song, K.-B., Jang, K. J., Kim, C. H., Jung, B. H., Rhee, S. K. (2000). Molecular cloning of a gene encoding the thermoactive levansucrase from *Rahnella aquatilis* and its growth phase-dependent expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 81: 63-72.
- Slabinski, L., Jaroszewski, L., Rychlewski, L., Wilson, I. A., Lesley, S. A., Godzik, A. (2007). XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics*, 23: 3403-3405.
- Song, K. B., Rhee, S. K. (1994). Enzymatic synthesis of levan by *Zymomonas mobilis* levansucrase overexpressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 16: 1305-1310.

- Srivastava, A., Al-Karablieh, N., Khandekar, S., Sharmin, A., Weingart, H., Ullrich, M. S. (2012). Genomic distribution and divergence of levansucrase-coding genes in *Pseudomonas syringae*. *Genes* 3: 115-137.
- St. John, J. A., Bonnett, G. D., Simpson, R. J. (1996). A method for rapid quantification of sucrose and fructan oligosaccharides suitable for enzyme and physiological studies. *New Phytol.* 134: 197-203.
- Steinmetz, M., LeCoq, D., Djemia, H. B., Gay, P. (1983). Genetic analysis of sacB, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gen. Genet.* 191: 138-144.
- Stiengle, F., Newell, J. W., Neeser, J. R. (1999). Unraveling the function of glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J. Bacteriol.* 181: 6354-6360.
- Strube, C. P., Homann, A., Gamer, M., Jahn, D., Seibel, J., Heinz D. W. (2011). Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *J. Biol. Chem.* 286: 17593-17600.
- Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130.
- Tieking, M., Kühnl, W., Gänzle, M. G. (2005). Evidence for formation of heterooligosaccharides by *Lactobacillus sanfranciscensis* during growth in wheat sourdough. *J. Agric. Food. Chem.* 53: 2456-2461.
- Tiirik, K. (2010). Levaansukraasi katalüüsis osalevate aminohapete kindlakstegemine Asp219 ja Asp225 muteerimisega. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- Tonozuka, T., Tamaki, A., Yokoi, G., Miyazaki, T., Ichikawa, M., Nishikawa, A., Ohta, Y., Hidaka, Y., Katayama, K., Hatada, Y., Ito, T., Fujita, K. (2012). Crystal structure of a lactosucrose-producing enzyme, *Arthrobacter* sp. K-1 β -fructofuranosidase. *Enzyme Microb. Technol.* 51: 359-365.
- Trowell, H. (1976). Definition of dietary fiber and hypotheses that it is a protective factor in certain diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 29: 417-427.
- Vaher, M. (2013). Asp333, Phe381 ja Val385 olulisus *Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc3 katalüüsile. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- Verdonk, J. M. A. J., Shim, S. B., Van Leeuwen, P., Verstegen, M. W. A. (2005) Application of inulin type fructan in animal and pet food. *Br. J. Nutr.* 93:125-138.
- Vijn, I., Smeekens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.* 120: 351-60.
- Visnapuu, T. (2007). Levaansukraasi geenide ekspresseerimine *E. coli*'s ja valkude omaduste uurimine. Magistritöö, Tartu Ülikool.
- Visnapuu, T., Mäe, A., Alamäe, T. (2008). *Hansenula polymorpha* maltase gene promoter with sigma 70-like elements is feasible for *Escherichia coli*-based biotechnological applications: Expression of three genomic levansucrase genes of *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Process Biochem.* 43: 414-422.

Visnapuu, T., Zamfir, A. D., Mosoarca, C., Stanescu, M. D., Alamäe, T. (2009). Fully automated chip-based negative mode nanoelectrospray mass spectrometry of fructooligosaccharides produced by heterologously expressed levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23: 1337-1346

Visnapuu, T., Mardo, K., Mosoarca, C., Zamfir, A. D., Vigants, A., Alamäe, T. (2011). Levansucrases from *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *P. chlororaphis* subsp. aurantiaca: Substrate specificity, polymerizing properties and usage of different acceptors for fructosylation. *J. Biotechnol.* 155: 338-349.

Visnapuu, T. (2012). Levansucrases encoded in the genome of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: heterologous expression, biochemical characterization, mutational analysis and spectrum of polymerization products. Doktoritöö, Tartu Ülikool.

Wei, D., Li, M., Zhang, X., Xing, L. (2004). An improvement of the site-directed mutagenesis method by combination of megaprimer, one-side PCR and Dpn I treatment. *Anal. Biochem.* 331: 401-403.

Yanase, H., Maeda, M., Hagiwara, E., Yagi, H., Taniguchi, K., Okamoto, K. (2002). Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *J. Biochem.* 132: 565-572.

Yoo, S. H., Yoon, E. J., Cha, J., Lee, H. G. (2004). Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *Int. J. Biol. Macromol.* 34: 37-41.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://brenda-enzymes.info>

<http://expasy.org/>

<http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>

<http://www.acaclone.com>

<http://www.beneo.com>

<http://www.cazy.org>

<http://www.pdb.org>

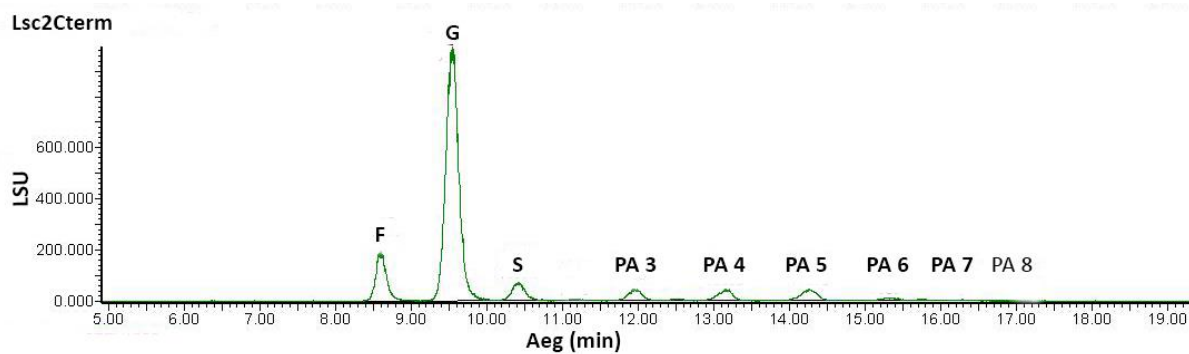
<http://www.sigmaaldrich.com>

<http://www.uniprot.org>

www.pseudomonas-syringae.org

LISA 2

Lsc2Cter valgu HPLC analüüsi kromatogramm. Joonisel on näha erinevate suhkrute piigid: fruktoos (F), glükoos (G), sahharoos (S) ja fruktooligosahhariidid erinevate polümerisatsiooni astmega (PA 3-8). Suhkrute väljumisaegade järgi määrati uuritavates proovides vastavad ained. Täpsem metoodika on kirjeldatud on peatükis 2.2.6. HPLC analüüsi viis läbi Heiki Vija (KBFI, Tallinn).



LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Kadri Mardo (29.03.92)

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

***Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasi Lsc2 iseloomustamine, inaktiivsete mutantide konstrueerimine ja võrdlus Lsc3 valguga,**

mille juhendajad on mille juhendajad on Tiina Alamäe ja Karin Mardo,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **02.06.2014** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
 3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014